

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 029**

51 Int. Cl.:

A61K 39/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2005 E 05858489 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1812056**

54 Título: **Composiciones inmunogénicas que contiene antígeno de antrax, micropartículas de polímero biodegradable, y adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido**

30 Prioridad:

15.11.2004 US 628049 P

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

13.12.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
(50.0%)
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608, US y
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, DHHS
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**O'HAGAN, DEREK T.;
SINGH, MANMOHAN y
KLINMAN, DENNIS M.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 434 029 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones inmunogénicas que contiene antígeno de ántrax, micropartículas de polímero biodegradable, y adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido.

5 Campo de la Invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas inmunogénicas, particularmente composiciones de vacunas.

10 Antecedentes

15 *Bacillus anthracis* es una bacteria Gram positiva aeróbica que forma esporas encontrada de manera natural en animales salvajes y domésticos. Hanna, P. 1998, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 225:13-35. Es altamente resistente a la degradación ambiental, y produce una toxina tripartita que reduce la habilidad del sistema inmune del huésped para eliminar el patógeno. *Id.* La exposición humana a ántrax típicamente surge tras el contacto con ganado infectado, y generalmente da como resultado una forma leve de enfermedad cutánea. Friedlander, A. M., y P. S. Brachman. 1998. Anthrax, p. 729-739. En S. A. Plotkin y E. A. Mortimer (ed.), Vaccines, W. B. Saunders, Filadelfia, PA. Quinn, C. P. y P. C. Turnbull. 98 A. D. Anthrax, p. 799-818. En M. Ballow y M. Sussman (ed.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Collier, Londres. Sin embargo, bioterroristas liberaron intencionadamente esporas de ántrax diseñadas para entrega de aerosol en los Estados Unidos en 2001. La resultante morbilidad, mortalidad y pánico extendido subrayaron el potencial del ántrax para usarse como un agente bioterrorista así como la necesidad de mejorar la velocidad, magnitud y seguridad de vacunación contra el ántrax. Lane, H. C., et al., Nat. Med. 7:1271-1273.

25 Como se ha señalado en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0082530, la patogenicidad de *B. anthracis* se expresa de dos maneras: un efecto tóxico que se hace evidente por la aparición de un edema, y un llamado efecto tóxico letal que puede llevar a la muerte en individuos infectados. Hay dos principales factores virulentos que *B. anthracis* posee, una cápsula poli-D-glutámico que inhibe fagocitosis y dos toxinas binarias que se forman a partir de combinaciones seleccionadas de tres factores de la proteína. Estas dos toxinas binarias poseen un componente celular común de enlace con el receptor que, cuando se combinan con cualquiera de los otros dos factores forma una toxina activa. El componente de enlace presente en ambas toxinas activas es no tóxico y está incluido en el enlace de las toxinas *B. anthracis* con membranas celulares en un huésped infectado. Los otros dos factores de la proteína constituyen los elementos activos responsables de la manifestación del efecto tóxico del tipo edema o del efecto tóxico con carácter letal. Estos dos factores activos se llaman factor edematogénico (FE) y factor letal (FL). El factor no tóxico responsable del enlace con membranas celulares se llama antígeno protector (AP) ya que, durante los ensayos de inmunización, la capacidad para conferir protección activa contra la enfermedad se atribuyó inicialmente este factor. Los tres factores, AP, FL y FE se han aislado y purificado como lo presenta Fish et al. (1968) J. Bacteriol. 95:907-917, y las dos toxinas obtenidas por la combinación de AP y FL y de AP y FE, se han caracterizado y descrito por Leppla et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3162-3166. Los genes de *B. anthracis* pag, cya y lef que codifican los factores AP, FE y FL, respectivamente, se distribuyen sobre un plásmido llamado "pX01" de *B. anthracis*, como lo describe Mikesell et al (1983) Infect. Immun. 39:371-376. Además, los genes pag, cya y lef se han clonado y secuenciado completamente como lo describe Welkos et al. (1988) Gene 69:287-300; Escuyer et al. (1988) Gene 71:293-298; y Bragg et al. (1989) Gene 81:45-54.

45 La Vacuna Adsorbida contra el Ántrax (AVA) es la única vacuna para ántrax autorizada para uso humano en los Estados Unidos de América. Se prepara adsorbiendo el filtrado de cultivo de una capa toxigenica no encapsulada de *B. anthracis* (V770-NP1-R) en hidróxido de aluminio. Ivis, B. E., y S. L. Welkos. 1988. Eur. J. Epidemiol. 4:12-19. Estudios muestran que el antígeno protector (AP), el núcleo de toxina ántrax, es el principal inmunógeno de AVA. Los anticuerpos (Ab) contra AP neutralizan la toxina, inhiben la germinación de esporas, y mejoran la fagocitosis/eliminación de esporas por macrófagos. Ivins, B. E., et al., 1992. Infect. Immun. 60:662-668. Little, S. F. y B. E. Ivins. 1999. Microbes. Infect. 1:131-139. Welkos, S., et al. 2001. Microbiology 147:1677-1685. Welkos, S. L. y A. M. Friedlander. 1988. Microb. Pathog. 5:127-139. La vacunación con AVA requiere una serie de 6 inmunizaciones entregadas durante 18 meses seguidas de revacunaciones anuales. Pittman, P. R., et al. 2001. Vaccine 20:972-978. Pittman, P. R. et al. 2002. Vaccine 20:1412-1420. Este programa se ha unido con el desarrollo de efectos secundarios adversos que incluyen dolor de articulaciones, trastornos gastrointestinales, y neumonía, llevando a muchos soldados norteamericanos a rechazar la vacunación. Geier, D. A., y M. R. Geier. 2002. Clin. Exp. Rheumatol. 20:217-220. Ready, T. 2004. Nat. Med. 10:112. Se esperan estrategias que reduzcan la dosis y número de inmunizaciones de AVA requeridas para conseguir protección para mejorar su cumplimiento.

60 Resumen de la Invención

La invención se describe en las reivindicaciones adjuntas.

65 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporcionan kits y composiciones inmunogénicas que comprenden: (a) una primera composición que comprende un antígeno derivado de *Bacillus anthracis*; (b) una

segunda composición que comprende micropartículas de polímero biodegradable y (c) una tercera composición que comprende un adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido, donde la segunda y tercera composición son las mismas composiciones, como se define en la reivindicación 20.

5 También se desvela una composición inmunogénica, que comprende: un antígeno derivado de *Bacillus anthracis*, micropartículas de polímero biodegradable y un adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido. También, se desvela un kit inmunogénico que comprende: una composición que comprende un antígeno derivado de *Bacillus anthracis*; otra composición separada que comprende micropartículas de polímero biodegradable; y otra
10 composición separada que comprende un adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido. Un kit inmunogénico de la invención comprende: una composición que comprende un antígeno derivado de *Bacillus anthracis*; y otra composición separada que comprende micropartículas de polímero biodegradable y un adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido.

15 Las micropartículas de polímero para su uso en conjunto con la presente invención comprenden un polímero biodegradable, por ejemplo, un polímero seleccionado de un poli(ácido α -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, un policianoacrilato, o una mezcla de los mismos, entre otros. Las micropartículas pueden prepararse por medio de una variedad de técnicas, varias de las cuales se describen más abajo. En varias realizaciones, las micropartículas se forman a partir de un poli(ácido α -hidroxi), tal como poli(láctido) ("PLA"), un copolímero de láctido y glicólido, por ejemplo, poli(D,L-láctido-co-glicólido) ("PLG"), o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona. Los polímeros poli(D,L-láctido-co-glicólido) incluyen aquellos que tienen un proporción molar láctido:glicólido que oscila, por ejemplo, entre 20:80 y 80:20, entre 25:75 y 75:25, entre 40:60 y 60:40, o entre 55:45 y 45:55, entre otras, y que tienen un peso molecular que oscila, por ejemplo, entre 5.000 y 200.000 Daltons, entre 10.000 y 100.000 Daltons, entre 20.000 y 70.000 Daltons, o entre 40.000 y 50.000 Daltons, entre otros.

25 Los antígenos para su uso en conjunto con la presente invención pueden derivarse de una variedad de cepas de *Bacillus anthracis*, incluyendo la cepa V770-NP1-R, e incluyen organismos eliminados, atenuados o inactivados así como antígenos de subunidades. Los antígenos incluyen especies que contienen polipéptido, tales como proteínas y oligopéptidos, especies que contienen polisacárido, y especies que contienen polinucleótido que expresan una proteína o polipéptido inmunogénico.

30 Los adyuvantes inmunológicos que contienen polinucleótido para su uso en conjunto con las composiciones o kits de la presente invención incluyen adyuvantes inmunológicos que contienen ADN o ARN, tales como oligodoxinucleótidos y ARN de doble hebra, entre otros.

35 Las composiciones y kits de la presente invención también incluyen opcionalmente adyuvantes inmunológicos complementarios además de micropartículas de polímero y adyuvantes inmunológicos que contienen polinucleótidos, cuyos ejemplos incluyen, entre otros (a) sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc., (c) toxinas termolábiles de *E. coli*, (c) compuestos de fosfato polisacárido (por ejemplo, monofosforilípido A y sus derivados) e imitadores de fosfato lipopolisacárido, y (d) emulsiones de submicrón que comprenden un aceite metabolizable, tal como escualeno, y un agente emulsionante, tal como uno o más derivados de sorbitán (por ejemplo, MF59).

45 Más realizaciones de la divulgación se dirigen a métodos de entrega de antígenos de *Bacillus anthracis* a un animal huésped, que comprende la administración al animal huésped de cualquiera de las composiciones y componentes de kit inmunogénicos descritos en el presente documento. El animal huésped es preferentemente un animal vertebrado, más preferentemente un mamífero, e incluso más preferentemente un humano.

50 La presente invención también se dirige a composiciones para su uso en métodos de estimulación de una respuesta inmune en un animal huésped, que comprende la administración al animal de cualquiera de las composiciones inmunogénicas y componentes de kit descritos en el presente documento en una cantidad efectiva para inducir la respuesta inmune.

55 La presente invención se dirige además a composiciones para su uso en métodos de inmunización de un animal huésped contra *Bacillus anthracis* que comprende la administración al animal de cualquiera de las composiciones inmunogénicas y componentes de kit descritos en el presente documento en una cantidad efectiva para inducir una respuesta protectora.

60 La entrega de las composiciones inmunogénicas y componentes del kit de la invención puede realizarse mediante cualquier método conocido farmacéuticamente efectivo, incluyendo inyección directa (por ejemplo, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente), entrega por la mucosa, entre otros.

