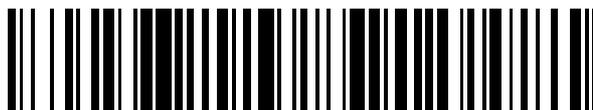


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 091**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 09739571 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2282771**

54 Título: **Procedimiento para producir nanopartículas**

30 Prioridad:

**28.04.2008 US 48428 P**

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

**24.09.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CHAKRAPANI, ARAVIND;  
SINGH, MANMOHAN y  
O'HAGAN, DEREK T.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 498 091 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).

**Procedimiento para producir nanopartículas****Descripción**

## 5 ANTECEDENTES

10 En las técnicas farmacéuticas se utilizan comúnmente vehículos particulados. Por ejemplo, se han utilizado vehículos particulados con antígenos adsorbidos o inmovilizados en tentativas para inducir respuestas inmunitarias adecuadas. Tales vehículos presentan al sistema inmunitario múltiples copias de un antígeno seleccionado y se cree que promueven la inmovilización y retención de antígenos en los ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por los macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígenos a través de la liberación de citocinas.

15 Por ejemplo, en la publicación internacional del mismo solicitante N° WO 98/33487 y en la publicación relacionada N° US 2003/0049298 se describe el uso de micropartículas con antígeno encapsulado y con antígeno adsorbido para estimular las respuestas inmunitarias, incluidas las respuestas inmunitarias celulares, así como métodos de fabricación de las micropartículas. Los polímeros utilizados para formar las micropartículas incluyen poli(lactida) y poli(lactida-co-glicólido) (PLG).

20 En la publicación internacional del mismo solicitante N° WO 00/06123 y WO 01/36599 y en la patente de EE.UU. N° 6.884.435 se describen métodos de fabricación de micropartículas que tienen macromoléculas adsorbidas, incluidos antígenos polipeptídicos y polinucleótidos. Las micropartículas comprenden, por ejemplo, un polímero biodegradable y se forman utilizando, por ejemplo, detergentes catiónicos, aniónicos o no iónicos. Las micropartículas que contienen detergentes aniónicos pueden utilizarse con macromoléculas cargadas positivamente, tales como polipéptidos. Las micropartículas que contienen detergentes catiónicos pueden utilizarse con macromoléculas cargadas negativamente, tales como ADN. También se describe el uso de tales micropartículas para estimular las respuestas inmunitarias, incluidas las respuestas inmunitarias celulares.

30 En la solicitud de patente internacional del mismo solicitante N° PCT/US06/46212 se describen composiciones de nanopartículas liofilizadas esterilizadas por filtración que contienen al menos un polímero biodegradable, al menos un tensioactivo, al menos un agente crioprotector y al menos un antígeno. También se describen métodos para fabricar y utilizar tales composiciones y kits que suministran tales composiciones. Las nanopartículas se crean utilizando el método de nanoprecipitación.

## 35 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

40 La invención se define en las reivindicaciones. En diversos aspectos de la presente descripción, se proporcionan composiciones de nanopartículas que comprenden (a) nanopartículas que comprenden uno o más polímeros biodegradables y (b) uno o más productos farmacéuticos asociados con las nanopartículas.

En determinadas formas de realización, las composiciones de nanopartículas son composiciones de nanopartículas esterilizadas por filtración, que pueden estar liofilizadas o no.

45 En determinadas formas de realización, las nanopartículas dentro de las composiciones de la presente descripción tienen por lo general una granulometría en la que el valor  $D(v, 0,5)$  y/o el Z medio es inferior a 200 nm, y más generalmente inferior a 150 nm y en la que el  $D(v, 0,9)$  es inferior a 250 nm, y más generalmente inferior a 200 nm.

50 En determinadas formas de realización, los polímeros biodegradables dentro de las nanopartículas son polímeros biodegradables sintéticos, por ejemplo, seleccionados de entre poliésteres que incluyen poli( $\alpha$ -hidroxiácidos) y policaprolactonas, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, y combinaciones de los mismos, entre otros.

55 En algunos aspectos, los productos farmacéuticos pueden ser especies inmunógenas.

En determinadas formas de realización, las especies inmunógenas son especies que estimulan una respuesta inmunitaria adaptativa. Por ejemplo, la especie inmunógena en las presentes formas de realización puede comprender uno o más antígenos. Los ejemplos de antígenos incluyen antígenos que contienen polipéptidos, antígenos que contienen polisacáridos y antígenos que contienen polinucleótidos, entre otros. Los antígenos pueden derivarse, por ejemplo, de células tumorales y de organismos patógenos tales como virus, bacterias, hongos y parásitos, entre otras fuentes.

60 En determinadas formas de realización, las especies inmunógenas son especies que estimulan una respuesta inmunitaria innata. Por ejemplo, la especie inmunógena puede ser un activador de uno o más de los siguientes receptores, entre otros: receptores tipo Toll (TLR), proteínas con dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) y receptores que inducen fagocitosis, tales como receptores scavenger, receptores de manosa y

receptores de  $\beta$ -glucano.

5 En determinadas formas de realización, la especie inmunógena puede estar seleccionada, por ejemplo, de entre uno o más de los siguientes adyuvantes inmunitarios: lipopolisacáridos bacterianos, peptidoglicano, lipoproteínas bacterianas, flagelinas bacterianas, compuestos de imidazoquinolina, oligonucleótidos inmunoestimuladores, ARN monocatenario, saponinas, ácido lipotecoico, toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de las mismas, polifosfaceno, péptidos de muramilo, compuestos de tiosemicarbazona, compuestos de triptatrina y derivados de lípido A, entre otros.

10 En determinadas formas de realización, la especie inmunógena puede estar seleccionada, por ejemplo, de entre uno o más inmunopotenciadores de molécula pequeña. Por ejemplo, la especie inmunógena puede estar seleccionada de entre compuestos de imidazoquinolina tales como resimiquod, imiquimod e imidazoquinolina 090, entre otros.

15 En determinadas formas de realización, las composiciones comprenden opcionalmente al menos un tensioactivo. En algunas formas de realización, las composiciones comprenden opcionalmente al menos un agente crioprotector. En algunas formas de realización, las composiciones comprenden opcionalmente al menos un tensioactivo y al menos un agente crioprotector. Los ejemplos de agentes crioprotectores incluyen polioles, carbohidratos y combinaciones de los mismos, entre otros. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos aniónicos y tensioactivos zwitteriónicos, entre otros. Pueden añadirse tensioactivos y/o agentes crioprotectores, por ejemplo, para asegurar que las nanopartículas liofilizadas puedan resuspenderse sin un aumento de tamaño inaceptable (por ejemplo, sin agregación significativa).

20 La invención se refiere a métodos para producir composiciones de nanopartículas que comprenden al menos un polímero biodegradable.

25 Por ejemplo, en algunas formas de realización, las composiciones de nanopartículas se producen a partir de un método que comprende poner en contacto un primer líquido que comprende uno o más polímeros biodegradables disueltos en un primer disolvente con un segundo líquido que comprende un segundo disolvente que es miscible con el primer disolvente al tiempo que es un no disolvente para el uno o más polímeros biodegradables, de manera que se formen nanopartículas. Los líquidos primero y segundo se ponen en contacto en condiciones de agitación suave, preferentemente sin remover o removiendo poco. Por ejemplo, la agitación suave se lleva a cabo utilizando un agitador giratorio, entre otras posibilidades.

30 En algunas formas de realización, las composiciones de nanopartículas se producen a partir de un método que comprende poner en contacto un primer líquido que comprende uno o más polímeros biodegradables disueltos en un primer disolvente con un segundo líquido que comprende un tampón y un segundo disolvente que es miscible con el primer disolvente, al tiempo que es un no disolvente para el uno o más polímeros biodegradables, de manera que se formen nanopartículas.

35 El primer disolvente puede comprender, por ejemplo, una o más especies de disolventes orgánicos hidrófilos, que pueden estar seleccionados, por ejemplo, de entre acetona y etanol, entre otros. El segundo disolvente puede comprender, por ejemplo, agua, entre otras posibilidades.

40 En algunas de las formas de realización anteriores, el primer líquido se añade al segundo líquido gota a gota, entre otras posibilidades.

45 En determinadas formas de realización, las nanopartículas se recuperan opcionalmente después de la formación.

50 En determinadas formas de realización, las nanopartículas se liofilizan opcionalmente después de la formación.

55 En determinadas formas de realización, el primer disolvente es más volátil que el segundo disolvente y se deja evaporar.

60 En determinadas formas de realización, la concentración de polímero biodegradable en el primer líquido va del 0,25% p/v al 5% p/v (por ejemplo, variando del 0,25% p/v al 0,5% p/v al 1% p/v al 2% p/v al 3% p/v al 5% p/v), más generalmente del 0,5% p/v al 3% p/v.

Los métodos tales como los anteriores resultan ventajosos, por ejemplo, en cuanto a que el rendimiento para las nanopartículas, en base a la cantidad de polímero biodegradable en la solución que se recupera en forma de nanopartículas, puede ser alto, por ejemplo, variando del 90% al 95% o más.

65 En algunas formas de realización, se añaden uno o más productos farmacéuticos durante o después de la formación de las nanopartículas. Por ejemplo, puede añadirse una o más especies inmunógenas (por ejemplo,



Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, 5ª ed. (Blackwell Publishers, 1996); Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); Ausubel, F. M. *et al.*, Short Protocols In Molecular Biology, 5ª ed. (Current Protocols, 2002); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S., ed., CRC Press, 2003) y Seymour/Carraher's Polymer Chemistry, 7ª ed. (CRC Press, 2007).

5 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en cualquiera de las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, el término "nanopartícula" se refiere a una o más nanopartículas, y similares.

10 A menos que se indique lo contrario o a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, todos los porcentajes y relaciones en el presente documento se dan en base al peso.

#### A. Definiciones

15 En la descripción de la presente invención, se entiende que los siguientes términos se definen como se indica a continuación.

20 El término "nanopartícula", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una partícula inferior a 1.000 nm de diámetro.

25 El tamaño de partícula puede determinarse (medirse) utilizando los métodos disponibles en la técnica. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede determinarse mediante espectroscopia de correlación de fotones, dispersión dinámica de luz o dispersión casi-elástica de luz. Estos métodos se basan en la correlación del tamaño de partícula con las propiedades de difusión de las partículas obtenidas a partir de mediciones del movimiento browniano. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo por las moléculas de disolvente que rodean las partículas. Cuanto mayor sea la partícula, más lento será el movimiento browniano. La velocidad se define mediante el coeficiente de difusión traslacional. El valor medido se refiere a cómo se mueve una partícula dentro de un líquido (diámetro hidrodinámico). El diámetro que se obtiene es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula.

30 El tamaño de partícula también puede determinarse mediante la dispersión estática de luz, que mide la intensidad de la luz dispersada por las partículas en una solución en un único momento. La dispersión estática de luz mide la intensidad de la luz en función del ángulo de dispersión y la concentración de soluto. Las partículas que pasan a través de una fuente de luz, por ejemplo, un haz de láser, dispersan la luz con un ángulo que es inversamente proporcional a su tamaño. Las partículas grandes generan un patrón de difracción con ángulos de dispersión bajos con alta intensidad, mientras que las partículas pequeñas dan lugar a señales de baja intensidad con ángulos amplios. Puede calcularse las distribuciones de tamaño de partícula si la intensidad de la luz dispersada a partir de una muestra se mide en función del ángulo. La información angular se compara con un modelo de dispersión (por ejemplo, la teoría de Mie) con el fin de calcular la granulometría.

35 40 Generalmente, el tamaño de partícula se determina a temperatura ambiente e implica múltiples análisis de la muestra en cuestión (por ejemplo, al menos 3 mediciones repetidas en la misma muestra) para obtener un valor medio para el diámetro de partícula.

45 Para la espectroscopia de correlación de fotones, el Z medio (también denominado media por cumulantes o diámetro hidrodinámico) se calcula por lo general a partir del análisis (monomodal) por cumulantes.

50 Para las mediciones de dispersión estática de luz (y también para la espectroscopia de correlación de fotones en algunas formas de realización), pueden medirse los parámetros de tamaño en base al volumen. Por ejemplo, el  $D(v, 0,5)$  (donde  $v$  significa volumen) es un parámetro de tamaño cuyo valor se define como el punto en el que el 50% de las partículas (en base al volumen) en la composición, tal como se mide, tienen un tamaño inferior al valor  $D(v, 0,5)$ , y el 50% de las partículas en la composición tienen un tamaño superior al valor  $D(v, 0,5)$ . Del mismo modo, el  $D(v, 0,9)$  es un parámetro de tamaño cuyo valor se define como el punto en el que el 90% (en base al volumen) de las partículas en la composición tienen un tamaño inferior al valor  $D(v, 0,9)$  y el 10% de las partículas en la composición tienen un tamaño superior al valor  $D(v, 0,9)$ .

55 60 Las nanopartículas dentro de las composiciones tienen por lo general una granulometría en la que el Z medio y/o el valor  $D(v, 0,5)$  es inferior a 200 nm, y más generalmente inferior a 150 nm y en la que el  $D(v, 0,9)$  es inferior a 250 nm, y más generalmente inferior a 200 nm.

Tal como se define en el presente documento, una "especie de disolvente orgánico" es una especie de disolvente que comprende al menos un átomo de carbono.

65 Tal como se define en el presente documento, un líquido "acuoso" es un líquido que contiene agua, por lo general un líquido que contiene más del 50% en peso de agua, por ejemplo del 50% al 75% al 90% al 95% en peso, o más, de agua.

Tal como se define en el presente documento, un disolvente "acuoso" es un disolvente que contiene agua, por lo general un disolvente que contiene más del 50% en peso de agua, por ejemplo del 50% al 75% al 90% al 95% en peso, o más, de agua.

5 Tal como se define en el presente documento, una "suspensión de nanopartículas" es una fase líquida que contiene nanopartículas.

10 Una "suspensión acuosa de nanopartículas" es un líquido que contiene agua que contiene adicionalmente nanopartículas. Las suspensiones acuosas de nanopartículas según la invención contienen por lo general más del 50% en peso de agua, por ejemplo del 50% al 75% al 90% al 95% en peso, o más, de agua.

15 Las nanopartículas de la invención se forman por lo general a partir de polímeros que son sustancialmente no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen poliésteres tales como poli( $\alpha$ -hidroxiácidos) y polilactonas (por ejemplo, policaprolactona), poliortoésteres, polianhídridos y policianoacrilatos (por ejemplo, polialquilcianoacrilato o "PACA"), entre otros. Más generalmente, las nanopartículas para su uso con la presente invención son nanopartículas poliméricas derivadas de poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), por ejemplo, de una poli(lactida) ("PLA") tal como poli(D,L-lactida), un copolímero de lactida y glicólido, tal como una poli(D,L-lactida-co-glicólido) o poli(L-lactida-co-glicólido) (ambos conocidos como "PLG") o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Las nanopartículas poliméricas pueden formarse a partir de polímeros con diversos pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros, tales como PLG, diversas relaciones entre monómeros (por ejemplo, láctido:glicólido). También se dispone de polímeros con diversos grupos terminales. Estos parámetros se analizan más adelante.

25 El término "tensoactivo" proviene de la expresión "agente con actividad superficial". Los tensoactivos se acumulan en las interfaces (por ejemplo, en las interfaces líquido-líquido, líquido-sólido y/o líquido-gas) y cambian las propiedades de la interfaz. Tal como se utilizan en el presente documento, los tensoactivos incluyen detergentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, estabilizadores de emulsiones, y similares.

30 Tal como se define en el presente documento, "carbohidratos" incluye monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, así como sustancias derivadas de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, por ejemplo, por reducción (por ejemplo, alditoles), por oxidación de uno o más grupos terminales a ácidos carboxílicos (por ejemplo, ácido glucurónico) o por sustitución de uno o más grupos hidroxilo por un átomo de hidrógeno o un grupo amino (por ejemplo, beta-D-glucosamina y beta-D-galactosamina).

35 Tal como se define en el presente documento, un "monosacárido" es un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que comprende adicionalmente 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 contienen por lo general 3-10 átomos de carbono. Además, los monosacáridos tienen comúnmente la fórmula empírica  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , donde n es un número entero de tres o más, por lo general 3-10. Los ejemplos de aldosas de 3-6 átomos de carbono incluyen gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, 2-desoxirribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa. Los ejemplos de cetosas de 3-6 átomos de carbono incluyen dihidroxiacetona, eritrolosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa y tagatosa. Los monosacáridos naturales se encuentran normalmente en forma de isómero D, a diferencia de la forma L.

