

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 429**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/095** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2011 E 11702892 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2525815**

54 Título: **Micropartículas de polímero biodegradables irradiadas**

30 Prioridad:

**24.01.2010 US 297809 P**

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

**25.05.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**O'HAGAN, DEREK;  
SINGH, MANMOHAN;  
JAIN, SIDDHARTHA y  
MALYALA, PADMA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 536 429 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).

**Micropartículas de polímero biodegradables irradiadas****DESCRIPCIÓN**

## 5 ANTECEDENTES

Se han usado vehículos en partículas con antígenos adsorbidos o atrapados en intentos por provocar respuestas inmunitarias adecuadas. Tales vehículos presentan múltiples copias de un antígeno seleccionado para el sistema inmunitario y se cree que promueven el atrapamiento y la retención de antígenos en ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígeno mediante la liberación de citocinas.

Por ejemplo, la publicación internacional del mismo solicitante nº WO 98/33487 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. en tramitación junto con la presente nº 2003/0049298 describen el uso de micropartículas adsorbidas en antígeno y encapsuladas en antígeno para estimular respuestas inmunológicas, que incluyen respuestas inmunológicas mediadas por células, además de métodos de preparación de las micropartículas. Polímeros que pueden usarse para formar las micropartículas incluyen poli(lactida) y poli(lactida-co-glicolida) (PLG).

La publicación internacional del mismo solicitante nº WO 00/06123 y el documento WO 01/36599 y la patente de EE.UU. nº 6.884.435 desvelan métodos de preparación de micropartículas que tienen macromoléculas adsorbidas, que incluyen polinucleótidos y antígenos de polipéptido. Las micropartículas comprenden, por ejemplo, un polímero tal como un poli(alfa-hidroxiácido) (por ejemplo, PLGA, un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y similares) y se forman usando, por ejemplo, detergentes catiónicos, aniónicos o no iónicos. Las micropartículas que contienen detergentes aniónicos, tales como micropartículas de PLG que contienen dodecilsulfato de sodio (SDS), pueden usarse con macromoléculas positivamente cargadas, tales como polipéptidos. Las micropartículas que contienen detergentes catiónicos, tales como micropartículas de PLG con CTAB (también conocidas como cetrimida o bromuro de cetiltrimetilamonio), pueden usarse con macromoléculas negativamente cargadas, tales como ADN. También se desvela el uso de tales micropartículas para estimular respuestas inmunológicas, que incluyen respuestas inmunológicas mediadas por células.

El documento US 2005/0271591 desvela una formulación de dosificación que proporciona imágenes de contraste por ultrasonidos potenciadas que comprenden micropartículas compuestas de un polímero biocompatible que incorporan un perfluorocarbono que es un gas a temperatura corporal. La formulación de dosificación desvelada normalmente se prepara en forma de un polvo seco que se reconstituye con agua estéril antes de uso añadiendo el agua para dar una suspensión isosmótica o isotónica de micropartículas.

El documento WO 2007/100699 desvela una composición de micropartículas inmunogénica compuesta de micropartículas de polímero que comprenden un polímero biodegradable. La composición de micropartícula desvelada comprende además un polisacárido catiónico y un antígeno, un adyuvante inmunológico o combinaciones de ambos.

**RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

La invención proporciona un kit que comprende (a) un primer envase sellado y una composición de micropartículas seca estéril contenida dentro de dicho primer envase sellado, comprendiendo dicha composición de micropartículas micropartículas biodegradables de blanco que comprenden un polímero biodegradable, en el que dicho primer envase sellado está configurado para permitir la introducción y eliminación de fluido estéril; y (b) un segundo envase sellado que está configurado para permitir la introducción y eliminación de fluido estéril, conteniendo dicho segundo envase sellado una composición antigénica estéril que comprende un antígeno.

Las composiciones de micropartículas estériles comprenden micropartículas biodegradables, que comprenden al menos un polímero biodegradable.

Las composiciones de micropartículas estériles están secas.

Las composiciones de micropartículas son blancos (es decir, están libres de agentes activos tales como productos farmacéuticos que incluyen fármacos, adyuvantes inmunológicos, antígenos, etc.).

En ciertas realizaciones, los polímeros biodegradables dentro de las composiciones de micropartículas estériles de la invención son polímeros biodegradables sintéticos, por ejemplo, seleccionados de poliésteres (por ejemplo, poli(hidroxiácidos), poli(ésteres cíclicos), etc.), policarbonatos, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, polifosfazinas, y combinaciones de los mismos, entre otros.

En ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas estériles se irradian con gamma. Irradiando con gamma las composiciones de micropartículas en un entorno sellado después de su preparación es posible proporcionar un producto estéril, incluso en el que las composiciones de micropartículas se han fabricado bajo

condiciones asépticas.

Las composiciones de micropartículas estériles según la invención pueden proporcionarse, por ejemplo, dentro de un envase sellado que está configurado para permitir la introducción y eliminación de fluido estéril (por ejemplo, dentro de un vial de vidrio que tiene un tabique de goma, etc.).

Proporcionando composiciones de micropartículas secas estériles dentro de un envase sellado tal, las micropartículas pueden exponerse a un fluido acuoso (por ejemplo, agua para inyección), formando así una suspensión acuosa de las micropartículas, que puede posteriormente extraerse y administrarse a un paciente.

Preferentemente, tras la adición de agua en una cantidad de forma que la composición de micropartículas esté presente en una concentración de 25 mg/ml, se forma una suspensión en la que las micropartículas en suspensión tienen un valor de  $D(v,0,5)$  que es inferior a 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, que oscila de 10  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  a 2,5  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  a 500 nm a 250 nm a 100 nm o menos.

En ciertas realizaciones, un envase sellado tal puede proveerse junto con una etiqueta que indica uno o más miembros del grupo que consiste en los siguientes: (a) una declaración de que la formulación de micropartículas se ha irradiado con gamma, (b) información de almacenamiento, (c) información de dosificación, y (d) instrucciones referentes a cómo administrar la formación de micropartículas. En algunos casos, el envase sellado y la etiqueta pueden estar contenidos dentro de un material de embalaje adecuado.

Ejemplos de antígenos incluyen antígenos que contienen péptidos, antígenos que contienen polisacáridos, antígenos que contienen polinucleótidos e híbridos de los mismos (por ejemplo, antígenos híbridos de péptidos-polisacáridos), entre otros. Los antígenos pueden derivarse, por ejemplo, de células tumorales y de organismos patógenos tales como virus, bacterias, hongos y parásitos.

Muchos antígenos no son resistentes a los efectos de la irradiación gamma, en cuyo caso los antígenos pueden combinarse con las micropartículas después de la esterilización por radiación. Por ejemplo, un fluido que contiene antígeno acuoso estéril (por ejemplo, disolución, suspensión, etc.) puede introducirse a las composiciones de micropartículas de la invención (que pueden estar, por ejemplo, en forma seca, en una suspensión acuosa, etc.), formando así una suspensión acuosa estéril que contiene las micropartículas y antígeno, que pueden extraerse y administrarse posteriormente a un paciente. En algunas de estas realizaciones, un porcentaje sustancial del antígeno (por ejemplo, 25 % en peso o más) se adsorbe a las micropartículas dentro de un corto periodo de tiempo (por ejemplo, 30 minutos o menos), por ejemplo, del 25 % en peso al 50 % en peso al 75 % en peso al 90 % en peso al 95 % en peso o más del antígeno puede adsorberse a las micropartículas, preferentemente dentro de un periodo que oscila de 30 minutos a 10 minutos a 5 minutos a 1 minuto o menos.

En ciertas realizaciones (por ejemplo, en las que el antígeno que va a administrarse es un antígeno que contiene péptidos), pueden emplearse micropartículas que tienen una carga negativa neta para potenciar la adsorción. En ciertas otras realizaciones (por ejemplo, en las que el antígeno que va a administrarse es un antígeno que contiene polinucleótidos), las micropartículas que tienen una carga positiva neta pueden emplearse para potenciar la adsorción.

La carga neta de una población de micropartículas dada puede medirse usando técnicas conocidas que incluyen medición del potencial zeta de las micropartículas. En ciertas realizaciones, tras la adición de agua en una cantidad tal que la composición de micropartículas esté presente en una concentración de 25 mg/ml, se forma una suspensión en la que las micropartículas en suspensión tienen un potencial zeta que es superior a + 20 mV (para partículas positivamente cargadas) o inferior a - 20 mV (para partículas negativamente cargadas) a pH fisiológico.

En ciertas realizaciones, las micropartículas se forman usando un polímero biodegradable cargado. En ciertas realizaciones, se forman micropartículas en presencia de una especie cargada o posteriormente se tratan con una especie cargada. Ejemplos de tales especies cargadas incluyen moléculas pequeñas iónicas, péptidos iónicos, polímeros iónicos y tensioactivos iónicos, entre otros.

En ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas estériles de la invención comprenden agentes crioprotectores. Tales agentes son particularmente deseables, por ejemplo, si las composiciones de micropartículas secas estériles se forman usando un proceso de congelación-secado (por ejemplo, liofilización). Ejemplos de agentes crioprotectores incluyen polioles, hidratos de carbono y combinaciones de los mismos, entre otros.

En ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas según la presente invención comprenden adyuvantes inmunológicos. Ejemplos de adyuvantes inmunológicos incluyen oligonucleótidos de CpG, ARN bicatenario, toxinas lábiles al calor de *E. coli*, sales de aluminio, compuestos de fosfato de liposacárido, miméticos de fosfato de liposacárido, análogos de monofosforil lípido A, potenciadores inmunitarios de moléculas pequeñas (tales como agonistas de TLR, que incluyen compuestos de benzonaftiridina, lipopéptidos, etc.), fosfatidiletanolamina de muramiltipéptido y tocoferoles, entre otros.

Si los adyuvantes inmunológicos no son resistentes a los efectos de la radiación gamma, los adyuvantes inmunológicos pueden combinarse con las micropartículas después de la esterilización por radiación. Por ejemplo, una disolución o suspensión que contiene antígeno estéril puede introducirse en las micropartículas (que pueden estar, por ejemplo, en forma seca, en una suspensión acuosa, etc.), formando así una suspensión acuosa estéril que contiene las micropartículas y adyuvante. En ciertas realizaciones, un porcentaje sustancial del adyuvante inmunológico (por ejemplo, 25 % en peso o más) se adsorbe a las micropartículas dentro de un corto periodo de tiempo (por ejemplo, 30 minutos o menos), por ejemplo, del 25 % en peso al 50 % en peso al 75 % en peso al 90 % en peso al 95 % en peso o más del adyuvante inmunológico puede adsorberse a las micropartículas dentro de un periodo que oscila de 30 minutos a 10 minutos a 5 minutos a 1 minuto o menos.

En ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas según la presente invención comprenden un potenciador inmunitario de molécula pequeña resistente a los efectos de potenciadores inmunitarios de molécula. En ciertas realizaciones, el potenciador inmunitario de molécula pequeña es un agonista de TLR7 (por ejemplo, un compuesto de benzonafiridina). En otras realizaciones, el potenciador inmunitario de molécula pequeña es un agonista de TLR2 (por ejemplo, un lipopéptido). En ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas de la invención comprenden tanto un agonista de TLR7 como de TLR2, encapsulado dentro de las micropartículas.

En ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas según la presente invención comprenden agentes terapéuticos u otros fármacos cargados. Si las micropartículas se esterilizan por irradiación gamma y si un agente terapéutico, o un fármaco cargado, es resistente a los efectos de tal radiación, el agente terapéutico, o fármaco cargado según lo requiera el caso, puede, por ejemplo, asociarse a la superficie de las micropartículas (por ejemplo, adsorberse o unirse de otro modo), atraparse o encapsularse dentro de las micropartículas, o ambos. Si un agente terapéutico, o un fármaco cargado, no es resistente a los efectos de tal radiación, el agente terapéutico o fármaco cargado se combina con las micropartículas después de la esterilización por radiación.

Otros aspectos de la presente invención se refieren a kits que contienen composiciones de micropartículas según la invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones se proporciona un kit que comprende: (a) un primer envase sellado que contiene una composición de micropartículas seca estéril como se describe en el presente documento, (b) un envase sellado adicional que contiene uno o más antígenos de vacuna estériles (por ejemplo en forma seca, en forma de una disolución/suspensión estéril, etc.) y/o (c) un envase sellado adicional que contiene uno o más adyuvantes inmunológicos estériles (por ejemplo, en forma seca, en forma de una disolución/suspensión estéril, etc.). En ciertas realizaciones se proporciona un kit que comprende: (a) un primer envase sellado que contiene una composición de micropartículas seca estéril como se describe en el presente documento, (b) un envase sellado adicional que contiene uno o más agentes terapéuticos estériles (por ejemplo en forma seca, en forma de una disolución/suspensión estéril, etc.) y/o (c) un envase sellado adicional que contiene uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables estériles.

El primer envase sellado y el uno o más envases sellados adicionales están configurados para permitir la introducción y eliminación de fluido estéril (por ejemplo, mediante un tabique de goma, etc.). Tales kits pueden proporcionarse con etiquetado y/o embalaje como se ha descrito anteriormente.

En otros aspectos, la presente invención proporciona métodos de producción de composiciones de micropartículas tales como las anteriores.

En todavía otros aspectos, la presente invención proporciona métodos de administración de las composiciones de micropartículas a un sujeto huésped (por ejemplo, para fines terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico). El animal huésped es preferentemente un animal vertebrado, más preferentemente un mamífero, e incluso más preferentemente un ser humano.

En ciertas realizaciones se proporcionan métodos de administración de las composiciones de micropartículas a un sujeto huésped, que comprenden (a) combinar micropartículas de polímero biodegradables secas estériles con un fluido acuoso que contiene uno o más antígenos, adsorbiéndose así al menos una porción del antígeno sobre la superficie de las micropartículas y (b) administrar la combinación a un mamífero, preferentemente en el plazo de 30 minutos desde la mezcla, más preferentemente en el plazo de 10 minutos desde la mezcla, incluso más preferentemente tan pronto como sea conveniente, después de la mezcla.

Estos y otros aspectos, realizaciones y ventajas de la presente invención serán más fácilmente evidentes para aquellos expertos habituales en la materia en vista de la divulgación en el presente documento.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un gráfico de barras que ilustra los títulos de ELISA de anticuerpos en ratones a dosificaciones 1 y 10 µg para los tres antígenos Men (287-953, 961 y 936-741) para lo siguiente (a) adsorción durante la noche de Men sobre PLG no irradiada con gamma y liofilización, (b) adsorción de 30 minutos de Men sobre PLG no irradiada con gamma, y (c) adsorción de 30 minutos de Men sobre PLG irradiada con gamma.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

## 1. MICROPARTÍCULAS

- 5 La presente invención proporciona composiciones de micropartículas estériles que comprenden micropartículas biodegradables que comprenden al menos un polímero biodegradable. En ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas estériles son secas y/o blancos.

10 Polímeros biodegradables útiles para formar las micropartículas de la invención incluyen homopolímeros, copolímeros y mezclas de polímeros, tanto naturales como sintéticos. Tales polímeros pueden derivarse, por ejemplo, de los siguientes: poliésteres (por ejemplo, polihidroxiácidos, policaprolactonas, etc.), policarbonatos, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos (por ejemplo, polialquilcianoacrilato o "PACA"), polifosfazinas y combinaciones de los mismos. Más típicos son los poliésteres, por ejemplo, homopolímeros y copolímeros de ácido glicólico, ácido L-láctico, ácido D,L-láctico, ácido hidroxibutírico, ácido hidroxivalérico, caprolactona y dioxanona, entre otros. Incluso más típicos son los homopolímeros y copolímeros de L-lactida, D,L-lactida y glicolida, por ejemplo, poliglicolida, polilactida, por ejemplo, poli(L-lactida) o poli(D,L-lactida) (denominada PLA en el presente documento) y poli(lactida-co-glicolida), por ejemplo, poli(L-lactida-co-glicolida) y poli(D,L-lactida-co-glicolida) (designada "PLG" o "PLGA" en el presente documento).

20 Los polímeros anteriores están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y un peso molecular adecuado para un uso dado se determina fácilmente por un experto en la materia. Así, por ejemplo, un peso molecular adecuado para PLA puede ser del orden de aproximadamente 2.000 a 5.000. Un peso molecular adecuado para PLG puede oscilar de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 200.000.

25 Si se emplean copolímeros, pueden estar disponibles copolímeros con una variedad de relaciones de monómero. Por ejemplo, si se usa PLG para formar las micropartículas, encontrará uso una variedad de relaciones molares de lactida:glicolida en el presente documento, y la relación es ampliamente una cuestión de elección, dependiendo en parte de cualquier especie adsorbida y/o atrapada coadministrada y la tasa de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero de PLG 50:50, que contiene 50 % de D,L-lactida y 50 % de glicolida proporcionará un copolímero que se resorbe más rápido, mientras que PLG 75:25 se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10, incluso más lentamente, debido al elevado componente de lactida. Mezclas de micropartículas con relaciones de lactida:glicolida variables pueden también encontrar uso en el presente documento con el fin de lograr la cinética de liberación deseada. La tasa de degradación de las micropartículas de la presente invención también puede controlarse por factores tales como peso molecular del polímero y cristalinidad del polímero.

35 Si se usan, los copolímeros de PLG normalmente son aquellos que tienen una relación molar de lactida/glicolida que oscila, por ejemplo, de 20:80 a 25:75 a 40:60 a 45:55 a 55:45 a 60:40 a 75:25 a 80:20, y que tiene un peso molecular que oscila, 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.

40 Los copolímeros de PLG con relaciones de lactida:glicolida, pesos moleculares y grupos terminales variables están fácilmente disponibles comercialmente de varias fuentes que incluyen de Boehringer Ingelheim, Alemania, Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL, EE.UU., DURECT Corporation, Pelham, AL y Lakeshore Biomaterials, Birmingham, AL, EE.UU. Algunos copolímeros de PLG a modo de ejemplo, disponibles de Boehringer Ingelheim, incluyen: (a) RG 502, una PLG que tiene predominantemente grupos terminales de éster de alquilo sobre uno de los extremos de cadena, una relación molar de lactida/glicolida de 50:50 y un peso molecular de 12.000 Da, (b) RG 503, una PLG que tiene predominantemente grupos terminales de éster de alquilo sobre uno de los extremos de cadena, una relación molar de lactida/glicolida de 50:50 y un peso molecular de 34.000 Da, (c) RG 504, una PLG que tiene predominantemente grupos terminales de éster de alquilo sobre uno de los extremos de cadena, una relación molar de lactida/glicolida de 50:50 y un peso molecular de 48.000 Da, (d) RG 752, una PLG que tiene predominantemente grupos terminales de éster de alquilo sobre uno de los extremos de cadena, una relación molar de lactida/glicolida de 75:25 y un peso molecular de 22.000 Da, (e) RG 755, una PLG que tiene predominantemente grupos terminales de éster de alquilo sobre uno de los extremos de cadena, una relación molar de lactida/glicolida de 75:25 y un peso molecular de 68.000 Da, (f) RG 502H, una PLG que tiene una relación molar de lactida/glicolida de 50:50 y que tiene predominantemente grupos terminales de carboxilo libres sobre uno de los extremos de cadena, y (g) RG 503H, una PLG que tiene una relación molar de lactida/glicolida de 50:50 y que tiene predominantemente grupos terminales de carboxilo libres sobre uno de los extremos de cadena.

60 Las micropartículas según la invención pueden prepararse usando cualquier método adecuado.

65 Por ejemplo, en algunas realizaciones, pueden formarse micropartículas usando secado por pulverización y coacervación como se ha descrito en, por ejemplo, Thomasin y col., J. Controlled Release, 41:131 (1996); patente de EE.UU. nº 2.800.457; Masters, K. (1976) Spray Drying 2nd Ed. Wiley, New York; técnicas de recubrimiento por suspensión de aire, tales como recubrimiento en paila y recubrimiento Wurster, como se describe por Hall y col., (1980) The "Wurster Process" in Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications (A.F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida and Deasy, P.B., Crit. Rev. Ther. Drug Carriers

Syst. S(2):99-139 (1988); y gelación iónica como se ha descrito por, por ejemplo, Lim y col., Science 210:908-910 (1980).

Más preferentemente, pueden formarse micropartículas usando un proceso de evaporación de disolvente de agua en aceite en agua (w/o/w) o usando un método de nanoprecipitación.