Muchos de los aspectos anteriores y otros de la presente invención se enumeran en los siguientes párrafos:

- Aspecto 1. Una composición inmunogénica que comprende: (a) un antígeno derivado de *Bacillus anthracis*; (b) micropartículas de polímero que comprenden un polímero biodegradable; y (c) un adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido, como se define en las reivindicaciones.
- 5 Aspecto 2. La composición inmunogénica del Aspecto 1, donde el antígeno se deriva de cepa V770-NP1-R de *Bacillus anthracis*.
- Aspecto 3. La composición inmunogénica del Aspecto 1, donde el antígeno comprende *Bacillus anthracis* eliminado o atenuado.
- Aspecto 4. La composición inmunogénica del Aspecto 1, donde el antígeno comprende un *Bacillus anthracis* atenuado toxigenico no encapsulado.
- 10 Aspecto 5. La composición inmunogénica del Aspecto 1, donde el antígeno comprende una construcción de vector que codifica un antígeno que contiene polipéptido.
- Aspecto 6. La composición inmunogénica del Aspecto 1, donde el antígeno comprende *Bacillus anthracis* atenuado toxigenico no encapsulado, y al menos una porción del mismo se adsorbe en hidróxido de aluminio.
- 15 Aspecto 7. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-6, donde la composición inmunogénica comprende además un surfactante.
- Aspecto 8. La composición inmunogénica del Aspecto 7, donde el surfactante comprende un surfactante catiónico.
- Aspecto 9. La composición inmunogénica del Aspecto 7, donde el surfactante comprende un surfactante aniónico.
- Aspecto 10. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-9, donde las micropartículas tienen un diámetro medio de entre 500 nanómetros y 20 micrones.
- 20 Aspecto 11. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-10, donde el polímero biodegradable se selecciona de un poli(ácido α -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, un policianoacrilato.
- Aspecto 12. La composición inmunogénica del Aspecto 11, donde el polímero biodegradable es un poli(ácido α -hidroxi).
- 25 Aspecto 13. La composición inmunogénica del Aspecto 12, donde el polímero biodegradable es un poli(láctido-co-glicólido).
- Aspecto 14. La composición inmunogénica del Aspecto 13, donde el polímero biodegradable es un poli(láctido-co-glicólido) que tiene una proporción molar láctido:glicólido que oscila entre 40:60 y 60:40.
- 30 Aspecto 15. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-14, donde el adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido comprende un adyuvante inmunológico de oligonucleótido.
- Aspecto 16. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-14, donde el adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido comprende un adyuvante inmunológico de oligodeoxinucleótido.
- Aspecto 17. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-14, donde el adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido comprende un oligodeoxinucleótido CpG.
- 35 Aspecto 18. La composición inmunológica de cualquiera de los Aspectos 1-5 y 7-17, que además comprende un adyuvante inmunológico complementario.
- Aspecto 19. La composición inmunogénica del Aspecto 18, donde el adyuvante inmunológico complementario es una sal de aluminio.
- 40 Aspecto 20. La composición inmunogénica del Aspecto 18, donde el adyuvante inmunológico complementario se selecciona de (a) toxinas termolábiles de *E. coli*, (b) compuestos de fosfato polisacárido, y (c) emulsiones de submicrón que comprenden escualeno, y un agente emulsionante.
- Aspecto 21. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-20, donde la composición inmunogénica es una composición inyectable.
- 45 Aspecto 22. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-21 para su uso en un método de inmunización de un animal vertebrado huésped contra infección por *Bacillus anthracis* que comprende la administración al animal de dicha composición.

Aspecto 23. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 1-21 para su uso en un método de estimulación de una respuesta inmune en un animal vertebrado huésped, que comprende la administración a dicho animal huésped de dicha composición inmunogénica.

5 Aspecto 24. La composición inmunogénica de cualquiera de los Aspectos 22-23, donde el animal vertebrado huésped es humano.

Aspecto 25. Un kit inmunogénico que comprende: (a) una primera composición que comprende un antígeno derivado de *Bacillus anthracis*; (b) una segunda composición que comprende micropartículas de polímero biodegradable y (c) una tercera composición que comprende un adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido donde la segunda y tercera composición son iguales y la tercera composición es diferente como se define en la reivindicación 20.

10 También se desvela un método de inmunización de un animal vertebrado huésped contra infección por *Bacillus anthracis* administrando al animal las composiciones del kit del Aspecto 25 y un método de estimulación de una respuesta inmune en un animal vertebrado huésped, que comprende la administración al animal de la composición del kit del Aspecto 25; donde, opcionalmente, el animal vertebrado huésped es humano.

15 Una ventaja de la presente invención es que las repuestas inmunes a *Bacillus anthracis* en sujetos vertebrados pueden estimularse y acelerarse.

Otra ventaja de la presente invención es que la inmunidad protectora contra *Bacillus anthracis* puede generarse rápidamente en sujetos vertebrados.

20 Los anteriores y otros varios aspectos, realizaciones y ventajas de la presente invención serán fácilmente aparentes para aquellos expertos en la técnica en vista de la divulgación en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas.

25 Breve Descripción de las Figuras

FIG. 1. Títulos IgG anti-PA Ab en ratones vacunados con AVA. Los ratones machos A/J se inmunizaron i.p con 200 μ l de AVA (F) \pm 20 μ g de CpG ODN libre (\square) o adsorbido por PLG (O). Los datos representan la media geométrica \forall de título SE suero IgG anti-PA de 10 ratones/grupo independientemente estudiados. ** P < 0,01, *** P < 0,001, ns = no significativo, determinado por ANOVA de dos sentidos. (A) Títulos IgG, contra semanas post-inmunización, (B) títulos IgG1 anti-PA contra semanas post-inmunización, (C) títulos IgG2a anti-PA contra semanas post-inmunización, (D) títulos TNA contra semanas post-inmunización.

35 FIG. 2. Respuesta de IgG anti-PA Ab en ratones A/J siguiendo dosis baja de inmunización AVA (8-25 μ l) (i. p.). No hubo diferencias significativas en títulos IgG anti-PA en estas dosis de vacunación, permitiendo que los datos de todos los ratones se pudieran combinar. Los resultados representan la media geométrica \forall de respuesta SE IgG anti-PA 14 días después de la inmunización (n = 11-29 ratones/grupo independientemente estudiados). ** P < 0,01, *** P < 0,001, determinado por ANOVA de dos sentidos.

40 FIG. 3. Supervivencia de ratones vacunados. Los ratones A/J se inmunizaron i.p. con \leq 8 μ l de AVA más 20 μ g de ODN libre o adsorbido por PLG. Los ratones se desafiaron i.p 7 días más tarde con $3 \times 10^{2-3}$ LD₅₀ de esporas STI. La supervivencia de los grupos de control (incluyendo ratones sin contacto con el virus y ratones vacunados con AV) fue distinguible entre experimentos. De este modo, los datos de múltiples experimentos se combinaron para producir un n = 11-36 ratones/grupo.

45 FIG. 4. Correlación entre respuesta de suero Ab y supervivencia. Los ratones se inmunizaron i.p. con 8 - 25 μ l de AVA más 20 μ g de CpG ODN libre o adsorbido por PLG. Dos semanas después de la inmunización, se determinaron títulos de suero IgG anti-PA y TNA, y los ratones se desafiaron i. p con 9×10^3 LD₅₀ de esporas STI. Se muestran los resultados de 4 experimentos independientes que incluyen un total de 130 ratones. (A) Regresión lineal de títulos IgG anti-PA contra TNA en ratones que sucumbieron a (Q) o sobrevivieron (\square) a la infección. (B) Regresión logística de supervivencia contra título IgG anti-PA. (C) Regresión logística de supervivencia contra título TNA.

50 Descripción Detallada de la Invención

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

Como se usa en esta especificación y en cualquiera de las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contenido claramente dicte lo contrario. De este modo, por ejemplo, el término “micropartícula” se refiere a una o más micropartículas, y similar.

A menos que el contexto indique lo contrario, todos los porcentajes y proporciones en el presente documento se dan sobre una base de peso.

A. Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica más abajo.

El término “micropartícula” como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 15 µm en diámetro, más típicamente de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30 µm en diámetro, e incluso más típicamente de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10-20 µm en diámetro. Las micropartículas de la presente invención pueden agregarse a masas más grandes bajo algunas circunstancias. La micropartícula tendrá generalmente un diámetro que permita la administración parental o por mucosa sin bloquear agujas y capilares. El tamaño de micropartícula se determina fácilmente mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como espectroscopia de correlación de fotones, difracción láser y/o microscopio electrónico de barrido. El término “partícula” también puede usarse para indicar una micropartícula como se define en el presente documento.

Las micropartículas de polímero para su uso en el presente documento se forman típicamente de materiales que son esterilizables, sustancialmente no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen poli(α-ácidos hidroxilados), ácidos polihidroxibutíricos, policaprolactonas, poliortoésteres, polianhidridos, y policianoacrilatos (por ejemplo, polialquilcianoacrilato o “PACA”). Más típicamente, las micropartículas para su uso con la presente invención son micropartículas de polímero derivadas de poli(α-ácidos hidroxilados), tales como poli(D,L-láctido-co-glicólido) (“PLG”) o un copolímero de D,L-láctido y coprolactona. Las micropartículas de polímero pueden derivarse de cualquiera de los varios materiales poliméricos iniciales que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una variedad de proporciones de monómero (por ejemplo, láctido:glicólido), cuya selección será en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de las especies co-administradas. Estos parámetros se analizan con más detalle más abajo.

El término “surfactante” como se usa en el presente documento incluye detergentes, agentes dispersadores, agentes suspensores, y estabilizantes de emulsión. Los surfactantes catiónicos incluyen, aunque no se limitan a, bromuro de cetiltrimetilamonio o “CTAB” (por ejemplo, cetrimida), cloruro de benzalconio, DDA (bromuro de dimetildioctodecil amonio), DOTAP (dioleoil-3-trimetilamonio-propano), quitosano y similares. Los surfactantes aniónicos incluyen, aunque no se limita a, SDS (dodecil sulfato de sodio), SLS (lauril sulfato de sodio), DSS (disulfosuccinato), alcoholes grasos sulfatados, y similares. Los surfactantes no iónicos incluyen, aunque no se limitan a, PVA, povidona (también conocido como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitán, polisorbatos, monoésteres de glicol polioxietilados, fenoles de alquil polioxietilados, poloxámeros, y similares.

El término “emulsión de submicrón” como se usa en el presente documento se refiere a una emulsión de aceite en agua que comprende gotas de aceite, todas sustancialmente en un rango de tamaño de hasta 1000 nm, por ejemplo, de 10 nm a 1000 nm.

El término “preparado farmacológico” se refiere a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, agentes antivirales, factores del crecimiento, hormonas, antígenos y similares.

El término “adyuvante” se refiere a cualquier sustancia que ayude o modifique la acción de un preparado farmacológico. Los adyuvantes incluyen, aunque no se limitan a, adyuvantes inmunológicos que llevan a uno o más de los siguientes efectos, entre otros: una mayor respuesta inmune, una respuesta inmune más diversificada, una respuesta inmune acelerada, una respuesta inmune más persistente/prolongada, y etcétera.

Un “polinucleótido” es un polímero de ácido nucleico sintético o natural. Un polinucleótido puede incluir tan poco como dos nucleótidos. Un “oligonucleótido” es un polinucleótido de peso molecular relativamente bajo, que típicamente contiene de 2 a 500 nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen secuencias de doble y única hebra y se refieren a, aunque no se limitan a, ADN genómico, mARN, cADN de mARN, ARN de doble hebra (dsARN) y oligonucleótidos CpG, entre otros. El término también captura secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base de ADN y ARN. El término incluye además modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras), por una secuencia nativa, por ejemplo, donde la molécula de ácido nucleico codifica una proteína de antígeno. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de huéspedes que producen antígenos.

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

5 Al decir que una especie es una “especie que contienen polinucleótido” se quiere decir que la especie es una molécula, siendo al menos una parte de ella un polinucleótido.

10 Como se usa en el presente documento, las expresiones “oligonucleótido que comprende al menos una unidad CpG” y “oligonucleótido de CpG” se refieren a un polinucleótido que comprende al menos un dinucleótido CpG. Los oligonucleótidos que comprenden una unidad CpG pueden comprender múltiples unidades CpG. Como se usa en el presente documento, la expresión “unidad CpG” se refiere a una parte o partes de dinucleótido de un oligonucleótido, que comprenden un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanosina. Los análogos de citosina y guanosina, tales como 5-metilcitosina, también pueden usarse en lugar de guanosina o citosina. Los oligonucleótidos de CpG pueden variar en gran medida en tamaño oscilando, por ejemplo, entre 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500 nucleótidos.