45 Tal como se define en el presente documento "oligosacárido" se refiere a un polímero de monosacáridos relativamente corto, es decir, uno que contiene de 2 a 30 unidades de monosacárido. Tal como se define en el presente documento, un "polisacárido" es un polímero de monosacáridos que supera la longitud del oligosacárido (es decir, uno que contiene más de 30 unidades de monosacárido). Por otra parte, tal como se utiliza en el presente documento, el término "polisacárido" también se refiere a un polímero de monosacáridos que contiene dos o más monosacáridos unidos. Para evitar la ambigüedad, se aplicará en todo momento la segunda definición, a menos que haya indicaciones explícitas en sentido contrario. El término "polisacárido" también incluye derivados polisacarídicos, tales como derivados polisacarídicos con funcionalidad amino y con funcionalidad carboxilo, entre muchos otros. Los monosacáridos están por lo general unidos mediante enlaces glicosídicos. Los ejemplos específicos incluyen disacáridos (tales como sacarosa, lactosa, trehalosa, maltosa, gentiobiosa y celobiosa), trisacáridos (tales como rafinosa), tetrasacáridos (tales como estaquiosa) y pentasacáridos (tales como verbascosa).

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sacárido" abarca monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Una "especie que contiene sacáridos" es una molécula, al menos una porción de la cual es un sacárido. Los ejemplos incluyen agentes crioprotectores sacarídicos, antígenos sacarídicos, antígenos que comprenden sacáridos conjugados con péptidos transportadores, y así sucesivamente.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, un "agente crioprotector" es un agente que protege a una composición para que no experimente efectos adversos tras la congelación y la descongelación. Por ejemplo, en la presente invención, pueden añadirse agentes crioprotectores para evitar que se produzca aglomeración sustancial de nanopartículas cuando se resuspenden las composiciones liofilizadas de la invención.

65 Un "polinucleótido" es un polímero de ácidos nucleicos. Tal como se utiliza en el presente documento, un

"polinucleótido" puede incluir tan sólo 5, 6, 7 u 8 nucleótidos. Además, un "polinucleótido" puede incluir secuencias bicatenarias y monocatenarias y se refiere a, pero no se limita a, ADNc de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias de ARN y ADN genómico de ADN viral (por ejemplo, virus y retrovirus de ARN y ADN) o procariota, y secuencias de ADN sintético. El término recoge también secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de ADN y ARN conocidos. El término incluye adicionalmente modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora) a una secuencia original, por ejemplo, en las que la molécula de ácido nucleico codifica una proteína antigénica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de los hospedadores que producen los antígenos.

Tal como se define en el presente documento un "oligonucleótido" es un polinucleótido que tiene un tamaño en el intervalo de 5 a 100 nucleótidos, más generalmente, de 5 a 30 nucleótidos.

Tal como se define en el presente documento, una "especie que contiene polinucleótidos" es una molécula, al menos una porción de la cual es un polinucleótido.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limita a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, están incluidos dentro de la definición proteínas, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares. Las proteínas para su uso en el presente documento incluyen proteínas de longitud completa y fragmentos de proteínas. En determinadas formas de realización, se emplean modificaciones de la secuencia original, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora).

Una "especie que contiene polipéptidos" es una molécula, al menos una porción de la cual es un polipéptido. Los ejemplos incluyen polipéptidos, glicoproteínas, metaloproteínas, lipoproteínas, antígenos sacarídicos conjugados con proteínas transportadoras, y así sucesivamente.

La expresión "producto farmacéutico" se refiere a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, antivirales, factores de crecimiento, hormonas, antígenos, adyuvantes inmunitarios, y similares.

El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que ayuda o modifica la acción de un producto farmacéutico, incluido pero no limitado a los adyuvantes inmunitarios, que aumentan y/o diversifican la respuesta inmunitaria frente a un antígeno. Por lo tanto, los adyuvantes inmunitarios son compuestos que son capaces de potenciar una respuesta inmunitaria frente a los antígenos. Los adyuvantes inmunitarios pueden potenciar la inmunidad humoral y/o celular. En algunas formas de realización, los adyuvantes inmunitarios estimulan una respuesta inmunitaria innata. Los adyuvantes inmunitarios también pueden denominarse en el presente documento "inmunopotenciadores."

Tal como se utiliza en el presente documento, un "antígeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítomos (por ejemplo, lineales, conformacionales o ambos) que induce una respuesta inmunitaria. El término puede utilizarse indistintamente con el término "inmunógeno".

Tal como se utiliza en el presente documento, un "epítomo" es la porción de una determinada especie (por ejemplo, una molécula antigénica o un complejo antigénico) que determina su especificidad inmunitaria. Un epítomo está dentro del alcance de la presente definición de antígeno. Comúnmente, un epítomo es un polipéptido o polisacárido en un antígeno natural. En los antígenos artificiales, puede ser una sustancia de bajo peso molecular tal como un derivado de ácido arsánico. Normalmente, un epítomo de linfocitos B incluirá al menos aproximadamente 5 aminoácidos, pero puede tener tan solo 3-4 aminoácidos. Un epítomo de linfocito T, tal como un epítomo de CTL, incluirá por lo general al menos aproximadamente 7-9 aminoácidos, y un epítomo de linfocito T cooperador incluirá por lo general al menos aproximadamente 12-20 aminoácidos.

El término "antígeno", tal como se utiliza en el presente documento, indica antígenos de subunidades, es decir, antígenos que son distintos y están separados de un organismo completo con el que el antígeno está asociado en la naturaleza, así como células tumorales o bacterias, virus, parásitos u otros patógenos muertos, atenuados o inactivados. Los anticuerpos tales como los anticuerpos antiidiotipo, o fragmentos de los mismos, y mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también quedan recogidos en la definición de antígeno tal como se utiliza en el presente documento. Del mismo modo, también se incluye en la definición de antígeno del presente documento un oligonucleótido o polinucleótido que expresa una proteína inmunógena, o determinante antigénico *in vivo*, tal como en las aplicaciones de inmunización con ácidos nucleicos.

Una "respuesta inmunitaria" frente a un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular frente a las moléculas presentes en la composición de interés.

Las respuestas inmunitarias incluyen la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa. Las respuestas inmunitarias innatas son respuestas de acción rápida que proporcionan una primera línea de defensa del sistema inmunitario. En contraposición, la inmunidad adaptativa utiliza la selección y expansión clonal de las células inmunitarias que tienen genes de receptores somáticamente reordenados (por ejemplo, receptores de linfocitos T y

de linfocitos B) que reconocen antígenos de un patógeno o trastorno determinado (por ejemplo, un tumor), proporcionando de este modo especificidad y memoria inmunitaria. Las respuestas inmunitarias innatas, entre sus muchos efectos, conducen a una rápida ráfaga de citocinas inflamatorias y la activación de células presentadoras de antígenos (APC) tales como macrófagos y células dendríticas. Para distinguir los patógenos de los componentes propios, el sistema inmunitario innato utiliza diversos receptores relativamente invariables que detectan las firmas de los patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP. Se sabe que la adición de componentes microbianos a las vacunas experimentales conduce al desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas robustas y duraderas. Se ha descrito que el mecanismo detrás de esta potenciación de las respuestas inmunitarias implica a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que se expresan de manera diferente en diversas células inmunitarias, incluidos neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos citolíticos espontáneos, linfocitos B y algunas células no inmunitarias, tales como las células epiteliales y endoteliales. La participación de los PRR conduce a la activación de algunas de estas células y de su secreción de citocinas y quimiocinas, así como la maduración y migración de otras células. En tándem, esto crea un entorno inflamatorio que conduce al establecimiento de la respuesta inmunitaria adaptativa. Los PRR incluyen receptores que no inducen la fagocitosis, tal como receptores de tipo Toll (TLR) y proteínas con dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), y receptores que inducen la fagocitosis, tal como receptores scavenger, receptores de manosa y receptores de  $\beta$ -glucano. Los TLR descritos (junto con ejemplos de algunos ligandos descritos, que puede utilizarse como especies inmunógenas en diversas formas de realización de la invención) incluyen los siguientes: TLR1 (lipoproteínas bacterianas de *Mycobacteria*, *Neisseria*), TLR2 (partículas de levadura cimosano, peptidoglicano, lipoproteínas, glucolípidos, lipopolisacárido), TLR3 (ARN bicatenario viral, poli:IC), TLR4 (lipopolisacáridos bacterianos, producto vegetal taxol), TLR5 (flagelinas bacterianas), TLR6 (partículas de levadura cimosano, ácido lipoteicoico, lipopéptidos de micoplasma), TLR7 (ARN monocatenario, imiquimod, resiquimod, y otros compuestos sintéticos tales como loxoribina y bropirimina), TLR8 (ARN monocatenario, resiquimod) y TLR9 (oligonucleótidos CpG), entre otros. Las células dendríticas se reconocen como algunos de los tipos celulares más importantes para iniciar la estimulación de linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> vírgenes (T<sub>H</sub>) y para inducir la diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a linfocitos citolíticos. Se ha descrito que la señalización de TLR desempeña un papel importante en la determinación de la calidad de estas respuestas de linfocitos T cooperadores, por ejemplo, determinando la naturaleza de la señal de TLR el tipo específico de respuesta de T<sub>H</sub> que se observa (por ejemplo, respuesta de T<sub>H</sub>1 *versus* de T<sub>H</sub>2). Como parte de una respuesta de tipo T<sub>H</sub>1, se produce una combinación de inmunidad celular y de anticuerpos (humoral), mientras que una respuesta de tipo T<sub>H</sub>2 es predominantemente una respuesta de anticuerpos. Se ha documentado que diversos ligandos de TLR tales como ADN con CpG (TLR9) e imidazoquinolinas (TLR7, TLR8) estimulan la producción de citocinas a partir de células inmunitarias *in vitro*. Las imidazoquinolinas son los primeros compuestos pequeños, similares a fármacos, que han demostrado ser agonistas de TLR. Para más información, véanse, por ejemplo, A. Pashine, N.M. Valiante y J.B. Ulmer, *Nature Medicine* 11, S63-S68 (2005), K.S. Rosenthal y Zimmerman D.H., *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(8), 821-829 (2006), y las referencias citadas en los mismos.

Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una "respuesta inmunitaria celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros leucocitos sanguíneos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por parte de los linfocitos T citolíticos ("CTL"). Los CTL tienen especificidad para los antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y expresadas en las superficies de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por parte de los linfocitos T cooperadores. Los linfocitos T cooperadores actúan para ayudar a estimular la función, y enfocar la actividad de, células efectoras no específicas contra células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC en su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas semejantes producidas por los linfocitos T activados y/u otros leucocitos sanguíneos, incluidos los derivados de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Por lo tanto, una composición tal como una vacuna o una composición inmunógena que induce una respuesta inmunitaria celular, puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación de antígeno en asociación con moléculas del MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria celular se dirige contra, o cerca de, células que presentan antígenos en su superficie. Además, pueden generarse linfocitos T específicos de antígeno para permitir la protección futura de un hospedador inmunizado. Puede determinarse la capacidad de una composición o antígeno concreto para estimular una respuesta inmunitaria celular mediante varios ensayos conocidos en la técnica, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, ensayando linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado o midiendo la producción de citocinas por los linfocitos T en respuesta a la reestimulación con el antígeno. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Erickson *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:4189-4199; Doe *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2369-2376. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria tal como se utiliza en el presente documento puede ser una que estimula la producción de CTL y/o la producción o activación de linfocitos T cooperadores. El antígeno de interés también puede inducir una respuesta inmunitaria de anticuerpos. Por lo tanto, una respuesta inmunitaria puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes efectos, entre otros: la producción de anticuerpos por parte de, por ejemplo, los linfocitos B; y/o la activación de linfocitos T supresores y/o linfocitos T y $\delta$  dirigidos específicamente contra un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas

respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad y/o mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), o de anticuerpo-complemento, para proporcionar protección a un hospedador inmunizado. Tales respuestas pueden determinarse utilizando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica.

5 Las composiciones inmunógenas según la presente invención presentan "inmunogenicidad potenciada" para un antígeno determinado cuando poseen una mayor capacidad para inducir una respuesta inmunitaria que la respuesta inmunitaria inducida por una cantidad equivalente del antígeno en una composición diferente (por ejemplo, en la que el antígeno se administra en forma de proteína soluble). Por lo tanto, una composición puede presentar  
10 "inmunogenicidad potenciada", por ejemplo, porque la composición genera una respuesta inmunitaria más fuerte, o porque se necesita una dosis más baja o un menor número de dosis de antígeno para conseguir una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra. Tal inmunogenicidad potenciada puede determinarse, por ejemplo, administrando a animales las composiciones de la invención, y controles de antígeno, y comparando los resultados de ensayo de los dos.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" (incluidas las variaciones del mismo, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a cualquiera de (i) la prevención de un patógeno o trastorno en cuestión (por ejemplo, cáncer o una infección patógena, como en una vacuna tradicional), (ii) la reducción o eliminación de los síntomas asociados con un patógeno o trastorno en cuestión, y (iii) la eliminación sustancial o completa de un patógeno o trastorno en cuestión. Por lo tanto, el tratamiento puede efectuarse de manera profiláctica (antes de la aparición del patógeno o trastorno en cuestión) o de manera terapéutica (después de la aparición de los mismos).

20 Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de una composición farmacéutica de la presente invención se refieren en el presente documento a una cantidad suficiente de la composición inmunógena para tratar o diagnosticar una afección de interés. La cantidad exacta necesaria variará de sujeto a sujeto, dependiendo, por ejemplo, en la especie, la edad y el estado general del sujeto; la gravedad de la afección que se está tratando; en el caso de una respuesta inmunitaria, la capacidad del sistema inmunitario 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 materia puede determinar una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual.  
25 Por lo tanto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se encontrará por lo general en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

30 "Sujeto vertebrado" o "animal vertebrado" se refiere a cualquier miembro del suborden cordata, incluidos, sin limitación, mamíferos tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras, caballos y seres humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluidas aves domésticas, silvestres y de caza tales como gallos y gallinas incluidos pollos, pavos y otras gallináceas. La expresión no indica una edad concreta. Por lo tanto, quedan incluidos animales adultos y recién nacidos.

35 "Farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a un material que no es indeseable biológicamente o de otra manera, por ejemplo, el material puede administrarse a un individuo sin que provoque efectos biológicos excesivamente indeseables en el individuo o interactúe de manera excesivamente perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

40 El término "excipiente" se refiere a cualquier sustancia esencialmente accesorio que puede estar presente en la forma farmacéutica terminada. Por ejemplo, el término "excipiente" incluye vehículos, aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, agentes de dispersión/suspensión, y así sucesivamente.

45 Un "pH fisiológico" o un "pH en el intervalo fisiológico" se refiere a un pH en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0 inclusive, más generalmente en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6 inclusive.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "constructo vector" se refiere generalmente a cualquier ensamblaje capaz de dirigir la expresión de una(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos o gen(es) de interés. Un "constructo vector de ADN" se refiere a una molécula de ADN que es capaz de dirigir la expresión de una(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos o gen(es) de interés. Un tipo específico de constructo vector de ADN es un plásmido, que es una molécula de ADN episomal circular capaz de replicación autónoma en una célula hospedadora. Por lo general, un plásmido es un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. El pCMV es un plásmido específico bien conocido en la técnica. Se conocen otros constructos vectores de ADN, que se basan en virus de ARN. Estos constructos vectores de ADN comprenden por lo general un promotor que funciona en una célula eucariota, en el extremo 5' de una secuencia de ADNc para la que el producto de transcripción es un constructo vector de ARN (por ejemplo, un replicón de vector de ARN de alfavirus), y una región de terminación 3'. Otros ejemplos de constructos vectores incluyen constructos vectores de ARN (por ejemplo, constructos vectores de alfavirus) y similares. Tal como se utiliza en el presente documento, "constructo vector de ARN", "replicón de vector de ARN" y "replicón" se refieren a una molécula de ARN capaz de dirigir su propia amplificación o autorreplicación *in vivo*, por lo general dentro de una célula diana. El constructo vector de ARN se utiliza directamente, sin necesidad de introducir ADN en una célula y transportarlo al núcleo donde se produciría la transcripción. Al utilizar el vector de ARN para la administración directa al citoplasma de la célula  
55  
60  
65

hospedadora, la replicación y traducción autónomas de la secuencia de ácido nucleico heteróloga se produce de manera eficaz.

## B. Métodos Generales

Tal como se ha indicado anteriormente, en diversos aspectos, se proporcionan composiciones de nanopartículas que comprenden (a) nanopartículas que comprenden al menos un polímero biodegradable y (b) al menos un producto farmacéutico asociado con las nanopartículas. Gran parte del siguiente análisis se refiere a especies inmunógenas como productos farmacéuticos ejemplares. Sin embargo, la invención no se limita a ello.

Otros aspectos de la invención se refieren a métodos para producir composiciones de nanopartículas que comprenden al menos un polímero biodegradable.

### 1. Composiciones de nanopartículas

Los polímeros útiles para formar composiciones de nanopartículas según la presente invención incluyen homopolímeros, copolímeros y mezclas de polímeros, tanto naturales como sintéticos. Tales polímeros pueden derivarse, por ejemplo, de los siguientes homopolímeros y copolímeros: poli(alfa-hidroxiácidos) incluido ácido poliglicólico (PGA) (también conocido como poliglicólido), ácido poliláctico (PLA) (también conocido como polilactida) y ácido polihidroxibutírico (también conocido como polihidroxibutirato); polidioxanona; policaprolactona; poliortoésteres; policianoacrilatos, polianhídridos; y combinaciones de los mismos. Son más típicos los poli( $\alpha$ -hidroxiácidos) tales como poli(L-lactida), poli(D,L-lactida) (ambos denominados "PLA" en el presente documento), copolímeros de lactida y glicólido, tales como poli(L-lactida-co-glicólido) y poli(D,L-lactida-co-glicólido) (ambos denominados "PLG" en el presente documento).