El proceso de evaporación de disolvente de w/o/w se describe, por ejemplo, en O'Hagan y col., Vaccine 11:965-969 (1993), Jeffery y col., Pharm. Res. 10:362 (1993), y el documento WO 00/06123 a O'Hagan y col. En general, un polímero de interés, tal como PLG, se disuelve en un disolvente orgánico, tal como cloruro de dimetilo (también llamado cloruro de metileno y diclorometano), acetato de etilo, acetonitrilo, acetona, cloroformo, y similares. Entonces, la disolución de polímero se combina con un primer volumen de disolución acuosa y se emulsiona para formar una emulsión de o/w. La disolución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, una disolución tamponada, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una disolución de tampón citrato de sodio/ácido etilendiaminatetraacético (citrato de sodio/ETDA), entre otros. Normalmente, la relación en volumen de disolución de polímero con respecto a disolución acuosa oscila de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1, más normalmente aproximadamente 10:1. La emulsión se realiza usando cualquier equipo apropiado para esta tarea, y normalmente es un dispositivo de alto cizallamiento tal como, por ejemplo, un homogeneizador. A continuación, un volumen de la emulsión de o/w se combina con un segundo volumen mayor de una disolución acuosa, que normalmente contiene un tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo sin carga (por ejemplo, PVA (poli(alcohol vinílico)), povidona (también conocida como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitano, polisorbatos, monoéteres de glicol polioxietilados, alquilfenoles polioxietilados, o poloxámeros, entre otros), un tensioactivo catiónico (tratado más adelante) o un tensioactivo aniónico (tratado más adelante). La relación en volumen de disolución acuosa con respecto a la emulsión de o/w normalmente oscila de aproximadamente 2:1 a 10:1, más normalmente aproximadamente 4:1. A continuación, esta mezcla se homogeneiza para producir una emulsión doble de w/o/w estable. Entonces, los disolventes orgánicos se evaporan dando micropartículas. Las micropartículas fabricadas en presencia de tensioactivos cargados, tales como tensioactivos aniónicos o catiónicos, pueden dar micropartículas con una superficie que tiene una carga negativa neta o una positiva neta, que pueden adsorber una amplia variedad de moléculas. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas con tensioactivos aniónicos, tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), por ejemplo, micropartículas de SDS-PLG, pueden adsorber especies positivamente cargadas, por ejemplo, especies que contienen polipéptidos tales como proteínas. Similarmente, las micropartículas fabricadas con tensioactivos catiónicos, tales como CTAB, por ejemplo, micropartículas de PLG/CTAB, pueden adsorber especies negativamente cargadas, por ejemplo, especies que contienen polinucleótidos tales como ADN, ARN, heteropolímeros de ADN-ARN u oligonucleótidos.

El método de nanoprecipitación, también denominado el método de desplazamiento de disolvente, es otro ejemplo de un método adecuado para formar micropartículas para su uso en la invención. Véanse, por ejemplo, la patente europea nº 0274961B1 titulada "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules", Devissaguet y col., la patente de EE.UU. nº 5.049.322 por el mismo título, Fessi y col., la patente de EE.UU. nº 5.118.528, titulada "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of microparticles" y Wendorf y col., documento WO 2008/051245, titulado "Nanoparticles for use in Immunogenic compositions". En esta técnica, por ejemplo, un polímero puede disolverse en un disolvente orgánico (por ejemplo, un disolvente orgánico hidrófilo tal como acetona, etanol, etc.). La disolución orgánica resultante puede entonces combinarse con otro disolvente, que es miscible con el disolvente orgánico aunque es un no disolvente para el polímero, normalmente una disolución acuosa. La disolución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, una disolución tamponada, tal como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una disolución de tampón citrato de sodio/ácido etilendiaminatetraacético (citrato de sodio/EDTA). La disolución orgánica y la disolución acuosa pueden entonces combinarse en volúmenes relativos adecuados (por ejemplo, normalmente de 1:2 a 2:1, más normalmente aproximadamente 1:1). Por ejemplo, la disolución orgánica puede verterse o inyectarse en el no disolvente mientras se agita, o viceversa. Seleccionando un sistema en el que el polímero es soluble en el disolvente orgánico, mientras que es significativamente menos soluble en la mezcla miscible del disolvente orgánico con el no disolvente, puede formarse una suspensión de micropartículas prácticamente instantáneamente. Posteriormente, el disolvente orgánico puede eliminarse de la suspensión, por ejemplo, mediante evaporación.

En algunas realizaciones, se desea proporcionar una o más especies adicionales (además de polímero biodegradable), que puedan asociarse al interior (por ejemplo, atraparse) y/o superficie (por ejemplo, adsorberse) de las micropartículas o puedan estar no asociadas a las micropartículas. Tales especies adicionales pueden incluir, por ejemplo, agentes para ajustar la tonicidad o pH, agentes crioprotectores, agentes inductores de la carga de micropartículas (por ejemplo, tensioactivos cargados, polímeros cargados, etc.), adyuvantes inmunológicos, antígenos, etc.

Tales especies adicionales pueden proporcionarse durante el proceso de formación de micropartículas, particularmente si la especie adicional no se vuelve inoperable por cualquier proceso de esterilización posterior (por ejemplo, un proceso de irradiación gamma). En las técnicas de formación de micropartículas anteriormente descritas (por ejemplo, evaporación de disolvente de w/o/w, nanoprecipitación, etc.), las disoluciones orgánicas y/o acuosas empleadas pueden así contener adicionalmente diversas especies adicionales según se desee. Por ejemplo, estas

especies adicionales pueden añadirse (a) a una disolución orgánica, tanto en forma soluble en aceite como dispersable en aceite o (b) a una disolución acuosa, tanto en forma soluble en agua como dispersable en agua.

En otras realizaciones, una o más especies adicionales pueden añadirse tras la formación de micropartículas (normalmente tras la eliminación de disolvente orgánico, además de tras las etapas de lavado, si las hay). Estas especies adicionales se añaden frecuentemente a las micropartículas como una disolución o dispersión acuosa. Estas especies pueden, por ejemplo, estar en disolución y/o se acumulan en la interfase partícula-disolución, por ejemplo, siendo adsorbidas en la superficie de las micropartícula.

Una vez se forma una composición de micropartículas adecuada que comprende micropartículas (por ejemplo, usando las técnicas anteriormente descritas u otras), puede liofilizarse para el uso futuro.

En muchas realizaciones, la composición de micropartículas se esteriliza, por ejemplo, usando un proceso de esterilización adecuado tal como irradiación gamma. Tales composiciones de micropartículas pueden esterilizarse, por ejemplo, después de cargarse en un envase sellado (por ejemplo, un vial con un tabique). Dosificaciones de irradiación gamma típicas oscilan, por ejemplo, de 10 a 30 unidades kGy.

## 2. ANTÍGENOS

Como se observa anteriormente, las composiciones de micropartículas y kits según la invención pueden incluir uno o más antígenos, proporcionándose cada antígeno 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 usarse para tratar o prevenir enfermedades producidas por cualquiera de los patógenos o tumores mencionados más adelante.

Antígenos para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los antígenos expuestos a continuación, o antígenos derivados de uno o más de los patógenos y tumores expuestos a continuación:

### A. ANTÍGENOS BACTERIANOS

Antígenos bacterianos adecuados para su uso en la invención incluyen proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y vesículas de la membrana externa que pueden aislarse, purificarse o derivarse de una bacteria. Además, los antígenos bacterianos incluyen lisados bacterianos y formulaciones de bacterias inactivadas. Los antígenos bacterianos pueden producirse por expresión recombinante. Los antígenos bacterianos incluyen preferentemente epítopes que se exponen sobre la superficie de la bacteria durante al menos una etapa de su ciclo vital. Los antígenos bacterianos se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos. Los antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de una o más de las bacterias expuestas más adelante, además de los ejemplos de antígenos específicos identificados más adelante.

*Neisseria meningitidis*: los antígenos de *Meningitidis* incluyen proteínas (tales como aquellas identificadas en los documentos WO99/24578; WO99/36544; WO99/57280; WO00/22430; Tettelin y col. (2000) Science 287:1809-1815; documento WO96/29412; y Pizza y col. (2000) Science 287:1816-1820), sacáridos (incluyendo un polisacárido, oligosacárido o lipopolisacárido), o vesículas de la membrana externa (documento WO 01/52885; Bjune y col. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096; Fuskasawa y col. (1999) Vaccine 17:2951-2958; y Rosenqist y col. (1998) Dev. Biol. Strand 92:323-333) purificadas o derivadas de un serogrupo de *N. meningitidis* tal como A, C, W135, Y y/o B. Pueden seleccionarse antígenos de proteína de *Meningitidis* de adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de Fe y proteínas asociadas a la membrana (preferentemente proteínas integrales de membrana externa).

*Streptococcus pneumoniae*: los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* incluyen un sacárido (incluyendo un polisacárido o un oligosacárido) y/o proteína de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos de sacárido pueden seleccionarse de 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 de proteína pueden seleccionarse, por ejemplo, de una proteína identificada en los documentos WO 98/18931; WO 98/18930; la patente de EE.UU. nº 6.699.703; la patente de EE.UU. nº 6.800.744; los documentos 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), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas químéricas de truncados de CbpX-truncados de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 o Sp133.

*Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A): los antígenos de *Streptococcus* del grupo A incluyen proteínas identificadas en los documentos WO 02/34771 y WO 2005/032582 (incluyendo GAS40), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluyendo aquellas 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 asociada a hemo estreptocócico (Shp) y estreptolisina S (SagA).

*Moraxella catarrhalis*: los antígenos de *Moraxella* incluyen antígenos identificados en los documentos WO 02/18595

y WO 99/58562, antígenos de proteína de membrana externa (HMW-OMP), antígeno C y/o LPS.

*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.

*Staphylococcus aureus*: los antígenos de *Staphylococcus aureus* incluyen polisacáridos capsulares de tipo 5 y 8 de *S. aureus* opcionalmente conjugados con exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante no tóxica tal como StaphVAX™, y antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, cinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben la asfixia fagocítica (cápsula, proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa, factor de coagulación y toxinas que dañan la membrana (opcionalmente desintoxicadas) que lisan membranas de células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina).

*Staphylococcus epidermidis*: los antígenos de *S. epidermidis* incluyen antígeno asociado a ceno (SAA).

*Clostridium tetani* (tétanos): los antígenos del tétanos incluyen toxoide tetánico (TT), usado preferentemente como una proteína portadora junto con/conjugada con las composiciones de la presente invención.

*Corynebacterium diphtheriae* (difteria): los antígenos de la difteria incluyen toxina diftérica, preferentemente desintoxicados, tales como CRM197. Antígenos adicionales que pueden modular, inhibir o asociarse a una ribosilación de ADP se contemplan para la combinación/coadministración/conjugación con las composiciones de la presente invención. Los toxoides de la difteria pueden usarse como proteínas portadoras.

*Haemophilus influenzae B (Hib)*: los antígenos de *Hib* incluyen un antígeno de sacárido de Hib.

*Pseudomonas aeruginosa*: los antígenos de *Pseudomonas* incluyen endotoxina A, proteína Wzz, LPS de *P. aeruginosa*, más particularmente LPS aislada de PAO1 (serotipo O5) y proteínas de membrana externa, que incluyen proteínas F de membrana externa (OprF) (Prince y col. (2001) Infect Immun. 69(5):3510-3515).

*Legionella pneumophila*: los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Legionella pneumophila*.

*Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B): los antígenos de *Streptococcus* del grupo B incluyen antígenos de proteína y de sacárido, tales como aquellos identificados en los documentos WO 02/34771; WO 03/093306; WO 04/041157; y WO 2005/002619 (que incluye proteínas GBS 59, GBS 67, GBS 80, GBS 276, GBS 322, y que incluye antígenos de sacárido derivados de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII).

*Neisseria gonorrhoeae*: los antígenos de *gonorrhoeae* incluyen proteína Por (o porina) tal como PorB (véase, por ejemplo, Zhu y col. (2004) Vaccine 22:660-669), una proteína de unión a transferrina tal como TbpA y TbpB (véase, por ejemplo, Price y col. (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 la membrana externa (OMV) (véanse, por ejemplo, Plante y col. (2000) J. Infect. Dis. 182:848-855; documentos WO 99/24578; WO 99/36544; WO 99/57280; y WO02/079243).

*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), serotipos L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> (asociados a linfogranuloma venéreo) y serotipos, D-K. Los antígenos de *Chlamydia trachomatis* también incluyen antígenos identificados en los documentos WO 00/37494; WO 03/049762; WO 03/068811; y WO 05/002619 que incluye PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), ADNK (CT396), CT398, similar a OmpH (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823), MurG (CT761), CT396 y CT761, y combinaciones específicas de estos antígenos.

*Treponema pallidum* (sífilis): los antígenos de la sífilis incluyen el antígeno TmpA.

*Haemophilus ducreyi* (que produce chancroide): los antígenos de *Ducreyi* incluyen proteína de membrana externa (DsrA).

*Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*: los antígenos incluyen una repetición de trisacáridos u otros antígenos derivados de *Enterococcus* proporcionados en la patente de EE.UU. nº 6.756.361.

*Helicobacter pylori*: los antígenos de *H. pylori* incluyen Cag, Vac, Nap, HopX, HopY y antígeno de ureasa.

*Staphylococcus saprophyticus*: los antígenos incluyen la hemaglutinina de 160 kDa del antígeno de *S. saprophyticus*.

*Yersinia enterocolitica*: los antígenos incluyen LPS (Xu y col. (2002) Infect. Immun. 70(8): 4414-4423).

*E. coli*: los antígenos de *E. coli* pueden derivarse de cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).



*Bacillus anthracis* (ántrax): los antígenos de *B. anthracis* están opcionalmente desintoxicados y pueden seleccionarse de componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), ambos de los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA). En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención no incluyen un antígeno del carbunco.

*Yersinia pestis* (plaga): los antígenos de plagas incluyen antígeno capsular F1 (Gosfeld y col. (2003) Infect. Immun. 71(1): 374-383), LPS (Fields y col. (1999) Infect. Immun. 67(10): 5395-5408), antígeno V de *Yersinia pestis* (Hill y col. (1997) Infect. Immun. 65(11): 4476-4482).

*Mycobacterium tuberculosis*: los antígenos de *Tuberculosis* incluyen lipoproteínas, LPS, antígenos BCG, una proteína de fusión de antígeno 85B (Ag85B) y ESAT-6 opcionalmente formulado en vesículas de lípido catiónico (Olsen y col. (2004) Infect. Immun. 72(10): 6148-6150), antígenos asociados a isocitrato deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Banerjee y col. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12652-12657) y antígenos de MPT51 (Suzuki y col. (2004) Infect. Immun. 72(7):3829-3837).

*Rickettsia*: los antígenos incluyen proteínas de membrana externa que incluyen la proteína de membrana externa A y/o B (OmpB) (Chao y col. (2004) Biochim. Biophys. Acta. 1702(2):145-152), LPS y antígeno de proteína de superficie (SPA) (Carl y col. (1989) J. Autoimmun. 2 Suppl:81-91).

*Listeria monocytogenes*: los antígenos bacterianos pueden derivarse de *Listeria monocytogenes*.

*Chlamydia pneumoniae*: los antígenos incluyen aquellos identificados en los documentos WO 02/02606 y WO 05/084306, que incluyen CPn0324, Cpn0301, Cpn0482, Cpn0503, Cpn0525, Cpn0558, Cpn0584, Cpn0800, Cpn0979, Cpn0498, Cpn0300, Cpn0042, Cpn0013, Cpn450, Cpn0661, Cpn0557, Cpn0904, Clpn0795, Cpn0186 y Cpn0604, y combinaciones específicas de estos antígenos.

*Vibrio cholerae*: los antígenos incluyen antígenos de proteinasa, LPS, particularmente lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos O-específicos O1 Inaba, *V. cholerae* O139, antígenos de la vacuna IEM108 (Liang y col. (2003) Infect. Immun. 71(10):5498-5504) y toxina de *Zonula occludens* (Zot).

*Salmonella typhi* (fiebre tifoidea): los antígenos incluyen polisacáridos capsulares preferentemente conjugados (Vi, es decir, vax-TyVi).

*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 (Erps), proteínas de unión a decorina (tales como DbpA) y proteínas VI antígenicamente variables tales como antígenos asociados a P39 y P13 (una proteína de membrana integral, Noppa y col. (2001) Infect. Immun. 69(5):3323-3334) y proteína de variación antigénica (Lawrenz y col. (1999) J. Clin. Microbiol. 37(12): 3997-4004).

*Porphyromonas gingivalis*: los antígenos incluyen la proteína de membrana externa (OMP).

*Klebsiella*: los antígenos incluyen OMP, que incluyen OMP A, y polisacáridos opcionalmente conjugados con toxoide tetánico.

Otros antígenos bacterianos incluyen ser antígenos capsulares, antígenos de polisacárido o antígenos de proteína de cualquiera de los anteriores. Otros antígenos bacterianos también incluyen preparaciones de vesículas de la membrana externa (OMV). Adicionalmente, los antígenos incluyen versiones vivas, atenuadas y/o purificadas de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas. Los antígenos pueden derivarse de bacterias Gram-negativas o Gram-positivas. Los antígenos pueden derivarse de bacterias aerobias o anaerobias.

Adicionalmente, cualquiera de los sacáridos derivados de bacterianos anteriores (polisacáridos, LPS, LOS u oligosacáridos) puede conjugarse con otro agente o antígeno tal como una proteína portadora (por ejemplo, CRM197). Tal conjugación puede ser conjugación directa efectuada por la aminación reductora de restos carbonilo sobre los grupos sacárido con respecto a amino sobre la proteína, como se proporciona en la patente de EE.UU. nº 5.360.897; y Roy y col. (1984) Can. J. Biochem. Cell Biol. 62(5):270-275. En otra realización, los sacáridos pueden conjugarse mediante un ligador tal como con succinamida u otros enlaces proporcionados en Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, 1st ed., Academic Press (1996) y Wong, S.S., CRC, Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, 1st ed., CRC-Press (1991).

## B. ANTÍGENOS VIRALES

Antígenos virales adecuados para uso en la invención incluyen virus inactivados (o destruidos), virus atenuados, formulaciones de virus fraccionados, formulaciones de subunidades purificadas, proteínas virales que pueden aislarse, purificarse o derivarse de un virus, y partículas similares a virus (VLP). Los antígenos virales pueden derivarse de virus propagados en cultivo celular u otro sustrato o expresarse recombinantemente. Los antígenos virales incluyen preferentemente epítopes que se exponen sobre la superficie del virus durante al menos una fase de

su ciclo vital. Los antígenos virales se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos o cepas aisladas. Los antígenos virales incluyen antígenos derivados de uno o más de los virus expuestos a continuación, además de los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación.

- 5 *Ortomixovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un ortomixovirus tal como la gripe A, B y C. Los antígenos de ortomixovirus pueden seleccionarse de una o más de las proteínas virales que incluyen hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), uno o más de los componentes de transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los antígenos preferidos incluyen HA y NA.
- 10 Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas de gripe interpandémica (anuales). Los antígenos de la gripe pueden derivarse de cepas con la posibilidad de producir un brote pandémico (es decir, cepas de gripe con nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en cepas actualmente en circulación, o cepas de gripe que son patógenas en sujetos aviares y tienen la posibilidad de transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de gripe que son patógenas para seres humanos). Los antígenos de la gripe pueden derivarse de virus
- 15 crecidos en huevos o cultivo celular.  
  
Virus *Paramyxoviridae*: los antígenos virales pueden derivarse de virus *Paramyxoviridae* tales como pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV) y morbillivirus (sarampión).
- 20 *Pneumovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un pneumovirus tal como el virus respiratorio sincitial (VSR), virus sincitial respiratorio bovino, virus de la neumonía de ratones y virus de la rinotraqueítis del pavo. Preferentemente, el pneumovirus es VSR. Los antígenos de pneumovirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas que incluyen las proteínas de superficie fusión (F), glucoproteína (G) y proteína hidrófoba pequeña (SH), proteínas de matriz M y M2, proteínas de nucleocápside N, P y L y proteínas no estructurales NS1 y
- 25 NS2. Los antígenos de pneumovirus preferidos incluyen F, G y M. Véase, por ejemplo, Johnstone y col. (2004) J. Gen. Virol. 2004 Nov; 85(Pt 11):3229-3238). Los antígenos de pneumovirus también pueden formularse en o derivarse de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos VSR/PIV pueden comprender componentes de tanto VSR como PIV.
- 30 *Paramixovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un paramixovirus tal como los tipos 1-4 del virus paragripal (PIV), paperas, virus de Sendai, virus simio 5, virus paragripal bovino y virus de la enfermedad de Newcastle. Preferentemente, el paramixovirus es PIV o paperas. Los antígenos de paramixovirus pueden seleccionarse de 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 matriz (M). Las proteínas de paramixovirus preferidas
- 35 incluyen HN, F1 y F2. Los antígenos de paramixovirus también pueden formularse en o derivarse de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus quiméricos VSR/PIV pueden comprender componentes de tanto VSR como PIV. Las vacunas contra la paperas comercialmente disponibles incluyen virus de las paperas atenuado vivo en tanto una forma monovalente como en combinación con vacunas contra el sarampión y la rubeola (MMR).
- 40 *Morbillivirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un morbillivirus tal como el sarampión. Los antígenos de morbillivirus pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas: hemaglutinina (H), glucoproteína (G), factor de fusión (F), proteína grande (L), nucleoproteína (NP), polimerasa fosfoproteína (P) y matriz (M). Las vacunas contra el sarampión comercialmente disponibles incluyen virus del sarampión atenuado vivo, normalmente en combinación con paperas y rubeola (MMR).
- 45 *Picornavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de picornavirus tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiovirus y aftovirus. Se prefieren antígenos derivados de enterovirus tales como virus de la poliomielitis.  
  
*Enterovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un enterovirus tal como los tipos 1, 2 ó 3 del virus de la poliomielitis, tipos 1 a 22 y 24 del virus Coxsackie A, tipos 1 a 6 del virus Coxsackie B, tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 de ecovirus (virus ECHO) y enterovirus 68 a 71. Preferentemente, el enterovirus es el virus de la poliomielitis. Los antígenos de enterovirus se seleccionan preferentemente de una o más de las siguientes proteínas de cápside VP1, VP2, VP3 y VP4. Las vacunas contra la poliomielitis comercialmente disponibles incluyen vacuna contra la poliomielitis inactivada (IPV) y vacuna oral contra el virus de la poliomielitis (OPV).
- 55 *Heparnavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un heparnavirus tal como virus de la hepatitis A (VHA). Las vacunas contra el VHA comercialmente disponibles incluyen vacuna contra el VHA inactivado.  
  
*Togavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un togavirus tal como un rubivirus, un alfavirus o un arterivirus. Se prefieren antígenos derivados de rubivirus tales como el virus de la rubeola. Los antígenos de togavirus pueden seleccionarse de E1, E2, E3, C, NSP-1, NSPO-2, NSP-3 y NSP-4. Los antígenos de togavirus se seleccionan preferentemente de E1, E2 y E3. Las vacunas contra la rubeola comercialmente disponibles incluyen un virus adaptado al frío vivo, normalmente en combinación con vacunas contra las paperas y el sarampión (MMR).
- 60 *Flavivirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un flavivirus tal como la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG), el dengue (tipos 1, 2, 3 ó 4), fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo occidental, encefalitis de
- 65

San Luis, encefalitis rusa de primavera-verano, encefalitis de Powassan. Los antígenos de flavivirus pueden seleccionarse de PrM, M, C, E, NS-1, NS-2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. Los antígenos de flavivirus se seleccionan preferentemente de PrM, M y E. La vacuna contra la ETG comercialmente disponible incluye vacunas de virus inactivados.

5 *Pestivirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un pestivirus tal como diarrea viral bovina (DVB), peste porcina clásica (PPC) o enfermedad de Border (BDV).

10 *Hepadnavirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un hepadnavirus tal como virus de la hepatitis B. Los antígenos de hepadnavirus pueden seleccionarse de antígenos de superficie (L, M y S), antígenos de núcleo (HBc, HBe). Las vacunas contra el VHB comercialmente disponibles incluyen vacunas de subunidades que comprenden el antígeno de superficie proteína S.

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

20 *Rabdovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un rabdovirus tal como un lyssavirus (virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV). Los antígenos de rabdovirus pueden seleccionarse de glucoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína grande (L) y proteínas no estructurales (NS). Las vacunas contra el virus de la rabia comercialmente disponibles comprenden virus destruidos cultivados en células diploides humanas o células de pulmón de rhesus fetal.

25 *Caliciviridae*: los antígenos virales pueden derivarse de Caliciviridae tales como virus Norwalk y virus similares a Norwalk tales como el virus de Hawái y el virus de las montañas nevadas.

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

35 *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 gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpr y vpu. Los antígenos de VIH pueden seleccionarse de gag (p24 gag y p55 gag), env (gp160 y gp41), pol, tat, nef, rev vpr, miniproteínas, (preferentemente p55 gag y gp140v delete). 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>LA1</sub>, VIH<sub>MN</sub>, VIH-1<sub>CM235</sub>, VIH-1<sub>US4</sub>.

40 *Reovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un reovirus tal como un ortoreovirus, un rotavirus, un orbivirus o un coltivirus. Los antígenos de reovirus pueden seleccionarse de proteínas estructurales  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$ , o  $\sigma 3$ , o proteínas no estructurales  $\sigma NS$ ,  $\mu NS$  o  $\sigma 1s$ . Los antígenos de reovirus preferidos pueden derivarse de un rotavirus. Los antígenos de rotavirus pueden seleccionarse de VP1, VP2, VP3, VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4 o NSP5. Los antígenos de rotavirus preferidos incluyen VP4 (o el producto escindido VP5 y VP8) y VP7.

45 *Parvovirus*: los antígenos virales pueden derivarse de un parvovirus tal como el parvovirus B19. Los antígenos de parvovirus pueden seleccionarse de VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 y NS-2. Preferentemente, el antígeno de parvovirus es la proteína de la cápside VP-2.

50 *Virus de la hepatitis delta (VHD)*: los antígenos virales pueden derivarse de VHD, particularmente el antígeno  $\delta$  del VHD (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.378.814).

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

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

60 *Virus del herpes humano*: los antígenos virales pueden derivarse de un virus del herpes humano tal como el virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus del herpes humano 6 (VHH6), virus del herpes humano 7 (VHH7) y virus del herpes humano 8 (VHH8). Los antígenos del virus del herpes humano pueden seleccionarse de proteínas inmediatas tempranas ( $\alpha$ ), proteínas tempranas ( $\beta$ ) y proteínas tardías ( $\gamma$ ). Los antígenos del VHS pueden derivarse de cepas de VHS-1 o VHS-2. Los antígenos del VHS pueden seleccionarse de glicoproteínas gB, gC, gD y gH, proteína de fusión (gB) o proteínas de inmunoescape (gC, gE o gI). Los antígenos del VVZ pueden seleccionarse de proteínas de núcleo, de nucleocápside, del tegumento o de la envuelta. Una vacuna contra el VVZ atenuado vivo está comercialmente disponible. Los antígenos

65

del VEB pueden seleccionarse de 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 proteínas de la cápside, glicoproteínas de la envuelta (tales como gB y gH) y proteínas del tegumento

5 *Papovavirus*: los antígenos pueden derivarse de papovavirus tales como el virus del papiloma y el virus del polio. Los virus del papiloma incluyen los serotipos de VPH 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 del VPH se derivan de los serotipos 6, 11, 16 ó 18. Los antígenos del VPH pueden seleccionarse de proteínas de la cápside (L1) y (L2), o E1 - E7, o fusiones de las mismas. Los antígenos del VPH se formulan preferentemente en partículas similares a virus (VLP). Los virus del polio incluyen virus BK y virus JK. Los antígenos del virus del polio pueden seleccionarse de VP 1, VP2 o VP3.

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

#### C. ANTÍGENOS FÚNGICOS

20 Los antígenos fúngicos para uso en la invención pueden derivarse de uno o más de los hongos expuestos a continuación.

Los antígenos fúngicos pueden derivarse de dermatofitos, que incluyen: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, *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 schoenleinii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. *album*, var. *discoideus*, var. *ochraceum*, *Trichophyton violaceum* y/o *Trichophyton faviforme*.

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 lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiospermum*, *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, *Saksenaea* 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 muy conocidos en la técnica (véase la patente de EE.UU. nº 6.333.164). En un método preferido, una fracción solubilizada se extrae y se separa de una fracción insoluble que puede obtenerse a partir de células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular, caracterizado porque el proceso comprende las etapas de: obtener células fúngicas vivas; obtener células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; romper las células fúngicas de las cuales se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; obtener una fracción insoluble; y extraer y separar una fracción solubilizada de la fracción insoluble.

#### 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 terapia para ETS tales como clamidia, herpes genital, hepatitis (tal como VHC), condilomas acuminados, gonorrea, sífilis y/o chancroide (véase el documento WO00/15255). Los antígenos pueden derivarse de una o más ETS bacterianas o virales. Los antígenos de ETS virales para uso en la invención pueden derivarse de, por ejemplo, VIH, virus del herpes simple (VHS-1 y VHS-2), virus del papiloma humano (VPH) y hepatitis (VHC). Los antígenos de ETS bacterianas para uso en la invención pueden derivarse de, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *E. coli* y *Streptococcus agalactiae*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### E. ANTÍGENOS RESPIRATORIOS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos derivados de un patógeno que produce

enfermedad respiratoria. Por ejemplo, antígenos respiratorios pueden derivarse de un virus respiratorio tal como ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV), morbillivirus (sarampión), togavirus (rubeola), VVZ y coronavirus (SARS). Los antígenos respiratorios pueden derivarse de una bacteria que produce enfermedad respiratoria tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Moraxella catarrhalis*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### F. ANTÍGENOS DE VACUNAS PEDIÁTRICAS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en sujetos pediátricos. Los sujetos pediátricos tienen normalmente menos de aproximadamente 3 años, o menos de aproximadamente 2 años, o menos de aproximadamente 1 año. Los antígenos pediátricos pueden administrarse múltiples veces durante el transcurso de 6 meses, 1, 2 ó 3 años. Los antígenos pediátricos pueden derivarse de un virus que puede elegir como diana poblaciones pediátricas y/o un virus al que las poblaciones pediátricas son susceptibles de ser infectadas. Los antígenos virales pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y paperas), morbillivirus (sarampión), togavirus (rubeola), enterovirus (poliomielitis), VHB, coronavirus (SARS) y virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB). Los antígenos bacterianos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B) y *E. coli*. Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### G. ANTÍGENOS ADECUADOS PARA USO EN ANCIANOS O INDIVIDUOS INMUNODEPRIMIDOS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos. Tales individuos pueden necesitar ser vacunados más frecuentemente, con mayores dosis o con formulaciones complementarias para mejorar su respuesta inmunitaria a los antígenos elegidos como diana. Los antígenos que pueden elegirse como diana para uso en ancianos o individuos inmunodeprimidos incluyen antígenos derivados de uno o más de los siguientes patógenos: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Clostridium tetani* (tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, ortomixovirus (gripe), pneumovirus (RSV), paramixovirus (PIV y paperas), morbillivirus (sarampión), togavirus (Rubeola), enterovirus (polio), VHB, coronavirus (SARS), virus de la varicela-zóster (VVZ), virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV). Ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

#### H. ANTÍGENOS ADECUADOS PARA USO EN VACUNAS PARA ADOLESCENTES

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos adecuados para uso en sujetos adolescentes. Los adolescentes pueden estar en necesidad de un refuerzo de un antígeno pediátrico previamente administrado. Los antígenos pediátricos que pueden ser adecuados para uso en adolescentes se han descrito anteriormente. Además, los adolescentes pueden elegirse como diana para recibir antígenos derivados de un patógeno de ETS con el fin de garantizar inmunidad protectora o terapéutica antes del comienzo de la actividad sexual. Los antígenos de ETS que pueden ser adecuados para uso en adolescentes se han descrito anteriormente.

#### I. ANTÍGENOS TUMORALES

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos tumorales o de cáncer. Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales que contienen péptidos tales como un antígeno tumoral de polipéptido o antígenos tumorales de glicoproteína. Un antígeno tumoral también puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene sacárido tal como un antígeno tumoral de glicolípido o un antígeno tumoral de gangliósido. Un antígeno tumoral puede ser adicionalmente, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene polinucleótido que expresa un antígeno tumoral que contiene polipéptido, por ejemplo, una construcción de vector de ARN o una construcción de vector de ADN tal como ADN de plásmido.

Los antígenos tumorales incluyen (a) antígenos tumorales que contienen polipéptidos, incluyendo polipéptidos (que pueden oscilar, por ejemplo, de 8-20 aminoácidos de longitud, aunque también son comunes longitudes fuera de este intervalo), lipopolipéptidos y glicoproteínas, (b) antígenos tumorales que contienen sacáridos, incluyendo 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 a células cancerosas, (b) homólogos y formas modificadas de las mismas que incluyen 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 limitados a la clase I reconocidos por linfocitos CD8+ o antígenos limitados a la clase II reconocidos por linfocitos CD4+.

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

Otros antígenos tumorales incluyen p 15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MIL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del virus del papiloma humano (VPH) que incluyen E6 y E7, antígenos del virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de linfocitos T humano, 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, CD68KP1, 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 ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y similares. Éstos, además de otros componentes celulares, se describen, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos 2002/0007173 y las referencias citadas en su interior.

Los antígenos tumorales pueden derivarse, por ejemplo, de componentes celulares mutados o alterados. Después de la alteración, los componentes celulares ya no realizan sus funciones reguladoras y, por tanto, la célula puede experimentar un crecimiento incontrolado. Ejemplos representativos de componentes celulares alterados incluyen ras, p53, Rb, proteína alterada codificada por el gen del tumor de Wilms, ubiquitina, mucina, proteína codificada por los genes DCC, APC y MCC, además de receptores o estructuras similares a receptores 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 estimulante de colonias (CSF). Éstos, además de otros componentes celulares, se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.693.522 y las referencias citadas en su interior.

Los antígenos bacterianos y virales pueden usarse conjuntamente con las composiciones de la presente invención para el tratamiento de cáncer. En particular, proteínas portadoras tales como CRM197, toxoide tetánico o antígeno de *Salmonella typhimurium* pueden usarse junto con/conjugarse con compuestos de la presente invención para el tratamiento de cáncer. Las terapias de combinación con antígeno de cáncer mostrarán un aumento de la eficacia y biodisponibilidad en comparación con terapias existentes.

Información adicional sobre antígenos del cáncer o de tumor puede encontrarse, por ejemplo, en Moingeon (2001) Vaccine 19:1305-1326; Rosenberg (2001) Nature 411:380-384; Dermine y col. (2002) Brit. Med. Bull. 62:149-162; Espinoza-Delgado (2002) The Oncologist 7(suppl 3):20-33; Davis y col. (2003) J. Leukocyte Biol. 23:3-29; Van den Eynde y col. (1995) Curr. Opin. Immunol. 7:674-681; Rosenberg (1997) Immunol. Today 18:175-182; Offringa y col. (2000) Curr. Opin. Immunol. 2:576-582; Rosenberg (1999) Immunity 10:281-287; Sahin y col. (1997) Curr. Opin.

Immunol. 9:709-716; Old y col. (1998) J. Exp. Med. 187:1163-1167; Chaux y col. (1999) J. Exp. Med. 189:767-778; Gold y col. (1965) J. Exp. Med. 122:467-468; Livingston y col. (1997) Cancer Immunol Immunother. 45:1-6; Livingston y col. (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45:10-19; Taylor-Papadimitriou (1997) Immunol. Today 18:105-107; Zhao y col. (1995) J. Exp. Med. 182:67-74; Theobald y col. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11993-11997; Gaudernack (1996) Immunotechnology 2:3-9; documento WO 91/02062; patente de EE.UU. nº 6.015.567; documentos WO 01/08636; WO 96/30514; patente de EE.UU. nº 5.846.538; y patente de EE.UU. nº 5.869.445.

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

Otros métodos de formulación y antígenos (especialmente antígenos de tumor) se proporcionan en la publicación de patente de EE.UU. nº 2004/0202680. Véase también la patente de EE.UU. nº 6.884.435.

#### J. REFERENCIAS DE ANTÍGENOS

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

- 1 Publicación internacional nº WO99/24578.
- 2 Publicación internacional nº WO99/36544.
- 3 Publicación internacional nº WO99/57280.
- 4 Publicación internacional nº WO00/22430.
- 5 Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
- 6 Publicación internacional nº WO96/29412.
- 7 Pizza y col. (2000) Science 287:1816-1820.
- 8 Publicación internacional nº WO 01/52885.
- 9 Bjune y col. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
- 10 Fuskasawa y col. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
- 11 Rosenqist y col. (1998) Dev. Biol. Strand 92:323-333.
- 12 Costantino y col. (1992) Vaccine 10:691-698.
- 13 Costantino y col. (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 Jedrzejask (2001) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65:187-207.
- 17 Publicación internacional nº WO 02/02606.
- 18 Kalman y col. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
- 19 Read y col. (2000) Nucleic Acids Res. 28:1397-1406.
- 20 Shirai y col. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3):S524-S527.
- 21 Publicación internacional nº WO99/27105.
- 22 Publicación internacional nº WO00/27994.
- 23 Publicación internacional nº WO00/37494.
- 24 Publicación internacional nº WO99/28475.
- 25 Bell (2000) Pediatr. Infect. Dis. J. 19:1187-1188.
- 26 Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
- 27 Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-S68, S79-S80.
- 28 Hsu y col. (1999) Clin. Liver Dis. 3:901-915.
- 29 Gastofsson y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- 30 Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- 31 Plotkin, S.A. et al., Vaccines, 4th ed., W.B. Saunders Co. (2004)
- 32 Del Giudice y col. (1998) Mol. Aspects Med. 19:1-70.
- 33 Publicación internacional nº WO93/018150.
- 34 Publicación internacional nº WO99/53310.
- 35 Publicación internacional nº WO98/04702.
- 36 Ross y col. (2001) Vaccine 19:135-142.
- 37 Sutter y col. (2000) Pediatr. Clin. North Am. 47:287-308.
- 38 Zimmerman & Spann (1999) Am. Fam. Physician 59:113-118, 125-126.
- 39 Dreensen (1997) Vaccine 15 Suppl:S2-S6.
- 40 MMWR Morb. Mortal Wkly Rep. (1998) 16:47(1):12, 19.
- 41 McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:5101-5107.
- 42 Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-56.
- 43 Publicaciones de patente de GB 0026333.5, 0028727.6 y 0105640.7.
- 44 Dale (1999) Infect. Disclin. North Am. 13:227-243.
- 45 Ferretti y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4658-4663.
- 46 Kuroda y col. (2001) Lancet 357(9264):1225-1240.
- 47 Ala'Aldeen y col. (2001) Lancet 357(9264):1218-1219.
- 48 Ramsay y col. (2001) Lancet 357(9251):195-196.
- 49 Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-S36.
- 50 Buttery & Moxon (2000) J. R. Coil Physicians Long 34:163-168.

- 51 Ahmad & Chapnick (1999) Infect. Dis. Clin. North Am. 13:113-133.
- 52 Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:663-667.
- 53 European Patent No. EP 0 477 508B1.
- 54 Patente de EE.UU. nº 5.306.492.
- 55 Publicación internacional nº WO98/42721.
- 56 Cruse y col. (eds.) Conjugate Vaccines, particularmente vol. 10:48-114.
- 57 Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, 1st ed., Academic Press (1996).
- 58 Publicación de patente europea nº 0 372 501.
- 59 Publicación de patente europea nº 0 378 881.
- 60 Publicación de patente europea nº 0 427 347.
- 61 Publicación internacional nº WO 93/17712.
- 62 Publicación internacional nº WO 98/58668.
- 63 Publicación de patente europea nº 0 471 177.
- 64 Publicación internacional nº WO00/56360.
- 65 Publicación internacional nº WO 00/67161.

### 3. ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS

Como se observa anteriormente, las composiciones de micropartículas y kits según la invención pueden incluir uno o más adyuvantes inmunológicos. Adyuvantes inmunológicos para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes expuestos a continuación:

#### A. COMPOSICIONES QUE CONTIENEN MINERALES

Composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes inmunológicos 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.) (New 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), tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.), y prefiriéndose la adsorción a la(s) sal(es). Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica (documento WO 00/23105).

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

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

Otro adyuvante basado en aluminio para su uso en formulaciones de vacuna 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, que tiene un área superficial de aproximadamente 500 m<sup>2</sup>/g. En otra realización, el adyuvante basado en aluminio es fosfato de aluminio  $AlPO_4$  o hidroxifosfato de aluminio que contienen grupos fosfato en lugar de alguno o todos los grupos hidroxilo del adyuvante de hidróxido de aluminio. Los adyuvantes de fosfato de aluminio preferidos proporcionados en este documento son amorfos y solubles en medios ácidos, básicos y neutros.