15 Un “monosacárido” es un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que además comprende un grupo aldehído (en cuyo caso el monosacárido es una aldosa) o un grupo ceto (en cuyo caso el monosacárido es una cetosa). Los monosacáridos típicamente contienen de 3-10 carbonos. Además, los monosacáridos tienen comúnmente la fórmula empírica $(CH_2O)_n$ donde n es un número entero de tres o mayor, típicamente 3-10. Ejemplos de aldosas de 3-6 carbonos incluyen gliceraldehído, eritosa, treosa, ribosa, 2-deoxiribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, lactadosa, y talosa. Ejemplos de cetosas de 3-6 carbonos incluyen dihidroxiacetona, eritrolosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, y tagatosa. Los monosacáridos que ocurren de manera natural se encuentran normalmente en forma de D-isómero, en oposición a la forma L. Un “oligosacárido” se refiere a un polímero de monosacárido relativamente corto, es decir, uno que contiene de 2 a 30 unidades de monosacárido. Un “polisacárido” es un polímero de monosacárido que está más allá de la longitud del monosacárido (es decir, uno que contiene más de 30 unidades de monosacárido). Además, como se usa en el presente documento, el término “polisacárido” también se refiere a un polímero de monosacárido que contiene dos o más monosacáridos unidos. Para evitar cualquier ambigüedad, la segunda definición se aplicará en todo momento, a menos que haya indicaciones explícitas de lo contrario. Los monosacáridos se unen típicamente mediante uniones glicosídicas. La definición abarca tanto los polisacáridos de longitud completa, que ocurren de manera natural como los fragmentos de los mismos. Los términos también incluyen modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones por las secuencias nativas de polisacárido.

20 Como se usa en el presente documento el término “sacárido” abarca monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Una “especie que contiene sacárido” es una molécula, siendo al menos una parte de la misma un sacárido. Ejemplos incluyen antígenos de sacárido, antígenos que comprenden sacáridos conjugados con péptidos transportadores, y etcétera.

25 Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a polímeros de residuos de aminoácido y no se limitan a una longitud mínima del producto. De este modo, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares se incluyen en la definición. La definición abarca tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en naturaleza), por una secuencia nativa, por ejemplo, de tal manera que la proteína mantenga la habilidad para obtener una respuesta inmunológica o tenga un efecto terapéutico sobre el sujeto al que se administra la proteína.

30 Una “especie que contiene polipéptido” es una molécula, siendo al menos una parte de la misma un polipéptido. Los ejemplos incluyen polipéptidos, proteínas tales como glicoproteínas, antígenos de sacárido conjugados con proteínas transportadoras, y etcétera.

35 Por “antígeno” se entiende una molécula que contiene uno o más epítopos capaces de estimular el sistema inmune de un huésped para hacer una respuesta inmune específica de antígeno celular cuando el antígeno está presente, o una respuesta de anticuerpo humoral. Un antígeno puede ser capaz de obtener una respuesta celular y/o humoral por sí mismo o cuando está presente en combinación con otra molécula.

40 Un “epítipo” es esa porción de una molécula antigénica o complejo antigénico que determina su especificidad inmunológica. Un epítipo está dentro del alcance de la presente definición de antígeno. Comúnmente, un epítipo es un polipéptido o polisacárido en un antígeno que ocurre de manera natural. En antígenos artificiales, puede ser una sustancia de bajo peso molecular tal como un derivado de ácido arsánico. Un epítipo reaccionará específicamente *in vivo* o *in vitro* con, por ejemplo, anticuerpos homólogos e linfocitos T. Descriptores alternativos son determinante antigénico, agrupamiento estructural antigénico y agrupamiento hapténico.

45 Un epítipo de polipéptido puede incluir, por ejemplo, entre aproximadamente 5-15 aminoácidos. Los epítopos de un antígeno dado pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, en Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden

determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de la proteína, y reaccionando los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos están aún unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos N° 4.708.871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. Similarmente, los epítopes conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tales como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*.

Donde se usa un sacárido o antígeno de carbohidrato, puede conjugarse con una proteína transportadora con el fin de mejorar la inmunogenicidad como es conocido en la técnica de las vacunas. Las proteínas transportadoras preferentes son toxinas bacterianas o toxoides, tales como toxoides de difteria y tétanos. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen proteína de membrana externa de *N. meningitidis* (Solicitud de Patente Europea 0372501), péptidos sintéticos (Solicitud de patente europea 037881; solicitud de patente europea 0427347), proteínas de choque térmico (Solicitud de patente internacional WO98/58668; solicitud de patente europea 0471177), proteína D de *H. Influenzae* (Solicitud de patente internacional WO00/56360), toxina A o B de *C. difficile* (Solicitud de patente internacional WO00/61761), y etcétera. Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier enlazador, donde sea necesario. Los antígenos tóxicos de proteína pueden desintoxicarse donde sea necesario (por ejemplo, desintoxicación de toxina de pertussis mediante medios químicos (Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238).

El término “antígeno” como se usa en el presente documento indica antígenos de subunidades, es decir, antígenos que están separados o diferenciados de un organismo entero con el que el antígeno se asocia por naturaleza, así como organismos eliminados, atenuados o inactivados. Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotipo, o fragmentos de los mismos, y mimotopos de péptido sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también se capturan bajo la definición de antígeno como se usa en el presente documento.

Similarmente, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa una proteína inmunogénica, o determinante antigénico *in vivo*, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, también se incluye en la definición de antígeno en el presente documento.

Además, para fines de la presente invención, un “antígeno” se refiere a una proteína, que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en naturaleza) por la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína mantenga la habilidad para obtener una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de huéspedes 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 moléculas presente en la composición de interés. Para fines de la presente invención, una “respuesta inmune humoral” se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una “respuesta inmune celular” es la mediada por linfocitos T y/o otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular incluye una respuesta específica de antígeno por células T citolíticas (“CTLs”). CTLs tienen especificidad para antígenos de péptidos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y se expresan sobre superficies de células. CTLs ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de inmunidad celular incluye una respuesta específica de antígeno por las células T ayudantes. Las células T ayudantes actúan para ayudar a estimular la función, y concentran la actividad de células efectoras no específicas contra células que muestran antígenos de péptido en asociación con moléculas de CMH sobre su superficie. Una “respuesta inmune celular” también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras moléculas producidas por células T activadas y/o otros glóbulos blancos, incluyendo aquellas derivadas de células T CD4+ y CD8+. Una composición tal como una composición inmunogénica o vacuna que obtiene una respuesta inmune celular puede servir para sensibilizar un sujeto vertebrado mediante la presentación de antígeno en asociación con moléculas de CMH en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por la célula se dirige a, o cerca de, células que presentan antígeno en su superficie. Además, pueden generarse linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un huésped inmunizado. La habilidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por la célula puede determinarse mediante un número de ensayos, tal como ensayos linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos celulares citotóxicos CTL, evaluando linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante medición de producción de citoquinas por células T en respuesta a la estimulación con antígeno. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376. El antígeno de interés puede también obtener una respuesta inmune mediada por anticuerpo. Por ello, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por células B; y/o la activación de células T supresoras y/o células T $\gamma\delta$ dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar infectividad, y/o mediar complemento de anticuerpo, o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) para proporciona protección a un huésped inmunizado. Tales respuestas pueden determinarse usando inmunoensayos estándares y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayos y ELISAs.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención muestran “inmunogenicidad mejorada” cuando poseen una mayor capacidad para obtener una respuesta inmune que la respuesta inmune obtenida por una cantidad equivalente del antígeno en una composición diferenciada. De este modo, una composición puede mostrar “inmunogenicidad mejorada” por ejemplo, porque la composición genera una respuesta inmune más fuerte, o porque es necesario una dosis más baja de antígeno para conseguir una respuesta inmune en el sujeto al que se administra, o porque la composición provoca una respuesta inmune más persistente/prolongada, porque la composición provoca más rápidamente una respuesta inmune, y etcétera. Tal inmunogenicidad mejorada puede determinarse, por ejemplo, administrando las composiciones de la invención, y controles de antígeno, a animales y comparando los resultados del ensayo de los dos.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, “tratar” o “tratado/a”) se refiere a cualquiera de (i) la prevención de infección por un patógeno o la prevención de un trastorno, (ii) la reducción o eliminación de síntomas asociados con un patógeno o trastorno, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. El tratamiento puede efectuarse profilácticamente (antes de la llegada del patógeno o trastorno en cuestión) o terapéuticamente (después de la llegada del mismo).

Los términos “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” de una composición inmunogénica de la presente invención se refieren en el presente documento a una cantidad suficiente de la composición inmunogénica para tratar una condición de interés. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo, por ejemplo, de la especie, edad, y condición general del sujeto; la severidad de la condición a ser tratada; el antígeno particular de interés; en el caso de una respuesta inmunológica, la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos, por ejemplo, y el grado de protección deseado; y el modo de administración, entre otros factores. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad “efectiva” apropiada en cualquier caso individual. De este modo, una “cantidad terapéuticamente efectiva” corresponderá típicamente en un rango relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios.

Por “sujeto vertebrado” o “animal vertebrado” se entiende cualquier miembro de los cordados subfilos, incluyendo, aunque sin limitación, mamíferos tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras, caballos y humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de juego tales como gallos y gallinas incluyendo pollos, pavos y otras aves gallináceas. El término no denota una edad particular. De este modo, tanto animales adultos como recién nacidos están cubiertos.

Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se entiende un material que no es biológicamente indeseable de otra manera, es decir, el material que puede administrarse a un individuo sin causar ningún efecto biológico excesivamente indeseable o sin interactuar de una manera excesivamente nociva con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

El término “excipiente” se refiere esencialmente a cualquier sustancia accesorio que puede estar presente en la forma finalizada de dosis. Por ejemplo, el término “excipiente” incluye vehículos, aglutinante, desintegrantes, rellenos (diluyentes), lubricantes, glidantes (potenciadores de flujo), ayudantes de compresión, colores, endulzantes, conservantes, agentes suspensores/dispersantes, formadores de película/baños, saborizantes y tintas de impresión.

Por “pH fisiológico” o “pH en el rango fisiológico” se entiende un pH en el rango de aproximadamente 7,2 a 8,0 incluidos, más típicamente en el rango de aproximadamente 7,2 a 7,6 incluidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “construcción de vector” generalmente se refiere a cualquier construcción que sea capaz de dirigir la expresión de una secuencia o secuencias o gen o genes de ácido nucleico de interés. Una construcción de vector típicamente incluye elemento(s) promotor(es)/potenciador(es), elemento(s) que define(n) el lugar, y otro(s) elemento(s) que controle(n) la expresión de gen a través de otros medios tales como unión alternativa, exportación de ARN nuclear, modificación post-traslacional de mensajero, o modificación post-traslacional de proteína. Además, la construcción de vector típicamente incluye una secuencia que, cuando se transcribe, está operablemente unida a la secuencia o secuencias o gen o genes de interés y actúa como una secuencia de iniciación de traslación. La construcción de vector también puede opcionalmente incluir una señal que dirija la poliadenilación, un marcador detectable, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de traslación. Además, si la construcción del vector se coloca en un retrovirus, la construcción del vector puede incluir una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (RTL), y sitios de enlace de cebador Gram negativo apropiados para el retrovirus usado (si estos no están ya presentes).

Una “construcción de vector de ADN” se refiere a una molécula de ADN que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o secuencias o gen o genes de ácido nucleico de interés. Un tipo específico de construcción de vector de ADN es un plásmido, que es una molécula de ADN circular episomal capaz de réplica autónoma dentro de una célula huésped. Típicamente, un plásmido es un bucle de ADN de doble hebra circular al que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. pCMV es un plásmido específico que es bien conocido en la técnica. Un vector pCMV preferente es uno que contenga el potenciador/promotor inmediato-temprano de CMV y un terminador de hormona del crecimiento bovino. Se describe en detalle en Chapman, B. S., et al. 1991. “Efecto de intrón A de gen

inmediato temprano de citomegalovirus humano (Towne) en expresión heteróloga en células". Nucleic Acids Res. 19:3979-86.

5 Se conocen otras construcciones de vector de ADN, que se basan en virus de ARN. Estas construcciones de vector de ADN típicamente comprenden un promotor que funciona en una célula eucariótica, 5' de una secuencia de cADN para la que el producto de transcripción es una construcción de vector de ARN (por ejemplo, un replicón de vector de ARN alfavirus), y una región de terminación 3'. La construcción del vector de ARN comprende preferentemente un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de fiebre amarilla, o alfavirus (por ejemplo, virus de Sindbis, virus del bosque de Semliki, virus de la encefalitis equina
10 venezolana, o virus del río Ross), que se han modificado mediante la sustitución de uno o más genes estructurales de proteína por una secuencia heteróloga seleccionada de ácido nucleico que codifica un producto de interés. Las construcciones de vector de ARN pueden obtenerse mediante transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN. Los ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en virus de Sindbis (pSIN), tal como pSINCP, descrito, por ejemplo, en Patentes de Estados Unidos 5.814.482 y 6.015.686, así como en las Solicitudes de Patente Internacional WO 97/38087, WO 99/18226 y de propiedad común WO 02/26209. La construcción de tales vectores, en general, se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.814.482 y 6.015.686.