Los polímeros anteriores están disponibles con diversos pesos moleculares, y un experto en la materia determinará fácilmente el peso molecular apropiado para un uso determinado. Por lo tanto, por ejemplo, un peso molecular adecuado para PLA puede estar en el orden de aproximadamente 2.000 a 5.000. Un peso molecular adecuado para PLG puede variar de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 200.000.

Cuando se emplean copolímeros, puede disponerse de copolímeros con diversas relaciones de monómeros. Por ejemplo, cuando se utiliza PLG para formar las nanopartículas, se utilizarán diversas relaciones molares de lactida:glicólido en el presente documento, y la relación es en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de cualquier especie coadministrada (por ejemplo, adsorbida, inmovilizada o asociada de otro modo con las nanopartículas) y la velocidad de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero de PLG 50:50, que contiene lactida al 50% y glicólido al 50%, proporcionará un copolímero de resorción más rápida, mientras que un PLG 75:25 se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10, aún más lentamente, debido al aumento del componente lactida. Las mezclas de nanopartículas con distintas relaciones lactida:glicólido también pueden utilizarse en el presente documento a fin de conseguir la cinética de liberación deseada. También puede controlarse la velocidad de degradación de las nanopartículas de la presente invención mediante factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero.

Cuando se utilizan copolímeros de PLG, son por lo general aquellos con una relación molar lactida:glicólido que va, por ejemplo, de 10:90 a 20:80 a 25:75 a 40:60 a 45:55 a 55:45 a 60:40 a 75:25 a 80:20 a 90:10, y con un peso molecular que va, por ejemplo, de 5.000 a 10.000 a 20.000 a 40.000 a 50.000 a 70.000 a 100.000 a 200.000 Daltons, entre otros.

También se dispone de copolímeros de PLG con diversos grupos terminales, incluidos grupos terminales ácidos y grupos terminales éster.

Pueden adquirirse fácilmente en el mercado copolímeros de PLG con diferentes relaciones lactida:glicólido, pesos moleculares y grupos terminales, de varias fuentes que incluyen Boehringer Ingelheim, Alemania, Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL, EE.UU. y Lakeshore Biomateriales, Birmingham, AL, EE.UU. Algunos copolímeros de PLG ejemplares, disponibles en Boehringer Ingelheim, incluyen: (a) RG 502, un PLG que tiene predominantemente grupos terminales éster de alquilo en uno de los extremos de la cadena, una relación molar lactida:glicólido de 50:50 y un peso molecular de 12.000 Da, (b) RG 503, un PLG que tiene predominantemente grupos terminales éster de alquilo en uno de los extremos de la cadena, una relación molar lactida:glicólido de 50:50 y un peso molecular de 34.000 Da, (c) RG 504, un PLG que tiene predominantemente grupos terminales éster de alquilo en uno de los extremos de la cadena, una relación molar lactida:glicólido de 50:50 y un peso molecular de 48.000 Da, (d) RG 752, un PLG que tiene predominantemente grupos terminales éster de alquilo en uno de los extremos de la cadena, una relación molar lactida:glicólido de 75:25 y un peso molecular de 22.000 Da, (e) RG 755, un PLG que tiene predominantemente grupos terminales éster de alquilo en uno de los extremos de la cadena, una relación molar lactida:glicólido de 75:25 y un peso molecular de 68.000 Da, (f) RG 502H, un PLG que tiene una relación molar lactida:glicólido de 50:50, y que tiene predominantemente grupos terminales carboxilo libres en uno de los extremos de la cadena, y (g) RG 503H, un PLG que tiene una relación molar lactida:glicólido de 50:50, y que tiene predominantemente grupos terminales carboxilo libres en uno de los extremos de la cadena.

Las nanopartículas pueden prepararse utilizando diversos métodos adecuados.

5 En determinadas formas de realización, un primer líquido que comprende uno o más polímeros biodegradables disueltos en un primer disolvente se pone en contacto con un segundo líquido que comprende un segundo disolvente que es miscible con el primer disolvente, siendo un no disolvente para el uno o más polímeros biodegradables, de manera que se formen las nanopartículas.

En algunas de estas formas de realización, el segundo disolvente es un disolvente acuoso.

10 En determinadas formas de realización, el segundo líquido comprende un tampón.

15 En determinadas formas de realización, el primer líquido puede ponerse en contacto con el segundo líquido mediante diversas técnicas adecuadas, siendo la idea general que los dos líquidos se combinen mezclándose lo mínimo. Por ejemplo, el primer líquido puede verterse con cuidado sobre el segundo líquido, o el primer líquido puede inyectarse suavemente en o sobre el segundo líquido, entre otras posibilidades. En una forma de realización, el primer líquido se añade gota a gota a la superficie del segundo líquido.

20 En determinadas formas de realización, durante o después de poner en contacto los líquidos primero y segundo, se deja que los líquidos interactúen entre sí en condiciones de agitación suave (por ejemplo, sin remover o removiendo poco), o sin agitar en absoluto, para producir las nanopartículas. La agitación suave puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando un agitador giratorio, entre otras posibilidades.

25 Se ha descubierto que combinar los líquidos con agitación suave puede dar como resultado partículas con una granulometría uniforme con mayores rendimientos que los obtenidos removiendo. Por ejemplo, el rendimiento, en base a la cantidad de polímero biodegradable que se recupera en forma de nanopartículas, es mayor con el método en el que los líquidos se combinan con agitación (por ejemplo, variando del 90% o más) que el rendimiento con el método en el que los líquidos se combinan removiendo (por ejemplo, 60% o menos).

30 Los líquidos primero y segundo pueden combinarse a cualquier volumen relativo adecuado. Por ejemplo, los líquidos primero y segundo pueden combinarse a volúmenes relativos seleccionados de entre 1:10 a 1:5 a 1:2 a 1:1 a 2:1 a 5:1 a 10:1, más generalmente de 1:2 a 2:1, aún más generalmente aproximadamente 1:1.

35 La concentración de polímero biodegradable en el primer líquido puede ajustarse a cualquier nivel adecuado, pero por lo general va del 0,25% p/v al 5% p/v (por ejemplo, variando del 0,25% p/v al 0,5% p/v al 1% p/v al 2% p/v al 3% p/v al 4% p/v al 5% p/v), más generalmente del 0,5% p/v al 3% p/v. En general, la concentración de polímero influiría en el tamaño de partícula, produciendo las menores concentraciones menores tamaños de partícula. La concentración de polímero también puede influir en la eficacia de encapsulación de los productos farmacéuticos que se introducen durante el proceso de formación de las nanopartículas.

40 El primer disolvente puede comprender, por ejemplo, una o más especies de disolventes orgánicos, por ejemplo, una o más especies de disolventes orgánicos hidrófilos que pueden seleccionarse de entre acetona y etanol, entre muchos otros.

45 El segundo disolvente puede comprender, por ejemplo, agua y/o una o más especies de disolventes orgánicos hidrófilos, entre otras posibilidades. Por ejemplo, el segundo líquido puede seleccionarse de entre agua desionizada, solución salina normal y soluciones tamponadas. Estas 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 las condiciones fisiológicas normales. En otras formas de realización, las características de tonicidad y/o de pH de las composiciones de la presente invención pueden ajustarse después de la formación de las nanopartículas.

50 El segundo líquido también puede comprender un tampón, por ejemplo, para potenciar la eficacia de encapsulación. Se dispone de tampones que pueden mantener el pH del segundo líquido dentro de un intervalo de pH deseado cuando se ponen en contacto entre sí los líquidos primero y segundo. Por ejemplo, se dispone de tampones en el mercado que están diseñados para mantener valores de pH que van de 2 o menos a 3 a 4 a 5 a 6 a 7 a 8 a 9 a 10 a 11 a 12 o más. Los siguientes son algunos ejemplos de tampones disponibles en el mercado (disponibles en Sigma-Aldrich y/o Polysciences Inc.): solución tampón de citrato (pH ~ 4,8), tampón de acetato de sodio (pH ~ 5,2, pH-7,0), tampón de citrato fosfato (pH ~ 5,0), tampón SSC (pH ~ 7,0), PBS (pH ~ 7,2 a 7,5), tampón SSPE (pH ~ 7,4), solución salina tamponada con Tris (pH ~ 7,4), Tris-fosfato-EDTA (pH ~ 8,0), tampón de bicarbonato de trietilamonio (pH ~ 8,0), Tris-EDTA (pH ~ 8,0), Tris-borato-EDTA (pH ~ 8,3), Tris-glicina (pH ~ 8,3), Tris-acetato-EDTA (pH ~ 8,3), tampón de bicarbonato de trietilamonio (pH ~ 8,5), tampón de Tris-glicina-SDS (pH ~ 8,6), solución tampón de glicina (pH ~ 9,2), y tampón de bicarbonato de sodio-carbonato de sodio (pH ~ 9,6), entre otros.

65 En determinadas formas de realización, el primer disolvente es más volátil que el segundo disolvente. En estas formas de realización, el primer disolvente puede eliminarse, por ejemplo, por evaporación en condiciones

ambientales o por evaporación a presión reducida y/o a temperatura elevada.

En algunas formas de realización, se añaden una o más especies adicionales durante o después de la formación de las nanopartículas. Tales especies adicionales pueden incluir, por ejemplo, productos farmacéuticos tales como especies inmunógenas (por ejemplo, especies que estimulan una respuesta inmunitaria innata, especies que estimulan una respuesta inmunitaria adaptativa, o ambas, incluidos adyuvantes inmunitarios, inmunopotenciadores y antígenos), tensioactivos, agentes crioprotectores y otros componentes suplementarios tales como agentes de ajuste de la tonicidad, agentes de ajuste del pH, y así sucesivamente.

En estas formas de realización, la una o más especies adicionales pueden estar inmovilizadas dentro de las nanopartículas, asociadas con las superficies de las nanopartículas (por ejemplo, adsorbidas o conjugadas a las superficies de las nanopartículas), mezcladas con las nanopartículas en una composición líquida o sólida (por ejemplo, proporcionadas en solución, como una suspensión acuosa, coliofilizadas con las nanopartículas, etc.), y/o asociadas de otro modo con las nanopartículas.

En algunas formas de realización de la invención, se añaden una o más especies adicionales durante el método de formación de nanopartículas anteriormente descrito. Por ejemplo, el primer líquido, el segundo líquido, o ambos, pueden contener especies adicionales como se desee.

Como ejemplo específico, además de uno o más polímeros biodegradables disueltos en un disolvente orgánico, el primer líquido puede comprender adicionalmente uno o más productos farmacéuticos (que pueden estar, por ejemplo, disueltos o suspendidos en el primer líquido). Por consiguiente, el uno o más productos farmacéuticos quedan inmovilizados en las nanopartículas.

En algunas de estas formas de realización, el segundo líquido puede comprender un tampón. El tampón puede seleccionarse, por ejemplo, para mantener el pH del segundo líquido en un punto en el que el producto farmacéutico esté predominantemente no cargado. En las formas de realización en las que el producto farmacéutico es un producto farmacéutico aceptor de protones, el tampón puede seleccionarse, por ejemplo, para mantener un pH superior a la pKa del producto farmacéutico. En las formas de realización en las que el producto farmacéutico es un producto farmacéutico donador de protones, el tampón puede seleccionarse para mantener un pH inferior a la pKa del producto farmacéutico.

En determinadas formas de realización, la cantidad de producto farmacéutico proporcionada (por ejemplo, especie inmunógena, etc.) va del 0,25% p/p al 5% p/p con respecto a la cantidad de polímero biodegradable utilizado en el proceso (por ejemplo, variando del 0,25% p/p al 0,5% p/p al 1% p/p al 2% p/p al 3% p/p al 4% p/p al 5% p/p).

Cuando el producto farmacéutico se añade al primer líquido, para concentraciones de polímero que van del 0,5% p/v al 3% p/v (de 5 g/ml a 30 g/ml) en el primer líquido, un intervalo del 0,5% p/p al 3% p/p para el producto farmacéutico con respecto a la cantidad de polímero corresponde a concentraciones globales en el primer líquido que van del 0,0025% p/v al 0,09% p/v (es decir, de 25 a 900 microgramos por ml, más generalmente de 100 a 600 microgramos por ml).

Métodos tales como los anteriores resultan ventajosos, por ejemplo, en cuanto a que la eficacia de encapsulación para el producto farmacéutico puede ser bastante alta, por ejemplo, variando del 50% al 60% al 70% al 80% al 90% o más.

La agitación vigorosa tras combinar los líquidos primero y segundo (por ejemplo, removiendo con una barra de agitación magnética), en ausencia de un tampón en el segundo líquido, da como resultado eficacias de encapsulación muy inferiores.

En algunas formas de realización de la invención, se añaden una o más especies adicionales con posterioridad a la formación de las nanopartículas (y por lo general con posterioridad a la eliminación del disolvente orgánico, así como con posterioridad a las etapas de lavado, en caso de haberlas). Por ejemplo, pueden añadirse productos farmacéuticos tales como especies inmunógenas (por ejemplo, antígenos, adyuvantes inmunitarios, inmunopotenciadores, etc.), agentes para ajustar la tonicidad y/o el pH, tensioactivos, agentes crioprotectores, y así sucesivamente, con posterioridad a la formación de las nanopartículas. Con frecuencia, estas especies adicionales se añaden a las nanopartículas como una dispersión o solución acuosa. En algunas formas de realización la mezcla resultante puede liofilizarse.

Como se ha indicado anteriormente, las especies adicionales pueden estar asociadas con las superficies de las nanopartículas (por ejemplo, adsorbidas o conjugadas a las superficies de las nanopartículas) y/o asociadas de otra manera o no asociadas con las nanopartículas en diversos grados (por ejemplo, mezcladas con las nanopartículas en una dispersión líquida, en una composición sólida, etc.), entre otras posibilidades.

Quando se emplean dos productos farmacéuticos (por ejemplo, especies inmunógenas, etc.), éstos pueden, por ejemplo, fijarse a (por ejemplo, adsorberse o conjugarse con) o inmovilizarse dentro de la misma población de

nanopartículas, o fijarse a o inmovilizarse dentro de poblaciones distintas de nanopartículas, entre otras posibilidades.

5 Las composiciones según algunas formas de realización de la invención pueden esterilizarse por filtración (por ejemplo, mediante un filtro de 200 micras) en cualquier momento después de la formación de las nanopartículas, por ejemplo, después de la formación de las nanopartículas, pero antes de la adición de cualquier especie adicional, después de la formación de las nanopartículas y después de la adición de cualquier especie adicional, y así sucesivamente.

10 Las nanopartículas dentro de las composiciones de la presente invención (incluidas las composiciones liofilizadas que han sido resuspendidas) tienen por lo general una granulometría en la que el Z medio y/o el valor  $D(v, 0,5)$  es inferior a 200 nm, y más generalmente inferior a 150 nm y en la que el  $D(v, 0,9)$  es inferior a 250 nm, y más generalmente inferior a 200 nm.

15 Tomando como ejemplo las nanopartículas formadas utilizando PLG, existen varias ventajas de las técnicas de la presente invención, en comparación con las técnicas de formación de micropartículas basadas en la emulsificación de aceite en agua y de agua en aceite en agua. Un primer beneficio es la facilidad de preparación. El método de nanopartículas es una técnica en una sola etapa y no necesita homogeneización de alta cizalla como el método de micropartículas, sólo agitación suave. Además, todo el proceso de preparación de micropartículas basado en la emulsión es por lo general aséptico, mientras que, debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas pueden esterilizarse por filtración después de la preparación de las partículas, lo que conduce a requisitos de producción menos estrictos.

25 Además, el tipo de disolvente orgánico utilizado con los dos métodos es diferente. El método de nanopartículas puede realizarse utilizando acetona, mientras que el método de micropartículas implica por lo general el uso de diclorometano (DCM) como disolvente. La Food and Drug Administration (FDA) clasifica el DCM como disolvente de Clase 2 y ha establecido límites a las cantidades de disolvente residual permisible que pueden estar presentes en los productos farmacéuticos, mientras que la acetona es un disolvente de Clase 3 para el que la FDA ha establecido límites más altos a las cantidades permitidas.

30 2. Adyuvantes inmunitarios

35 Como se ha indicado anteriormente, pueden proporcionarse opcionalmente uno o más adyuvantes inmunitarios en las composiciones de la invención. Éstos pueden, por ejemplo, inmovilizarse dentro de las nanopartículas, asociarse con las superficies de las nanopartículas (por ejemplo, adsorbidos o conjugados a las superficies de las nanopartículas) y/o asociarse de otra manera con las nanopartículas en diversos grados (por ejemplo, mezclados con las nanopartículas en una suspensión líquida, mezclados con las nanopartículas en una composición sólida, por ejemplo, coliofilizados con las nanopartículas, etc.), entre otras posibilidades.