En otra realización, el adyuvante comprende tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio. En una realización más particular de la misma, el adyuvante tiene una mayor cantidad de fosfato de aluminio que el 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 de fosfato de aluminio con respecto a hidróxido de aluminio. En otra realización, las sales de aluminio en la vacuna están presentes a 0,4 a 1,0 mg por dosis de vacuna, o 0,4 a 0,8 mg por dosis de vacuna, o 0,5 a 0,7 mg por dosis de vacuna, o aproximadamente 0,6 mg por dosis de vacuna.

Generalmente, el (los) adyuvante(s) basado(s) en aluminio preferido(s), o relación de múltiples adyuvantes basados en aluminio tales como fosfato de aluminio con respecto a hidróxido de aluminio, se selecciona por la optimización de la atracción electrostática entre moléculas de forma que el antígeno lleve una carga opuesta a la del adyuvante al pH deseado. Por ejemplo, el adyuvante de fosfato de aluminio (iep = 4) se adsorbe a lisozima, pero no a albúmina a pH 7,4. Si la albúmina debiera ser la diana, se seleccionaría el adyuvante de hidróxido de aluminio (iep 11,4). Alternativamente, el pretratamiento de hidróxido de aluminio con fosfato reduce su punto isoelectrico, haciendo que sea un adyuvante preferido para antígenos más básicos.

#### B. EMULSIONES DE ACEITE

Composiciones y formulaciones de emulsión de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes inmunológicos (con



o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como muramilo péptidos o componentes de la pared celular bacteriana) incluyen emulsiones de escualeno-agua tales como MF59 (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formuladas en emulsiones de partículas submicrométricas usando un microfluidizador). Véase el documento WO 90/14837. Véanse también Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680; Frey y col. (2003) Vaccine 21:4234-4237. MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente contra el virus de la gripe FLUAD™.

Adyuvantes para su uso en las composiciones incluyen emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en este documento son emulsiones de escualeno/agua que opcionalmente contienen cantidades variables de MTP-PE tales como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene 4-5% peso/volumen de escualeno, 0,25-1,0% peso/volumen de Tween 80™ (poli(monooleato de oxiethylensorbitano)) y/o 0,25-1,0% de Span 85™ (trioleato de sorbitano) y opcionalmente N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión de aceite en agua submicrométrica conocida como "MF59" (documento WO 90/14837; patente de EE.UU. nº 6.299.884; patente de EE.UU. nº 6.451.325; y Ott y col., "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. eds.) (New York: Plenum Press) 1995, pág. 277-296). MF59 contiene 4-5% peso/volumen de escualeno (por ejemplo 4,3%), 0,25-0,5% peso/volumen de Tween 80™ y 0,5% peso/volumen de Span 85™ y opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador de modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 µg/dosis, más preferentemente de 0-250 µg/dosis y lo más preferentemente de 0-100 µg/dosis. Como se usa en este documento, el término "MF59-0" se refiere a la emulsión de aceite en agua submicrométrica anterior que carece de MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP denota una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 µg de MTP-PE por dosis, etc. MF69, otra emulsión de aceite en agua submicrométrica para su uso en este documento, contiene 4,3% peso/volumen de escualeno, 0,25% peso/volumen de Tween 80™ y 0,75% peso/volumen de Span 85™ y opcionalmente MTP-PE. Todavía otra emulsión de aceite en agua submicrométrica es MF75, también conocida como SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80™, 5% de polímero L121 bloqueado con Pluronic y thr-MDP, también microfluidizado en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP denota una formulación de MF75 que incluye MTP, tal como de 100-400 µg de MTP-PE por dosis.

Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas, los métodos de preparación de las mismas y los agentes inmunoestimulantes tales como muramilo péptidos para su uso en las composiciones se describen en detalle en el documento WO 90/14837; patente de EE.UU. nº 6.299.884; y patente de EE.UU. nº 6.451.325.

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

### C. FORMULACIONES DE SAPONINA

Las formulaciones de saponina también son adecuadas para su uso como adyuvantes inmunológicos. 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 amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como ISCOM. Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen el adyuvante STIMULON® (Antigenics, Inc., Lexington, MA).

Las composiciones de saponina se han purificado usando cromatografía en capa fina de alta resolución (HP-TLC) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la patente de EE.UU. nº 5.057.540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol tal como colesterol (véase el documento WO 96/33739).

Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM). Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, 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 carecer de detergente(s) adicional(es). Véase el documento WO 00/07621.

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponinas puede encontrarse en Barr y col. (1998) Adv. Drug Del. Rev. 32:247-271. Véase también Sjölander y col. (1998) Adv. Drug Del. Rev. 32:321-338.

## D. VIROSOMAS Y PARTÍCULAS SIMILARES A VIRUS (VLP)

Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también son adecuados como adyuvantes inmunológicos. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenas, no replicantes y generalmente no contienen ninguno de los genomas virales nativos. Las proteínas virales pueden producirse recombinantemente o aislarse a partir de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tales como proteínas de núcleo o de cápside), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la glosopeda, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q $\beta$  (tal como proteínas de la cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como la proteína p1 del retrotransposón Ty). Los VLP se tratan adicionalmente en los documentos WO 03/024480; WO 03/024481; Niikura y col. (2002) *Virology* 293:273-280; Lenz y col. (2001) *J. Immunol.* 166(9):5346-5355; Pinto y col. (2003) *J. Infect. Dis.* 188:327-338; y Gerber y col. (2001) *J. Virol.* 75(10):4752-4760. Los virosomas se tratan adicionalmente en, por ejemplo, Gluck y col. (2002) *Vaccine* 20:B10-B16. Los virosomas de la gripe reconstituidos potenciadores de la inmunidad (IRIV) se usan como sistema de administración de antígeno de subunidad en el producto trivalente intranasal INFLEXAL™ (Mischler y Metcalfe (2002) *Vaccine* 20 Suppl 5:B17-B23) y el producto INFLUVAC PLUS™.

## E. DERIVADOS BACTERIANOS O MICROBIANOS

Adyuvantes inmunológicos 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). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en el documento EP 0 689 454. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son demasiado pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros (véase el documento EP 0 689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A tales como derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, por ejemplo, RC-529. Véase Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

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

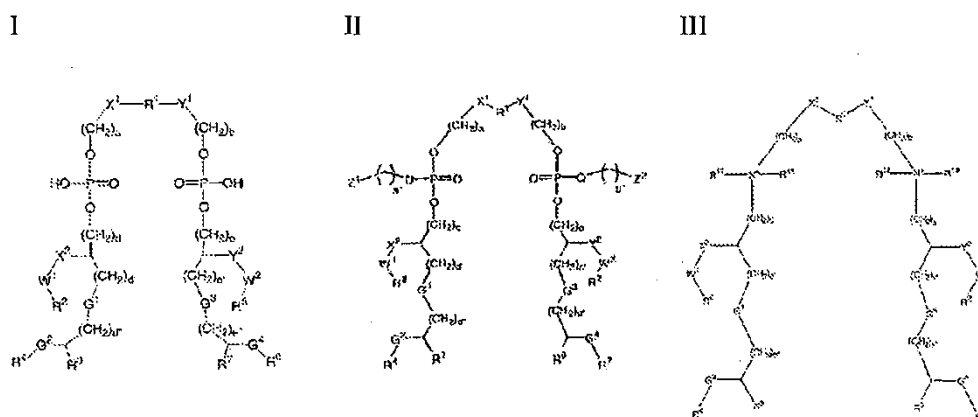
(3) Oligonucleótidos inmunoestimulantes: Los oligonucleótidos inmunoestimulantes o moléculas poliméricas adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar seguida de guanósina y ligada por un enlace fosfato a una guanósina). También se ha mostrado que los ARN bicatenarios bacterianos u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) son inmunoestimulantes. Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Opcionalmente, la guanósina puede sustituirse con un análogo tal como 2'-desoxi-7-deazaguanósina. Véanse Kandimalla y col. (2003) *Nucl. Acids Res.* 31 (9): 2393-2400; documento WO 02/26757; y documento WO 99/62923 para ejemplos de posibles sustituciones análogas. El efecto adyuvante de oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en Krieg (2003) *Nat. Med.* 9(7):831-835; McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32:179-185; documento WO 98/40100; patente de EE.UU. nº 6.207.646; patente de EE.UU. nº 6.239.116; y patente de EE.UU. nº 6.429.199. La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Véase Kandimalla y col. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* 31 (parte 3):654-658. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria 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 tratan en Blackwell y col. (2003) *J. Immunol.* 170(8):4061-4068; Krieg (2002) *TRENDS Immunol.* 23(2): 64-65; y documento WO 01/95935. Preferentemente, el CpG es un ODN de CpG-A.

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

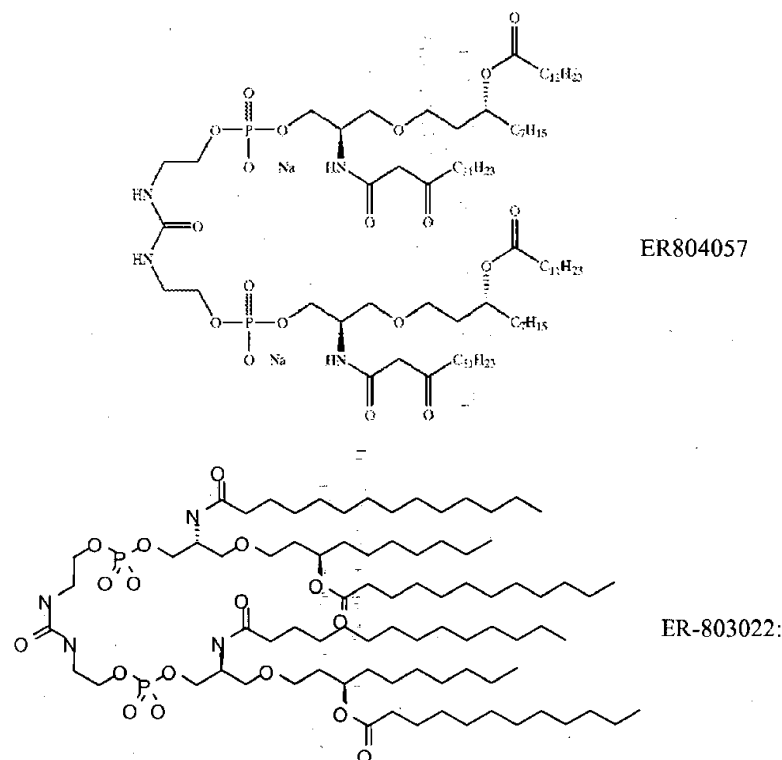
Los oligonucleótidos inmunoestimulantes y las moléculas poliméricas también incluyen estructuras de esqueleto de polímero alternativas tales como, pero no se limitan a, esqueletos de polivinilo (Pitha y col. (1970) *Biochem. Biophys. Acta* 204(1):39-48; Pitha y col. (1970) *Biopolymers* 9(8):965-977) y esqueletos de morfolino (patente de EE.UU. nº 5.142.047; patente de EE.UU. nº 5.185.444). Una variedad de otros análogos de polinucleótidos cargados y no cargados se conocen en la técnica. Se conocen en la técnica numerosas modificaciones del esqueleto, que incluyen, pero no se limitan a, enlaces sin cargar (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos y carbamatos) y enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos y fosforoditioatos).

(4) Toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas: Las toxinas ribosilantes de ADP bacterianas y los derivados desintoxicados de las mismas pueden usarse como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en el documento WO 95/17211 y como adyuvantes parenterales en el documento WO 98/42375. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT desintoxicado tal como LT-K63, LT-R72 y LT-192G. El uso de toxinas ribosilantes de ADP y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en las siguientes referencias: Beignon y col. (2002) *Infect. Immun.* 70(6):3012-3019; Pizza y col. (2001) *Vaccine* 19:2534-2541; Pizza y col. (2000) *Int. J. Med. Microbiol.* 290(4-5):455-461; Scharton-Kersten y col. (2000) *Infect. Immun.* 68(9):5306-5313; Ryan y col. (1999) *Infect. Immun.* 67(12):6270-6280; Partidos y col. (1999) *Immunol. Lett.* 67(3):209-216; Peppoloni y col. (2003) *Vaccines* 2(2):285-293; y Pine y col. (2002) *J. Control Release* 85(1-3):263-270. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y B de toxinas ribosilantes de ADP expuestas en Domenighini y col. (1995) *Mol. Microbiol.* 15(6):1165-1167.

Los compuestos de fórmula I, II o III, o sales de los mismos, también pueden usarse como adyuvantes:



como se define en el documento WO03/011223, tales como, por ejemplo, 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', 'ER 803022 o 'ER 804057':



## F. INMUNOMODULADORES HUMANOS

Inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes inmunológicos 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 estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF).

## G. BIOADHESIVOS Y MUCOADHESIVOS

También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes inmunológicos. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh y col. (2001) J. Cont. Release 70:267-276) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención. (véase el documento WO 99/27960).

## H. LIPOSOMAS

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en la patente de EE.UU. nº 6.090.406, la patente de EE.UU. nº 5.916.588; y la publicación de patente EP nº EP 0 626 169.

## I. FORMULACIONES DE POLIOXIETILENÉTERES Y POLIOXIETILENÉSTERES

Adyuvantes inmunológicos adecuados para uso en la invención incluyen polioxietilenéteres y polioxietilenésteres. (véase, por ejemplo, el documento WO 99/52549). Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol (documento WO 01/21207), además de tensioactivos de polioxietilentalquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO 01/21152).

Los polioxietilenéteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

## J. POLIFOSFACENO (PCPP)

Formulaciones de PCPP adecuadas para su uso como adyuvantes inmunológicos se describen, por ejemplo, en Andrianov y col. (1998) Biomaterials 19(1-3):109-115; y Payne y col. (1998) Adv. Drug Del. Rev. 31(3):185-196.

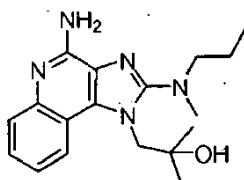
## K. MURAMILPÉPTIDOS

Ejemplos de muramilpéptidos adecuados para uso como adyuvantes incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE).

## L. COMPUESTOS DE IMIDAZOQUINOLINA

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolina adecuados para uso como adyuvantes inmunológicos 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. nº 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.

Imidazoquinolinas para la práctica de la presente invención incluyen imiquimod, resiquimod y



Véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales WO 2006/031878 y WO 2007/109810. Se sabe que tales compuestos son agonistas de TLR7.

## M. COMPUESTOS DE TIOSEMICARBAZONA

Ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona adecuados para su uso como adyuvantes inmunológicos, además de

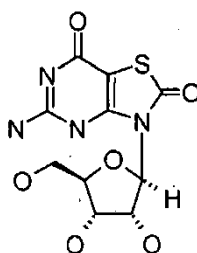
métodos de formulación, preparación y cribado para los compuestos, incluyen aquellos descritos en el documento WO 04/60308. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- $\alpha$ .

## 5 N. COMPUESTOS DE TRIPTANTRINA

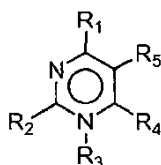
Ejemplos de compuestos de triptantrina adecuados para su uso como adyuvantes inmunológicos, además de métodos de formulación, preparación y cribado para tales compuestos, incluyen aquellos descritos en el documento WO 04/64759. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- $\alpha$ .

## 10 O. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS

Pueden usarse diversos análogos de nucleósidos como adyuvantes inmunológicos, tales como (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en la patente de EE.UU. nº 6.924.271; publicación de EE.UU. nº 2005/0070556; y la patente de EE.UU. nº 5.658.731; (f) un compuesto que tiene la fórmula:

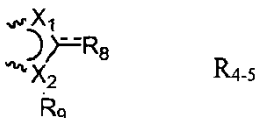


en la que:

$R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente H, halógeno,  $-NR_aR_b$ ,  $-OH$ , alcoxi  $C_{1-6}$ , alcoxi  $C_{1-6}$  sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo  $C_{6-10}$ , arilo  $C_{6-10}$  sustituido, alquilo  $C_{1-6}$  o alquilo  $C_{1-6}$  sustituido;

$R_3$  está ausente, H, alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido, arilo  $C_{6-10}$ , arilo  $C_{6-10}$  sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

$R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente H, halógeno, heterociclilo, heterociclilo sustituido,  $-C(O)-R_d$ , alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido o unidos juntos para formar un anillo de 5 miembros como en  $R_{4-5}$ :

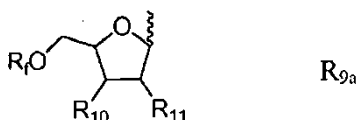


consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por  $\sim$

$X_1$  y  $X_2$  son cada uno independientemente N, C, O o S;

$R_8$  es H, halógeno,  $-OH$ , alquilo, alqueno  $C_{2-6}$ , alquino  $C_{2-6}$ ,  $-OH$ ,  $-NR_aR_b$ ,  $-(CH_2)_n-O-R_c$ ,  $-O-(alquilo C_{1-6})$ ,  $-S(O)_pRe$  o  $-C(O)-R_d$ ;

$R_9$  es H, alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o  $R_{9a}$ , en la que  $R_{9a}$  es:



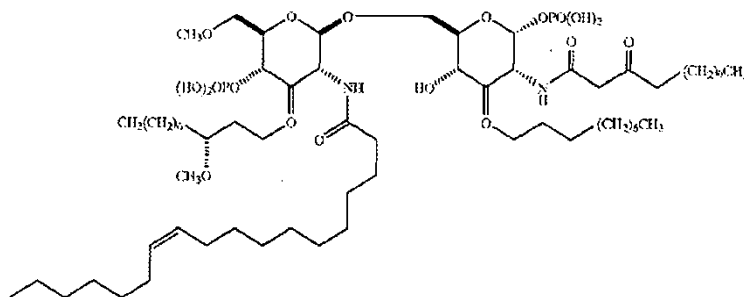
consiguiéndose la unión en el enlace indicado por  $\sim$

$R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente H, halógeno, alcoxi  $C_{1-6}$ , alcoxi  $C_{1-6}$  sustituido,  $-NR_aR_b$  o  $-OH$ ;

cada  $R_a$  y  $R_b$  es independientemente H, alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido,  $-C(O)R_d$ , arilo  $C_{6-10}$ ;  
 cada  $R_c$  es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo  $C_{1-6}$  o alquilo  $C_{1-6}$  sustituido;  
 cada  $R_d$  es independientemente H, halógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido, alcoxi  $C_{1-6}$ , alcoxi  $C_{1-6}$  sustituido,  $-NH_2$ ,  $-NH$ (alquilo  $C_{1-6}$ ),  $-NH$ (alquilo  $C_{1-6}$  sustituido),  $-N$ (alquilo  $C_{1-6})_2$ ,  $-N$ (alquilo  $C_{1-6}$  sustituido) $_2$ , arilo  $C_{6-10}$  o heterociclilo;  
 cada  $R_e$  es independientemente H, alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido, arilo  $C_{6-10}$ , arilo  $C_{6-10}$  sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;  
 cada  $R_f$  es independientemente H, alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido,  $-C(O)R_d$ , fosfato, difosfato o trifosfato;  
 cada  $n$  es independientemente 0, 1, 2 ó 3;  
 cada  $p$  es independientemente 0, 1 ó 2; o  
 o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

#### P. LÍPIDOS LIGADOS A ESQUELETO ACÍCLICO QUE CONTIENE FOSFATO

Adyuvantes inmunológicos que contienen lípidos ligados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato incluyen el antagonista de TLR4 E5564 (Wong y col. (2003) J. Clin. Pharmacol. 43(7):735-742; documento US2005/0215517):



#### Q. INMUNOPOTENCIADORES DE MOLÉCULA PEQUEÑA (SMIP)

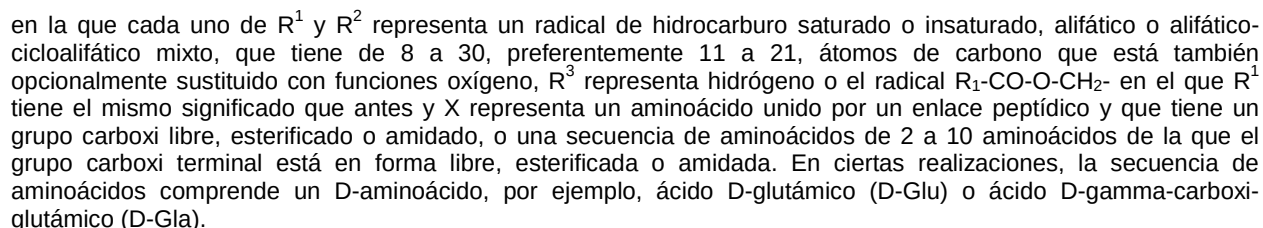
SMIP incluyen:

- N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
- 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;
- 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol;
- 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]acetato de etilo;
- 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona;
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina;
- 1-{4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-2-metilpropan-2-ol;
- 1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol;
- N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina.