Otros ejemplos de construcciones de vector incluyen construcciones de vector de ARN (por ejemplo, construcciones de vector de alfavirus) y similares. Como se usa en el presente documento, "construcción de vector de ARN", "replicón de vector de ARN" y "replicón" se refieren a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o auto-replica *in vivo*, típicamente dentro de una célula diana. La construcción de vector de ARN se usa directamente, sin el requisito de introducir ADN en una célula y transportar al núcleo donde ocurriría la transcripción. Al usar el vector de ARN para una entrega directa en el citoplasma de la célula huésped, la réplica autónoma y la traslación de la secuencia heteróloga de ácido nucleico ocurren de manera eficiente.

25 B. Métodos Generales

1. Micropartículas

30 Los polímeros útiles para formar micropartículas para composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento incluyen homopolímeros, copolímeros y mezclas de polímeros derivadas de los siguientes: ácido polihidroxitúterico (también conocido como polihidroxitúterato), ácido polihidroxitálico (también conocido como polihidroxitálico); ácido poliglicólico (PGA) (también conocido como poliglicólido); ácido poliláctico (PLA) (también conocido como poliláctido); polidioxanona; policaprolactona; poliortoéster; y polianhídrido. Más típicos son poli(ácido α -hidroxi), tal como poli(láctido) ("PLA"), un copolímero de láctido y glicólido, por ejemplo, poli(D,L-láctido-co-glicólido) ("PLG"), o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona.

Los polímeros anteriores están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y un experto en la técnica determina fácilmente el peso molecular apropiado para un uso dado. De este modo, por ejemplo, un peso molecular adecuado para PLA puede estar en el orden de aproximadamente 2000 a 5000. Un peso molecular adecuado para PLG puede oscilar entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 200.000, típicamente entre aproximadamente 15.000 y aproximadamente 150.000.

45 Cuando se usan copolímeros, pueden estar disponibles copolímeros con una variedad de proporciones de monómero. Por ejemplo, donde se usa PLG para formar las micropartículas, una variedad de proporciones molares láctido:glicólido encontrarán uso en el presente documento, y la proporción es en gran parte una cuestión de elección, dependiendo en parte de cualquier especie co-administrada adsorbida y/o atrapada y el índice deseado de degradación. Por ejemplo, un polímero PLG 50:50, que contiene 50% D,L-láctido y 50% glicólido, proporcionará un copolímero rápido re-absorbente mientras que PLG 75:25 se degrada más despacio, y 85:15 y 90:10, incluso más despacio, debido al mayor componente de láctido. Las mezclas de micropartículas con proporciones variadas láctido:glicólido pueden también encontrar uso con el fin de conseguir la cinética deseada de liberación. El índice de degradación de las micropartículas de la presente invención también puede controlarse mediante factores tales como peso molecular de polímero y cristalinidad de polímero.

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

65 Cuando se usan, los polímeros poli(D,L-láctido-co-glicólido) son típicamente aquellos que tienen una proporción molar láctido/glicólido que oscila entre 20:80 y 80:20, más típicamente entre 40:60 y 60:40, y que tienen

un peso molecular que oscila entre 10.000 y 100.000 Daltons, más típicamente entre 20.000 Daltons y 70.000 Daltons.

5 Puede pensarse que las micropartículas biodegradables son un tipo particular de adyuvante inmunológico. Se cree que las micropartículas biodegradables mejoran la absorción y procesamiento de antígeno adsorbido por las células presentadoras de antígeno (CPAs). Briones, M. et al. 2001. "La preparación, caracterización y evaluación de micropartículas catiónicas para entrega de vacuna de ADN". *Pharm. Res.* 18:709-712. Denis-Mize, K. S., et al., 2000. "ADN de plásmido adsorbido en micropartículas catiónicas media la expresión de gen diana y la presentación de antígenos por células dendríticas". *Gene Ther.* 7:2105-2112. Denis-Mize, K. S., et al. 2003. "Mecanismo de mayor inmunogenicidad para vacunas con base de ADN adsorbidas en micropartículas catiónicas". *Cell Immunol.* 225:12-20. O'Hagan, D., et al. 2001. "Inducción de respuestas inmunes potentes por micropartículas catiónicas con vacunas de ADN de virus de inmunodeficiencia humano adsorbido". *J. Virol.* 75:9037-9043. Singh, M. et al. 2004. "Micropartículas de poliláctido co-glicólido cargadas como sistemas de entrega de antígeno". *Expert. Opin. Biol Ther.* 4:483-491. Singh, M., et al. 1997. "Micropartículas de liberación controlada como una vacuna para hepatitis B en una única dosis: evaluación de inmunogenicidad en ratones". *Vaccine* 15:475-481. Singh, M., et al. 2001. "Micropartículas catiónicas son un sistema efectivo de entrega para CpG ADN estimulante inmune". *Pharm. Res.* 18:1476-1479.

20 Las micropartículas se preparan usando cualquiera de los varios métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, técnicas de doble evaporación emulsión/disolvente, tales como aquellas descritas en la Patente de Estados Unidos Nº 3.523.907 y Ogawa et al, *Chem. Pharm. Bull.* (1988) 36:1095-1103, pueden usarse en el presente documento para hacer las micropartículas. Estas técnicas incluyen la formación de una emulsión primaria que comprende gotas de solución de polímero, que posteriormente se mezclan con una fase acuosa continua que contiene un estabilizador de partícula/surfactante.

25 En otras realizaciones, las micropartículas también pueden formarse usando secado por aspersión y coacervación como se describe, por ejemplo, en Thomasin et al., *J. Controlled Release* (1996) 41:131, Patente de Estados Unidos Nº 2.800.457; Masters, K. (1976) *Spray Drying* 2ª Ed. Wiley, Nueva York; técnicas de baño en suspensión de aire, tales como recubrimiento con cacerola o recubrimiento Wurster, como se describe en Hall et al., (1980) *The Wurster Process in Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Application* (A. F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, páginas 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida y Deasy, P. B., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1988) S(2):99-139; y gelificación iónica como describe, por ejemplo, Lim et al., *Science* (1980) 210:908-910.

35 En realizaciones preferente, puede usarse un sistema de evaporación de disolvente en agua en aceite en agua (a/a/a) para formar las micropartículas, junto con líneas descritas por O'Hagan et al., *Vaccine* (1993) 11:965-969, PCT/US99/17308 (WO 00/06123) para O'Hagan et al. y Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10:362.

40 En general, un polímero de interés, tal como PLG, se disuelve en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, dimetilcloruro (también llamado cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroforno, y similares. El polímero se proporcionará típicamente en una solución de aproximadamente 1-30% peso, más típicamente de aproximadamente 2-15% peso, incluso más típicamente de aproximadamente 3-10% peso y lo más típicamente de aproximadamente 4-8% peso, en un disolvente orgánico. La solución de polímero se combina después con un primer volumen de solución acuosa y se emulsiona para formar una emulsión a/a. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, un solución amortiguada, por ejemplo, tampón fosfato salino (PBS), o una solución tampón de ácido citrato de sodio/etilenodiaminatetraacético (citrato de sodio/ETDA), entre otros. Las últimas soluciones pueden (a) proporcionar una tonicidad, es decir, osmolalidad, que es esencialmente la misma que la de los fluidos fisiológicos normales y (b) mantener un pH compatible con condiciones fisiológicas normales. Alternativamente, la tonicidad y/o características de pH de las composiciones de la presente invención pueden ajustarse después de la formación de micropartículas y antes de la administración. Preferentemente, la proporción de volumen de solución de polímero con solución oscila entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 20:1, más preferentemente aproximadamente 10:1. La emulsificación se realiza usando cualquier equipo apropiado para esta tarea, y es típicamente un dispositivo de alto cizallamiento tal como, por ejemplo, un homogenizador.

55 En algunas realizaciones, uno o más componentes adicionales están atrapados dentro de las micropartículas. Por ejemplo, un antígeno y/o adyuvante inmunológico puede estar atrapado añadiendo el mismo (a) a la solución de polímero, si está en forma que sea soluble en aceite o que pueda dispersarse en aceite o (b) a la solución acuosa, si está en forma soluble en agua o que pueda dispersarse en agua.

60 Un volumen de la emulsión a/a se combina después con un segundo volumen mayor de una solución acuosa, que típicamente contiene un surfactante. La proporción de volumen de la solución acuosa con la emulsión a/a oscila entre aproximadamente 2:1 y 10:1, más típicamente aproximadamente 4:1. Ejemplos de surfactantes apropiados para la práctica de la invención están enumerados más arriba. Aquellos expertos ordinarios en la técnica pueden seleccionar fácilmente surfactantes apropiados para el tipo de especie a ser adsorbida. Por ejemplo, micropartículas fabricadas en presencia de surfactantes cargados, tales como surfactantes aniónicos o catiónicos,

65

5 pueden producir micropartículas con una superficie que tiene una carga de red negativa o de red positiva, que pueden adsorber una amplia variedad de moléculas. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas con surfactantes aniónicos, tales como dodecilsulfato sódico (DSS), por ejemplo, micropartículas DSS-PLG, pueden adsorber especies positivamente cargadas, por ejemplo, especies que contienen polipéptido tales como proteínas.
 10 Similarmente, las micropartículas fabricadas con surfactantes catiónicos, tales como CTAB, por ejemplo, micropartículas de PLG/CTAB, pueden adsorber especies negativamente cargadas, por ejemplo, especies que contienen polinucleótido tales como ADN, ARN u oligonucleótidos. Donde la especie a ser adsorbidas tienen regiones de carga positiva y negativa, pueden ser apropiados los surfactantes catiónicos o aniónicos o no iónicos. Ciertas especies pueden adsorber más rápidamente micropartículas que tienen una combinación de surfactantes. Además, en algunos casos, puede desearse añadir surfactante a la solución orgánica anterior.

15 Donde se usa un surfactante catiónico tal como CTAB, típicamente se proporciona en una solución de aproximadamente 0,00025-1%, más típicamente una solución de aproximadamente 0,00025-0,1%. Donde se usa un surfactante aniónico tal como DSS, típicamente se proporciona en una solución de aproximadamente 0,00001-0,25%, más típicamente una solución de aproximadamente 0,00001-0,0025%. Donde se usa un surfactante no iónico tal como PVA, típicamente se proporciona en una solución de aproximadamente 2-15%, más típicamente una solución de aproximadamente 4-10%. Para un surfactante catiónico, típicamente se usa una proporción peso a peso surfactante con polímero en el rango de desde aproximadamente 0,00001:1 a aproximadamente 0,5:1; más típicamente desde aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 0,1:1; e incluso más típicamente desde aproximadamente 0,0025:1 a aproximadamente 0,05:1; para un surfactante aniónico tal como DSS, típicamente se usa una proporción peso a peso surfactante con polímero en el rango de desde aproximadamente 0,00001:1 a aproximadamente 0,25:1, más típicamente desde aproximadamente 0,0001:1 a aproximadamente 0,0025:1; para un surfactante no iónico tal como PVA, típicamente se usa una proporción peso a peso surfactante con polímero en el rango de desde aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 0,1:1; se usa más típicamente desde aproximadamente 0,0025:1 a aproximadamente 0,05:1.

20 La mezcla después se homogeniza para producir una emulsión doble estable a/a. Cada una de las etapas anteriores de homogenización se realiza típicamente a una temperatura ambiente (es decir, 25 °C) o menos, más típicamente, por ejemplo, mientras se enfría dentro de un baño de hielo.

25 Los disolventes orgánicos después se evaporan. Después de la evaporación, las micropartículas pueden usarse, por ejemplo, liofilizadas para uso futuro.