40 Los adyuvantes inmunitarios para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes:

a. Composiciones que contienen minerales

45 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. (véase, por ejemplo, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. y Newman, M.J. eds.) (Nueva York: Plenum Press) 1995, capítulos 8 y 9), o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso de fosfato), adoptando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y resultando preferente la adsorción a la(s) sal(es). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse en forma de partícula de sal metálica (WO 00/23105).

55 Pueden incluirse sales de aluminio en las vacunas de la invención, de manera que la dosis de  $Al^{3+}$  sea de entre 0,2 mg y 1,0 mg por dosis.

60 En una forma de realización, el adyuvante a base de aluminio para su uso en la presente invención es el alumbre (sulfato de aluminio y potasio  $AlK(SO_4)_2$ ), o un derivado de alumbre, tal como el formado *in situ* mezclando un antígeno en tampón de fosfato con alumbre, seguido de titulación y precipitación con una base tal como hidróxido de amonio o hidróxido de sodio.

65 Otro adyuvante a base de aluminio para su uso en las formulaciones de vacunas de la presente invención es el adyuvante de hidróxido de aluminio  $(Al(OH)_3)$  u oxihidróxido de aluminio cristalino  $(AlOOH)$ , que es un excelente adsorbente, con una superficie de contacto de aproximadamente  $500 \text{ m}^2/\text{g}$ . En otra forma de realización, el adyuvante a base de aluminio es adyuvante de fosfato de aluminio  $(AlPO_4)$  o hidroxifosfato de aluminio, que

contiene grupos fosfato en lugar de algunos o todos los grupos hidroxilo del adyuvante de hidróxido de aluminio. Los adyuvantes de fosfato de aluminio preferentes proporcionados en el presente documento son amorfos y solubles en medios ácidos, básicos y neutros.

5 En otra forma de realización, el adyuvante comprende fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En una forma de realización más concreta del mismo, el adyuvante tiene una mayor cantidad de fosfato de aluminio que de hidróxido de aluminio, tal como una relación de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o superior a 9:1, en peso, entre fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio. En otra forma de realización, las sales de aluminio en la vacuna están presentes a una concentración de 0,4 mg a 1,0 mg por dosis de vacuna, o de 0,4 mg a 0,8 mg por dosis de vacuna, o de 0,5 mg a 0,7 mg por dosis de vacuna, o aproximadamente 0,6 mg por dosis de vacuna.

15 Generalmente, el adyuvante o adyuvantes a base de aluminio preferentes, o la relación entre múltiples adyuvantes a base de aluminio, tales como entre fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, se selecciona mediante la optimización de la atracción electrostática entre moléculas, de manera que el antígeno porte una carga opuesta a la del adyuvante al pH deseado. Por ejemplo, el adyuvante de fosfato de aluminio (iep = 4) adsorbe lisozima, pero no albúmina a pH 7,4. En caso de ser la albúmina la diana, se seleccionará el adyuvante de hidróxido de aluminio (iep = 11,4). Como alternativa, el pretratamiento del hidróxido de aluminio con fosfato disminuye su punto isoelectrónico, lo que lo convierte en un adyuvante preferente para antígenos más básicos.

## 20 b. Emulsiones de aceite

Las composiciones de emulsión de aceite y las formulaciones adecuadas para su uso como adyuvantes (con o sin otros inmunoestimuladores específicos tales como péptidos de muramilo o componentes de la pared celular bacteriana) incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5%, formulados en partículas submicrométricas utilizando un microfluidificador). Véase el documento WO 90/14837. Véanse también, Podda (2001) Vaccine 19:2673-2680; Frey *et al.* (2003) Vaccine 21:4234-4237. MF59 se utiliza como adyuvante en la vacuna de subunidades antigripal trivalente FLUAD™.

30 Los adyuvantes de emulsión de aceite particularmente preferentes para su uso en las composiciones son emulsiones submicrométricas de aceite en agua. Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua preferentes para su uso en el presente documento son emulsiones de escualeno/agua que contienen opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE, tal como una emulsión submicrométrica de aceite en agua que contiene escualeno al 4%-5% p/v, Tween 80™ (monooleato de polioxietilensorbitán) al 0,25%-1,0% p/v y/o Span 85™ (trioleato de sorbitán) al 0,25%-1,0%, y, opcionalmente, N-acetil-muramilo-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión submicrométrica de aceite en agua conocida como "MF59" (WO 90/14837; patente de EE.UU. Nº 6.299.884; patente de EE.UU. Nº 6.451.325; y Ott *et al.*, "MF59 - Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. y Newman, M.J. ed.) (Nueva York: Plenum Press) 1995, págs. 277-296). MF59 contiene escualeno al 4%-5% p/v (por ejemplo, 4,3%), Tween 80™ al 0,25%-0,5% p/v y Span 85™ al 0,5% p/v y contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE, formulado en partículas submicrométricas utilizando un microfluidificador tal como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, la MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 µg/dosis, más preferentemente 0-250 µg/dosis y, lo más preferentemente, 0-100 µg/dosis. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "MF59-0" se refiere a la emulsión submicrométrica de aceite en agua anteriormente indicada que carece de MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP indica una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 µg de MTP-PE por dosis, y así sucesivamente. MF69, otra emulsión submicrométrica de aceite en agua para su uso en el presente documento, contiene escualeno al 4,3% p/v, Tween 80™ al 0,25% p/v y Span 85™ al 0,75% p/v y opcionalmente MTP-PE. Otra emulsión submicrométrica de aceite en agua es MF75, también conocida como SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80™ al 0,4%, polímero de bloque pluronic L121 al 5% y thr-MDP, también microfluidificado en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP indica una formulación de MF75 que incluye MTP, tal como de 100 µg-400 µg de MTP-PE por dosis.

55 Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua, los métodos para fabricarlas y los inmunoestimuladores, tales como péptidos de muramilo, para su uso en las composiciones, se describen detalladamente en el documento WO 90/14837, la patente de EE.UU. Nº 6.299.884 y la patente de EE.UU. Nº 6.451.325.

También pueden utilizarse como adyuvantes en la invención adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

## 60 c. Formulaciones de saponina

Las formulaciones de saponina también son adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una gran variedad de especies vegetales. Las saponinas aisladas a partir de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como

adyuvantes. Las saponinas también pueden obtenerse en el mercado de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como los ISCOM. Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen el adyuvante STIMULON® (Antigenics, Inc., Lexington, MA). Se han purificado composiciones de saponina utilizando la cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HP-TLC) y la cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC). Se han identificado fracciones purificadas específicas utilizando estas técnicas, incluidas QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QHC. Preferentemente, la saponina es QS21. En la patente de EE.UU. N° 5.057.540 se describe un método de producción de QS21. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol (véase el documento WO 96/33739).

Pueden utilizarse combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimuladores (ISCOM). Los ISCOM incluyen también por lo general un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede utilizarse en los ISCOM cualquier saponina conocida. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de entre Quil A, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en los documentos EP 0 109 942, WO 96/11711 y WO 96/33739. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de (un) detergente(s) adicional(es). Véase el documento WO 00/07621.

Puede encontrarse una revisión del desarrollo de los adyuvantes a base de saponina en Barr *et al.* (1998) Adv. Drug Del. Rev. 32: 247-271. Véase también Sjolander *et al.* (1998) Adv. Drug Del. Rev. 32:321-338.

#### d. Virosomas y partículas pseudovirales (VLP)

Los virosomas y las partículas pseudovirales (VLP) también son adecuados como adyuvantes. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus, opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Generalmente son no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral original. Las proteínas virales pueden producirse por recombinación o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), del virus de la hepatitis B (tal como las proteínas del core o de la cápside), del virus de la hepatitis E, del virus del sarampión, del virus Sindbis, de rotavirus, del virus de la fiebre aftosa, de retrovirus, del virus de Norwalk, del papilomavirus humano, del VIH, de fagos de ARN, del fago QB (tal como proteínas de la cubierta), del fago GA, del fago fr, del fago AP205 y de Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Las VLP se analizan adicionalmente en los documentos WO 03/024480, WO 03/024481, Niikura *et al.* (2002) Virology 293:273-280, Lenz *et al.* (2001) J. Immunol. 166(9):5346-5355, Pinto *et al.* (2003) J. Infect. Dis. 188:327-338 y Gerber *et al.* (2001) J. Virol. 75(10): 4752-4760. Los virosomas se analizan adicionalmente por ejemplo en Gluck *et al.* (2002) Vaccine 20:B10-B16. Los virosomas de la gripe reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV) se utilizan como sistema de administración del antígeno de subunidades en el producto trivalente intranasal INFLEXAL™ (Mischler y Metcalfe (2002) Vaccine 20 Supl. 5:B17- B23) y el producto INFLUVAC PLUS™.

#### e. Derivados bacterianos o microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como:

(1) Derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS): Tales derivados incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 De-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En el documento EP 0 689 454 se describe una forma de "partícula pequeña" preferente de monofosforil lípido A 3 De-O-acilado. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micras (véase el documento EP 0 689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato, por ejemplo, RC-529. Véase Johnson *et al.* (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2273-2278.

(2) Derivados de lípido A: los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. El OM-174 se describe por ejemplo en Meraldi *et al.* (2003) Vaccine 21:2485-2491; y Pajak *et al.* (2003) Vaccine 21:836-842.

(3) Oligonucleótidos inmunoestimuladores: los oligonucleótidos inmunoestimuladores o moléculas poliméricas adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia que contiene una citosina no metilada seguida de guanósina y unida por un enlace fosfato). El ARN bicatenario bacteriano o los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) también han demostrado ser inmunoestimuladores. Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Opcionalmente, la guanósina puede ser reemplazada con un análogo tal como 2'-desoxi-7-desazaguanósina. Véanse Kandimalla *et al.* (2003) Nucl. Acids Res. 31(9): 2393-2400; los documentos WO 02/26757 y WO 99/62923, para ejemplos de posibles sustituciones análogas. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza adicionalmente en Krieg (2003) Nat. Med. 9(7): 831-835, McCluskie *et al.* (2002) FEMS Immunol. Med. Microbiol. 32:179-185, el documento WO 98/40100, la patente de EE.UU. N° 6.207.646, la patente de EE.UU. N° 6.239.116 y la patente de

EE.UU. Nº 6.429.199. La secuencia CpG puede dirigirse contra TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Véase Kandimalla *et al.* (2003) *Biochem. Soc. Trans.* 31 (parte 3):654-658. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria de Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se analizan en Blackwell *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170(8):4061-4068, Krieg (2002) *TRENDS Immunol.* 23(2):64-6 y el documento WO 01/95935. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, pueden fijarse dos secuencias de oligonucleótidos CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953, Kandimalla *et al.* (2003) *Biochem. Soc. Trans.* 31 (parte 3):664-658, Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861 y el documento WO03/035836.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores y las moléculas poliméricas también incluyen estructuras alternativas de la cadena principal del polímero tales como, pero no limitadas a, cadenas principales de polivinilo (Pitha *et al.* (1970) *Biochem. Biophys. Acta* 204(1):39-48, Pitha *et al.* (1970) *Biopolymers* 9(8):965-977) y cadenas principales de morfolino (patente de EE.UU. Nº 5.142.047, patente de EE.UU. Nº 5.185.444). Se conocen en la técnica diversos otros análogos de polinucleótidos cargados y no cargados. Se conocen en la técnica numerosas modificaciones de la cadena principal, incluidas, pero no limitadas a, enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos y carbamatos) y enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos y fosforoditioatos).

(4) Toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de las mismas: pueden utilizarse toxinas bacterianas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de las mismas como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT"), del cólera ("CT") o de pertussis ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación de ADP detoxificadas como adyuvantes para la administración por vía mucosa se describe en el documento WO 95/17211 y como adyuvantes para la administración parenteral en el documento WO 98/42375. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LTR192G. El uso como adyuvantes de toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, puede encontrarse en las siguientes referencias: Beignon *et al.* (2002) *Infect. Immun.* 70(6):3012-3019, Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541, Pizza *et al.* (2000) *Int. J. Med. Microbiol.* 290(4-5):455-461, Scharon-Kersten *et al.* (2000) *Infect. Immun.* 68(9):5306-5313, Ryan *et al.* (1999) *Infect. Immun.* 67(12):6270-6280, Partidos *et al.* (1999) *Immunol. Lett.* 67(3):209-216, Peppoloni *et al.* (2003) *Vaccines* 2(2):285-293 y Pine *et al.* (2002) *J. Control Release* 85(1-3):263-270. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas de ribosilación de ADP establecidos en Domenighini *et al.* (1995) *Mol. Microbiol.* 15(6):1165-1167.

#### f. Bioadhesivos y mucoadhesivos

También pueden utilizarse como adyuvantes bioadhesivos y mucoadhesivos. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificado (Singh *et al.* (2001) *J. Cont. Release* 70:267-276) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden utilizarse como adyuvantes en la invención quitosano y sus derivados (véase el documento WO 99/27960).

#### 2. Liposomas

Se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes en la patente de EE.UU. Nº 6.090.406, la patente de EE.UU. Nº 5.916.588 y la publicación de patente europea Nº EP 0 626 169.

#### h. Formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (véase, por ejemplo, el documento WO 99/52549). Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO 01/21207), así como tensioactivos de éster o éteres de alquilo de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO 01/21152).

Los éteres de polioxietileno preferentes se seleccionan del siguiente grupo: éter de polioxietileno-9-laurilo (laureth 9), éter de polioxietileno-9-estearilo, éter de polioxietileno-8-estearilo, éter de polioxietileno-4-laurilo, éter de polioxietileno-35-laurilo y éter de polioxietileno-23-laurilo.

#### i. Polifosfaceno (PCPP)

Se describen formulaciones de PCPP adecuadas para su uso como adyuvantes, por ejemplo, en Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19(1-3):109-115 y Payne *et al.* (1998) *Adv. Drug Del. Rev.* 31(3):185-196.

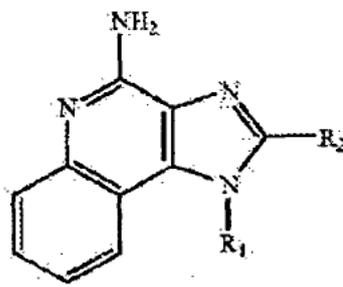
j. Péptidos de muramilo

Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-1-alanil-d-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramil-1-alanil-d-isoglutaminil-1-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforilo)-etilamina MTP-PE).

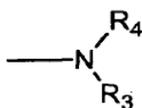
k. Compuestos de imidazoquinolina

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolina adecuados para su uso como adyuvantes incluyen Imiquimod y sus análogos, que se describen adicionalmente en Stanley (2002) Clin. Exp. Dermatol. 27(7):571-577, Jones (2003) Curr. Opin. Investig. Drugs 4(2):214-218 y las patentes de EE.UU. N° 4.689.338, 5.389.640, 5.268.376, 4.929.624, 5.266.575, 5.352.784, 5.494.916, 5.482.936, 5.346.905, 5.395.937, 5.238.944 y 5.525.612.

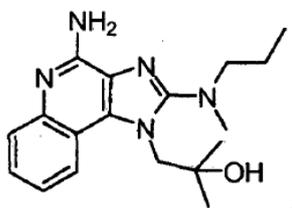
Las imidazoquinolinas preferentes son las de fórmula,



en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de uno a diez átomos de carbono, hidroxialquilo de uno a diez átomos de carbono, alcoxialquilo de uno a diez átomos de carbono, aciloxialquilo en el que el resto aciloxi es alcanoiloxi de uno a cinco átomos de carbono o benzoiloxi y en la que el resto alquilo contiene de uno a seis átomos de carbono,



en la que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo de uno a diez átomos de carbono, bencilo, (fenil)etilo y fenilo, en la que el sustituyente bencilo, (fenil)etilo o fenilo está opcionalmente sustituido en el anillo de benceno por uno o dos restos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, alcoxi de uno a cuatro átomos de carbono y halógeno. Los grupos alquilo anteriores pueden ser lineales, ramificados y/o cíclicos. Las imidazoquinolinas particularmente preferentes para la práctica de la presente invención incluyen imiquimod, resiquimod, y



el último de los cuales también se denomina en el presente documento "imidazoquinolina 090". Véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO 2006/031878 de Valiante *et al.* y WO 2007/109810 de Sutton *et al.*

1. Compuestos de tiosemicarbazona

Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona adecuados para su uso como adyuvantes, así como los métodos de formulación, fabricación y cribado de tales compuestos, incluyen los descritos en el documento WO 04/60308. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- $\alpha$ .

m. Compuestos de tripatrina

5 Los ejemplos de compuestos tripatrina adecuados para su uso como adyuvantes, así como los métodos de formulación, fabricación y cribado de tales compuestos, incluyen los descritos en el documento WO 04/64759. Los compuestos de tripatrina son particularmente eficaces en la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- $\alpha$ .

n. Inmunomoduladores humanos

10 Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo interferón- $\gamma$ ), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF).

15 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente.