#### R. PROTEOSOMAS

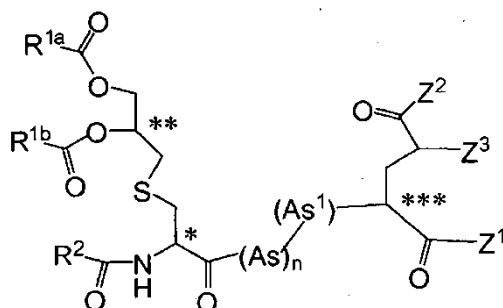
Un adyuvante es una preparación de proteosomas de proteínas de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de liposacárido derivada de una segunda bacteria Gram-negativa, en la que las preparaciones de proteosomas de proteínas de membrana externa y liposacáridos forman un complejo de adyuvante no covalente estable. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo que comprende membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Se han usado como

Los lipopéptidos (es decir, compuestos que comprenden uno o más residuos de ácidos grasos y dos o más residuos de aminoácidos) también son conocidos por tener carácter inmunoestimulante. Los lipopéptidos basados en glicerilcisteína son particularmente adecuados para su uso como adyuvantes. Ejemplos específicos de tales péptidos incluyen compuestos de la siguiente fórmula



Los lipopéptidos bacterianos generalmente reconocen TLR2, sin requerir TLR6 para participar (los TLR operan cooperativamente para proporcionar reconocimiento específico de diversos desencadenadores, y TLR2 más TLR6 reconocen juntos peptidoglicanos, mientras que TLR2 reconoce lipopéptidos sin TLR6). Éstos se clasifican algunas veces como lipopéptidos naturales y lipopéptidos sintéticos. Los lipopéptidos sintéticos tienden a comportarse similarmente, y son principalmente reconocidos por TLR2.

Lipopéptidos adecuados para su uso como adyuvantes incluyen compuestos de fórmula I:



en el que el centro quiral marcado \* y el marcado \*\*\* están ambos en la configuración R;

el centro quiral marcado \* está tanto en la configuración R como S:

cada  $R^{1a}$  y  $R^{1b}$  es independientemente un grupo de hidrocarburo alifático o cicloalifático-alifático que tiene 7-21 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con funciones oxígeno, o uno de  $R^{1a}$  y  $R^{1b}$ , pero no ambos, es H;

R<sup>2</sup> es un grupo de hidrocarburo alifático o cicloalifático que tiene 1-21 átomos de carbono y opcionalmente sustituido con funciones oxígeno;

$n$  es 0 ó 1:

As representa tanto -O-Kw-CO- como -NH-Kw-CO-, en la que Kw es un grupo de hidrocarburo alifático que tiene 1-

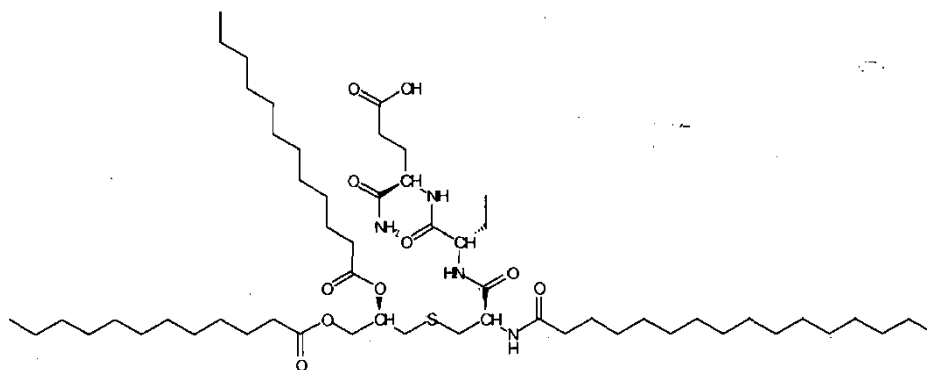
12 átomos de carbono;

As<sup>1</sup> es un D- o L-alfa-aminoácido;

Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> representan cada uno independientemente -OH o el radical del extremo N de un aminoácido D- o L-alfa de un ácido amino-(alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados de los ácidos aminocarboxílicos D- y L-alfa y ácidos amino-alquil inferior-sulfónicos; y

Z<sup>3</sup> es H o -CO-Z<sup>4</sup>, en la que Z<sup>4</sup> es -OH o el radical del extremo N de un aminoácido D- o L-alfa de un ácido amino-(alcano inferior)-sulfónico o de un péptido que tiene hasta 6 aminoácidos seleccionados de los ácidos aminocarboxílicos D y L-alfa y ácidos amino-alquil inferior-sulfónicos; o un éster o amida formado del ácido carboxílico de tales compuestos. Amidas adecuadas incluyen -NH<sub>2</sub> y NH(alquilo inferior), y ésteres adecuados incluyen ésteres alquílicos C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> (alquilo inferior o alcano inferior, como se usa en el presente documento, se refiere a alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de cadena lineal o ramificada).

Tales compuestos se describen en más detalle en el documento US 4.666.886. En una realización preferida, el lipopéptido es de la siguiente fórmula:

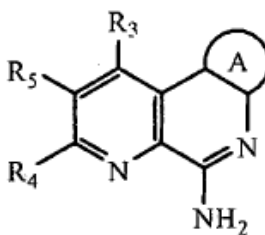


Otro ejemplo de una especie de lipopéptido se llama LP40, y es un agonista de TLR2 (Akdis, y col., Eur. J. Immunology, 33: 2717-2726 (2003)).

Éstos están relacionados con una clase conocida de lipopéptidos de *E. coli*, denominada lipoproteínas de mureína. Ciertos productos de degradación parcial de aquellas proteínas llamadas lipopéptidos de mureína se describen en Hantke, y col. (Eur. J. Biochem., 34: 284-296 (1973)). Estos comprenden un péptido ligado a ácido N-acetilmurámico y así se relacionan con muramilpéptidos, que se describen en Baschang y col. (Tetrahedron, 45(20): 6331-6360 (1989)).

#### T. BENZONAFTIRIDINAS

Ejemplos de compuestos de benzonaftiridina adecuados para su uso como adyuvantes incluyen compuestos que tienen la estructura de fórmula (I), y sales, solvatos, N-óxidos, profármacos e isómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos:



Formula (I)

en la que:

R<sup>3</sup> es H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, en el que los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> o heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> de R<sup>3</sup> están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -CN, -R<sup>7</sup>, -OR<sup>8</sup>, -C(O)R<sup>8</sup>, -OC(O)R<sup>8</sup>, -C(O)OR<sup>8</sup>, -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub> y -NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> están seleccionados cada uno independientemente de H, halógeno, -C(O)OR<sup>7</sup>, -C(O)R<sup>7</sup>, -C(O)N(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>), -N(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>), -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NHN(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -SR<sup>7</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR<sup>7</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sup>7</sup>, -LR<sup>8</sup>, -LR<sup>10</sup>, -OLR<sup>8</sup>, -OLR<sup>10</sup>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, cicloalquilo

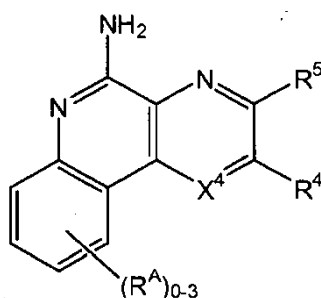


C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, en los que los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> de R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -CN, -NO<sub>2</sub>, -R<sup>7</sup>, -OR<sup>8</sup>, -C(O)R<sup>8</sup>, -OC(O)R<sup>8</sup>, -C(O)OR<sup>8</sup>, -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -S(O)R<sup>8</sup>, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub> y -NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>; o R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, cuando están presentes en átomos de anillos adyacentes, pueden ligarse opcionalmente juntos para formar un anillo de 5-6 miembros, en los que el anillo de 5-6 miembros está opcionalmente sustituido con R<sup>7</sup>; cada L está seleccionado independientemente de un enlace, -(O(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>)<sub>1-7</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquinilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, en el que alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> y alquinilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> de L están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -R<sup>8</sup>, -OR<sup>8</sup>, -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub> y -OP(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>; R<sup>7</sup> está seleccionado de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, en el que los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> de R<sup>7</sup> están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos R<sup>13</sup>; cada R<sup>8</sup> está seleccionado independientemente de H, -CH(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heterocicloalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heterocicloalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de R<sup>8</sup> están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de -CN, R<sup>11</sup>, -OR<sup>11</sup>, -SR<sup>11</sup>, -C(O)R<sup>11</sup>, -OC(O)R<sup>11</sup>, -C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)OR<sup>11</sup>, -NR<sup>9</sup>C(O)R<sup>11</sup>, -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, -NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -OR<sup>9</sup>, -OR<sup>10</sup>, -C(O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -C(O)NR<sup>11</sup>OH, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>, -S(O)R<sup>11</sup>, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>11</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>, -P(O)(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub> y -OP(O)(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub>; cada R<sup>9</sup> está seleccionado independientemente de H, -C(O)R<sup>8</sup>, -C(O)OR<sup>8</sup>, -C(O)R<sup>10</sup>, -C(O)OR<sup>10</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>10</sup>, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, o cada R<sup>9</sup> es independientemente un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que junto con N se unen para formar un heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, en el que el anillo de heterocicloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S, y en el que los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> o heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> de R<sup>9</sup> están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de -CN, R<sup>11</sup>, -OR<sup>11</sup>, -SR<sup>11</sup>, -C(O)R<sup>11</sup>, -OC(O)R<sup>11</sup>, -C(O)OR<sup>11</sup>, -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>R<sup>12</sup>, -C(O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -C(O)NR<sup>11</sup>OH, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>, -S(O)R<sup>11</sup>, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>11</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>, -P(O)(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub> y -OP(O)(OR<sup>11</sup>)<sub>2</sub>; cada R<sup>10</sup> está seleccionado independientemente de arilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y heteroarilo, en el que los grupos arilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halógeno, -R<sup>8</sup>, -OR<sup>8</sup>, -LR<sup>9</sup>, -LOR<sup>9</sup>, -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>C(O)R<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -C(O)R<sup>8</sup> y -C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>; R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> están seleccionados independientemente de H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, acrílo, heteroarilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, en el que los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y heterocicloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> de R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> están cada uno opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -CN, R<sup>8</sup>, -OR<sup>8</sup>, -C(O)R<sup>8</sup>, OC(O)R<sup>8</sup>, -C(O)OR<sup>8</sup>, -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>C(O)R<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>C(O)OR<sup>8</sup>, -C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; o R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> son cada uno independientemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y tomados conjuntamente con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de heterocicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> opcionalmente sustituido que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N, O y S; cada R<sup>13</sup> está seleccionado independientemente de halógeno, -CN, -LR<sup>9</sup>, -LOR<sup>9</sup>, -OLR<sup>9</sup>, -LR<sup>10</sup>, -LOR<sup>10</sup>, -OLR<sup>10</sup>, -LR<sup>8</sup>, -LOR<sup>8</sup>, -OLR<sup>8</sup>, -LSR<sup>8</sup>, -LSR<sup>10</sup>, -LC(O)R<sup>8</sup>, -OLC(O)R<sup>8</sup>, -LC(O)OR<sup>8</sup>, -LC(O)R<sup>10</sup>, -LOC(O)OR<sup>8</sup>, -LC(O)NR<sup>9</sup>R<sup>11</sup>, -LC(O)NR<sup>9</sup>R<sup>8</sup>, -LN(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -LNR<sup>9</sup>R<sup>8</sup>, -LNR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, -L=NOH, -LC(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -LS(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -LS(O)R<sup>8</sup>, -LC(O)NR<sup>9</sup>OH, -LNR<sup>9</sup>C(O)R<sup>8</sup>, -LNR<sup>9</sup>C(O)OR<sup>8</sup>, -LS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -OLS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -LNR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -LC(O)NR<sup>9</sup>LN(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -LP(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -LOP(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -LP(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub> y -OLP(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>; anillo A es un arilo o un heteroarilo, en el que los grupos arilo y heteroarilo del anillo A están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 grupos R<sup>A</sup>, en el que cada R<sup>A</sup> está seleccionado independientemente de halógeno, -R<sup>8</sup>, -R<sup>7</sup>, -OR<sup>7</sup>, -OR<sup>8</sup>, -R<sup>10</sup>, -OR<sup>10</sup>, -SR<sup>8</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>C(O)R<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>C(S)R<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>C(S)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>NR<sup>9</sup>C(O)R<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>NR<sup>9</sup>C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>NR<sup>9</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -C(O)C(O)R<sup>8</sup>, -C(O)CH<sub>2</sub>C(O)R<sup>8</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -C(O)R<sup>8</sup>, -C(S)R<sup>8</sup>, -C(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -C(S)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -OC(O)R<sup>8</sup>, -C(O)N(OR<sup>8</sup>)R<sup>8</sup>, -C(NOR<sup>8</sup>)R<sup>8</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -S(O)<sub>3</sub>R<sup>8</sup>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -S(O)R<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>SO<sub>2</sub>N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>9</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -P(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, -N(OR<sup>8</sup>)R<sup>8</sup>, -CH=CHCO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, -C(=NH)-N(R<sup>9</sup>)<sub>2</sub> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NHC(O)R<sup>8</sup>; o dos sustituyentes R<sup>A</sup> adyacentes sobre el anillo A forman un anillo de 5-6 miembros que contiene hasta dos heteroátomos como miembros de anillo; n es, independientemente en cada aparición, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; cada m está seleccionado independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmulas (I), el anillo A es un anillo aromático, tal como fenilo, piridilo o pirimidinilo, que puede estar sustituido con los mismos sustituyentes con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> opcionalmente sustituido, y cada uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> representa independientemente H, halógeno, o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> opcionalmente sustituido o grupo alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, R<sup>3</sup> y R<sup>5</sup> representan cada uno H.

En estos compuestos,  $R^4$  normalmente es un alquilo  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituido, y en algunas realizaciones  $R^4$  es alquilo  $C_1-C_4$  sustituido con un anillo de fenilo o anillo de heteroarilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, piridina, pirimidina, indol, tiofeno, furano, oxazol, isoxazol, benzoxazol, bencimidazol y similares). En algunas de estas realizaciones,  $R^5$  es H. El anillo de fenilo o heteroarilo opcionalmente sustituido puede tener hasta tres sustituyentes seleccionados de Me, CN,  $CF_3$ , halógeno, OMe,  $NH_2$ , NHMe, NMe<sub>2</sub>, y opcionalmente alquilo  $C_1-C_4$  o alcoxi  $C_1-C_4$  sustituido, en el que los sustituyentes para los grupos alquilo  $C_1-C_4$  o alcoxi  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituidos en la fórmula (I) están seleccionados de halógeno, -OH, -OMe, alquilo  $C_1-C_4$ , alcoxi  $C_1-C_4$ , COOH, - $PO_3H_2$ , - $OPO_3H_2$ ,  $NH_2$ , NMe<sub>2</sub>, cicloalquilo  $C_3-C_6$ , arilo (preferentemente fenilo o fenilo sustituido), heterociclilo  $C_5-C_6$  (por ejemplo, piperidina, morfolina, tiomorfolina, pirrolidina); y las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

Otros ejemplos de compuestos de benzonafitridina adecuados para su uso como adyuvantes incluyen compuestos de la siguiente fórmula:



en la que cada  $R^A$  es independientemente halógeno, CN,  $NH_2$ , NHMe, NMe<sub>2</sub> o alquilo  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituido o alcoxi  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituido;  $X^4$  es CH o N; y  $R^4$  y  $R^5$  representan independientemente H o un grupo alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido.

Preferentemente, los compuestos de la fórmula anterior tienen 0-1 sustituyentes  $R^A$  presentes.

En estos compuestos,  $R^4$  normalmente es un alquilo  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituido, y en algunas realizaciones,  $R^4$  es alquilo  $C_1-C_4$  sustituido con un anillo de fenilo o anillo de heteroarilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, piridina, pirimidina, indol, tiofeno, furano, oxazol, isoxazol, benzoxazol, bencimidazol y similares). En algunas de estas realizaciones,  $R^5$  es H. El anillo de fenilo o heteroarilo opcionalmente sustituido puede tener hasta tres sustituyentes seleccionados de Me, CN,  $CF_3$ , halógeno, OMe,  $NH_2$ , NHMe, NMe<sub>2</sub> y alquilo  $C_1-C_4$  o alcoxi  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituido, en el que los sustituyentes para los grupos alquilo  $C_1-C_4$  o alcoxi  $C_1-C_4$  opcionalmente sustituidos en la fórmula (X) están seleccionados de halógeno, -OH, -OMe, alquilo  $C_1-C_4$ , alcoxi  $C_1-C_4$ , COOH, - $PO_3H_2$ , - $OPO_3H_2$ ,  $NH_2$ , NMe<sub>2</sub>, cicloalquilo  $C_3-C_6$ , arilo (preferentemente fenilo o fenilo sustituido), heterociclilo  $C_5-C_6$  (por ejemplo, piperidina, morfolina, tiomorfolina, pirrolidina); y las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

En ciertas realizaciones, el compuesto de benzonafitridina está seleccionado de:

2-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenil)propan-2-ol;  
2-(4-metoxi-2-metilfenetil)-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-5-amina; 2-(2,4-dimetilfenetil)benzo[f][1,7]naftiridin-5-amina;  
4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilbenzoato de etilo;  
2-(4-(dimetilamino)fenetil)-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-5-amina,  
y 2-(4-metoxifenetil)-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-5-amina.

Otros ejemplos de compuestos de benzonafitridina adecuados para su uso como adyuvantes, además de métodos de formulación y fabricación, incluyen aquellos descritos en la solicitud internacional nº PCT/US2009/35563 (publicada como el documento WO2009/111337).

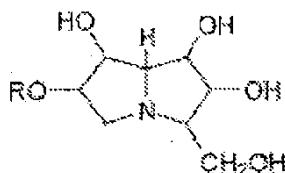
#### U. OTROS ADYUVANTES

Otras sustancias que actúan de adyuvantes inmunológicos se desvelan en Burdman, J.R. y col. (eds) (1995) (Vaccine Design: Subunit and Adjuvant Approach (Springer) (Capítulo 7) y O' Hagan, D.T. (2000) (Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Humana Press) (Volumen 42 de la serie Methods in Molecular Medicine)).

Otras sustancias adyuvantes útiles incluyen:

- Inosina-5'-monofosfato de metilo ("MIMP") (Signorelli & Hadden (2003) Int. Immunopharmacol. 3(8):1177-1186).

- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilado (documento WO2004/064715), tal como aquel que tiene la fórmula:



en la que R está seleccionado del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenoilo, alquinoilo y arilo lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal o derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- $\alpha$ -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

- Una gamma-inulina (Cooper (1995) Pharm. Biotechnol. 6:559-580) o derivado de la misma, tal como algamulina.
- Compuestos desvelados en el documento PCT/US2005/022769.
- Compuestos desvelados en el documento WO2004/87153, que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazolquinolinona (ABIQ) (patente de EE.UU. nº 6.605.617; documento WO 02/18383), compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esteroil, compuestos de quinazilina, compuestos de pirrol (documento WO2004/018455), compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol (documento WO03/082272).
- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) (patente de EE.UU. nº 5.011.828).
- Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (normalmente neutro), tal como aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-bromuro de propanaminio-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-bromuro de propanaminio-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren formulaciones que contienen sales de ( $\pm$ )-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradecenoiloxi)-1-propanaminio (patente de EE.UU. nº 6.586.409).

La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes inmunológicos identificados anteriormente. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes composiciones de adyuvante en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (documento WO 99/11241); (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) (véase el documento WO 94/00153); (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroil) (documento WO 98/57659); (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 10 % de escualano, 0,4 % de Tween 80, 5 % de Pluronic-polímero de bloque L121, y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula; (7) sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualano, 0,2 % de Tween 80, y uno o más componentes de la pared de la célula bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado de LPS no tóxico (tal como 3dPML); (9) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulante (tal como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

Las sales de aluminio y MF59 son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas inyectables contra la gripe. Las toxinas bacterianas y los bioadhesivos son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas administradas por las mucosas, tales como vacunas nasales.