30 Los parámetros de formulación pueden manipularse para permitir la preparación de micropartículas pequeñas en un orden de 0,05 µm (50 nm) a micropartículas más grandes de 50 µm o incluso más grandes. Véase, por ejemplo, Jeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10:362-368; McGee et al., J. Microencap. (1996). Por ejemplo, la agitación reducida típicamente da como resultado micropartículas más grandes, como lo hace un incremento en el volumen de fase interna y un incremento en la concentración de polímero. Las partículas pequeñas típicamente se producen mediante una mayor agitación así como volúmenes bajos de fase acuosa, altas concentraciones de estabilizadores de emulsión y un descenso en la concentración de polímero.

35 El tamaño de partícula puede determinarse, por ejemplo, mediante dispersión de luz láser, usando por ejemplo, un espectrómetro que incorpora un laser de helio-neón. Generalmente, el tamaño de partícula se determina a temperatura ambiente e incluye múltiples análisis de la muestra en cuestión (por ejemplo, 5-10 veces) para producir un valor medio para el diámetro de partícula. El tamaño de partícula también se determina fácilmente usando microscopio electrónico de barrido (MEB).

40 Después de la preparación, una variedad de componentes pueden mezclarse con las micropartículas, incluyendo un antígeno y/o un adyuvante inmunológico y la formulación resultante puede liofilizarse antes de su uso si se desea. Típicamente, estos componentes se añaden a las micropartículas en el contexto de una solución o dispersión acuosa. En algunos casos, estas especies se adsorberán a la superficie de las micropartículas (véase, por ejemplo, los Ejemplos más abajo en los que los oligonucleótidos se adsorben a la superficie de micropartícula). El contenido de la especie adsorbida puede determinarse usando técnicas estándares.

45 De este modo, las micropartículas de polímero de la presente invención pueden tener una variedad de componentes adsorbidos en las mismas, así como una variedad de componentes atrapados o encapsulado dentro de ellas.

60 2. Antígenos

Las composiciones y kits inmunogénicos de la presente invención también incluyen uno o más antígenos *B. anthracis*, que puede, por ejemplo, adsorberse en la superficie de las micropartículas de polímero, atraparse dentro de las micropartículas de polímero, disolverse o dispersarse en la solución, y/o proporcionarse o atraparse dentro de una población separada de micropartículas (incluyendo micropartículas orgánicas, tales como micropartículas de polímero, o micropartículas inorgánicas, tales como micropartículas de hidróxido de aluminio). En la invención, el antígeno se adsorbe en micropartículas de hidróxido de aluminio. Como se ha indicado anteriormente, los antígenos

para su uso en conjunto con la presente invención incluyen organismos eliminados, atenuados o inactivados así como antígenos de subunidad. En la invención el antígeno es un antígeno de subunidad que es un antígeno que contiene un péptido. Los antígenos incluyen especies que contienen polipéptido, tales como proteínas y otros polipéptidos (por ejemplo, antígeno protector (AP)), especies que contienen polisacárido, y especies que contienen polinucleótido que expresan proteínas o polipéptidos inmunogénicos. Ejemplos de antígenos que contienen polinucleótido incluyen, por ejemplo, (a) secuencias de ácido nucleico que directamente codifican antígenos que contienen polipéptido (por ejemplo, moléculas de mRNA) y (b) construcciones de vector que indirectamente codifican antígenos que contienen polipéptidos, por ejemplo, construcciones de vector que expresan secuencias heterólogas de ácido nucleico, que a su vez codifican antígenos que contienen polipéptido (por ejemplo, construcciones de vector de ADN y construcciones de vector de ARN).

Como se ha indicado anteriormente, la vacuna adsorbida contra el ántrax (AVA) es la única vacuna para ántrax autorizada para uso humano en los Estados Unidos de América, y es de este modo una fuente beneficiosa de antígeno para la práctica de la presente invención. Como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0082530, la vacuna actual se produce a partir de filtrados estériles obtenidos de cultivos de lotes de *B. anthracis* V770-NP1-R, una cepa de producción derivada de la cepa Sterne (Sterne (1939). Onderstepoort, J. Vet. Sci. Anim. Indust. 13:313-317. El filtrado que contiene AP se adsorbe en el hidróxido de aluminio (véase, por ejemplo, Puziss et al. (1963) Appl. Microbiol. 11:330-334). Además, se han desarrollado un número de sistemas alternativos de expresión (bacteriana) procariótica para producción de antígeno, incluyendo un sistema de expresión de *Escherichia coli* (Vodkin et al. (1983) Cell 34:693-697), un sistema de expresión de *Salmonella typhimurium* (Coulson et al. (1994) Vaccine 12:1395-1401), un sistema de expresión de *Bacillus subtilis* (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.267.966 de Baillie; Ivins et al. (1986) Infection and Immunity 54:537-542; y Baillie et al. (1994) Let. Appl. Microbiol. 19:225-227), y un número de sistemas de expresión recombinantes de *Bacillus anthracis* que son asporogénicos o incapaces de producir las toxinas LF o EF (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.840.312 de Mock et al. y Patente de Estados Unidos N° 6.316.006 de Worsham et al.). Además, se conoce la secuencia genética completa para el antígeno AP de *B. anthracis* (Welkos et al. (1988) Gene 69:287-300) y está públicamente disponible, permitiendo el desarrollo y producción de una amplia variedad de antígenos, incluyendo antígenos que contienen polipéptido y polinucleótido. Por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0082530 describe ácidos nucleicos que contienen secuencias que codifican antígenos de polipéptido obtenidos o derivados de *B. anthracis*, incluyendo secuencias que codifican el antígeno AP y secuencias que codifican otros antígenos tales como fragmentos de los antígenos EF o LF, que pueden insertarse en las construcciones apropiadas de vector usando técnicas conocidas.

3. Adyuvantes Inmunológicos

Además de las micropartículas de polímero y al menos un tipo de antígeno de *B. anthracis*, las composiciones y kits inmunogénicos de la presente invención además incluyen (a) al menos un adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido y (b) opcionalmente, al menos un adyuvante inmunológico complementario. Estos adyuvantes inmunológicos pueden, por ejemplo, adsorberse en la superficie de las micropartículas de polímero, atraparse dentro de las micropartículas de polímero, disolverse o dispersarse en la solución, y/o proporcionarse o atraparse dentro de una población separada de micropartículas (incluyendo micropartículas orgánicas o inorgánicas).

Las micropartículas de polímero, el antígeno *B. anthracis*, el adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido, y el adyuvante inmunológico complementario opcional pueden administrarse simultáneamente con las micropartículas de polímero y el antígeno *B. anthracis*, por ejemplo, administrarse en la misma composición o simultáneamente en dos o más composiciones separadas. Alternativamente, estas especies pueden administrarse secuencialmente en dos o más composiciones separadas.

Los adyuvantes inmunológicos que contienen polinucleótidos para su uso en conjunto con la presente invención incluyen adyuvantes inmunológicos que contienen ADN y ARN, ejemplos específicos de los cuales incluyen oligodeoxinucleótidos y ARN de doble hebra, entre otros.

Los oligonucleótidos de CpG son adyuvantes inmunológicos que contienen polinucleótidos particularmente beneficiosos para la práctica de la presente invención. Como se ha señalado anteriormente, las expresiones "oligonucleótido que comprende al menos una unidad CpG" y "oligonucleótido CpG" se refieren a un polinucleótido que comprende al menos un dinucleótido CpG. Los oligonucleótidos que comprenden una unidad CpG pueden comprender múltiples unidades CpG. Como se usa en el presente documento, la expresión "unidad CpG" se refiere a una parte o partes de dinucleótido de un oligonucleótido, que comprenden un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanosina. Los análogos de citosina y guanosina, (por ejemplo 5-metilcitosina), también pueden usarse en lugar de guanosina o citosina.

Los oligodeoxinucleótidos sintéticos (ODN) que contienen unidades inmunoestimulantes de CpG son conocidos para estimular la respuesta inmune a antígeno(s) co-administrado(s) (Ag), incluyendo AVA. Davis, H. L., et al. 2000. "CpG ADN supera la hiposensibilidad a vacuna para hepatitis B en orangutanes". Vaccine 18:1920-1924. Jones, T. R. et al. 1999. "Oligodeoxinucleótidos sintéticos que contienen unidades de CpG mejoran la vacuna

inmunogénica en monos Aotus". *Vaccine* 17:3065-3071. Klinman, D. M. 2004. "Usos inmunoterapéuticos de Oligodeoxinucleótidos de CpG". *Nat. Rev. Immunol.* 4:249-258. Klinman D. M. et al. 2004. "Oligonucleótidos de CpG mejorar la respuesta inmune protectora inducida por la vacunación de ántrax de macacos Rhesus". *Vaccine* 33:2881-2886. Verthelyi, D., et al. 2002. "Oligodeoxinucleótidos de CpG como adyuvantes de vacuna en primates". *J. Immunol.* 168:1659-1663. CpG ODN inducen la maduración funcional de células presentadoras de Ag profesionales (CPAs) y provocan la producción de citoquinas y quimioquinas inmunoestimulantes. Ballas, Z. D., et al. 1996 "Inducción de actividad NK en células murinas y humanas por unidades de CpG en oligodeoxinucleótidos y ADN bacteriano". *J. Immunol.* 157:1840-1847. Halpern, M. D., et al. 1996. "ADN bacteriano induce producción murina interferón-gamma mediante estimulación de IL-12 y factor alfa de necrosis tumoral". *Cell Immunol.* 167:72-78. Klinman, D. M., et al. 1996. "Unidades de CpG expresadas por ADN bacteriano inducen rápidamente linfocitos para secretar IL-6, IL-12 y IFN γ ". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2879. Krieg, A. M. et al. 1995. "Unidades de CpG en ADN bacteriano provocan activación directa de célula B". *Nature* 374:546-548.

Los dinucleótidos no metilados de CpG son relativamente comunes en ADN bacteriano, pero están pobremente representados y metilados en ADN vertebrado. Bir, *Trends Genet.*, 1987, 3, 342-347. ADN bacteriano u oligonucleótidos que contienen unidades no metiladas de CpG también se conocen para inducir respuestas inmunes incluyendo, por ejemplo, proliferación de célula B, secreción de interleuquina-6 e inmunoglobulina, y resistencia a apoptosis. Krieg et al., *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al., *J. Immunol.* 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al., *Cell. Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2111; Messina et al., *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; y Yi et al., *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906; Publicación PCT WO 96/02555; Publicación PCT WO 98/16247; Publicación PCT WO 98/18810; Publicación PCT WO 98/40100; Publicación PCT WO 98/55495; Publicación PCT WO 98/37919; y Publicación PCT WO 98/52581.

Los oligonucleótidos de CpG pueden prepararse usando técnicas convencionales de síntesis de oligonucleótidos bien conocidas por aquellos artesanos expertos. Los oligonucleótidos de CpG pueden comprender una columna modificada, tal como un fosforotioato o ácido nucleico de péptido, para conferir una resistencia de nucleasa al oligonucleótidos. Las columnas modificadas son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Véase los Números de Patentes de Estados Unidos 5.821.060, 5.789.573, 5.736.392 y 5.721.102, la Patente Japonesa Nº 10231290, Patente Europea Nº 839.828, y los Números de Publicación PCT WO 98/42735, WO 98/42876, WO 98/36098, WO 98/27105, WO 98/20162, WO 98/16550, WO 98/15648, WO 98/04571, WO 97/41150, WO 97/39024 y WO 97/38013.

Los oligonucleótidos de CpG pueden variar en gran medida en rango de tamaño, por ejemplo, entre 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500 oligonucleótidos. Los oligonucleótidos de CpG típicamente comprenden entre aproximadamente 6 y aproximadamente 100 nucleótidos, más típicamente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 nucleótidos, incluso más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 nucleótidos. Además, los oligonucleótidos de CpG para su uso en la invención pueden comprender sustituciones de las fracciones de azúcar y fracciones de base de nitrógeno.