Por ejemplo, pueden utilizarse las siguientes composiciones de adyuvantes en la invención:

- 20 (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (WO 99/11241);  
 (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo 3dMPL) (véase el documento WO 94/00153);  
 (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado no tóxico de LPS (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol;  
 (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) (WO 98/57659);  
 25 (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véanse los documentos EP 0 835 318, EP 0 735 898 y EP 0 761 231);  
 (6) SAF, que contiene escualano al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero de bloque pluronic L121 al 5%; y thr-MDP, microfluidificado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula;  
 30 (7) sistema adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualano al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y la esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™);  
 (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL);  
 35 (9) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulador (tal como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

3. Antígenos

40 Como se ha indicado anteriormente, pueden proporcionarse opcionalmente uno o más antígenos en las composiciones de la invención. Los antígenos pueden estar inmovilizados dentro de las nanopartículas, asociados con las superficies de las nanopartículas (por ejemplo, adsorbidos o conjugados a las superficies de las nanopartículas) y/o asociados de otra manera con las nanopartículas en diversos grados (por ejemplo, mezclados con las nanopartículas en una suspensión líquida, mezclados con las nanopartículas en una composición sólida, por ejemplo, coliofilizados con las nanopartículas), entre otras posibilidades.

45 Cada antígeno puede proporcionarse en una cantidad eficaz (por ejemplo, una cantidad eficaz para su uso en métodos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico según la invención). Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar o prevenir infecciones causadas por cualquiera de los patógenos que se enumeran más adelante.

50 Los antígenos para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes antígenos que se presentan a continuación, o antígenos derivados de uno o más de los patógenos que se presentan a continuación:

a. Antígenos bacterianos

55 Los antígenos bacterianos adecuados para su uso en la invención incluyen proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y vesículas de membrana externa que pueden aislarse, purificarse o derivarse de una bacteria. Además, los antígenos bacterianos incluyen lisados bacterianos y formulaciones de bacterias inactivas. Los antígenos bacterianos pueden producirse mediante expresión recombinante. Los antígenos bacterianos incluyen preferentemente epítomos que están expuestos en la superficie de las bacterias durante al menos una etapa de su ciclo vital. Los antígenos bacterianos se conservan preferentemente en múltiples serotipos. Los antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de una o más de las bacterias que se presentan a continuación, así como los ejemplos de antígenos específicos que se identifican a continuación.

65 *Neisseria meningitidis*: los antígenos de *meningitidis* incluyen proteínas (tales como las identificadas en los

- documentos WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280, WO00/22430, Tettelin *et al.* (2000) Science 287:1809-1815, WO96/29412 y Pizza *et al.* (2000) Science 287:1816-1820), sacáridos (incluido un polisacárido, oligosacárido o lipopolisacárido) o vesículas de membrana externa (WO 01/52885, Bjune *et al.* (1991) Lancet 338(8775):1093-1096, Fuskasawa *et al.* (1999) Vaccine 17:2951-2958 y Rosenqist *et al.* (1998) Dev Biol Strand 92:323-333) purificadas o derivadas de *N. meningitidis* de serogrupos tales como A, C, W135, Y y/o B. Los antígenos proteicos de *meningitidis* pueden estar seleccionados de entre adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de Fe y proteínas asociadas a la membrana (preferentemente la proteína integral de la membrana externa).
- 5
- Streptococcus pneumoniae*: los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* incluyen un sacárido (incluido un polisacárido o un oligosacárido) y/o una proteína de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos sacarídicos pueden seleccionarse de entre los serotipos 1, 2, 3, 4,5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Los antígenos proteicos pueden seleccionarse de entre una proteína identificada en los documentos WO 98/18931, WO 98/18930, la patente de EE.UU. N° 6.699.703, la patente de EE.UU. N° 6.800.744, WO 97/43303 y WO 97/37026. Las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* pueden seleccionarse de la familia de la tríada de polihistidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), formas truncadas de CbpX, la familia LytX, formas truncadas de LytX, las proteínas híbridas forma truncada de CbpX-forma truncada de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, SP101, Sp130, SP125 o SP133.
- 10
- 15
- Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A): los antígenos de estreptococos del grupo A incluyen las proteínas identificadas en los documentos WO 02/34771 y WO 2005/032582 (incluida GAS 40), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluidas las descritas en el documento WO 02/094851 y Dale (1999) Vaccine 17:193-200 y Dale (1996) Vaccine 14(10):944-948)), proteína de unión a fibronectina (Sfb1), proteína estreptocócica asociada al grupo hemo (Shp) y estreptolisina S (SagA).
- 20
- Moraxella catarrhalis*: los antígenos de *Moraxella* incluyen los antígenos identificados en los documentos WO 02/18595 y WO 99/58562, antígenos proteicos de membrana externa (HMW-OMP), antígeno C y/o LPS.
- 25
- Bordetella pertussis*: los antígenos de pertussis incluyen holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.
- 30
- Staphylococcus aureus*: los antígenos de *Staphylococcus aureus* incluyen los polisacáridos capsulares de *S. aureus* de tipo 5 y 8 opcionalmente conjugados con exotoxina A no tóxica recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*, tal como StaphVAX™, y antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, quinazas, hialuronidasas), factores de superficie que inhiben el ingestión fagocítica (cápsula, proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa, factores de coagulación y toxinas que dañan la membrana (opcionalmente detoxificadas) que lisan las membranas de células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina).
- 35
- Staphylococcus epidermis*: los antígenos de *S. epidermidis* incluyen el antígeno asociado al slime (SAA).
- 40
- Clostridium tetani* (tétanos): los antígenos tetánicos incluyen el toxoide tetánico (TT), que se utiliza preferentemente como proteína transportadora junto con/conjugada con las composiciones de la presente invención.
- Corynebacterium diphtheriae* (difteria): los antígenos de la difteria incluyen la toxina diftérica, preferentemente detoxificada, tal como CRM<sub>197</sub>. Además, se contemplan los antígenos capaces de modular, inhibir o asociados con la ribosilación de ADP para la combinación/coadministración/conjugación con las composiciones de la presente invención. Los toxoides diftéricos pueden utilizarse como proteínas transportadoras.
- 45
- Haemophilus influenzae* B (Hib): los antígenos de Hib incluye un antígeno sacarídico de Hib.
- 50
- Pseudomonas aeruginosa*: los antígenos de *Pseudomonas* incluyen endotoxina A, proteína Wzz, LPS de *P. aeruginosa*, más concretamente el LPS aislado de PAO1 (serotipo O5), y proteínas de membrana externa, incluidas las proteínas de membrana externa F (OprF) (Price *et al.* (2001) Infect. Immun. 69(5):3510-3515).
- 55
- Legionella pneumophila*. Pueden derivarse antígenos bacterianos de *Legionella pneumophila*.
- Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B): los antígenos de estreptococos del grupo B incluyen antígenos proteicos y sacarídicos, tal como los identificados en los documentos WO 02/34771, WO 03/093306, WO 04/041157 y WO 2005/002619 (incluidas las proteínas GBS 80, GBS 104, GBS 276 y GBS 322, e incluidos los antígenos sacarídicos derivados de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII).
- 60
- Neisseria gonorrhoeae*: los antígenos de *gonorrhoeae* incluyen la proteína Por (o porina), tal como PorB (véase, por ejemplo, Zhu *et al.* (2004) Vaccine 22:660-669), una proteína de unión a transferrina, tales como TbpA y TbpB (véase, por ejemplo, Price *et al.* (2004) Infect. Immun. 71(1):277-283), una proteína de opacidad (tal como Opa), una proteína modificable por reducción (Rmp), y preparaciones de vesículas de membrana externa (OMV) (véanse, por ejemplo, Plante *et al.* (2000) J. Infect. Dis. 182:848-855.), los documentos WO 99/24578, WO 99/36544, WO 99/57280 y WO02/079243).
- 65

- 5 *Chlamydia trachomatis*: los antígenos de *Chlamydia trachomatis* incluyen antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C (agentes de tracoma, una causa de ceguera), los serotipos L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> (asociados con el linfogranuloma venéreo) y los serotipos D-K. Los antígenos de *Chlamydia trachomatis* también incluyen los antígenos identificados en los documentos WO 00/37494, WO 03/049762, WO 03/068811 y WO 05/002619, incluidos PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), DnaK (CT396), CT398, similar a OmpH (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823) y MurG (CT761).
- 10 *Treponema pallidum* (sífilis): los antígenos de la sífilis incluyen el antígeno TmpA.
- 15 *Haemophilus ducreyi* (que provoca chancroide): los antígenos de *ducreyi* incluyen la proteína de membrana externa (DsrA).
- 15 *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*: los antígenos incluyen una repetición de trisacáridos y otros antígenos derivados de *Enterococcus* proporcionados en la patente de EE.UU. N° 6.756.361.
- 20 *Helicobacter pylori*: los antígenos de *H. pylori* incluyen Cag, Vac, Nap, HopX, HopY y el antígeno ureasa.  
*Staphylococcus saprophyticus*: los antígenos incluyen el antígeno hemaglutinina de 160 kDa de *S. saprophyticus*.
- 20 Los antígenos de *Yersinia enterocolitica* incluyen LPS (Xu *et al.* (2002) Infect. Immun. 70(8):4414-4423).
- 25 *E. coli*: los antígenos de *E. coli* pueden derivarse de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).
- 30 *Bacillus anthracis* (ántrax): los antígenos de *B. anthracis* están opcionalmente detoxificados y pueden seleccionarse de entre componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), pudiendo compartir ambos un componente B común conocido como antígeno protector (PA). En determinadas formas de realización, las composiciones de la presente invención no incluyen un antígeno del ántrax.
- 35 *Yersinia pestis* (peste): los antígenos de la peste incluyen antígeno capsular F1 (Gosfeld *et al.* (2003) Infect. Immun. 71(1):374-383), LPS (Fields *et al.* (1999) Infect. Immun. 67(10):5395-5408), antígeno V de *Yersinia pestis* (Hill *et al.* (1997) Infect. Immun. 65(11):4476-4482).
- 40 *Mycobacterium tuberculosis*: los antígenos de la tuberculosis incluyen lipoproteínas, LPS, antígenos de BCG, una proteína de fusión del antígeno 85B (Ag85B) y ESAT-6 opcionalmente formulados en vesículas de lípidos catiónicos (Olsen *et al.* (2004) Infect. Immun. 72(10):6148-6150), antígenos asociados a isocitrato deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Banerjee *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34):12652-12657) y antígenos de MPT51 (Suzuki *et al.* (2004) Infect. Immun. 72(7):3829-3837).
- 45 *Rickettsia*: los antígenos incluyen proteínas de membrana externa, incluida la proteína de membrana externa A y/o B (OmpB) (Chao *et al.* (2004) Biochim. Biophys. Acta 1702(2):145-152), LPS y el antígeno proteico de superficie (SPA) (Carl *et al.* (1989) J. Autoimmun. 2 Supl.: 81-91).
- 50 *Listeria monocytogenes*. Los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Listeria monocytogenes*.
- Chlamydia pneumoniae*: los antígenos incluyen los identificados en el documento WO 02/02606.
- 50 *Vibrio cholerae*: los antígenos incluyen antígenos de proteinasa, LPS, particularmente lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos específicos de O1 Inaba O, *V. cholera* 0139, antígenos de la vacuna IEM108 (Liang *et al.* (2003) Infect. Immun. 71(10):5498-5504) y la toxina de Zónula occludens (Zot).
- 55 *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea): los antígenos incluyen polisacáridos capsulares preferentemente conjugados (Vi, es decir vax-TyVi).
- 60 *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme): los antígenos incluyen lipoproteínas (tales como OspA, OspB, Osp C y Osp D), otras proteínas de superficie tales como proteínas relacionadas con OspE (Erp), proteínas de unión a decorina (tales como DbpA) y proteínas antigénicamente variables VI, tales como los antígenos asociados con P39 y P13 (una proteína integral de membrana, Noppa *et al.* (2001) Infect. Immun. 69(5):3323-3334), proteína de modificación antigénica V1sE (Lawrenz *et al.* (1999) J. Clin. Microbiol. 37(12):3997-4004).
- 65 *Porphyromonas gingivalis*: los antígenos incluyen la proteína de membrana externa (OMP) de *P. gingivalis*.  
*Klebsiella*: los antígenos incluyen OMP, incluida OMP A, y polisacáridos opcionalmente conjugados con toxoide tetánico.
- Otros antígenos bacterianos incluyen antígenos capsulares, antígenos polisacáridicos o antígenos proteicos

de cualquiera de los anteriores. Otros antígenos bacterianos también incluyen preparaciones de vesículas de membrana externa (OMV). Además, los antígenos incluyen versiones vivas, atenuadas y/o purificadas de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas. Los antígenos pueden derivarse de bacterias gramnegativas o grampositivas. Los antígenos pueden derivarse de bacterias aerobias o anaerobias.

Además, cualquiera de los sacáridos derivados de las bacterias anteriormente indicadas (polisacáridos, LPS, LOS u oligosacáridos) pueden conjugarse con otro agente o antígeno, tal como una proteína transportadora (por ejemplo CRM<sub>197</sub>). Tal conjugación puede ser conjugación directa lograda mediante aminación reductora de restos carbonilo en el sacárido a grupos amino en la proteína, según lo dispuesto en la patente de EE.UU. N° 5.360.897 y Roy *et al.* (1984) Can. J. Biochem. Cell Biol. 62(5):270-275. En otra forma de realización, los sacáridos pueden conjugarse a través de un conector, tal como con succinamida u otros enlaces proporcionados en Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, 1ª ed., Academic Press (1996) y Wong, S.S., *CRC, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, 1ª ed., CRC-Press (1991).

#### 15 b. Antígenos virales

Los antígenos virales adecuados para su uso en la invención incluyen virus inactivados (o muertos), virus atenuados, formulaciones de virus fraccionados, formulaciones de subunidades purificadas, proteínas virales que pueden aislarse, purificarse o derivarse de un virus y partículas pseudovirales (VLP). Los antígenos virales pueden derivarse de virus propagados en cultivo celular u otro sustrato o expresados por recombinación. Los antígenos virales incluyen preferentemente epítomos que están expuestos en la superficie del virus durante al menos una etapa de su ciclo vital. Los antígenos virales se conservan preferentemente en múltiples serotipos o cepas. Los antígenos virales incluyen antígenos derivados de uno o más de los virus que se presentan a continuación, así como los ejemplos de antígenos específicos que se identifican a continuación.

*Orthomyxovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un *Orthomyxovirus*, tal como Influenza A, B y C. Los antígenos de *Orthomyxovirus* puede seleccionarse de entre una o más de las proteínas virales, incluidas hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de la matriz (M1), proteína de membrana (M2), uno o más de los componentes de la transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los antígenos preferentes incluyen HA y NA.

Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas de gripe interpandémica (anuales). Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas con el potencial de provocar un brote pandémico (es decir, cepas de la gripe con nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas que circulan actualmente, o cepas de la gripe que son patógenas en aves y tienen el potencial de transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de la gripe que son patógenas para los seres humanos). Los antígenos de la gripe pueden derivarse de virus cultivados en huevos o en cultivo celular.

Virus *Paramyxoviridae*: los antígenos virales pueden derivarse de virus *Paramyxoviridae*, tales como neumovirus (RSV), paramixovirus (PIV) y morbilivirus (sarampión).

*Pneumovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un neumovirus, tal como el virus respiratorio sincicial (RSV), el virus respiratorio sincicial bovino, el virus de la neumonía del ratón y el virus de la rinotraqueítis del pavo. Preferentemente, el neumovirus es RSV. Los antígenos de neumovirus puede seleccionarse de entre una o más de las siguientes proteínas, incluidas las proteínas de superficie de fusión (F), glicoproteína (G) y proteína hidrófoba pequeña (SH), proteínas de la matriz M y M2, proteínas de la nucleocápside N, P y L, y proteínas no estructurales NS1 y NS2. Los antígenos de neumovirus preferentes incluyen F, G y M. Véase, por ejemplo, Johnstone *et al.* (2004) J. Gen. Virol. 85(Pt 11):3229-3238). Los antígenos de neumovirus también pueden formularse en o derivarse de virus híbridos. Por ejemplo, los virus RSV/PIV híbridos pueden comprender componentes de RSV y de PIV.

*Paramyxovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un paramixovirus, tal como el virus de la parainfluenza tipos 1-4 (PIV), de la parotiditis, los virus Sendai, el virus Simian 5, el virus de la parainfluenza bovina y el virus de la enfermedad de Newcastle. Preferentemente, el paramixovirus es PIV o de la parotiditis. Los antígenos de paramixovirus puede seleccionarse de entre una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina neuraminidasa (HN), proteínas de fusión F1 y F2, nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína grande (L) y proteína de la matriz (M). Las proteínas de paramixovirus preferentes incluyen HN, F1 y F2. Los antígenos de paramixovirus también pueden formularse en o derivarse de virus híbridos. Por ejemplo, los virus RSV/PIV híbridos pueden comprender componentes de RSV y de PIV. Las vacunas contra la parotiditis disponibles en el mercado incluyen el virus de la parotiditis atenuado vivo, en forma monovalente o en combinación con vacunas del sarampión y la rubéola (MMR).

*Morbillivirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un morbilivirus, tal como el del sarampión. Los antígenos de morbilivirus pueden seleccionarse de entre una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina (H), glicoproteína (G), factor de fusión (F), proteína grande (L), nucleoproteína (NP), fosfoproteína polimerasa (P) y de matriz (M). Las vacunas contra el sarampión disponibles en el mercado incluyen virus de sarampión atenuados vivos, por lo general en combinación con parotiditis y rubéola (MMR).

*Picornavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de picornavirus, tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiovirus y aftovirus. Resultan preferentes los antígenos derivados de enterovirus, tal como poliovirus.

5 *Enterovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un enterovirus, tal como los poliovirus de los tipos 1, 2 ó 3, virus Coxsackie A de los tipos 1 a 22 y 24, virus Coxsackie B de los tipos 1 a 6, virus Echovirus (ECHO) de los tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 y Enterovirus 68 a 71. Preferentemente, el enterovirus es poliovirus. Los antígenos de enterovirus se seleccionan preferentemente de entre una o más de las siguientes proteínas de la cápside: VP1, VP2, VP3 y VP4. Las vacunas antipoliomielíticas disponibles en el mercado incluyen la vacuna antipoliomielítica inactivada (IPV) y la vacuna antipoliomielítica oral (OPV).

10 *Heparnavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un heparnavirus, tal como el virus de la hepatitis A (HPV). Las vacunas HAV disponibles en el mercado incluyen la vacuna HAV inactivada.

15 *Togavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un togavirus, tal como un rubivirus, un alfavirus o un arterivirus. Resultan preferentes los antígenos derivados de rubivirus, tales como el virus de la rubéola. Los antígenos de togavirus pueden seleccionarse de entre E1, E2, E3, C, NSP-1, NSPO-2, NSP-3 y NSP-4. Los antígenos de togavirus se seleccionan preferentemente de entre E1, E2 y E3. Las vacunas contra la rubéola disponibles en el mercado incluyen un virus vivo adaptado al frío, por lo general en combinación con las vacunas contra la parotiditis y el sarampión (MMR).

20 *Flavivirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un flavivirus, tal como del de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), dengue (tipos 1, 2, 3 ó 4), fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo Occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis rusa de primavera-verano, encefalitis de Powassan. Los antígenos de flavivirus pueden seleccionarse de entre PrM, M, C, E, NS-1, NS-2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Los antígenos de flavivirus se seleccionan preferentemente de entre PrM, M y E. La vacuna TBE disponible en el mercado incluye vacunas de virus inactivados.

25 *Pestivirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un pestivirus, tal como el de la diarrea viral bovina (BVDV), fiebre porcina clásica (CSFV) o enfermedad de la frontera (BDV).

30 *Hepadnavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un hepadnavirus, tal como el virus de la hepatitis B. Los antígenos de hepadnavirus pueden seleccionarse de entre antígenos de superficie (L, M y S), antígenos del core (HBc, HBe). Las vacunas HBV disponibles en el mercado incluyen vacunas de subunidades que comprenden la proteína antígeno de superficie S.

35 *Virus de la hepatitis C*: los antígenos virales pueden derivarse de un virus de la hepatitis C (HCV). Los antígenos del HCV pueden seleccionarse de entre uno o más de E1, E2, E1/E2, poliproteína NS345, poliproteína de la nucleocápside NS-345, nucleocápside y/o péptidos de las regiones no estructurales (Houghton *et al.* (1991) Hepatology 14:381-388).

40 *Rhabdovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un *Rhabdovirus*, tal como un *Lyssavirus* (virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV). Los antígenos de *Rhabdovirus* pueden seleccionarse de entre glicoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína grande (L) y proteínas no estructurales (NS). La vacuna antirrábica disponible en el mercado comprende virus muertos cultivados en células diploides humanas o células de pulmón de Rhesus fetal.

45 *Caliciviridae*: los antígenos virales pueden derivarse de *Caliciviridae*, tal como el virus de Norwalk y los virus de tipo Norwalk, tal como el virus de Hawaii y el virus Snow Mountain.

50 *Coronavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un coronavirus, SARS, coronavirus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis de ratón (MHV), virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV). Los antígenos de coronavirus pueden seleccionarse de entre espícula (S), envoltura (E), matriz (M), nucleocápside (N) y glicoproteína hemaglutinina-esterasa (HE). Preferentemente, el antígeno de coronavirus se deriva de un virus SARS. Los antígenos virales de SARS se describen en el documento WO 04/92360.

55 *Retrovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un retrovirus, tal como un oncovirus, un lentivirus o un espumavirus. Los antígenos de oncovirus pueden derivarse de HTLV-1, HTLV-2 o HTLV-5. Los antígenos de lentivirus pueden derivarse de VIH-1 o VIH-2. Los antígenos de retrovirus pueden seleccionarse de entre gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpu y vpr. Los antígenos de VIH pueden seleccionarse de entre gag (p24gag y p55gag), env (gp160 y gp41), pol, tat, nef, rev vpu, miniproteínas, (preferentemente delección de p55 gag y gp140v). Los antígenos de VIH pueden derivarse de una o más de las siguientes cepas: VIH<sub>IIIb</sub>, VIH<sub>SF2</sub>, VIH<sub>LAV</sub>, VIH<sub>LAI</sub>, VIH<sub>MIN</sub>, VIH-1<sub>CM235</sub>, VIH-1<sub>US4</sub>.

60 *Reovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un reovirus, tal como un *Orthoreovirus*, un rotavirus, un orbivirus o un coltivirus. Los antígenos de reovirus pueden seleccionarse de entre las proteínas estructurales  $\lambda$ 1,  $\lambda$ 2,  $\lambda$ 3,  $\mu$ 1,  $\mu$ 2,  $\sigma$ 1,  $\sigma$ 2 u  $\sigma$ 3, o las proteínas no estructurales  $\sigma$ NS,  $\mu$ NS u  $\sigma$ 1s. Los antígenos de reovirus preferentes

pueden derivarse de un rotavirus. Los antígenos de rotavirus pueden seleccionarse de entre VP1, VP2, VP3, VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4 o NSP5. Los antígenos de rotavirus preferentes incluyen VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8) y VP7.

5 *Parvovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un parvovirus, tal como el parvovirus B 19. Los antígenos de parvovirus pueden seleccionarse de entre VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 y NS-2. Preferentemente, el antígeno de parvovirus es la proteína de la cápside VP-2.

10 *Virus de la hepatitis Delta (HDV)*: los antígenos virales pueden derivarse de HDV, particularmente el antígeno δ de HDV (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.378.814).

*Virus de la hepatitis E (HEV)*: los antígenos virales pueden derivarse de HEV.

15 *Virus de la hepatitis G (HGV)*: los antígenos virales pueden derivarse de HGV.

20 *Herpesvirus humano*: los antígenos virales pueden derivarse de un herpesvirus humano, tal como el virus del herpes simple (HSV), virus de la varicela zoster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HHV6), herpesvirus humano 7 (HHV7) y herpesvirus humano 8 (HHV-8). Los antígenos de herpesvirus humano pueden seleccionarse de entre proteínas inmediatas tempranas (α), proteínas tempranas (β) y proteínas tardías (γ). Los antígenos de HSV pueden derivarse de cepas HSV-1 o HSV-2. Los antígenos de HSV pueden seleccionarse de entre las glicoproteínas gB, gC, gD y gH, la proteína de fusión (gB) o proteínas de evasión inmunitaria (gC, gE o gI). Los antígenos de VZV pueden seleccionarse de entre proteínas del core, nucleocápside, tegumento o envoltura. Se dispone en el mercado de una vacuna de VZV vivo atenuado. Los antígenos de EBV pueden seleccionarse de entre las proteínas de antígeno temprano (EA), antígeno de la cápside viral (VCA) y glicoproteínas del antígeno de membrana (MA). Los antígenos de CMV pueden seleccionarse de entre proteínas de la cápside, glicoproteínas de la envoltura (tales como gB y gH) y proteínas del tegumento.

30 *Papovavirus*: los antígenos pueden derivarse de papovavirus, tales como los papilomavirus y los poliomavirus. Los papilomavirus incluyen los serotipos de HPV 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 y 65. Preferentemente, los antígenos de HPV se derivan de los serotipos 6, 11, 16 ó 18. Los antígenos de HPV pueden seleccionarse de entre las proteínas de la cápside (L1) y (L2), o E1- E7, o fusiones de las mismas. Los antígenos de HPV se formulan preferentemente en partículas pseudovirales (VLP). Los virus de poliomavirus incluyen el virus BK y el virus JK. Los antígenos de poliomavirus pueden seleccionarse de entre VP1, VP2 o VP3.

35 Se describen otros antígenos, composiciones, métodos y microbios para su uso en la invención en Plotkin, S.A. *et al.*, Vaccines, 4ª ed., W.B. Saunders Co. (2004), Murray, P.R. *et al.*, Medical Microbiology 5ª ed., Mosby Elsevier (2005), Joklik, W.K. (ed.), Virology, 3ª ed., Appleton y Lange (1988), Howley, P.M. *et al.* (eds.), Fundamental Virology, 4ª ed., Lippincott Williams y Wilkins (1991) y Fields, B.N. *et al.* (eds.), Fields Virology, 4ª ed., Lippincott Williams y Wilkins (2001).

### 40 c. Antígenos fúngicos

45 Los antígenos fúngicos para su uso en la invención pueden derivarse de uno o más de los hongos que se presentan a continuación.

50 Los antígenos fúngicos pueden derivarse de *Dermatophytes*, incluidos: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouini*, *Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum gypsum*, *Microsporum nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum* y/o *Trichophyton faviforme*.

55 Los patógenos fúngicos pueden derivarse de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitaniae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guillienonni*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiosperum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffe*, *Malassezia spp.*, *Fonsecaea spp.*, *Wangiella spp.*, *Sporothrix spp.*, *Basidiobolus spp.*, *Conidiobolus spp.*, *Rhizopus spp.*, *Mucor spp.*, *Absidia spp.*, *Mortierella spp.*, *Cunninghamella spp.*, *Saksenaia spp.*, *Alternaria spp.*, *Curvularia spp.*, *Helminthosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Monolinia spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Pithomyces spp.* y *Cladosporium spp.*

Los procesos para producir antígenos fúngicos son bien conocidos en la técnica (véase la patente de EE.UU. Nº 6.333.164). En un método preferente, se extrae y separa una fracción solubilizada a partir de una fracción insoluble que puede obtenerse a partir de células fúngicas cuya pared celular se ha eliminado sustancialmente o se ha eliminado al menos parcialmente, caracterizado porque el procedimiento comprende las etapas de: obtener células fúngicas vivas; obtener células fúngicas cuya pared celular se ha eliminado sustancialmente o se ha eliminado al menos parcialmente; romper las células fúngicas cuya pared celular se ha eliminado sustancialmente o se ha eliminado al menos parcialmente; obtener una fracción insoluble; y extraer y separar una fracción solubilizada a partir de la fracción insoluble.

#### 10 d. Antígenos de ETS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Tales antígenos pueden proporcionar profilaxis o tratamiento frente a ETS tales como la clamidia, el herpes genital, la hepatitis (tal como HCV), las verrugas genitales, la gonorrea, la sífilis y/o el chancroide (véase el documento WO 00/15255). Los antígenos pueden derivarse de una o más ETS virales o bacterianas. Los antígenos de ETS virales para su uso en la invención pueden derivarse de, por ejemplo, VIH, virus del herpes simple (HSV-1 y HSV-2), papilomavirus humano (HPV) y hepatitis (HCV). Los antígenos de ETS bacterianas para su uso en la invención pueden derivarse de, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *E. coli* y *Streptococcus agalactiae*. Los ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### 20 e. Antígenos respiratorias

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de un patógeno que provoca una enfermedad respiratoria. Por ejemplo, los antígenos respiratorios pueden derivarse de un virus respiratorio tal como los ortomixovirus (gripe), neumovirus (RSV), paramixovirus (PIV), morbilivirus (sarampión), togavirus (rubéola), VZV y coronavirus (SARS). Los antígenos respiratorios pueden derivarse de una bacteria que provoca una enfermedad respiratoria, tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Moraxella catarrhalis*. Los ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### 30 f. Antígenos para vacunas pediátricas

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para su uso en pacientes pediátricos. Los pacientes pediátricos tienen por lo general menos de aproximadamente 3 años de edad, o menos de aproximadamente 2 años de edad, o menos de aproximadamente 1 año de edad. Los antígenos pediátricos pueden administrarse varias veces a lo largo de 6 meses, 1, 2 ó 3 años. Los antígenos pediátricos pueden derivarse de un virus que puede amenazar a la población pediátrica y/o un virus por el que la población pediátrica es susceptible de infección. Los antígenos virales pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de ortomixovirus (gripe), neumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y parotiditis), morbilivirus (sarampión), togavirus (rubéola), enterovirus (polio), HBV, coronavirus (SARS) y virus de la varicela zoster (VZV), virus de Epstein Barr (EBV). Los antígenos bacterianos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de entre *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) y *E. coli*. Los ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### 50 g. Antígenos adecuados para su uso en individuos de edad avanzada o inmunocomprometidos

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para su uso en individuos de edad avanzada o inmunocomprometidos. Tales individuos pueden necesitar vacunarse con mayor frecuencia, con dosis más altas o con formulaciones con adyuvantes para mejorar la respuesta inmunitaria frente a los antígenos diana. Los antígenos que pueden tenerse como diana para su uso en individuos de edad avanzada o inmunocomprometidos incluyen antígenos derivados de uno o más de los siguientes patógenos: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Clamydia pneumoniae*, ortomixovirus (gripe), neumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y parotiditis), morbilivirus (sarampión), togavirus (rubéola), enterovirus (polio), HBV, coronavirus (SARS), virus de la varicela zoster (VZV), virus de Epstein Barr (EBV), citomegalovirus (CMV). Los ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### 65 h. Antígenos adecuados para su uso en vacunas para adolescentes

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para su uso en sujetos adolescentes. Los adolescentes pueden necesitar un refuerzo de un antígeno pediátrico administrado anteriormente. Los antígenos pediátricos que pueden ser adecuados para su uso en adolescentes se han descrito anteriormente. Además, los adolescentes pueden ser un objetivo para recibir antígenos derivados de un patógeno de ETS con el fin de asegurar la inmunidad protectora o terapéutica antes del inicio de la actividad sexual. Los antígenos de ETS que pueden ser adecuados para su uso en adolescentes se han descrito anteriormente.

#### i. Antígenos tumorales

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos tumorales. Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales que contienen péptidos, tales como un antígeno tumoral polipeptídico o antígenos tumorales glicoproteicos. Un antígeno tumoral también puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene sacárido, tal como un antígeno tumoral glicolipídico o un antígeno tumoral gangliosídico. Un antígeno tumoral puede ser adicionalmente, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene polinucleótido que expresa un antígeno tumoral que contiene polipéptido, por ejemplo, un constructo vector de ARN o un constructo vector de ADN, tal como ADN de plásmido.

Los antígenos tumorales incluyen (a) antígenos tumorales que contienen polipéptido, incluidos polipéptidos (que pueden variar, por ejemplo, de 8 a 20 aminoácidos de longitud, aunque también son comunes las longitudes fuera de este intervalo), lipopolipéptidos y glicoproteínas, (b) antígenos tumorales que contienen sacárido, incluidos polisacáridos, mucinas, gangliósidos, glicolípidos y glicoproteínas, y (c) polinucleótidos que expresan polipéptidos antigénicos.

Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, (a) moléculas de longitud completa asociadas con células cancerosas, (b) homólogos y formas modificadas de las mismas, incluidas moléculas con porciones delecionadas, añadidas y/o sustituidas, y (c) fragmentos de las mismas. Los antígenos tumorales pueden proporcionarse en forma recombinante. Los antígenos tumorales incluyen, por ejemplo, antígenos restringidos por la clase I reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup> o antígenos restringidos por la clase II reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>.