#### 4. AGENTES TERAPÉUTICOS

Agentes terapéuticos adecuados para su uso en la invención incluyen fármacos y productos biológicos de molécula pequeña y productos biológicos.

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de enfermedades respiratorias y/o trastornos que incluyen, pero no se limitan a, asma, asma bronquial, asma alérgica, asma intrínseca, asma extrínseca, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por fármacos (incluyendo aspirina e inducida por AINE) y asma inducida por el polvo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); bronquitis, que incluye bronquitis infecciosa y eosinofílica; enfisema; bronquiectasia; fibrosis quística; sarcoidosis; pulmón del granjero y enfermedades relacionadas; neumonitis por hipersensibilidad; fibrosis pulmonar, que incluye alveolitis fibrosante criptogénica, neumonías intersticiales idiopáticas, terapia antineoplásica complicada por fibrosis e infección crónica,

que incluye tuberculosis y aspergilosis, y otras infecciones fúngicas; complicaciones del trasplante de pulmón; trastornos vasculíticos y trombóticos de la vasculatura del pulmón, e hipertensión pulmonar; actividad antitusiva que incluye tratamiento de tos crónica asociada a afecciones inflamatorias y secretoras de las vías respiratorias, y tos iatrogénica; rinitis aguda y crónica que incluye rinitis medicamentosa, y rinitis vasomotora; rinitis alérgica perenne y estacional que incluye rinitis nerviosa (fiebre del heno); poliposis nasal; infección viral aguda que incluye el resfriado común, e infección debida al virus respiratorio sincitial, gripe, coronavirus (incluyendo SARS) y adenovirus.

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de trastornos dermatológicos que incluyen, pero no se limitan a, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto u otras dermatosis eccematosas, y reacciones de hipersensibilidad tipo retardada; fito- y fotodermatitis; dermatitis seborreica, dermatitis herpetiforme, liquen plano, liquen escleroso y atrófico, pioderma gangrenoso, sarcoide de piel, carcinoma de células basales, queratosis actínica, lupus eritematoso discoide, pénfigo, penfigoide, epidermólisis bullosa, urticaria, angioedema, vasculitis, eritemas tóxicos, eosinofilias cutáneas, alopecia areata, calvicie de patrón masculino, síndrome de Sweet, síndrome de Weber-Christian, eritema multiforme; celulitis, tanto infecciosa como no infecciosa; paniculitis; linfomas cutáneos, cáncer de piel no melanoma y otras lesiones displásicas; trastornos inducidos por fármacos que incluyen erupciones por fármacos fijos.

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos oculares que incluyen, pero no se limitan a, blefaritis; conjuntivitis, que incluye conjuntivitis alérgica perenne y vernal; iritis; uveítis anterior y posterior; coroiditis; trastornos autoinmunitarios, degenerativos o inflamatorios que afectan la retina; oftalmía que incluye oftalmía simpática; sarcoidosis; infecciones que incluyen viral, fúngica y bacteriana.

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos genitourinarios que incluyen, pero no se limitan a, nefritis que incluye intersticial y glomerulonefritis; síndrome nefrótico; cistitis que incluye cistitis aguda y crónica (intersticial) y úlcera de Hunner; uretritis aguda y crónica, prostatitis, epididimitis, ooforitis y salpingitis; vulvo-vaginitis; enfermedad de Peyronie; disfunción eréctil (tanto masculina como femenina).

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de rechazo del aloinjerto que incluye, pero no se limitan a, agudo y crónico tras, por ejemplo, trasplante de riñón, corazón, hígado, pulmón, médula ósea, piel o córnea o tras trasfusión de sangre; o enfermedad de injerto contra huésped crónica.

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de otros trastornos autoinmunitarios y alérgicos que incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, síndrome del intestino irritable, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, diabetes mellitus, púrpura trombocitopénica idiopática, fascitis eosinofílica, síndrome de hiper-IgE, síndrome antifosfolípidos y síndrome de Sazary.

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de cáncer que incluyen, pero no se limitan a, tumores de próstata, mama, pulmón, ovario, pancreático, intestino y colon, estómago, piel y cerebrales y tumores malignos que afectan la médula ósea (incluyendo las leucemias) y sistemas linfoproliferativos, tales como linfoma de Hodgkin y no Hodgkin; que incluyen la prevención y tratamiento de enfermedad metastásica y reapariciones tumorales, y síndromes paraneoplásicos. En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (I), sales, solvatos, N-óxidos, profármacos e isómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, y composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, son útiles como moduladores de la actividad de receptores similares a Toll, y se usan en el tratamiento de neoplasias que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, queratosis actínica, melanoma, carcinomas, sarcomas, leucemias, carcinoma de células renales, sarcoma de Kaposi, leucemia mielógena, leucemia linfocítica crónica y mieloma múltiple.

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de enfermedades infecciosas que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades virales tales como condilomas acuminados, verrugas comunes, verrugas plantares, virus respiratorio sincitial (VRS), hepatitis B, hepatitis C, virus del dengue, virus del herpes simple (a modo de ejemplo solo, HSV-I, HSV-II, CMV o VZV), molusco contagioso, variolovacuna, viruela, lentivirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH), citomegalovirus (CMV), virus de la varicela zóster (VZV), rinovirus, enterovirus, adenovirus, coronavirus (por ejemplo, SARS), gripe, para-gripe, virus de las paperas, virus del sarampión, papovavirus, hepadnavirus, flavivirus, retrovirus, arenavirus (a modo de ejemplo solo, LCM, virus de Junin, virus de Machupo, virus de Guanarito y fiebre de Lassa) y filovirus (a modo de ejemplo solo, virus del ébola o virus de Marburgo).

Tales agentes terapéuticos incluyen agentes terapéuticos usados en el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y protozoicas que incluyen, pero no se limitan a, tuberculosis y *Mycobacterium avium*, lepra; *Pneumocystis carinii*, criptosporidiosis, histoplasmosis, toxoplasmosis, infección por tripanosomas, leishmaniasis, infecciones producidas por bacterias del género *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* y *Chlamydia*, e infecciones fúngicas tales como candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis, meningitis criptocócica.

## 5. AGENTES CRIOPROTECTORES

Como se ha observado previamente, pueden añadirse agentes crioprotectores a las composiciones de micropartículas de la presente invención en algunas realizaciones, por ejemplo, para prevenir que se produzca la sustancial aglomeración de micropartículas cuando se resuspenden las composiciones liofilizadas según la invención.

Los agentes crioprotectores incluyen (a) aminoácidos tales como ácido glutámico y arginina, entre otros; (b) polioles, que incluyen dioles tales como etilenglicol, propanodiolos tales como 1,2-propilenglicol y 1,3-propilenglicol, y butanodiolos tales como 2,3-butilenglicol, entre otros, trioles tales como glicerol, entre otros, además de otros polioles superiores; y (c) hidratos de carbono que incluyen, por ejemplo, (i) monosacáridos (por ejemplo, glucosa, galactosa y fructosa, entre otros), (ii) polisacáridos que incluyen 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), además de numerosos otros polisacáridos superiores, y (iii) alditos tales como xilitol, sorbitol y manitol, entre otros (a este respecto, se indica que los alditos son polioles superiores, además de ser hidratos de carbono).

Las composiciones según la invención pueden contener cantidades variables de agente crioprotector, si se proporcionan, dependiendo de la cantidad que es eficaz para prevenir que se produzca la sustancial aglomeración de micropartículas cuando se resuspenden las composiciones liofilizadas según la invención.

## 6. ESPECIES CARGADAS

Como se ha observado anteriormente, las composiciones de micropartículas según la presente invención pueden incluir especies cargadas con el fin de conferir una carga superficial a las micropartículas. Ejemplos de especies cargadas incluyen, por ejemplo, tensioactivos cargados, polímeros cargados y moléculas pequeñas cargadas. Tales especies pueden proporcionarse, por ejemplo, en una cantidad eficaz para promover la adsorción de especies a las superficies de las micropartículas (por ejemplo, antígenos, adyuvantes inmunológicos, etc.). Tales especies también pueden proporcionarse, por ejemplo, en una cantidad eficaz para promover la suspensión de micropartículas aceptable (por ejemplo, durante la formación y/o resuspensión de micropartículas después de la liofilización).

Ejemplos específicos de moléculas pequeñas cargadas incluyen biotina y potenciadores inmunitarios de molécula pequeña cargados.

Los tensioactivos cargados incluyen tensioactivos catiónicos y aniónicos. Los tensioactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio o "CTAB" (por ejemplo, cetrimida), cloruro de benzalconio, DDA (bromuro de dimetildioctodecilamonio) y DOTAP (dioleoil-3-trimetilamonio-propano), entre otros. Los tensioactivos aniónicos incluyen, por ejemplo, SDS (dodecilsulfato de sodio), SLS (laurilsulfato de sodio), DSS (disulfosuccinato) y alcoholes grasos sulfatados, entre otros.

Los polímeros cargados son polímeros que tienen múltiples grupos cargados (tales polímeros también se denominan comúnmente "polielectrolitos"). Algunos polímeros cargados tienen solo grupos aniónicos a pH fisiológico y así tienen una carga neta negativa (denominados en el presente documento polianiones). Otros polímeros cargados tienen solo grupos catiónicos a pH fisiológico y así tienen una carga neta positiva a pH fisiológico (denominados en el presente documento policationes). Todavía otros polímeros cargados tienen tanto grupos aniónicos como catiónicos (por ejemplo, péptidos, proteínas, etc.) y pueden tener carga neta negativa (por ejemplo, debido a que los grupos aniónicos contribuyen con más carga que los grupos catiónicos) o una carga neta positiva (por ejemplo, debido a que los grupos catiónicos contribuyen con más carga que los grupos aniónicos). Dependiendo de qué grupos predominen a pH fisiológico, los polímeros cargados que contienen tanto grupos catiónicos como aniónicos pueden clasificarse en el presente documento o bien como policationes (en los que el polímero tiene una carga neta positiva) o bien como polianiones (en los que el polímero tiene una carga neta negativa).

Ejemplos específicos de policationes incluyen, por ejemplo, poliaminas, que incluye poli(aminometacrilatos) que incluyen poli(metacrilatos de dialquilaminoalquilo) tales como poli(metacrilato de dimetilaminoetilo) y poli(metacrilato de dietilaminoetilo), polivinilaminas, polivinilpiridinas que incluyen polivinilpiridinas cuaternarias tales como poli(N-etil-4-vinilpiridina), poli(vinilbenciltrimetilaminas), polialilaminas tales como poli(clorhidrato de alilamina) (PAH) y poli(dialildialquilaminas) tales como poli(cloruro de dialildimetilamonio), poliamidoaminas, poliminas que incluyen polialquiléniminas tales como poli(etilenimina) (PEI), poli(propilenimina) y poli(etileniminas) etoxiladas, péptidos policationes y proteínas, que incluyen péptidos de histona y homopolímeros y copolímeros que contienen aminoácidos básicos tales como lisina, arginina, ornitina y combinaciones de los mismos, gelatina, protamina y sulfato de protamina, espermina, espermidina, bromuro de hexadimetreno (polibreno) y polisacáridos policationes tales como almidón catiónico y quitosano, además de copolímeros, sales, derivados y combinaciones de los precedentes, entre diversos otros.

Ejemplos específicos de polianiones incluyen, por ejemplo, polisulfonatos tales como polivinilsulfonatos, poli(estirenosulfonatos) tales como poli(estirenosulfonato de sodio) (PSS), poli(tetrafluoroetileno) sulfonatado,

polisulfatos tales como polivinilsulfatos, glucosaminoglicanos sulfatados y no sulfatados, además de ciertos proteoglicanos, por ejemplo, heparina, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratán, sulfato de dermatán, policarboxilatos tales como polímeros de ácido acrílico y sales de los mismos (por ejemplo, amonio, potasio, sodio, etc.), por ejemplo, aquellos disponibles de Atofina y Polysciences Inc., polímeros de ácido metacrílico y sales de los mismos (por ejemplo, EUDRAGIT, un copolímero de ácido metacrílico y acrilato de etilo), carboximetilcelulosa, carboximetilamilosa y derivados de ácido carboxílico de diversos otros polímeros, péptidos polianiónicos y proteínas tales como homopolímeros y copolímeros de aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico o combinaciones de los mismos, homopolímeros y copolímeros de ácidos urónicos tales como ácido manurónico, ácido galacturónico y ácido gularónico, y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácido hialurónico y sus sales, albúmina, gelatina, carragenina, polifosfatos tales como derivados de ácido fosfórico de diversos polímeros, polifosfonatos tales como polivinilfosfonatos, además de copolímeros, sales, derivados y combinaciones de los precedentes, entre diversos otros.

## 7. OTROS EXCIPIENTES

También puede estar presentes uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales tales como sustancias de tamponamiento biológico, agentes de ajuste de la tonicidad, y similares, en las composiciones de micropartículas de la presente invención.

## 8. ADMINISTRACIÓN

Una vez formuladas (y resuspensas según sea necesario), las composiciones de micropartículas de la invención pueden administrarse parenteralmente, por ejemplo, mediante inyección (que puede ser sin aguja), entre otras vías de administración. A este respecto, las composiciones de micropartículas normalmente se suministran liofilizadas en un vial u otro recipiente que se suministra con un tapón u otro medio adecuado para suministrar un medio de resuspensión (por ejemplo, agua para inyección) y para la extracción de la suspensión resultante. Una jeringa adecuada también puede suministrarse para inyección.

Como se observa anteriormente, en ciertas realizaciones, las composiciones de micropartículas se irradian con gamma, en cuyo caso puede desearse añadir antígeno(s) y cualquier otra especie sensible a la radiación (por ejemplo, adyuvantes inmunológicos, etc.) en el momento de la administración.

Por ejemplo, una disolución o suspensión que contiene uno o más antígenos y/o uno o más adyuvantes inmunológicos puede introducirse a una composición de micropartículas liofilizada dentro de un vial y agitarse el vial (por ejemplo, rodarse) para mezclar minuciosamente el contenido. Entonces, el contenido se extrae para administración a un sujeto vertebrado.

En algunas realizaciones, se deja que pase un periodo de tiempo predeterminado después del contacto entre el (los) antígeno(s) y/o adyuvante(s) inmunológico(s), antes de administrar la composición. Por ejemplo, la composición puede administrarse después de un tiempo que oscila de 30 minutos a 10 minutos a 5 minutos a 1 minuto a inmediatamente después de tal contacto.

Las composiciones pueden inyectarse, por ejemplo, subcutáneamente, intradérmicamente, intramuscularmente, intravenosamente, intrarterialmente o intraperitonealmente. Otros modos de administración incluyen administración nasal, mucosa, intraocular, rectal, vaginal, oral y pulmonar, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden usarse para administración elegida como diana específica de sitio. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones puede usarse para elegir como diana el pulmón, hígado, bazo, circulación de la sangre o médula ósea.

El tratamiento puede realizarse según un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. Un programa de dosis múltiples es uno en el que puede administrarse un ciclo primario de administración, por ejemplo, con 1-10 dosis separadas, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores, elegidas para mantener y/o reforzar la respuesta terapéutica, por ejemplo a 1-4 meses para una segunda dosis, y si se necesita, una dosis(s) posterior(es) después de varios meses. La pauta de dosificación también se determinará, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y será dependiente del criterio del médico.

Además, si se desea prevención de la enfermedad, las composiciones se administran generalmente antes de la llegada de la manifestación primaria de la infección o trastorno de interés. Si se desean otras formas de tratamiento, por ejemplo, la reducción o eliminación de síntomas o reapariciones, las composiciones se administran generalmente tras la llegada de la manifestación primaria de la infección o trastorno de interés.

## 9. KITS

La presente invención engloba kits que pueden simplificar la administración de cantidades apropiadas de composiciones inmunológicas a un sujeto.

Un kit típico de la invención comprende una forma de dosificación unitaria de una composición de micropartículas liofilizada según la invención, preferentemente en un envase sellado.

Los kits de la invención pueden comprender además un envase sellado que contiene uno o más antígenos y/o uno o más adyuvantes inmunológicos. Los antígenos y/o adyuvantes pueden estar en forma liofilizada o proporcionarse en forma de un fluido acuoso.

Los kits de la invención pueden comprender además un envase sellado que contiene uno o más agentes terapéuticos y/o fármacos cargados. Los agentes terapéuticos y/o fármacos cargados pueden estar en forma liofilizada o proporcionarse en forma de un fluido acuoso.

Los kits de la invención pueden comprender además un envase sellado que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable que puede usarse para suspender y administrar la composición de micropartículas liofilizada y en algunas realizaciones para suspender/disolver cualquier antígeno liofilizado y/o composición de adyuvante que se suministra, y en otras realizaciones para suspender/disolver cualquier agente terapéutico liofilizado y/o composición de fármaco cargada.

El kit puede incluir además uno o más dispositivos que pueden usarse para administrar las composiciones de la invención a un sujeto vertebrado. Ejemplos de tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, jeringas, bolsas de goteo e inhaladores.

Por ejemplo, puede usarse una jeringa para introducir un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado (por ejemplo, agua para inyección) a una composición liofilizada que contiene uno o más antígenos (y opcionalmente uno o más adyuvantes) en un envase sellado. La suspensión/disolución que contiene antígeno resultante puede entonces sacarse del recipiente e introducirse a una composición de micropartículas en un recipiente adicional. La suspensión resultante puede entonces sacarse del recipiente adicional y administrarse a un sujeto. Como se observa anteriormente, en ciertas realizaciones, se deja que transcurra un periodo adecuado (por ejemplo, para permitir la suficiente adsorción de antígeno a las micropartículas) entre (a) el tiempo en el que la suspensión/disolución que contiene antígeno se introduce a la composición de micropartículas y (b) el tiempo de introducción a un sujeto vertebrado.

## 10. DEFINICIONES

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguiente términos, y pretenden definirse como se indica más adelante.

El término "micropartícula", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula de menos de 10.000 nm de diámetro, por ejemplo, de aproximadamente 10 nm o menos a aproximadamente 150  $\mu$ m de diámetro, más particularmente, que oscila de 10 nm a 25 nm a 50 nm a 100 nm a 250 nm a 500 nm a 1000 nm a 2500 nm a 5000 nm a 10.000 nm. En algunas realizaciones, existen micropartículas secas en agregados que son mayores que 10.000 nm de diámetro, pero que se dispersan en tamaños de micropartícula inferiores a 10.000 nm tras la adición de un fluido acuoso. Las micropartículas dentro de las composiciones de la presente invención normalmente tienen una distribución de tamaño en fluido acuoso, en las que el valor promedio de Z y/o de D(v,0,5) es inferior a 5.000 nm, por ejemplo, que oscila de 5.000 nm a 2.500 nm a 1.000 nm a 500 nm a 250 nm o menos.

El tamaño de partícula puede determinarse (medirse) usando métodos disponibles en la materia. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede determinarse usando espectroscopía de correlación fotónica, dispersión de la luz dinámica o dispersión de la luz cuasi-elástica. Estos métodos se basan en la correlación del tamaño de partícula con las propiedades de difusión de partículas obtenidas 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 por el coeficiente de difusión traduccional (D). El valor medido se refiere a cómo una partícula se mueve dentro de un líquido (diámetro hidrodinámico). El diámetro que se obtiene es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traduccional que la partícula.

El tamaño de partícula también puede determinarse usando dispersión de la luz estática, que mide la intensidad de luz dispersada por partículas en una disolución en un único momento. La dispersión de la luz estática 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 un ángulo que es inversamente proporcional a su tamaño. Partículas más grandes generan un patrón de difracción a bajos ángulos de dispersión con alta intensidad, mientras que partículas pequeñas dan lugar a señales de baja intensidad de ángulo ancho. Las distribuciones del tamaño de partícula pueden calcularse si la intensidad de luz dispersada de una muestra se mide en función del ángulo. La información angular se compara con un modelo de dispersión (por ejemplo, teoría de Mie) con el fin de calcular la distribución de tamaño.

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 dar un valor promedio para el diámetro de partícula.

Para la espectroscopía de correlación fotónica, Z promedio (también llamado la media de cumulantes o diámetro hidrodinámico) normalmente se calcula a partir de análisis de cumulantes (monomodal).

Para las mediciones de la dispersión de la luz estática (y también para espectroscopía de correlación fotónica en algunas realizaciones), pueden medirse parámetros de tamaño basados en el volumen. Por ejemplo, el  $D(v,0,5)$  (en el que  $v$  significa volumen) es un parámetro de tamaño cuyo valor se define como el punto al que el 50 % de las partículas (base de volumen) en la composición, como se mide, tienen un tamaño que es inferior al valor de  $D(v,0,5)$ , y el 50 % de las partículas en la composición tienen un tamaño que es mayor que el valor de  $D(v,0,5)$ .