Como se usa en el presente documento, "dsARN" se refiere a ARN de doble hebra, que puede obtenerse de varias fuentes. Un número de organismos producen de manera natural dsARN, incluyendo levaduras y virus. dsARN de tales fuentes está generalmente hecho de pares intermitentes de base ácido riboguanílico-ácido ribocitidílico ([rG-rC]) y ácido riboadenílico-ácido polirribouridílico ([rA-rU]). Se cree que todos los virus excepto los virus de ADN de única hebra, producen dsARN. dsARN viral generalmente existe en forma doble de hebras complementarias de ARN o en forma de estructura secundaria intramolecular dentro de ARN de única hebras. Las fuentes virales de dsARN para virus dsARN (genómicos), virus ssARN (intermediarios de transcripción), virus dsADN (transcripción simétrica seguida por recocido ARN-ARN), y retrovirus (estructura secundaria en mRNA viral) son conocidos y se describen en, por ejemplo, Majde, J. A., *J. Interfer. Cytokine Res.* (2000) 20:259-272 y Jacobs y Langland, *Virology* (1996) 219:339-349. Las fuentes particulares de dsARN incluyen, aunque no se limitan a, dsARNs de células infectadas por virus Mengo (Falcoff et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (1973) 3:590-598); dsARNs de retrovirus y virus fúngicos (Field et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1967) 58:1004-1010, De Benedetti et al., *J. Virol.* (1985) 54:408-413); retrovirus dsARN (Jacobs y Langland, *Virology* (1996) 219:339-349), tales como VIH-1 (Maitra et al., *Virology* (1994) 204:823-827); dsARN extraído de células infectadas con picornavirus (Falcoff et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (1973) 3:590-298); dsARN de pulmones infectados con influenza (Majde et al., *Microb. Pathogen.* (1991) 10:105-115); dsARN de células de planta infectadas (Lin y Langenberg, *Virology* (1985) 142:291-298); dsARN de togavirus (Stollar, B. D., *Crit. Rev. Biochem.* (1975) 3:45-69); dsARN de células infectadas con virus de rubeola (Lee et al., *Virology* (1994) 200:307-312); dsARN de células infectadas con virus del bosque de Semliki (Lee et al., *Virology* (1994) 200:307-312); dsARN de células infectadas con virus del dengue (MacKenzie et al., *Virology* (1996) 220:232-240); los dsARNs conocidos como Larifan (Riga, Letonia) y Ridostin ("Diapharam" NOP "VECTOR", Berdsk, Rusia). Cualquiera de estos dsARNs varios, así como dsARNs de otras fuentes, encontrarán uso con la presente composición y métodos.

DsARN de células infectadas se obtiene fácilmente usando métodos estándares de extracción de ácido nucleico, tales como técnicas de extracción de fenol, como se describe en varias de las publicaciones anteriores. Véase, por ejemplo, Falcoff et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (1973) 3:590-598; Fayer et al., *Prog. Immunobiol. Standard.* 81972 5:267-273; Majde et al., *Microb. Pathogen.* (1991) 10:105-115.

También se conocen un número de dsARNs sintéticos. Se sintetizan usando técnicas bien conocidas y descritas en la técnica. Tales dsARNs sintéticos incluyen, aunque no se limitan a, ácido polirribonucleico-ácido polirribocitidílico (poli[rI-rC]) y ácido polirriboguanílico-ácido polirribocitidílico (poli[rG-rC]) (véase, por ejemplo, Michelson et al., *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* (1967) 6:83-141); ácido polirriboadenílico-polirribouridílico (poli[rA-rU]); dsARN de bajo peso molecular de composición base mezclada, tal como, aunque sin limitar a, dsARN sintético con 309 bp (Haines et al., *J. Biol. Chem.* (1992) 267:18315-18319); así como dsARNs sintéticos no combinados descritos, por ejemplo, en Patentes de Estados Unidos Números 5.906.980 y 5.258.369. Además, pueden hacerse dsARNs con columnas modificadas usando técnicas bien conocidas en la técnica. Puede encontrarse más información, por ejemplo, en PCT/US02/30423 de propiedad común.

Los adyuvantes inmunológicos complementarios opcionales para su uso en conjunto con la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, los siguientes: (1) sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc. (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramil (véase más abajo) o componentes de pared de célula bacteriana, tales como, por ejemplo (a) MF59 (Publicación Internacional N° WO90/14837; Capítulo 10 en *Vaccine design: the subunit adjuvant approach*, Eds. Powell & Newman, Plenum Press, 1995) que contiene 5% Escualeno, 0,5% Tween 80 y 0,5% Span 85 (conteniendo opcionalmente varias cantidades de MTP-PE (véase más abajo), aunque no son requeridas) formulado en partículas de submicrón usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene 10% Escualeno, 0,4% Tween 80, 5% polímero L121 bloqueado plurónico, y tr-MDP (véase más abajo) bien microfluidizado en una emulsión submicrón o agitado con vórtices para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (c) sistema adyuvante Ribij (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% Escualeno, 0,2% Tween 80, y uno o más componente de pared de célula bacteriana del grupo consistente en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxJ) (para un análisis más profundo de emulsiones de submicrón aceite en agua adecuadas para su uso en el presente documento, véase de propiedad común, la solicitud de patente n° 09/015.736, presentada el 29 de enero, 1998); (3) adyuvantes de saponina, tal como Quil A, o QS21 (por ejemplo, StimulonJ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)) pueden usarse, o partículas generadas de los mismos tales como ISCOMs (complejos inmunoestimulantes), cuyos ICOMs pueden estar libres de detergente adicional, por ejemplo, WO00/07621; (4) Adyuvante Completo de Freund (ACF) y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF); (5) citoquinas e interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonia de macrófago (FEC-M), factor de necrosis tumoral (FNT), etc.; (6) adyuvantes fosfolípidos, incluyendo adyuvantes de fosfato lipopolisacárido y liposacárido, por ejemplo, monofosforil lípido A (MPL), MPL 3-O-deacilado (3dMPL) por ejemplo, GB-2220221, EP-A-068454, opcionalmente en ausencia sustancial de alum cuando se usa con sacáridos neumocócicos, por ejemplo, WO00/56358; así como compuestos de aminoalquil glucosamina fosfato tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.355.257; (7) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, ejemplo, EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (8) éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo, WO99/52549; (9) un surfactante de éster de sorbitán de polioxietileno en combinación con un octoxinol (WO01/21207) o un surfactante de éter o éster de polioxietileno alquilo en combinación con al menos un surfactante no iónico adicional tal como octoxinol (WO01/21152); (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo, un oligonucleótido de CpG) (WO00/62800); (11) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica, por ejemplo, WO00/23105; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo, WO99/11241; (13) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) por ejemplo, WO98/57659; (14) mutantes desintoxicados de una toxina bacteriana ADP-ribosolante tal como una toxina de cólera (TC), una toxina de pertussis (TP), o una toxina termolábil de *E. coli* (TL), particularmente LT-K63 (donde lisina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 63) LT-R72 (donde arginina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 72), CT-S109 (donde serina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 109), y PT-K9/G129 (donde lisina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 9 y glicina se sustituye en la posición 129) (véase, por ejemplo, Publicaciones Internacionales Números WO93/13202 y WO92/19265); (15) aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGPs), véase, por ejemplo, Johnson, D. A. et al.; *Cell. Immunol.* 2000 Ag 25; 204(1):64-74, (17) imitadores de lipopolisacárido (incluyendo imitadores de monofosforil lípido A), tales como fosfolípidos no sacáridos (por ejemplo, análogos simplificados de lípido A que carecen de un disarído) descritos en Hawkins, L.D., et al; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2022 Feb.; 300(29:655-61) y Patente de Estados Unidos N° 6.290.973; y(18) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la efectividad de la composición. Los péptidos de muramil incluyen, aunque no se limitan a, N-acetil-muramil-Ltreonil-D-isoglutamina (tr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isogluatme (no-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isogluatminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

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

4. Formulaci3n y Administraci3n

Las composiciones de la presente invenci3n generalmente incluir3n uno o m3s excipientes farmac3uticamente aceptables. Por ejemplo, pueden usarse veh3culos tales como agua, soluci3n salina, glicerol, glicol de polietileno, 3cido hialur3nico, etanol, etc. Otros excipientes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias biol3gicas amortiguadoras, y similares, pueden estar presentes. Un tamp3n biol3gico puede ser virtualmente cualquier soluci3n que sea farmac3uticamente aceptable y que proporcione la formulaci3n con el pH deseado, es decir, un pH en el rango fisiol3gico. Ejemplos incluyen varios tampones que incluyen tampones de fosfato, tampones de citrato, tampones de borato, tampones de succinato, y tampones de histidina, as3 como combinaciones de tamp3n fosfato salino, soluci3n salina amortiguada Tris, soluci3n salina amortiguada de Hank, y similares.

Dependiendo de la forma final de dosis, tambi3n pueden introducirse otros excipientes conocidos en la t3cnica, incluyendo adhesivos de la mucosa, aglutinantes, desintegrantes, rellenos (diluyentes), lubricantes, glidantes (potenciadores de flujo), ayudantes de compresi3n, colores, endulzantes, conservantes, agentes suspensorios/dispersantes, formadores de pel3cula/ba3os y saborizantes.

Una vez formuladas, las composiciones de la invenci3n pueden administrarse parenteralmente, por ejemplo, mediante inyecci3n (que puede ser sin aguja). Las composiciones pueden inyectarse subcut3neamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intraarterialmente, intrad3rmicamente, o intramuscularmente, por ejemplo. Otros modos de administraci3n incluyen administraci3n nasal, por mucosa, intraocular, rectal, vaginal, oral y pulmonar, y aplicaciones transd3rmicas o transcut3neas.

El tratamiento puede realizarse de acuerdo con un programa de una 3nica dosis o un programa de m3ltiples dosis. Un programa de m3ltiples dosis es aquel en el que puede darse un curso primario de administraci3n, seguido de una o m3s dosis adicionales dadas en posteriores intervalos de tiempo, por ejemplo, para mantener y/o reforzar la respuesta terap3utica. El r3gimen de dosis puede tambi3n, al menos en parte, determinarse por la necesidad del sujeto y depender del juicio del m3dico.

C. Experimental

M3s abajo hay ejemplos de realizaciones espec3ficas para realizar la presente invenci3n. Los ejemplos se ofrecen 3nicamente para fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invenci3n de ninguna manera.

Se han hecho esfuerzos por asegurar la precisi3n con respecto a los n3meros usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero, por supuesto, deber3a permitirse alg3n error y desviaci3n experimental.

Reagentes: Fosforotioato CpG ODN 155 (GCTAGACGTTAGCGT) (SEQ ID NO:1) y control ODN 1612 (GCTAGAGCTTAGCGT) (SEQ ID NO:2) se sintetizaron en la instalaci3n com3n CBER. V3ase Gursel, I, et al., 2001. "Liposomas cati3nicos est3ricamente estabilizados mejoran la absorci3n y la actividad inmunoestimulante de oligonucle3tidos CpG". J. Immunol. 167:3324-3328. Todos los oligodeoxinucle3tidos (ODN) estaban libres de contaminaci3n de endotoxina y prote3ina. ODN se adsorbieron en PLG en 1% p/p como se ha descrito anteriormente. Singh, M., et al. 2001. "Micropart3culas cati3nicas son un sistema efectivo de entrega para ADN CpG inmune estimulante". Phar. Res. 18:1476-1479. En resumen, las micropart3culas PLG con una proporci3n de copol3mero 50/50 se emulsionaron con bromuro de hexadecil-trimetil-amonio a trav3s de un proceso de evaporaci3n de disolvente. Las micropart3culas PLC cati3nicas resultantes se incubaron con ODN durante la noche a 4 3C con una agitaci3n suave seguida de un lavado y liofilizaci3n, y se cuantific3 la cantidad de ODN adsorbida a PLG. Se obtuvo Vacuna Adsorbida contra el 3ntrax (AVA) de BioPort Corporation (East Lansing, MI, Estados Unidos). USAMRIID (Fort Detrick, MD, Estados Unidos) proporcion3 el ant3geno protector recombinante (APr) y se prepar3 como se ha descrito. Ivins, B. E., et al. 1988. "Eficacia comparativa de candidatos a vacuna experimental de 3ntrax contra 3ntrax de inhalaci3n en macacos Rhesus". Vaccine 16:1141-1148. El factor letal recombinante (FLr) se compr3 en Research Diagnostics Inc. (Flanders, NJ). Las esporas de la cepa de vacuna Sterne toxinog3nicas (pXO1⁺), no encapsuladas (pXO2⁻) de B. anthracis (STI) se obtuvieron de USAMRIID y se almacenaron a 4 3C. Ivins, B. E. et al. 1990. "Inmunizaci3n contra 3ntrax con mutantes arom3ticos dependientes de compuesto (Aro-) de *Bacillus anthracis* y con cepas recombinantes de *Bacillus subtilis* que producen ant3geno protector de 3ntrax". Infect. Immun. 58:303-308.