Se conocen en la técnica numerosos antígenos tumorales, incluidos: (a) antígenos de cáncer de testículo, tales como NY-ESO-1, SSX2, SCP1 así como polipéptidos de la familia RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que puede utilizarse, por ejemplo, para tratar el melanoma, tumores de pulmón, de cabeza y cuello, CPNM, de mama, gastrointestinales y de vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con diversos tumores sólidos, por ejemplo, el cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado con, por ejemplo, el melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, el melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, el melanoma), caspasa-8 (asociada con, por ejemplo, el cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, por ejemplo, el cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, catenina beta (asociada con, por ejemplo, el melanoma), TCR (asociado con, por ejemplo, el linfoma no Hodgkin de células T), BCR-abl (asociado con, por ejemplo, la leucemia mielógena crónica), triosafosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT, (c) antígenos sobreexpresados, por ejemplo, Galectina 4 (asociada con, por ejemplo, el cáncer colorrectal), Galectina 9 (asociada con, por ejemplo, la enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada con, por ejemplo, la leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociado con, por ejemplo, diversas leucemias), anhidrasa carbónica (asociada con, por ejemplo, el cáncer renal), aldolasa A (asociada con, por ejemplo, el cáncer de pulmón), PRAME (asociado con, por ejemplo, el melanoma), HER-2/neu (asociado con, por ejemplo, el cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), alfa-fetoproteína (asociada con, por ejemplo, el hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, el cáncer colorrectal), gastrina (asociada con, por ejemplo, el cáncer de páncreas y gástrico), proteína catalítica de la telomerasa, MUC-1 (asociado con, por ejemplo, el cáncer de mama y ovario), G-250 (asociado con, por ejemplo, el carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, el cáncer de mama, de colon) y el antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, el cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal, tales como el cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación melanoma-melanocito tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimuladora de melanocitos, tirosinasa, proteína 1 relacionada con la tirosinasa/TRP1 y proteína 2 relacionada con la tirosinasa/TRP2 (asociadas con, por ejemplo, el melanoma), (e) antígenos asociados a próstata tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados con, por ejemplo, el cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulinas (asociados con el mieloma y los linfomas de linfocitos B, por ejemplo), y (g) otros antígenos tumorales, tales como antígenos que contienen polipéptido y antígenos que contienen sacárido, incluidos (i) glicoproteínas tales como sialil Tn y sialil Le<sup>x</sup> (asociadas con, por ejemplo, el cáncer de mama y colorrectal), así como diversas mucinas; pueden acoplarse glicoproteínas a una proteína transportadora (por ejemplo, MUC-1 puede acoplarse a KLH); (ii) lipopolipéptidos (por ejemplo, MUC-1 unido a un resto lipídico); (iii) polisacáridos (por ejemplo, hexasacárido sintético Globo H), que pueden acoplarse a proteínas transportadoras (por ejemplo, a KLH), (iv) gangliósidos tales como GM2, GM12, GD2, GD3 (asociados con, por ejemplo, el cáncer cerebral, de pulmón, el melanoma), que también pueden acoplarse a proteínas transportadoras (por ejemplo, KLH).

Otros antígenos tumorales incluyen p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del papilomavirus humano (HPV), incluidos E6 y E7, antígenos

del virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrófico de células T humanas, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72 -4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, y similares. Estos, así como otros componentes celulares se describen por ejemplo en la publicación de patente de los Estados Unidos N° 2002/0007173 y en las referencias citadas en la misma.

Los antígenos que contienen polinucleótidos según la presente invención comprenden por lo general polinucleótidos que codifican antígenos tumorales polipeptídicos tales como los enumerados anteriormente. Los antígenos que contienen polinucleótidos preferentes incluyen constructos vectores de ADN o ARN, tales como vectores plásmidos (por ejemplo, pCMV), que son capaces de expresar antígenos tumorales polipeptídicos *in vivo*.

Los antígenos tumorales pueden derivarse, por ejemplo, de componentes celulares mutados o modificados. Después de modificación, los componentes celulares ya no desempeñan sus funciones de regulación, y por lo tanto la célula puede experimentar un crecimiento descontrolado. Los ejemplos representativos de componentes celulares modificados incluyen ras, p53, Rb, proteína modificada codificada por el gen del tumor de Wilms, ubiquitina, mucina, proteína codificada por los genes de DCC, APC y MCC, así como receptores o estructuras de tipo receptor tales como neu, receptor de la hormona tiroidea, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor del factor estimulador de colonias (CSF). Estos, así como otros componentes celulares se describen por ejemplo en la patente de EE.UU. N° 5.693.522 y en las referencias citadas en la misma.

Pueden utilizarse antígenos bacterianos y virales junto con las composiciones de la presente invención para el tratamiento del cáncer. En concreto, pueden utilizarse proteínas transportadoras, tales como CRM<sub>197</sub>, toxoide tetánico o antígeno de *Salmonella typhimurium* junto con/conjugadas con los compuestos de la presente invención para el tratamiento del cáncer. Las terapias de combinación de antígenos tumorales mostrarán una mayor eficacia y biodisponibilidad en comparación con los tratamientos existentes.

Puede encontrarse información adicional sobre los antígenos tumorales, por ejemplo, en Moingeon (2001) Vaccine 19:1305-1326, Rosenberg (2001) Nature 411:380-384, Dermine *et al.* (2002) Brit. Med. Bull. 62:149-162, Espinoza-Delgado (2002) The Oncologist 7 (Supl. 3):20-33, Davis *et al.* (2003) J. Leukocyte Biol. 23:3-29, Van den Eynde *et al.* (1995) Curr. Opin. Immunol. 7:674-681, Rosenberg (1997) Immunol. Today 18:175-182, Offringa *et al.* (2000) Curr. Opin. Immunol. 2:576-582, Rosenberg (1999) Immunity 10:281-287, Sahin *et al.* (1997) Curr. Opin. Immunol. 9:709-716, Old *et al.* (1998) J. Exp. Med. 187:1163-1167, Chau *et al.* (1999) J. Exp. Med. 189:767-778, Gold *et al.* (1965) J. Exp. Med. 122:467-468, Livingston *et al.* (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45:1-6, Livingston *et al.* (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45:10-19, Taylor-Papadimitriou (1997) Immunol. Today 18:105-107, Zhao *et al.* (1995) J. Exp. Med. 182:67-74, Theobald *et al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11993-11997, Gaudemack (1996) Immunotechnology 2:3-9, documento WO 91/02062, patente de EE.UU. N° 6.015.567, documentos WO 01/08636, WO 96/30514, patente de EE.UU. N° 5.846.538 y patente de EE.UU. N° 5.869.445.

Otros antígenos también pueden incluir una preparación de vesículas de membrana externa (OMV).

Se proporcionan otros métodos de formulación y antígenos (especialmente antígenos tumorales) en la publicación de patente de EE.UU. N° 2004/0202680. Véase también la patente de EE.UU. N° 6.884.435.

#### i. Referencias de antígenos

Las composiciones de la invención pueden incluir los antígenos descritos en cualquiera de las siguientes referencias:

- 1 Publicación internacional N° WO99/24578.
- 2 Publicación internacional N° WO99/36544.
- 3 Publicación internacional N° WO99/57280.
- 4 Publicación internacional N° WO00/22430.
- 5 Tettelin *et al.* (2000) Science 287:1809-1815.
- 6 Publicación internacional N° WO96/29412.
- 7 Pizza *et al.* (2000) Science 287:1816-1820.
- 8 Publicación internacional N° WO 01/52885.
- 9 Bjune *et al.* (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
- 10 Fuskasawa *et al.* (1999) Vaccine 17:2951-2958.
- 11 Rosenqist *et al.* (1998) Dev. Biol. Strand 92:323-333.
- 12 Constantino *et al.* (1992) Vaccine 10:691-698.
- 13 Constantino *et al.* (1999) Vaccine 17:1251-1263.
- 14 Watson (2000) Pediatr. Infect. Dis. J. 19:331-332.

- 15 Rubin (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:269-285.  
 16 Jedrzejewski (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:187-207.  
 17 Publicación internacional N° WO 02/02606.  
 5 18 Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.  
 19 Read *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:1397-1406.  
 20 Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Supl 3):S524-S527.  
 21 Publicación internacional N° WO99/27105.  
 22 Publicación internacional N° WO00/27994.  
 10 23 Publicación internacional N° WO00/37494.  
 24 Publicación internacional N° WO99/28475.  
 25 Bell (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:1187-1188.  
 26 Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.  
 27 Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Supl:S63-S68, S79-S80.  
 15 28 Hsu *et al.* (1999) *Clin. Liver Dis.* 3:901-915.  
 29 Gastofsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.  
 30 Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.  
 31 Plotkin, S.A. *et al.*, *Vaccines*, 4ª ed., W.B. Saunders Co. (2004)  
 32 Del Giudice *et al.* (1998) *Mol. Aspects Med.* 19:1-70.  
 33 Publicación internacional N° WO93/018150.  
 20 34 Publicación internacional N° WO99/53310.  
 35 Publicación internacional N° WO98/04702.  
 36 Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:135-142.  
 37 Sutter *et al.* (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:287-308.  
 25 38 Zimmerman y Spann (1999) *Am. Fam. Physician* 59:113-118, 125-126.  
 39 Dreensen (1997) *Vaccine* 15 Supl:S2-S6.  
 40 MMWR *Morb. Mortal Wkly Rep.* (1998) 16:47(1):12, 19.  
 41 McMichael (2000) *Vaccine* 19 Supl 1:S101-S107.  
 42 Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-56.  
 30 43 Solicitudes de patente GB 0026333.5, 0028727.6 y 0105640.7.  
 44 Dale (1999) *Infect. Disclin. North Am.* 13:227-243.  
 45 Ferretti *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4658-4663.  
 46 Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240.  
 47 Ala'Aldeen *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1218-1219.  
 35 48 Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.  
 49 Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Supl 2:S28-S36.  
 50 BATTERY y Moxon (2000) *J. R. Coll Physicians Long* 34:163-168.  
 51 Ahmad y Chapnick (1999) *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13:113-133.  
 52 Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:663-667.  
 40 53 Patente europea N° EP 0 477 508B1.  
 54 Patente de EE.UU. N° 5.306.492.  
 55 Publicación internacional N° WO98/42721.  
 56 Cruse *et al.* (eds.) *Conjugate Vaccines*, particularmente el volumen 10:48-114.  
 57 Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, 1ª ed., Academic Press (1996).  
 45 58 Publicación de patente europea N° 0 372 501.  
 59 Publicación de patente europea N° 0 378 881.  
 60 Publicación de patente europea N° 0 427 347.  
 61 Publicación internacional N° WO 93/17712.  
 62 Publicación internacional N° WO 98/58668.  
 63 Publicación de patente europea N° 0 471 177.  
 50 64 Publicación internacional N° WO00/56360.  
 65 Publicación internacional N° WO 00/67161.

#### 4. Productos farmacéuticos adicionales

- 55 Además de especies inmunógenas tales como las anteriormente indicadas (por ejemplo, antígenos y adyuvantes inmunizantes), puede utilizarse una variedad casi ilimitada de nuevos productos farmacéuticos. Los ejemplos de tales productos farmacéuticos incluyen los siguientes, entre muchos otros: antibióticos y antivirales,  
 60 fármacos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, vasodilatadores, fármacos cardiovasculares, psicotrópicos, neurolépticos, antidepresivos, fármacos antiparkinsonianos, betabloqueantes, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de bradicinina, inhibidores de ACE, vasodilatadores, inhibidores de prolactina, esteroides, antagonistas de hormonas, antihistamínicos, antagonistas de serotonina, heparina, agentes quimioterapéuticos, antineoplásicos y factores de crecimiento, incluidos pero no limitados a PDGF, EGF, KGF, IGF-1 e IGF-2, FGF, hormonas incluidas hormonas peptídicas tales como insulina, proinsulina, hormona del crecimiento, GHRH, LHRH, EGF, somatostatina, SNX-111, BNP, insulínotropina, ANP, FSH, LH, PSH y hCG, hormonas esteroideas gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterona), hormona estimuladora de la tiroides, inhibina, colecistoquinina, ACTH, CRF, dinorfinas, endorfinas, endotelina, fragmentos de fibronectina, galanina, gastrina, insulínotropina, glucagón, fragmentos de

5 proteínas de unión a GTP, guanilina, las leucocininas, magainina, mastoparinas, dermaseptina, systemina, neuromedinas, neurotensina, pancreastatina, polipéptido pancreático, sustancia P, secretina, timosina, y similares, enzimas, mediadores de la transcripción o de la traducción, productos intermedios de las vías metabólicas, e inmunomoduladores, tales como cualquiera de las diversas citocinas incluidas interleucina-1, interleucina-2, interleucina-3, interleucina-4 e interferón gamma.

#### 5. Tensioactivos y/o agentes crioprotectores

10 Como se ha indicado anteriormente, pueden añadirse opcionalmente a las composiciones de la invención uno o más tensioactivos y/o uno o más agentes crioprotectores, por ejemplo, para asegurar que las nanopartículas liofilizadas puedan resuspenderse sin un aumento de tamaño inaceptable (por ejemplo, sin agregación significativa).

15 Los tensioactivos incluyen tensioactivos catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos y tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio o "CTAB" (por ejemplo, cetrimida), cloruro de benzalconio, DDA (bromuro de dimetil dioctodecilamonio) y DOTAP (dioleoil-3-trimetilamonio-propano), entre otros. Los tensioactivos aniónicos incluyen, por ejemplo, SDS (dodecil sulfato de sodio), SLS (lauril sulfato de sodio), DSS (disulfosuccinato) y alcoholes grasos sulfatados, entre otros. Los tensioactivos no iónicos incluyen, por ejemplo, PVA (alcohol polivinílico), povidona (también conocida como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitán, polisorbatos, monoéteres de glicol polioxiethylado, alquil fenoles polioxiethylados y poloxámeros, entre otros.

20 En algunas formas de realización, se añaden a las composiciones de la invención uno o más tensioactivos en una cantidad eficaz para promover la suspensión de las nanopartículas (y la resuspensión después de la liofilización). La relación ponderal entre el tensioactivo y el polímero biodegradable puede variar, por ejemplo, de menos de 0,001:1 a 0,5:1 o más, por ejemplo, variar de 0,005:1 a 0,1:1, entre otras relaciones. En general, los tensioactivos iónicos se utilizan en menores relaciones que los tensioactivos no iónicos.

25 Los agentes crioprotectores comunes incluyen (a) aminoácidos tales como ácido glutámico y arginina, entre otros; (b) polioles, incluidos dioles tales como etilenglicol, propanodiolos, tales como 1,2-propilenglicol y 1,3-propilenglicol, butanodiolos tal como 2,3-butilenglicol, entre otros, trioles tales como glicerol, entre los otros, así como otros polioles superiores; y (c) carbohidratos, incluidos, por ejemplo, (i) monosacáridos (por ejemplo, glucosa, galactosa y fructosa, entre otros), (ii) polisacáridos incluidos disacáridos (por ejemplo, sacarosa, lactosa, trehalosa, maltosa, gentiobiosa y celobiosa, entre otros), trisacáridos (por ejemplo, rafinosa, entre otros), tetrasacáridos (por ejemplo, estaquiosa entre otros), pentasacáridos (por ejemplo, verbascosa entre otros), así como numerosos otros polisacáridos superiores y (iii) alditoles tales como xilitol, sorbitol y manitol, entre otros (en este sentido, se observa que los alditoles son polioles superiores y también son carbohidratos).

35 En algunas formas de realización, se añaden a las composiciones de la invención uno o más agentes crioprotectores en una cantidad eficaz para promover la suspensión de las nanopartículas (y la resuspensión después de la liofilización). La relación ponderal entre el agente crioprotector y el polímero biodegradable puede variar, por ejemplo, de menos de 0,01:1 a 0,5:1 o más, por ejemplo, variar de 0,05:1 a 0,1:1, entre otras relaciones.

#### 6. Componentes suplementarios

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir opcionalmente uno o más de una gran diversidad de componentes suplementarios, incluidos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, pueden utilizarse vehículos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, etanol, etc. Pueden estar presentes otros excipientes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de ajuste de la tonicidad, sustancias biológicas de tamponamiento, y similares. Un tampón biológico puede ser virtualmente cualquier especie que sea farmacológicamente aceptable y que proporcione la formulación con el pH deseado, es decir, un pH en el intervalo fisiológico. Los ejemplos de sistemas tamponados incluyen solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada de Hank, y similares. Otros sistemas tampón incluyen los presentados anteriormente para su uso en el proceso de formación de las nanopartículas.

50 Dependiendo de la forma farmacéutica final, también pueden introducirse otros excipientes conocidos en la técnica, incluidos aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, deslizantes (agentes reológicos), adyuvantes de compresión, edulcorantes, saporíferos, conservantes, agentes de suspensión/dispersantes, formadores de película/recubrimientos, y así sucesivamente.

#### 7. Administración

60 Las composiciones de nanopartículas según la invención pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por inyección (que puede ser sin aguja). Las composiciones pueden inyectarse por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal, por ejemplo. Otros modos de administración incluyen la administración nasal, en las mucosas, intraocular, rectal, vaginal, oral y pulmonar, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas.

En algunas formas de realización, las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para la administración dirigida específica de sitio. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones puede utilizarse para dirigirse al pulmón, al hígado, al bazo, a la circulación sanguínea o a la médula ósea.

5 El tratamiento puede llevarse a cabo según un régimen monodosis o un régimen multidosis. Un régimen multidosis es uno en el que puede administrarse un primer ciclo de vacunación, por ejemplo, con 1-10 dosis separadas, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores, elegidos para mantener y/o reforzar la respuesta terapéutica, por ejemplo a 1-4 meses para una segunda dosis, y en caso necesario, una(s) dosis posterior(es) después de varios meses. La pauta posológica también será, al menos en parte, determinada por la necesidad del sujeto y dependerá del criterio del médico.

10 Además, si se desea la prevención de la enfermedad, las composiciones se administran generalmente antes de producirse la primera aparición de la infección o trastorno de interés. Si se desean otras formas de tratamiento, por ejemplo, la reducción o eliminación de los síntomas o reparaciones, las composiciones se administran generalmente con posterioridad a producirse la primera aparición de la infección o trastorno de interés.

### 15 C. Parte experimental

Más adelante se presentan ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen sólo a efectos ilustrativos, y no pretenden limitar en modo alguno el alcance de la presente invención.