Como se define en el presente documento, una "suspensión" es una fase líquida que contiene material en partículas sólido en suspensión. Las suspensiones pueden ser estables o inestables. Como se define en el presente documento, una "disolución" es una fase líquida que contiene material disuelto. Como se define en el presente documento, una suspensión o disolución "acuosa" es una suspensión o disolución que contiene agua, normalmente 50 % en peso de agua o más, por ejemplo, que oscila del 50 % en peso al 75 % en peso al 90 % en peso al 95 % en peso o más de agua.

Como se define en el presente documento, las composiciones de micropartículas "secas" son composiciones de micropartículas que no se sumergen en un líquido (por ejemplo, no dentro de una suspensión líquida). Normalmente, una composición de micropartículas "seca" comprenderá menos del 3 % en agua.

Como se define en el presente documento, micropartículas de "blanco" son micropartículas que están libres de agentes activos (es decir, están libres de productos farmacéuticos, que incluyen fármacos, adyuvantes inmunológicos, antígenos, etc.).

Las composiciones de micropartículas para su uso en el presente documento normalmente se forman a partir de polímeros que son esterilizables, sustancialmente no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen poliésteres (por ejemplo, poli[hidroxiácidos] tales como polilactida y poliglicolida, poli[ésteres cíclicos] tales como caprolactona, etc.), policarbonatos, poliortoésteres, polianhídridos, policianoacrilatos, polifosfazinas, y combinaciones de los mismos, entre otros. Más normalmente, las micropartículas para su uso con la presente invención son micropartículas de polímero derivadas de poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), por ejemplo, de una poli(lactida) ("PLA") tal como poli(L-lactida) o poli(D,L-lactida), de un copolímero de lactida y glicolida ("PLGA") tal como una poli(L-lactida-co-glicolida) o poli(D,L-lactida-co-glicolida), o de un copolímero de lactida y caprolactona. Las micropartículas de polímero pueden así formarse usando cualquiera de diversos materiales de partida poliméricos que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros, tales como PLGA, una variedad de relaciones de monómeros (por ejemplo, lactida:glicolida), cuya selección será en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de las especies coadministradas. Estos parámetros se tratan adicionalmente más adelante.

"Potencial zeta", como se usa en el presente documento, se refiere al potencial eléctrico que existe a través de la interfase de todos los sólidos y líquidos, por ejemplo, el potencial a través de la capa difusa de iones que rodea una partícula coloidal cargada. El potencial zeta puede calcularse a partir de movilidades electroforéticas, es decir, las tasas a las que las partículas coloidales se desplazan entre electrodos cargados situados en contacto con la sustancia que va a medirse, usando técnicas muy conocidas en la técnica.

El término "tensioactivo" procede de la frase "agente activo superficial". Los tensioactivos se acumulan en interfases (por ejemplo, en las interfases líquido-líquido, líquido-sólido y/o líquido-gas) y cambian las propiedades de esa interfase. Como se usa en el presente documento, los tensioactivos incluyen detergentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, estabilizadores de la emulsión y similares.

Como se define en el presente documento, "hidratos de carbono" incluyen monosacáridos, sacáridos y polisacáridos, además de sustancias derivadas de monosacáridos, 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).

Como se define en el presente documento, un "monosacárido" es un alcohol polihidroxilado, es decir, un alcohol que comprende además cualquiera de 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 normalmente contienen de 3-10 carbonos. Además, los monosacáridos tienen comúnmente la fórmula empírica  $(CH_2O)_n$  en la que  $n$  es un número entero de tres o mayor, normalmente 3-10. Ejemplos de aldosas de 3-6 carbonos incluyen gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, 2-desoxirribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa. Ejemplos de cetosas de 3-6 carbonos incluyen dihidroxiacetona, eritrolulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa y tagatosa. Los monosacáridos que se producen naturalmente normalmente se encuentran en la forma del isómero D, a diferencia de la forma L.



Un "oligosacárido" se refiere a un polímero de monosacárido relativamente corto, es decir, uno que contiene de 2 a 30 unidades de monosacárido. Un "polisacárido" es un polímero de monosacárido que tiene más de la longitud del sacárido (es decir, uno que contiene más de 30 unidades de monosacárido). Además, como se usa en el presente documento, el término "polisacárido" también se refiere a un polímero de monosacárido que contiene dos o más monosacáridos ligados. Para evitar ambigüedad, la segunda definición va a aplicarse en todo momento, a menos que haya indicaciones explícitas al contrario. El término "polisacárido" también incluye derivados de polisacárido, tales como derivados de polisacárido con funcionalidad amino y con funcionalidad carboxilo, entre muchos otros. Los monosacáridos normalmente están ligados por enlaces glucosídicos. 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).

Como se usa en el presente documento, el término "sacárido" engloba monosacáridos, sacáridos y polisacáridos. Una "especie que contiene sacáridos" es una molécula, al menos una porción de la cual es un sacárido. Ejemplos incluyen agentes crioprotectores de sacárido, antígenos de sacárido, antígenos que comprenden sacáridos conjugados con péptidos portadores, etc. Una "especie que contiene polisacáridos" es una molécula, al menos una porción de de la cual es un polisacárido.

Como se usa en el presente documento, un "agente crioprotector" es un agente que protege una composición de experimentar efectos adversos tras la congelación y descongelación. Por ejemplo, en la presente invención, pueden añadirse agentes crioprotectores para prevenir que se produzca la aglomeración de micropartículas sustancial cuando se resuspenden las composiciones liofilizadas de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" significa un homopolímero o heteropolímero de al menos 2 unidades de nucleótidos (también denominados en el presente documento "nucleótidos"). Los nucleótidos que forman polinucleótidos como se define en el presente documento incluyen nucleótidos que se producen naturalmente, tales como ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, además de equivalentes, derivados, variantes y análogos de nucleótidos que se producen naturalmente.

Un polinucleótido puede estar en cualquier forma monocatenaria o forma multi-catenaria (por ejemplo, bicatenaria, tricatenaria, etc.). Un polinucleótido puede estar en forma lineal o forma no lineal (por ejemplo, que comprende elementos circulares, ramificados, etc.). Un polinucleótido puede ser natural, sintético o una combinación de ambos.

Un polinucleótido puede ser capaz de auto-replicación cuando se introduce en una célula huésped. Así, ejemplos de polinucleótidos incluyen ARN y ADN auto-replicantes y, por ejemplo, seleccionados de replicones, plásmidos, cósmidos, fagémidos, transposones, vectores virales, cromosomas artificiales (por ejemplo, bacterianos, levadura, etc.), además de otras especies auto-replicantes. Los polinucleótidos incluyen aquellos que expresan polipéptidos antigénicos en una célula huésped (por ejemplo, antígenos que contienen polinucleótido). Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos auto-replicantes dentro de los cuales se han insertado secuencias naturales o sintéticas derivadas de organismos eucariotas o procariotas (por ejemplo, secuencias de ADN genómico, secuencias de ARN genómico, secuencias de ADNc, etc.). Ejemplos específicos de polinucleótidos auto-replicantes incluyen construcciones de vector de ARN y construcciones de vector de ADN, entre otras. Secuencias que pueden expresarse incluyen secuencias nativas y modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a las secuencias nativas, entre otros. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de huéspedes que producen antígenos.

Como define en el presente documento, un "oligonucleótido" es un polinucleótido que tiene en el intervalo de 5 a 100 y más preferentemente 5 a 30 nucleótidos de tamaño.

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" incluye ADN, ARN, y quimeras formadas a partir de los mismos.

Una "especie que contiene polinucleótidos" es una molécula, al menos una porción de la cual es un polinucleótido.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Así, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares están incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están englobados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a una secuencia nativa, por ejemplo, de forma que la proteína mantenga la capacidad para provocar una respuesta inmunológica o tener un efecto terapéutico en un sujeto al que se administra la proteína.

Una "especie que contiene polipéptidos" es una molécula, al menos una porción de la cual es un polipéptido. Ejemplos incluyen polipéptidos, proteínas que incluyen glucoproteínas, antígenos de sacárido conjugados con proteínas transportadoras, etc.

El término “farmacéutico” se refiere a compuestos biológicamente activos tales como fármacos, antibióticos, agentes antivirales, factores de crecimiento, hormonas, antígenos, adyuvantes y similares.

- 5 El término “adyuvante” se refiere a cualquier sustancia que ayude o modifique la acción de un producto farmacéutico, que incluye, pero no se limita a, adyuvantes inmunológicos, que aumentan o diversifican la respuesta inmunitaria a un antígeno. Por tanto, los adyuvantes inmunológicos son compuestos que pueden potenciar una respuesta inmunitaria a antígenos. Los adyuvantes inmunológicos pueden potenciar inmunidad humoral y/o celular.
- 10 Por “antígeno” se indica una molécula que contiene uno o más epítopes que pueden estimular el sistema inmunitario de un huésped para producir una respuesta inmunitaria específica de antígeno celular cuando el antígeno se presenta, o una respuesta de anticuerpos humoral. Un antígeno puede ser capaz de provocar una respuesta celular y/o humoral por sí mismo o cuando está presente en combinación con otra molécula.
- 15 Un “epítipo” es aquella porción de una molécula antigénica o complejo antigénico que determina su especificidad inmunológica. Un epítipo está dentro del alcance de la presente definición de antígeno. Comúnmente, un epítipo es un polipéptido o polisacárido en un antígeno que se produce naturalmente. En antígenos artificiales puede ser una sustancia de bajo peso molecular tal como un derivado de ácido arsánico. Un epítipo reaccionará específicamente *in vivo* o *in vitro* con, por ejemplo, anticuerpos homólogos o linfocitos T. Descriptores alternativos son determinante
- 20 antigénico, agrupación estructural antigénica y agrupación hapténica.

- Frecuentemente, un epítipo incluirá entre aproximadamente 5 y 15 aminoácidos. Epítopes de una proteína dada pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopes, muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996)
- 25 Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, pueden determinarse epítopes lineales, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.708.871; Geysen y col. (1984) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002); Geysen y col. (1986) (*Molec. Immunol.* 23:709-715). Similarmente, epítopes conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tales como, por ejemplo, por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, arriba.
- 30

- El término “antígeno”, como se usa en el presente documento, indica tanto antígenos de subunidad, es decir, antígenos que están separados y son discretos de un organismo completo con el que el antígeno está asociado en la naturaleza, además de bacterias, virus, parásitos u otros patógenos o células tumorales muertos, atenuados o inactivados. Anticuerpos tales como anticuerpos antiidiotipo, o fragmentos de los mismos, y mimotopes de péptidos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también se recopilan bajo la definición de antígeno como se usa en el presente documento.
- 35

- Similarmente, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa una proteína inmunogénica, o determinante antigénico *in vivo*, tal como en aplicaciones de inmunización de ácidos nucleicos, también se incluye en la definición de antígeno en el presente documento.
- 40

- Además, para los fines de la presente invención, un “antígeno” se refiere a una proteína que tiene modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a la secuencia nativa, en tanto que la proteína mantenga la capacidad para provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de huéspedes que producen los antígenos.
- 45

- Una “respuesta inmunológica” o “respuesta inmunitaria” a un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular a moléculas presentes en la composición de interés.
- 50

- Respuestas inmunitarias incluyen respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Las respuestas inmunitarias innatas son respuestas que actúan rápidamente que proporcionan una primera línea de defensa para el sistema inmunitario. A diferencia, la inmunidad adaptativa usa selección y expansión clónica de células inmunitarias que tienen genes receptores somáticamente reorganizados (por ejemplo, receptores de linfocitos T y B) que reconocen antígenos de un patógeno o trastorno dado (por ejemplo, un tumor), proporcionando así especificidad y memoria inmunológica. Las respuestas inmunitarias innatas, entre sus muchos efectos, conducen a un rápido estallido de las citocinas inflamatorias y la activación de células presentadoras de antígeno (APC) tales como macrófagos y células dendríticas. Para distinguir patógenos de auto-componentes, el sistema inmunitario innato usa una variedad de receptores relativamente invariables que detectan distintivos de patógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos, o PAMP. Se sabe que la adición de componentes microbianos a vacunas experimentales conduce al desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas robustas y duraderas. Se ha informado que el mecanismo detrás de esta potenciación de las respuestas inmunitarias implica receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que se expresan diferencialmente en una variedad de células inmunitarias, que incluyen neutrófilos,
- 55
- 60
- 65

macrófagos, células dendríticas, linfocitos citolíticos espontáneos, linfocitos B y algunas células no inmunitarias tales como células epiteliales y endoteliales. La interacción de PRR conduce a la activación de algunas de estas células y su secreción de citocinas y quimiocinas, además de la maduración y migración de otras células. En conjunto, esto crea un entorno inflamatorio que conduce al establecimiento de la respuesta inmunitaria adaptativa. Los PRR incluyen receptores no fagocíticos, tales como receptores similares a Toll (TLR) y proteínas del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), y receptores que inducen la fagocitosis, tales como receptores depuradores, receptores de manosa y receptores de  $\beta$ -glucano.

Los TLR informados (junto con ejemplos de algunos agonistas de TLR informados, que pueden usarse como adyuvantes inmunológicos en diversas realizaciones de la invención) incluyen los siguientes: TLR1 (lipoproteínas bacterianas de *Mycobacteria*, *Neisseria*), TLR2 (partículas de levadura zymosan, peptidoglicano, lipoproteínas, glicolípidos, lipopolisacárido, lipopéptido), TLR3 (ARN bicatenario viral, poli:IC), TLR4 (lipopolisacáridos y análogos bacterianos, producto vegetal taxol), TLR5 (flagelinas bacterianas), TLR6 (partículas de levadura zymosan, ácido lipoteicoico, lipopéptidos de mycoplasma), TLR7 (ARN monocatenario, imiquimod, resimiquimod, y otros compuestos sintéticos tales como loxoribina y bropirimina), TLR8 (ARN monocatenario, resimiquimod) y TLR9 (oligonucleótidos de CpG), entre otros. Las células dendríticas son reconocidas como algunos de los tipos de células más importantes para iniciar la sensibilización de linfocitos T cooperadores  $CD4^+$  ( $T_H$ ) sin tratamiento previo y para inducir la diferenciación de linfocitos T  $CD8^+$  en células asesinas. Se ha informado que la señalización de TLR desempeña una función importante en determinar la calidad de estas respuestas de linfocitos T cooperadores, por ejemplo, con la naturaleza de la señal de TLR que determina el tipo específico de respuesta  $T_H$  que se observa (por ejemplo, respuesta  $T_H1$  frente a  $T_H2$ ). Se produce una combinación de anticuerpo (humoral) e inmunidad celular como parte de una respuesta de tipo  $T_H1$ , mientras que una respuesta de  $T_H2$  es predominantemente una respuesta de anticuerpos. Se han documentado diversos ligandos de TLR tales como ADN de CpG (TLR9) e imidazoquinolinas (TLR7, TLR8) para estimular la producción de citocinas de células inmunitarias *in vitro*. Las imidazoquinolinas son los primeros compuestos similares a fármaco pequeños que se muestra que son agonistas de TLR. Para información adicional véase, por ejemplo, A. Pashine, N. M. Valiante y J. B. Ulmer (Nature Medicine 11, S63-S68 (2005)), K. S. Rosenthal y D. H. Zimmerman (Clinical and Vaccine Immunology, 13(8), 821-829 (2006)), y las referencias citadas en su interior.

Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una "respuesta inmunitaria celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por linfocitos T citolíticos ("CTL"). Los CTL tienen especificidad por antígenos de péptido que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresan sobre las superficies de 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 antígenos por linfocitos T cooperadores. Los linfocitos T cooperadores actúan ayudando a estimular la función, y concentran la actividad de, células efectoras no específicas contra células que muestran antígenos de péptido en asociación con moléculas del MHC sobre su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras de tales moléculas producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, que incluyen aquellos derivados de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ .

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

La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse por varios ensayos conocidos en la técnica, tales como por ensayos de linfoproliferación (activación de linfocito), ensayos de células citotóxicas CTL, ensayando para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o por medición de la producción de citocinas por linfocitos T en respuesta a la reestimulación con antígeno. Tales ensayos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col. (1993) (J. Immunol. 151:4189-4199); Doe y col. (1994) (Eur. J. Immunol. 24:2369-2376); y los ejemplos más adelante.

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

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención muestran "inmunogenicidad potenciada" cuando poseen una mayor capacidad para provocar una respuesta inmunitaria que la respuesta inmunitaria provocada por una

cantidad equivalente del antígeno en una composición diferente. Así, una composición puede mostrar “inmunogenicidad potenciada”, por ejemplo, debido a que la composición genera una respuesta inmunitaria más fuerte, o debido a que se necesita una menor dosis de antígeno para lograr una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra. Tal inmunogenicidad potenciada puede determinarse, por ejemplo, administrando las composiciones de la invención, y controles de antígeno, a animales y comparando los resultados del ensayo de los dos.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, “tratar” o “tratado”) 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 síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. El tratamiento puede efectuarse profilácticamente (antes de la llegada del patógeno o trastorno en cuestión) o terapéuticamente (tras la llegada de los mismos).

Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” de una composición inmunogénica de la presente invención se refieren en el presente documento a una cantidad suficiente de la composición inmunogénica para tratar o diagnosticar una afección de interés. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo, por ejemplo, de la especie, edad y condición general del sujeto; la gravedad de la afección que está tratándose; el antígeno particular de interés; en el caso de una respuesta inmunológica, 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. Una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto habitual en la materia. Así, una “cantidad terapéuticamente eficaz” normalmente se encontrará en un intervalo relativamente ancho que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

Por “sujeto vertebrado” o “animal vertebrado” se indica cualquier miembro del subfilo cordados que incluye, sin limitación, mamíferos tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras, caballos y seres humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, que incluyen aves domésticas, salvajes y de caza tales como gallos y gallinas que incluyen pollos, pavos y otras aves gallináceas. El término no indica una edad particular. Así, están cubiertos tanto animales adultos como recién nacidos.

Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se indica un material que no es biológicamente o de otro modo no deseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar ningún efecto biológico excesivamente no deseable en el individuo o interaccionando de una manera excesivamente perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

El término “excipiente” se refiere a cualquier sustancia esencialmente secundaria que puede estar presente en la forma de dosificación acabada. Por ejemplo, el término “excipiente” incluye vehículos, aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, deslizantes (potenciadores del flujo), adyuvantes de compresión, colores, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersantes, formadores de película/recubrimientos, aromas y tintas de impresión.

Por “pH fisiológico” o un “pH en el intervalo fisiológico” se indica un pH en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0, ambos incluidos, más normalmente en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6, ambos incluidos.

Como se usa en el presente documento, el término “construcción de vector” generalmente se refiere a cualquier ensamblaje que pueda dirigir la expresión de una secuencia(s) de ácidos nucleicos o gen(es) de interés. Una construcción de vector normalmente incluye promotor/potenciador de la transcripción o sitio que define los elemento(s), u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación post-traducciona del mensajero, o modificación post-transcripcional de proteína. Además, la construcción de vector normalmente incluye una secuencia que, cuando se transcribe, está operativamente ligada a la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés y actúa de una secuencia de iniciación de la traducción. La construcción de vector puede también incluir opcionalmente una señal que dirige la poliadenilación, un marcador de selección, además de uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Además, si la construcción de vector se coloca en un retrovirus, la construcción de vector puede incluir una señal de encapsidación, repeticiones terminales largas (LTR) y sitios de unión al cebador de cadena positiva y negativa apropiados para el retrovirus usado (si estos ya no están presentes).

Una “construcción de vector de ADN” se refiere a una molécula de ADN que puede dirigir la expresión de una secuencia(s) de ácidos nucleicos o gen(es) de interés.

Un tipo específico de construcción de vector de ADN es un plásmido, que es una molécula de ADN episómica circular, capaz de replicación autónoma dentro de una célula huésped. Normalmente, un plásmido es un ADN bicatenario circular, bucle en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. El pCMV es un plásmido específico que es muy conocido en la técnica. Un vector de pCMV preferido contiene el potenciador/promotor inmediato-temprano del CMV y un terminador de la hormona de crecimiento bovina. Un ejemplo específico se describe en detalle en Chapman, B.S., y col. (1991) (Nucleic Acids Res. 19:3979-3986).