Animales. Se obtuvieron ratones A/J machos libres de pat3geno espec3fico de NCI (Frederick, MD, Estados Unidos). Se alojaron en jaulas est3riles micro-aisladoras en un medio barrera, y se estudiaron en la semanas 8-12 de edad. Todos los experimentos con animales se realizaron usando protocolos aprobados por ACUC, y los estudios desaf3os se realizaron en una instalaci3n BL-2.

Inmunizaci3n y estudios de desaf3o. Se inmunizaron ratones A/J intraperitonealmente (i.p) con AVA formulado en alum \pm CpG ODN, PLG o CpG ON adsorbido en PLG (CpG ODN-PLG). Los ratones sangraron semanalmente, y su suero se almacen3 a -203 C hasta su uso. Los ratones fueron desaf3ados i.p con $3 \times 10^2 - 9 \times 10^2$

10^3 50% dosis letales (LD_{50}) de esporas STI suspendidas en 0,5 ml de tampón fosfato salino (PBS) estéril ($1 LD_{50} = 1,1 \times 10^3$ esporas STI). La supervivencia se controló durante 21 días.

5 **ELISA IgG anti-AP.** Los títulos Ab de IgG anti-AP se controlaron como se ha descrito. Klinman DM, et al. 2004. Vaccine 22:2881-2886. En resumen, placas de microtítulo con 96 pozos (Immulon 1B, Thermo LabSystems, Franklin, MA) se cubrieron con $1 \mu\text{g/ml}$ de rAP en PBS a 4°C durante la noche. Las placas se bloquearon después con 5% leche seca sin grasa en PBS que contenía 0,1% Tween-20. Las placas se lavaron, y se cubrieron con suero diluido en serie durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un minucioso lavado, se detectaron Abs unidos añadiendo IgG anti-ratón de cabra con etiqueta HRP, IgG1 o IgG2a (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, Estados Unidos) seguido de sustrato ABTS (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Los títulos Ab relativos se determinaron mediante comparación con una curva estándar creada usando sueros acumulados de ratones hiper-inmunizados, y se expresaron como el recíproco de la dilución del punto final que produjo un valor de absorbancia al menos 3 veces los niveles de los antecedentes. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

15 **Ensayo neutralizador de toxina.** Los títulos neutralizadores de toxina de muestras individuales de suero se evaluaron para su habilidad para proteger células RAW264.7 (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos) de toxina letal (LTx) con pequeñas modificaciones con respecto a los métodos previamente descritos. Ivins, B.E., et al. 1998. Vaccine 16:1141-1148. Las células RAW264.7 se colocaron en placas en 3×10^4 células/pozo en $100 \mu\text{l}$ de medio RPMI 1640 libre de glutamina que contenía 10% suero bovino fetal y 2 mM glutamax-1 (Invitrogen Corporation, Francia). Las células se incubaron a 37°C en un 5% CO_2 en una incubadora con aire durante la noche. El antisuero diluido en serie fue 1:1 (vol/vol) se mezcló con LTx (100 ng/ml rPA más 100 mg/ml rLF) a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que ocurriera la neutralización. Después $100 \mu\text{l}$ de esta mezcla se incubaron con las células durante 6 horas a 37°C . La viabilidad celular se determinó controlando la reducción de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los resultados se estandarizaron contra el suero de mono de título alto conocido amablemente proporcionado por CDC.

20 **Estadísticas.** Las diferencias en el desarrollo cinético de respuestas inmunes anti-AP se determinaron mediante ANOVA de dos sentidos. Las diferencias en la respuesta IgG anti-AP inducidas por varias combinaciones vacuna-adyuvante se evaluaron mediante ANOVA de un sentido. Las diferencias en la supervivencia se evaluaron usando análisis de Chi cuadrado de las curvas de Kaplan-Meier. Los coeficientes de correlación se determinaron mediante análisis de regresión lineal. El valor predictivo de IgG anti-AP y los títulos neutralizadores de toxina en supervivencia se evaluaron usando regresión logística de 2 parámetros. Agresti, A., y B. A. Coull. 1996. Pruebas con orden restringido para comparaciones estratificadas de proporciones binomiales. Biometrics 52:1103-1111.

35 **(CpG ODN-PLG) estimula la inmunogenicidad de AVA.** Los estudios previos establecieron que CpG ODN podían actuar como adyuvantes inmunes cuando se co-administraban con AVA. Klinman DM, et al. 2004. Vaccine 22:2881-2886. Para examinar si CpG ODN adsorbidos en micropartículas de PLG constituían un adyuvante incluso más efectivo, (CpG ODN-PLC) se co-administraron a ratones A/J con una dosis ópticamente inmunogénica de AVA ($200 \mu\text{l}$). Los ratones A/J se seleccionaron para estudio porque eran susceptibles a desafío por esporas de ántrax STI, permitiendo la actividad protectora de la respuesta inmune resultante que se examinará en una instalación BL-2. Id.

40 Consistente con estudios previos, la magnitud de la respuesta IgG anti-AP inducida por AVA mejoró significativamente por la co-administración de CpG ODN ($P < 0,01$, Fig. 1A). Sin embargo, la co-administración de (CpG ODN-PLG) con AVA estimuló esta respuesta en 4-30 veces adicionales ($P < 0,001$, Fig. 1A). Esta respuesta inmune humoral mejorada persistió durante la duración del estudio (4 meses). Los títulos de IgG1, IgG2 y Ab neutralizador de toxina de suero (TNA) aumentaron todos de manera significativa combinando (CpG ODN-PLG) con AVA (Fig. 1, B-D). Ab Ig anti-AP fueron indetectables en ratones no vacunados.

45 **Efecto moderado de Antígeno de (CpG ODN-PLG).** Es posible que la reactividad de la vacuna de ántrax autorizada se reduzca si la cantidad de AVA requerida para inducir inmunidad protectora se reduce. De este modo, se examinó la habilidad de (CpG ODN-PLG) para reducir la dosis de AVA necesaria para obtener inmunidad protectora. Experimentos preliminares establecieron que $8-25 \mu\text{l}$ de AVA indujeron una respuesta anti-AP detectable en todos los ratones vacunados, mientras que $3 \mu\text{l}$ de AVA fue inmunogénico en solamente una fracción de animales vacunados. Como se ve en la Fig. 2, la co-administración de (CpG ODN-PLG) con $8-25 \mu\text{l}$ de AVA estimuló la respuesta IgG anti-AP resultante en casi 50 veces en comparación con AVA solo ($P < 0,001$, Fig. 2). Este efecto requirió la combinación de CpG ODN con PLG, ya que las micropartículas de PLG (solas o en combinación con ODN de control) no tuvieron impacto significativos en la magnitud de la respuesta inducida por AVA (Fig. 2).

50 **(CpG ODN-PLG) acelera el desarrollo de protección mediada por AVA.** Estudios preliminares demostraron que ratones inmunizados con $3-8 \mu\text{l}$ de AVA tardaron > 2 semanas requeridas para desarrollar una respuesta inmune protectora contra infección de ántrax (datos no mostrados). Para determinar si (CpG ODN-PLG) podía acelerar esta inducción de inmunidad protectora, ratones A/J se inmunizaron con AVA \pm adyuvante y se examinó su habilidad para resistir el desafío de ántrax una semana más tarde.

65

Consistente con estudios preliminares, los ratones inmunizados con solamente AVA fueron altamente susceptibles a infección en este punto temporal temprano (<90% mortalidad, Fig. 3). Finalmente >80% de los ratones inmunizados con (CpG ODN-PLG) más AVA sobrevivieron a la infección en este punto temporal temprano ($P > 0,0001$, Fig. 3). La inmunización con CpG ODN más AVA en ausencia de PLG produjo una producción intermedia (50% supervivencia, $P < 0,01$ contra (CpG ODN-PLG)/AVA, Fig. 3), mientras que (CpG ODN PLG) en ausencia de AVA no fue protector.

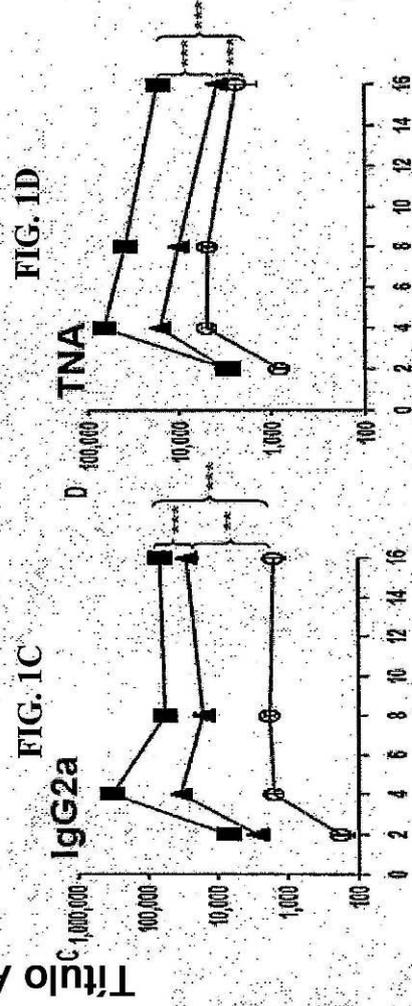
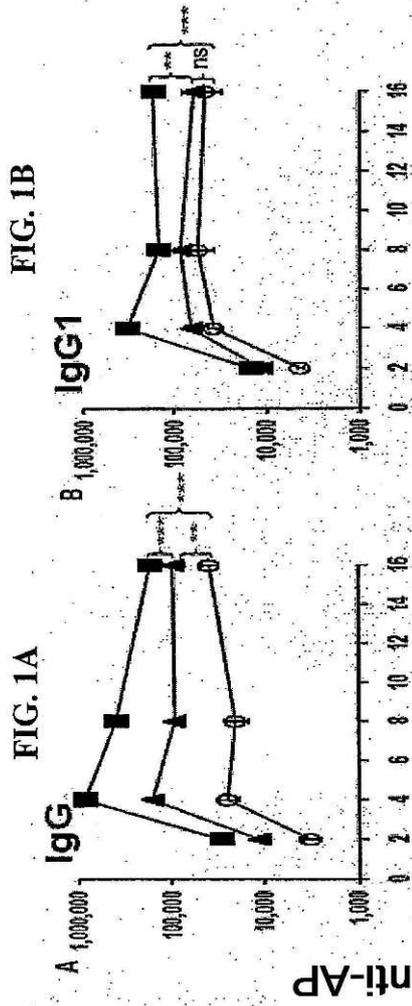
Inmunidad humoral como un indicador de protección. Hay un considerable interés en identificar un marcador sustituto para inmunidad protectora contra ántrax. Con este fin, se evaluaron la actividad neutralizadora de toxina y el título IgG anti-AP como indicadores de supervivencia después del desafío de esporas de ántrax. Como se ve en la Fig. 4A, TNA se correlacionó significativamente con título IgG anti-AP ($R^2 = 0,46$, $P < 0,0001$). Aunque TNA predijo protección contra ántrax, el modelaje de regresión logística de 2 parámetros mostró que IgG anti-AP fue el marcador sustituto superior de supervivencia (Fig. 4B, IgG: $R^2 = 0,64$, $P < 0,0001$; Fig. 4C, TNA: $R^2 = 0,36$ ($P < 0,0001$). En este contexto, el análisis característico de la operación receptora mostró que el título total IgG anti-AP fue 97% preciso en la predicción de supervivencia después del desafío de ántrax, mientras que TNA fue 91% preciso. La magnitud de la respuesta de IgG anti-AP proporcionó información valiosa sobre la resistencia de un animal a infección de ántrax. Por ejemplo, >90% de ratones están protegidos contra 9×10^3 LD₅₀ de ántrax si su título IgG anti-AP excede 1.000, mientras que un título >6.000 indica que >99% de ratones están protegidos de tal desafío de dosis alta.