20 Se ha hecho todo lo posible por asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se contará con alguna desviación y error experimental.

### 25 **Materiales.**

La polilactida-co-glicólido (PLG), RG502H con una relación de copolímero de 50:50 se obtuvo de Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Alemania). La sacarosa y el manitol para la liofilización se obtuvieron de Sigma Chemicals (St. Louis, MO). El alcohol polivinílico (PVA) (PM = 15.000) se obtuvo de ICN Biomedicals (actualmente MP Biomedicals, Irvine, CA). La acetona se obtuvo de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). La vacuna meningocócica recombinante derivada de *Escherichia Coli* potencial MB1 de Novartis Vaccines se aisló y purificó como se describe en el presente documento. M. Comanducci, *et al.*, "NadA, a Novel Vaccine Candidate of Neisseria meningitides" J. Exp. Med. 195:1445-1454 (2002). El Tampón Tris-EDTA se obtuvo de Novartis Vaccines. La síntesis de SMIP (imidazoquinolina 090) se describe en las publicaciones internacionales N° WO 2006/031878 de Valiante *et al.* y N° WO 2007/109810 de Sutton *et al.*

### 30 **Ejemplo 1. Preparación de nanopartículas.**

Se prepararon nanopartículas de poli(lactida-co-glicólido) basándose en el método de desplazamiento de disolvente. Se añadió, gota a gota, una fase orgánica con PLG disuelto en acetona, a tampón Tris EDTA colocado en un agitador giratorio modelo G2 (New Brunswick Scientific Co., Inc., NJ, EE.UU.) a 120 rpm y se dejó evaporar la acetona durante toda la noche. Se encapsuló el SMIP codisolviéndolo con PLG en la fase orgánica. Los tamaños de las partículas preparadas dependían de la concentración de PLG, como se observa más adelante. No hubo tensioactivo presente en la fase acuosa ni en la fase orgánica.

40 Se determinó la granulometría de las partículas [D(v, 0,5)] con un Zetasizer 3000HsA (Malvern, Worcestershire, Reino Unido), con un ángulo de dispersión de 90° a 25°C. Se analizó cada preparación de nanopartículas con 10 lecturas por muestra después de la dilución de las nanopartículas en agua. Las mediciones se realizaron por triplicado. Este instrumento mide el tamaño de las partículas en base a la dispersión dinámica de luz. Las partículas se consideraron nanopartículas si no había agregados y se obtuvo un único pico monodisperso. Se midió el potencial zeta con el Zetasizer con una concentración diluida típica de 0,2 mg/ml de PLG en agua.

50 Se formularon nanopartículas de diferentes tamaño (véase la Tabla 1 a continuación) ajustando la concentración inicial de PLG en la fase orgánica. Se prepararon partículas pequeñas (~130 nm) con 10 ml de PLG al 0,05% (p/v) en acetona añadida, gota a gota, a 10 ml de agua. Se prepararon partículas de tamaño intermedio (~180 nm) con 10 ml de PLG al 2% (p/v) en acetona añadida a 10 ml de agua. Se prepararon partículas grandes (~240 nm) con 10 ml de PLG al 3,0% (p/v) en acetona añadida a 10 ml de agua. El potencial zeta de las partículas fue ~45 mV.

60

65

Tabla 1. Tamaño de partícula vs. concentración de PLG

	Concentración de PLG	Tamaño de partícula
5	RG 502H 0,5% p/v (5 mg/ml)	130nm
	RG 502H 1% p/v (10mg/ml)	160nm
	RG 502H 2% p/v (20 mg/ml)	180nm
	RG 502H 2,5% p/v (25 mg/ml)	225nm
	RG 502H 3% p/v (30 mg/ml)	240nm

10 Dado que el proceso de la formación de nanopartículas no utiliza ningún tensioactivo, se liofilizó un volumen conocido de la suspensión de nanopartículas y se determinó el contenido de PLG. Más concretamente, se determinó el contenido de PLG de la suspensión alicuotando un volumen de 1 ml en cuatro viales previamente pesados, que se liofilizaron y se pesaron de nuevo, utilizando el peso neto medio como el contenido de PLG. La recuperación de PLG resultó ser sistemáticamente superior al 90% para las concentraciones de polímero que iban de 10 mg/ml a 25 mg/ml. Con concentraciones superiores a 25 mg/ml, el tamaño de partícula era superior a 225 nm y estas concentraciones no se investigaron adicionalmente.

15 Inicialmente, se agitó la suspensión de nanopartículas con un agitador magnético. Sin embargo, esto provocó que el polímero se agregarse formando grumos, lo que dio como resultado una menor recuperación para las nanopartículas. Esta cuestión se trató con éxito colocando la suspensión de nanopartículas en un agitador giratorio, que impedía la agregación de las partículas.

### 20 Ejemplo 2. Encapsulación de SMIP

25 Todas las partículas que se utilizaron para la encapsulación de SMIP se formaron utilizando RG 502H 2% p/v (20 mg/ml) con concentraciones de SMIP del 1% y 2% p/p con respecto al polímero.

30 Para el estudio de encapsulación de SMIP se prepararon nanopartículas con un nivel de carga de SMIP teórico del 2% p/p de PLG. Para las fases acuosas se utilizaron agua (pH 5,5-6) y tampón Tris EDTA (pH 7-8). El pH de la fase acuosa influye en la ionización de un adyuvante determinado y por lo tanto en su solubilidad. Dado que en el presente documento se está empleando un SMIP básico, se utilizó tampón Tris EDTA para la fase acuosa, que mantenía el pH de la suspensión entre 7 y 8.

35 La eficacia de encapsulación se calculó como una relación entre la masa de SMIP en las nanopartículas y la masa de SMIP utilizada en la formulación. Más concretamente, se alicuotó la suspensión de nanopartículas (1 ml) en 2 viales y se centrifugó a 16.000 rpm durante 30 minutos. La cantidad de SMIP en el sobrenadante se determinó mediante un ensayo de cromatografía de líquidos de rendimiento ultra alto (Waters Acquity UPLC, Milford, MA, EE.UU.). Se lavó tres veces el sedimento y se determinó la cantidad de SMIP en el sedimento después de hidrolizar el sedimento con hidróxido de sodio, seguido de neutralización con ácido clorhídrico. La eficacia de encapsulación se calculó como la relación entre el SMIP en el sedimento y el contenido total de SMIP de la suspensión. Se consiguió el balance de masas mediante la hidrólisis de 1 ml de la suspensión y la determinación del contenido total de SMIP en 1 ml de la suspensión.

40 La eficacia de encapsulación variaba del 40%-50% cuando se utilizaba agua en la fase acuosa, mientras que con tampón Tris EDTA como fase acuosa, la eficacia de encapsulación era superior al 90%. El aumento de la eficacia de encapsulación se debe muy probablemente a un cambio en el grado de ionización. Sin desear limitarse a la teoría, se plantea la hipótesis de que, debido a que se empleó un SMIP en forma de base, el aumento del pH puede haber reducido su migración a la fase acuosa, potenciando la encapsulación del SMIP en la nanopartícula.

### 45 Ejemplo 3. Adsorción de proteínas.

50 Se adsorbió la proteína MenB a las partículas con SMIP encapsulado del Ejemplo 2, incubándolas en un tampón de Tris EDTA (y ningún otro excipiente) durante toda la noche en un agitador de balanceo de laboratorio a 4°C. Después de la adsorción de las proteínas, se añadieron los excipientes adicionales tensioactivo y azúcar (PVA al 10% p/p de polímero así como sacarosa al 4% y manitol al 3% p/v de reconstitución) antes de la liofilización. Una ventaja de las nanopartículas en comparación con las micropartículas es la mayor superficie de contacto disponible que facilita el aumento de los niveles de carga de proteínas. El aumento del nivel de carga de proteínas permite administrar la misma cantidad de antígeno proteico utilizando menos PLG y menos cantidad de tensioactivo en la liofilización.

55 Los excipientes se añadieron a las suspensiones de nanopartículas inmediatamente antes de la liofilización. Las suspensiones se colocaron en viales de vidrio y se congelaron a -80°C durante 30 minutos. La liofilización se llevó a cabo en un Labconce Freeze Dry System, Freezone 4.5 (Kansas City, MO) que operaba a -49°C y un vacío inferior a  $133 \times 10^{-3}$  mBar durante aproximadamente 24 horas. Todas las muestras se reconstituyeron con 1 ml de agua estéril para inyección.

60 Se centrifugaron las muestras reconstituidas y se separó el sobrenadante del sedimento. Se midió la

cantidad de proteína en el sobrenadante mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) con una columna de permeación en gel con detección por luz ultravioleta (UV) a 214 nm, y se confirmó semi-cuantitativamente mediante los geles de SDS-PAGE. El límite de detección del detector de UV es de 1 µg/ml. Esto conduce a un error típico inferior al 5% para la cantidad de proteína adsorbida. Los resultados del ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño indican que no había proteína-antígeno presente en el sobrenadante, lo que implica que la proteína estaba asociada con las partículas al menos en un 95% (permitiendo un error del 5%). La formulación también se caracterizaba por la granulometría, el pH, la osmolaridad y el contenido de endotoxina tras la liofilización después de la reconstitución en 1 ml de agua estéril. La granulometría se determinó con un Zetasizer 3000HsA (Malvern, Worcestershire, Reino Unido), y los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Nanopartículas RG 502H/SMIP al 2% (p/p)/proteína-antígeno adsorbida en la superficie	177 nm	196,5 nm
Nanopartículas RG 502H/SMIP al 1% (p/p)/proteína-antígeno adsorbida en la superficie	182 nm	202,5 nm

Se midió el pH con tiras indicadoras del pH (colorpHast, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). El pH de la suspensión de nanopartículas tras la liofilización resultó ser de aproximadamente 5,5.

La osmolaridad de la formulación se determinó utilizando un osmómetro de presión de vapor (Wescor Inc., Logan, UT). La osmolaridad de las formulaciones se encontraba en el intervalo de 260-320 mOsm/l.

El contenido de endotoxina de la formulación se determinó colocando la formulación de nanopartículas con PLG apropiadamente diluida en un sistema Endosafe PTS (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, EE.UU.). Este es un sistema de detección de endotoxinas con licencia de la FDA que utiliza un cartucho de ensayo LAL para determinar los niveles de endotoxina en la muestra y que tiene una sensibilidad de 0,01-1,0 EU/ml. Los niveles de endotoxina determinados mediante el sistema Endosafe PTS fueron inferiores a 1,43 UE/ml.

#### Ejemplo 4. Liberación *in vitro* de SMIP

Los estudios de liberación *in vitro* para las formulaciones liofilizadas y no liofilizadas con proteína adsorbida se compararon utilizando nanosuspensiones (1 ml) que tenían concentraciones de SMIP del 1% y del 2% p/p con respecto al polímero. Las concentraciones de polímero utilizadas para formar las nanopartículas se mantuvieron al 2% p/v. Se midieron los perfiles de liberación *in vitro* determinando el contenido de SMIP en el sobrenadante de las nanosuspensiones (volumen de 1 ml). Las formulaciones se reconstituyeron en agua estéril para dar una concentración total de SMIP de 120 µg/ml. Las suspensiones se mantuvieron en agitación, removiendo, a 37°C. Las suspensiones se centrifugaron periódicamente y el sobrenadante se analizó mediante un ensayo de cromatografía de líquidos de rendimiento ultra alto para determinar la cantidad de SMIP en el sobrenadante.

Como se observa en la Fig. 1, las suspensiones no liofilizadas liberaban el contenido de SMIP completamente en dos semanas. Por otro lado, como se observa en la Fig. 2, las formulaciones liofilizadas liberaban sólo aproximadamente el 40% del contenido total de SMIP en 2 semanas. Sin desear limitarse a la teoría, se planteó la hipótesis de que esto podría deberse a la interacción del PVA con el PLGA, de manera que el PVA forma una capa protectora alrededor del PLGA.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de formación de nanopartículas que comprende poner en contacto un primer líquido que comprende un polímero biodegradable disuelto en un disolvente orgánico con un segundo líquido que comprende un disolvente acuoso que comprende un tampón, que es miscible con el disolvente orgánico, al tiempo que es un no disolvente para el polímero biodegradable, en condiciones de agitación suave sin remover de manera que se forman nanopartículas, con lo que el rendimiento del proceso, en base a la cantidad de polímero biodegradable que se recupera en forma de nanopartículas, es del 90% o más y con lo que el valor  $D(v, 0,5)$  para las nanopartículas es inferior a 200 nm.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que:
- 15 a) el polímero biodegradable es un poli(alfa-hidroxiácido); o  
b) el polímero biodegradable está seleccionado de entre los polímeros que comprenden polilactida, poliglicólido o poli(lactida-co-glicólido).
- 20 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la concentración de polímero biodegradable en el primer líquido va del 0,5% al 3% p/v.
4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la agitación se lleva a cabo utilizando un agitador giratorio.
5. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer líquido se añade al segundo líquido gota a gota.
- 25 6. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente permitir que el disolvente orgánico se evapore.
7. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el disolvente orgánico es un disolvente orgánico hidrófilo y es opcionalmente acetona.
- 30 8. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer líquido comprende adicionalmente un producto farmacéutico, que es opcionalmente una especie inmunógena.
9. Método según la reivindicación 8, en el que la especie inmunógena:
- 35 a) es un antígeno; o  
b) es un adyuvante inmunitario; o  
c) un inmunopotenciador de molécula pequeña (SMIP); o  
d) estimula una respuesta inmunitaria innata.
- 40 10. Método según la reivindicación 8, en el que la especie inmunógena:
- 45 a) es una especie inmunógena aceptora de protones y en el que el tampón está seleccionado para mantener un pH superior a la pKa de la especie inmunógena; o  
b) es una especie inmunógena donadora de protones y en el que el tampón está seleccionado para mantener un pH inferior a la pKa de la especie inmunógena.
11. Método según la reivindicación 8, en el que dicho método tiene una eficacia de encapsulación para dicha especie inmunógena del 50% o más.
- 50 12. Método según la reivindicación 8, en el que la cantidad de especie inmunógena con respecto al polímero biodegradable utilizado en el método va del 0,5% al 2%.
13. Método según la reivindicación 8, en el que dicho método tiene una eficacia de encapsulación para dicha especie inmunógena del 80% o más.
- 55 14. Método según la reivindicación 8, en el que la cantidad de especie inmunógena con respecto al polímero biodegradable utilizado en el método va del 0,5% al 3%.
- 60
- 65

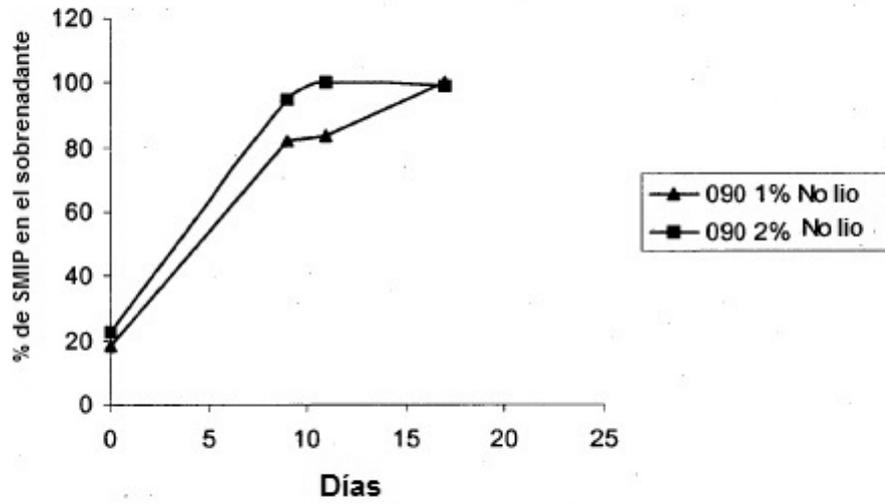


Fig. 1

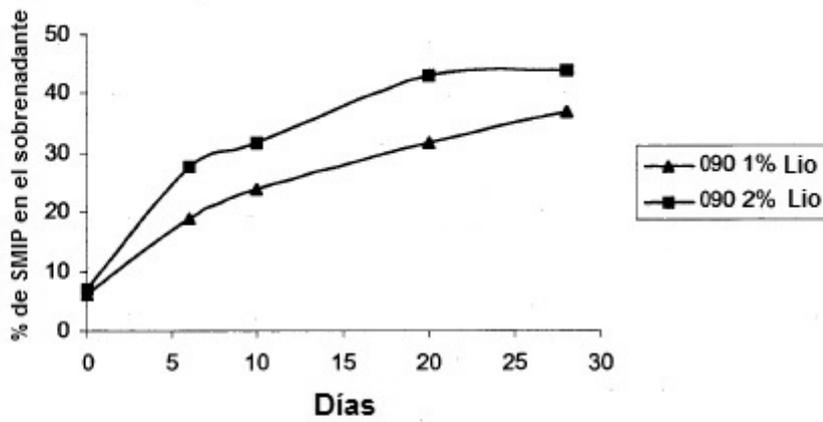


Fig. 2