Conclusiones. Los descubrimientos actuales indican que (CpG ODN-PLG) co-administrado con AVA da como resultado una respuesta anti-AP Ab más rápida y fuerte que la inmunización con AVA solamente o con AVA combinada con CpG ODN en ausencia de LPG. Véase las Figs. 1 y 2. Una protección significativa contra desafío de ántrax estuvo presente después de una semana de vacunación con (CpG ODN-PLG) más AVA (Fig. 3), lo que indica que la combinación de (CpG ODN-PLG) es significativamente más efectiva como un adyuvante inmune que CpG ODN solo o PLG solo. La calidad de la respuesta anti-AP resultante fue alta, como lo prueban la mayor actividad neutralizadora de toxina, la mejor protección *in vivo*, y los altos niveles de IgG2a Ab (conocido por promover la limpieza de infección bacteriana por citotoxicidad mediada por complemento). Oishi, K., et al. 1992. "Propiedades antibacterianas y protectoras de anticuerpos monoclonales reactivos con lipopolisacárido de *Escherichia coli* 0111:B4: relación con isotipo de anticuerpo y actividad fijadora de complemento". J. Infect. Dis. 165:34-45. Los resultados actuales demuestran que cuando se combina con AVA, (CpG ODN-LPG) estimula y acelera la respuesta inmune resultante, obteniendo inmunidad protectora después de una semana. Esta respuesta persistió en niveles protectores a lo largo de una duración de 4 meses del experimento (véase Figs. 1 y 4).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende: (a) un antígeno derivado de *Bacillus anthracis*, donde el antígeno se adsorbe en micropartículas de hidróxido de aluminio; (b) micropartículas de polímero que comprenden un polímero biodegradable; y (c) un adyuvante inmunológico que contienen polinucleótido, donde al menos una parte del adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido se adsorbe en las micropartículas de polímero, donde el adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido es un oligonucleótido de CpG y donde el antígeno comprende un antígeno de subunidad que es un antígeno que contienen polipéptido.
- 10 2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, donde el antígeno se deriva de la cepa V770-NP1-R de *Bacillus anthracis*, o donde el antígeno comprende *Bacillus anthracis* eliminado o atenuado, o donde el antígeno comprende un *Bacillus anthracis* atenuado toxigenico no encapsulado.
- 15 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, donde el antígeno comprende una construcción de vector que codifica un antígeno que contiene polipéptido.
- 20 4. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, donde el antígeno comprende *Bacillus anthracis* atenuado toxigenico no encapsulado.
- 25 5. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la composición inmunogénica comprende además un surfactante.
- 30 6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, donde el surfactante comprende un surfactante catiónico, o un surfactante aniónico.
- 35 7. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde las micropartículas tienen un diámetro medio de entre 500 nanómetros y 20 micrones.
- 40 8. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el polímero biodegradable se selecciona de un poli(ácido α -hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, un policianoacrilato.
- 45 9. La composición inmunogénica de la reivindicación 8, donde el polímero biodegradable es un poli(ácido α -hidroxi).
- 50 10. La composición inmunogénica de la reivindicación 9, donde el polímero biodegradable es un poli(láctido-co-glicólido).
- 55 11. La composición inmunogénica de la reivindicación 10, donde el polímero biodegradable es un poli(láctido-co-glicólido) que tiene una proporción molar láctido:glicólido que oscila entre 40:60 y 60:40.
- 60 12. La composición inmunológica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido comprende un adyuvante inmunológico de oligonucleótido o un adyuvante inmunológico de oligodeoxinucleótido.
13. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 7-12, que además comprende un adyuvante inmunológico complementario.
14. La composición inmunogénica de la reivindicación 13, donde el adyuvante inmunológico complementario es una sal de aluminio.
15. La composición inmunogénica de la reivindicación 13, donde el adyuvante inmunológico complementario se selecciona de (a) toxinas termolábiles de *E. coli*, (b) compuestos de fosfato liposacárido, y (c) emulsiones submicrón que comprenden escualeno y un agente emulsionante.
16. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la composición inmunogénica es una composición inyectable.
17. Una composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para su uso en la inmunización de un animal huésped vertebrado contra infección por *Bacillus anthracis*.
18. Una composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 para su uso en la estimulación de una respuesta inmune en un animal huésped vertebrado.
19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 17-18, donde el animal huésped vertebrado es humano.

- 5 **20.** Un kit inmunogénico que comprende: (a) una primera composición que comprende un antígeno derivado de *Bacillus anthracis*, donde el antígeno comprende un antígeno de subunidad que es un antígeno que contiene polipéptido; (b) una segunda composición que comprende micropartículas de polímero biodegradable y (c) una tercera composición que comprende un adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido, donde la segunda y tercera composición son iguales y la primera composición es diferente,
- que además comprende micropartículas de hidróxido de aluminio, donde el antígeno se adsorbe en micropartículas de hidróxido de aluminio, donde el adyuvante inmunológico que contiene polinucleótido comprende oligonucleótido de CpG, y donde al menos una parte del oligonucleótido de CpG se adsorbe a las micropartículas de polímero.



Semanas post-inmunización

FIG. 2

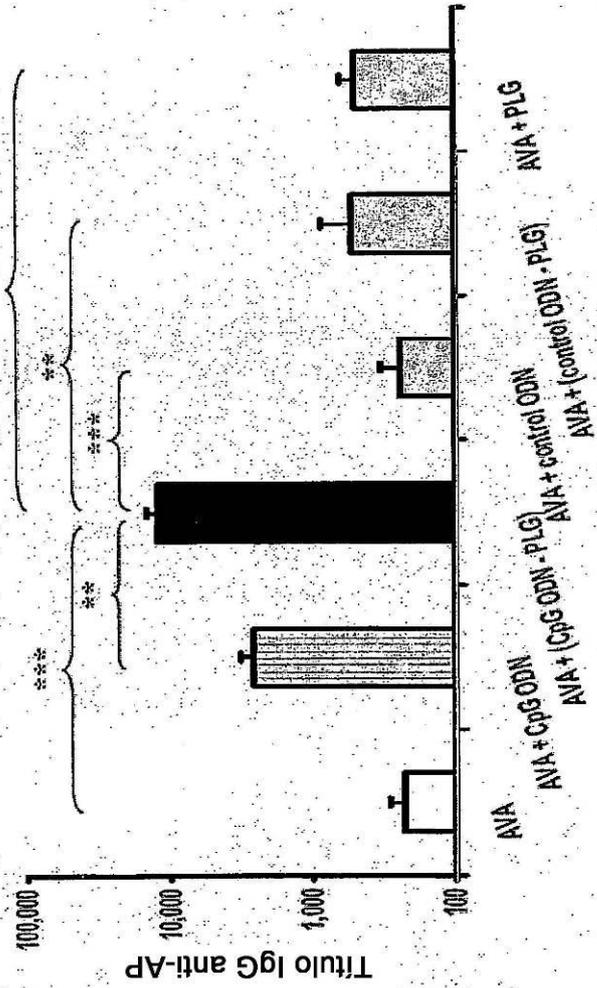


FIG. 3

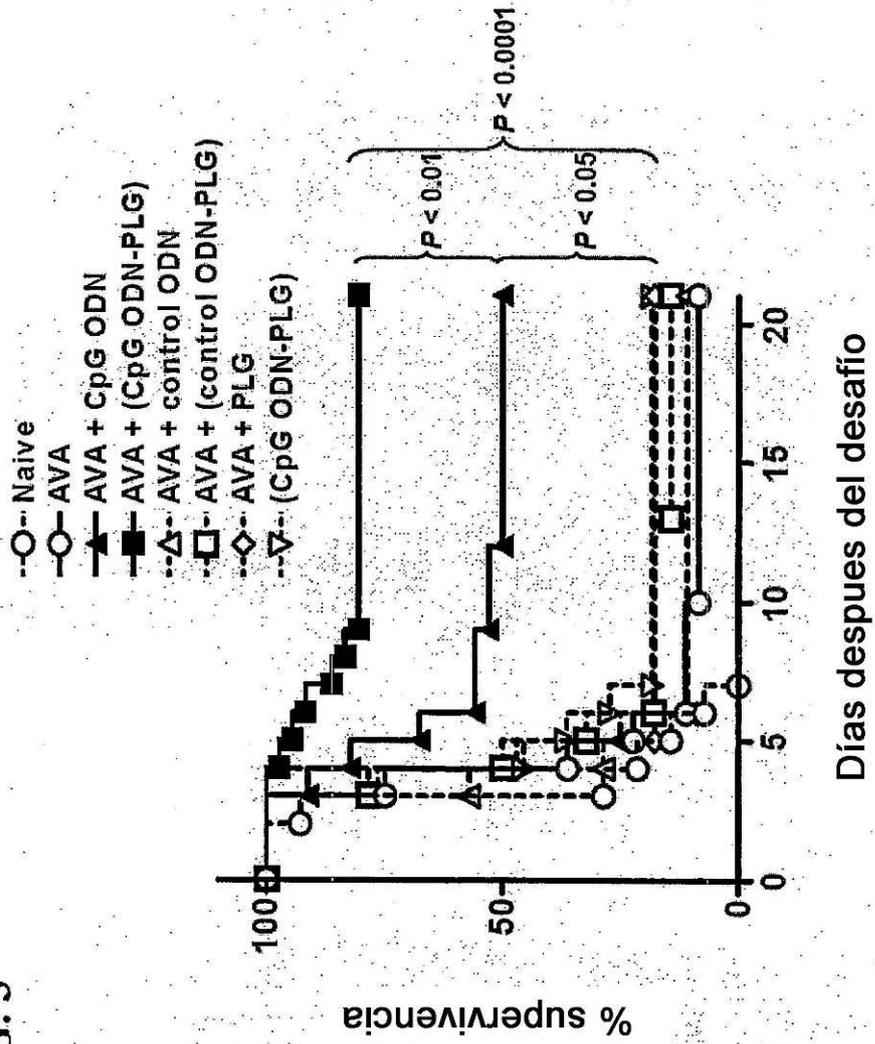


FIG. 4A

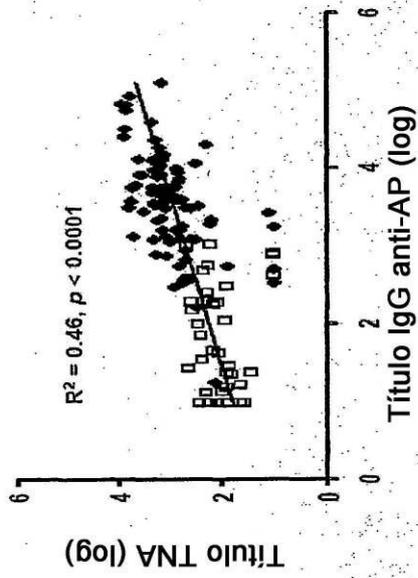


FIG. 4B

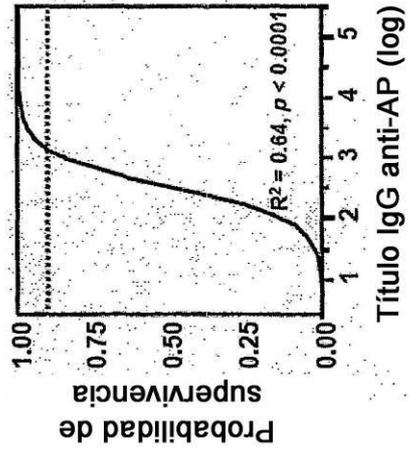


FIG. 4C