Se conocen otras construcciones de vector de ADN, que se basan en virus de ARN. Estas construcciones de vector de ADN normalmente comprenden un promotor que funciona en una célula eucariota, 5' de una secuencia de ADNc para la que el producto de transcripción es una construcción de vector de ARN (por ejemplo, un replicón de vector de ARN de alfavirus) y una región de terminación de 3'. La construcción de vector de ARN comprende preferentemente un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de la fiebre amarilla o alfavirus (por ejemplo, virus de Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana o virus del río Ross), que se ha modificado por la sustitución de uno o más genes de proteína estructural con una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga seleccionada que codifica un producto de interés. Las construcciones de vector de ARN pueden obtenerse por transcripción *in vitro* de un molde de ADN. Ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en el virus de Sindbis (pSIN) tales como pSINCP, descritos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.814.482 y 6.015.686, además de en las publicaciones internacionales nº WO 97/38087, WO 99/18226 y WO 02/26209. La construcción de tales vectores, en general, se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.814.482 y 6.015.686.

Otros ejemplos de construcciones de vector incluyen construcciones de vector de ARN (por ejemplo, construcciones de vector de alfavirus) y similares. Como se usa en el presente documento, "construcción de vector de ARN", "replicón de vector de ARN" y "replicón" se refieren a una molécula de ARN que puede dirigir su propia amplificación o auto-replicación *in vivo*, normalmente dentro de una célula diana. La construcción de vector de ARN se usa directamente, sin el requisito de la introducción de ADN en una célula y transporte al núcleo en el que se produciría la transcripción. Usando el vector de ARN para la administración directa al citoplasma de la célula huésped, se produce eficazmente la replicación y traducción autónoma de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga.

## GENERAL

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, 5th ed. (Blackwell Publishers, 1996); Sambrook, J. y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); Ausubel, F.M. y col., 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, 5ª ed. (Marcel Dekker Inc., 2007).

A menos que se establezca de otro modo o a menos que el contexto dicte claramente de otro modo, todos los porcentajes y relaciones en el presente documento se facilitan en base en peso.

## EXPERIMENTAL

A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Se obtuvieron la composición de copolímero 50:50 de poli(D,L-lactida-co-glicolida) RG503 y RG505 de Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Alemania). El sulfosuccinato de dioctilo y sodio (DSS) fue de Sigma Chemical (St. Louis, MO). Los antígenos de la proteína meningocócica B (Men B) recombinante derivada de *Escherichia coli* (*E. coli*), 287-953, 936-741 y 961c (también conocidos como GNA2132-1030, GNA2091-1870 y NadA, respectivamente, obtenidos de Novartis Vaccines (IRIS, Siena, Italia) se aislaron y purificaron como se ha descrito previamente en el documento WO2004/032958 y M. Pizza y col., Science 287: 1816-1820 (2000). Se obtuvieron placas de microtitulación de enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) de Nunc (Roskilde, Dinamarca). Todos los otros reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Company. Todos los estudios realizados en los animales fueron autorizados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Novartis.

Otros experimentos de apoyo, que incluyen más detalles y variaciones opcionales, pueden encontrarse en S. Jain. y col., J. Pharm. Sci. 100:646-654 (2010).

## EJEMPLO 1 PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS

Se prepararon micropartículas por un método de evaporación de disolvente como se ha descrito previamente (M. Singh y col., J. Pharm. Sci. 93: 273-282 (2004) y J. Kazzaz y col., J. Control Release 67: 347-356 (2000)). Se sintetizaron micropartículas usando la técnica de emulsión de W/O/W. Se añadieron 6 ml de solución salina tamponada con fosfato a 30 ml de disolución al 6 % en peso/volumen del polímero de poli(lactida-co-glicolida) RG503 o RG505 en diclorometano, y se homogeneizaron durante 2 min a 24.000 rpm usando una sonda de 10 mm (Ultra-Turrax T25 IKA-Labortechnik, Wasserburg, Alemania) para formar emulsión primaria de W/O. Esta emulsión se añadió a 150 ml de agua que contenía 0,05 % en peso/peso de DSS, y se homogeneizó a 16800 rpm durante 15-20 min usando una sonda de 20 mm (ES-15 Omni International, Jarrenton, VA) durante 20 min en un baño de hielo. La emulsión resultante se agitó a 1000 rpm durante la noche para evaporar diclorometano. Se recogieron

micropartículas por filtración a través de un filtro de 53 µm y se guardaron con agitación a 2-8 °C.

La distribución de tamaño de las micropartículas resultante se determinó con un analizador del tamaño de partícula (LA-920, Horiba). A viales de vidrio previamente pesados se añadió 1 ml de suspensión de partículas y se liofilizó (sistema de liofilización de mesa de 4,5 l FreeZone de Labconco). Se determinó la recuperación de polímero de la diferencia en los pesos. Se añadieron suspensiones de partículas de PLG (48 mg de PLG) a cada vial de vidrio (Metrohm) con 54 mg de manitol y 18 mg de sacarosa. Estos excipientes se añadieron para estabilizar la formulación durante la liofilización al 4,5 % y 1,5 % en peso/volumen del volumen de reconstitución final, respectivamente. Las suspensiones de partículas se liofilizaron durante dos días usando una liofilizadora de estantes de ciclos controlados (Virtis). Tras la liofilización, el espacio de la cabeza del vial se purgó con nitrógeno para eliminar el oxígeno (el contenido de oxígeno en los viales durante la irradiación gamma puede afectar la degradación del polímero (T. N. Bowmer y col., Journal of Applied Polymer Science 24: 425-439 (1979)). Los viales se taparon y ciertos de los viales se irradiaron con gamma a 15 kGy o 25 kGy (H. Nguyen y col., Cell Tissue Bank 8: 93-105 (2007), H. Nguyen y col., Cell Tissue Bank 8: 81-91 (2007), H. Nguyen y col., Cell Tissue Bank 9: 139-147 (2008)). Los viales se almacenaron a 2-8 °C hasta que se usaron.

El producto liofilizado se analizó para el contenido de humedad residual usando el sistema de valoración volumétrica de Karl-Fischer según las instrucciones del fabricante. El oxígeno residual se determinó por cromatografía de gases. Las micropartículas se reconstituyeron en agua estéril y se probaron para el contenido de endotoxinas usando el sistema EndoSafe PTS (Charles River Laboratories, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

Los resultados de los procedimientos anteriores (antes de la irradiación) se presentan en la Tabla 1. Las micropartículas de PLG sintetizadas con RG503 o RG505 produjeron una población homogénea con el tamaño de partícula de ~1 µm. Una medida de la eficiencia del proceso de síntesis de partículas es la recuperación de PLG. Para tanto los polímeros RG503 como RG505, se determinó que la recuperación de PLG era > 70 %. El contenido de humedad residual para las formulaciones fue < 3 %. El contenido de endotoxina fue significativamente inferior al límite recomendado de 1 UE/dosis en dosis de 100 µl.

TABLA 1. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DESPUÉS DE LA SÍNTESIS DE PARTÍCULAS Y ANTES DE LA IRRADIACIÓN GAMMA.

|           | Tamaño medio de partícula (µm) | PLG Recuperación (%) | Contenido de humedad (%) | Contenido Residual de oxígeno (%) | Contenido/endotoxina (EU/DOSIS) |
|-----------|--------------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| RG503 PLG | 0.8                            | 90                   | 0.1                      | 0.2                               | 0.03                            |
| RG505 PLG | 1.0                            | 71                   | 0.0                      | < 0.1                             | 0.36                            |

Las micropartículas RG503 no irradiadas e irradiadas con gamma (25 kGy) se caracterizaron para el tamaño de partícula y peso molecular para identificar el efecto del proceso de irradiación sobre las micropartículas. Se midieron el peso molecular promedio en número (Mn) y el peso molecular promedio en peso (Mw) para partículas de PLG no irradiadas (no GI) e irradiadas con gamma (GI) por cromatografía de exclusión molecular.

Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, el tamaño de partícula medio de las micropartículas de RG503 aumentó a 4,3 µm tras la irradiación gamma. Se observaron aumentos similares en el tamaño de partícula medio para las micropartículas de RG505 después de la irradiación (datos no mostrados). Este aumento en el tamaño de partícula con irradiación gamma se ha informado en la bibliografía (R. Dorati y col. J Control Release 107: 78-90 (2005); R. Dorati y col., J. Microencapsul. 23: 123-133 (2006); C. E. Holy y col., Biomaterials 22: 25-31 (2001)). El polímero de RG503 se sometió a degradación que se asoció al 23 % de pérdida en peso molecular cuando se irradió con gamma a 25 kGy.

TABLA 2. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE PLG RG503 ANTES Y DESPUÉS DE LA IRRADIACIÓN GAMMA

|                           | Tamaño medio de partícula (µm) | Número de peso molecular (Mn (Da)) | Número de peso molecular (Mw (Da)) | Mw/Mn |
|---------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------|
| Pre-irradiación           | 0.8                            | 18800                              | 34700                              | 1.85  |
| Post-irradiación (25 kGy) | 4.3                            | 14700                              | 26800                              | 1.82  |

## EJEMPLO 2 PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES DE MICROPARTÍCULAS LIOFILIZADAS IRRADIADAS Y NO IRRADIADAS PARA EL ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE ADSORCIÓN Y ADMINISTRACIÓN *IN VIVO*

Para cada antígeno de MenB probado más adelante, se prepararon tres grupos de micropartículas liofilizadas.

Grupo I (adsorción/lioofilización durante la noche). Se prepararon micropartículas (RG503 o RG505) como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se adsorbieron independientemente tres antígenos de MenB bacterianos (287-953, 961 c, 936-741) a las micropartículas a 2-8 °C durante la noche. Las micropartículas adsorbidas a proteína se añadieron a los viales en cantidades correspondientes a 4,8 y 48 mg que fueron suficientes para obtener una dosis de antígeno total de 1 y 10 µg por antígeno, respectivamente. Se añadieron 54 mg de D-manitol y 18 mg de sacarosa a cada vial y se liofilizaron usando una liofilizadora de estantes Virtis. Los viales se reconstituyeron con agua para inyección antes de la inmunización para obtener concentraciones de micropartículas de 4 y 40 mg/ml y una dosis de antígeno total de 1 y 10 µg por antígeno, respectivamente.

Grupo II (micropartículas de blanco liofilizadas/irradiadas). Micropartículas (RG503 o RG505) preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1 se añadieron a 48 mg por vial en un vial de 5 ml junto con 54 mg de D-manitol y 18 mg de sacarosa, y se liofilizaron en una liofilizadora de estantes Virtis como se ha descrito anteriormente. Después de la liofilización, los viales se trataron con irradiación gamma de 15 ó 25 kGy bajo atmósfera de nitrógeno y se guardaron a 2 - 8 °C.

Grupo III (micropartículas de blanco liofilizadas/no irradiadas). Micropartículas (RG503 o RG505) preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1 se añadieron a 48 mg por vial en un vial de 5 ml junto con 54 mg de D-manitol y 18 mg de sacarosa, y se liofilizaron en una liofilizadora de estantes Virtis como se ha descrito anteriormente. Después de la liofilización, los viales se almacenaron a 2 - 8 °C.

### EJEMPLO 3. EFICIENCIA DE ADSORCIÓN PARA TRES CEPAS DE MEN B

Se añadieron independientemente tres antígenos bacterianos de una vacuna de MenB trivalente (287-953, 961c y 936-741) con agua para inyección a composiciones de micropartículas irradiadas con gamma (grupo II) y no irradiadas (grupo III) en viales preparados como se ha descrito en el Ejemplo 2, para obtener concentraciones de micropartículas de 4 y 40 mg/ml y una dosis de antígeno total por 100 µl de 1 y 10 µg por antígeno, respectivamente. Para 1 µg de dosis de antígeno, se diluyeron 10 veces 10 µg de dosis de antígeno adsorbido en agua. Los viales se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y 2 horas. Los viales del grupo I se reconstituyeron con agua para inyección.

Estas suspensiones de micropartículas con 10 µg de dosis de antígeno se sometieron posteriormente al procedimiento basado en RP-HPLC como se ha descrito en Malyala y col. (J. Pharm. Sci., 97:1155-1164 (2008)) para determinar el % de adsorción para cada antígeno de MenB sobre las micropartículas irradiadas y no irradiadas. Específicamente, se inyectaron 100 µl del sobrenadante sobre una columna C4 4,6 mm x 150 mm (Waters) con un instrumento Waters 2690/432 (Bedford, MA). Se establecieron curvas de calibración lineales en el intervalo de 10-200 µg/ml con proteína Men B, y se calculó la cantidad de proteína presente en el sobrenadante. Entonces se restó la cantidad total de proteína no unida de la cantidad total de proteína añadida inicialmente y la diferencia se usó para calcular la eficiencia de carga real.

La eficiencia de adsorción de proteínas después de la reconstitución de partículas también se midió por SDS-PAGE semi-cuantitativa. Las micropartículas con proteína adsorbida se separaron del medio de adsorción por centrifugación y la cantidad de proteína no unida restante en el sobrenadante se midió por SDS-PAGE. Esencialmente, se cargaron 10 µl del sobrenadante correspondientes al 10 % de sobrenadante total. Se establecieron curvas de calibración lineales en el intervalo de 0,5-10 µg/ml con proteína MenB, y se calculó la cantidad de proteína presente en el sobrenadante. Entonces se restó la cantidad total de proteína no unida de la cantidad total de proteína añadida inicialmente y la diferencia se usó para calcular la eficiencia de carga real ( $R^2$  de toda la curva de regresión estándar fueron superiores a 0,98). Se comparó la eficiencia de adsorción de proteínas sobre partículas irradiadas con y con la adsorción de proteína sobre las partículas no irradiadas.

Se observó que las proteínas 287-953 y 936-741 se adsorbían sobre las micropartículas en el plazo de 30 min a >90 % de eficiencia que era comparable a la adsorción de proteínas después de 30 min con las micropartículas no irradiadas (Tabla 3). La proteína 961c se adsorbió sobre las micropartículas irradiadas en el plazo de 30 min a > 35 %. En comparación, las partículas de PLG de control que se incubaron durante la noche produjeron adsorción de 961 c de > 80 %.

TABLA 3. EFICIENCIA DE PARTÍCULAS DE PLG DE ANTÍGENOS DE PROTEÍNA MENB (% DE ANTÍGENO TOTAL)

| Antígeno                                                                          | Sin tratar                                 |                                            | 15 kGy Irradiación <sup>b</sup> |        | 25 kGy Irradiación <sup>b</sup> |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|
|                                                                                   | RG503                                      | RG505                                      | RG503                           | RG505  | RG503                           | RG505  |
| 287-953                                                                           | 86.5 <sup>a</sup><br>(86.5) <sup>b</sup>   | 96.6 <sup>a</sup><br>(> 97.5) <sup>b</sup> | > 97.5                          | > 97.5 | > 97.5                          | > 96.0 |
| 936-741                                                                           | 88.5 <sup>a</sup><br>(> 97.5) <sup>b</sup> | 92.8 <sup>a</sup><br>(> 97.5) <sup>b</sup> | > 97.5                          | > 97.5 | > 97.5                          | > 97.5 |
| 961c                                                                              | 95.8 <sup>a</sup><br>(86.0) <sup>b</sup>   | 90.1 <sup>a</sup><br>(88.5) <sup>b</sup>   | 42.0                            | 40.0   | 36.0                            | 38.0   |
| <sup>a</sup> Analizado mediante el uso de RP-HPLC en las muestras de sobrenadante |                                            |                                            |                                 |        |                                 |        |
| <sup>b</sup> Estimado por análisis densitométrico de geles SDS-PAGE               |                                            |                                            |                                 |        |                                 |        |

Se evaluaron proteínas adsorbidas para la integridad por SDS-PAGE tras la extracción de micropartículas. En este caso, se extrajeron proteínas de micropartículas de 1 mg, con 100 µl de tampón de muestra SDS, y se cargaron 10 µl - correspondientes al 10 % de la formulación - sobre un gel de poliacrilamida de gradiente 4-12 % de Tris/glicina (Novex, San Diego, CA) para análisis de SDS-PAGE. El gel se tiñó con tinción con azul coloidal (Novex), se destiñó y se barrió. Los antígenos desorbidos de las micropartículas irradiadas y no irradiadas fueron comparables y mantuvieron la estructura del antígeno basándose en los pesos moleculares, sugiriendo que la irradiación gamma de las micropartículas de PLG tiene impacto mínimo sobre la eficiencia de adsorción de antígenos o sobre la integridad de los antígenos cuando los antígenos se adsorben después de la irradiación. Por tanto, los resultados demuestran que la pérdida en el peso molecular de PLG no altera la adsorción de antígenos.

#### EJEMPLO 4. TÍTULOS DE ANTICUERPOS DE ELISA EN RATONES

Antes de la inmunización, se añadieron independientemente tres antígenos bacterianos de una vacuna de MenB trivalente (287-953, 961c y 936-741) con agua para inyección a viales de composiciones de micropartículas (RG503 o RG505) irradiadas con gamma (Grupo II) (15kGy) o 25 kGy) y no irradiadas (Grupo III) preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2, para obtener concentración de micropartículas de 4 mg/ml o 40 mg/ml y concentraciones de antígeno deseadas (dosificaciones de 1 y 10 µg por 100 µl por antígeno, respectivamente). Los viales se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y el contenido se usó posteriormente para las inmunizaciones de animales (ratones CD-1). Los ratones se inmunizaron intramuscularmente con 100 µl de volumen de inyección de cada vial (correspondiente a las dosificaciones de antígeno de 1 ó 10 µg por dosificación de antígeno) en grupos de 10, tres veces, en los días 0, 21 y 35. También se inyectó de esta forma el contenido de los viales del Grupo I del Ejemplo 2 para cada uno de los antígenos 287-953, 961c y 936-741, después de inyectar agua para inyección para obtener concentraciones de micropartículas de 4 y 40 mg/ml a dosis de antígeno total por 100 µl de 1 y 10 µg por antígeno, respectivamente. Se midieron títulos de anticuerpos de ELISA en ratones después de 2 semanas usando el método publicado previamente en Malyala y col. (J. Pharm Sci., 97, 1155-1164 (2008)).

Los resultados se muestran en la Fig. 1 (el primer y cuarto grupos de tres barras se corresponden con los resultados obtenidos con las micropartículas del Grupo I). Los títulos de IgG son estadísticamente similares para micropartículas irradiadas con gamma y no irradiadas. Estos resultados demuestran que la irradiación gamma no tiene un impacto significativo sobre la eficacia de micropartículas de PLG y que la irradiación gamma seguida de adsorción de antígeno puede usarse como estrategia de vacunación viable.

#### EJEMPLO 5. ACTIVIDAD BACTERICIDA DE SUERO MEDIADA POR EL COMPLEMENTO EN RATONES - PRIMER ESTUDIO

En un primer estudio, se evaluó el efecto del tratamiento sobre la inmunogenicidad del polímero de PLG RG503 y se optimizó el periodo de incubación para la adsorción de proteínas (30 min frente a 2 h).

Antes de la inmunización, se añadieron independientemente tres antígenos de MenB bacterianos (es decir, 287-953, 961c y 936-741) con agua para inyección a viales de composiciones de micropartículas (RG503) irradiadas con gamma (Grupo II) (25 kGy) y no irradiadas (Grupo III) preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2, para obtener concentración de micropartículas de 4 mg/ml o 40 mg/ml y concentraciones de antígeno deseadas (1 y 10 µg por dosificaciones de antígeno por 100 µl, respectivamente). Los viales se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y 2 horas y posteriormente se usaron para inmunizaciones de animales (ratones CD-1).

Se inmunizaron intramuscularmente ratones en grupos de 10, tres veces, en los días 0, 21 y 35. Se recogieron muestras de sangre 2 semanas tras la tercera inmunización (día 49), se recogieron los sueros y se midieron los títulos de actividad bactericida en suero (SBA) en los ratones después de 2 semanas para cinco cepas (H44/76, 5/99, M4407, NZ 98/254 y GB364) usando el método publicado previamente por Malyala y col. (J. Pharm Sci., 97:1155-1164 (2008)). El ensayo de SBA mide la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento sobre la superficie de la bacteria y desencadenar la lisis bacteriana (M. Pizza, y col., Science 287: 1816-1820 (2000); R. A. Wall, Ann Med 34: 624-634 (2002), y S. S. Wildes y col., BioDrugs 16: 321-329 (2002). El grado de SBA se ensayó como se ha descrito previamente (M. Pizza, y col., Science 287: 1816-1820 (2000)). Los sueros se analizaron para



títulos de SBA contra un panel de cepas de *N. meningitidis*. El ensayo implica la evaluación de sueros de ratón reunidos en diluciones dobles. Basándose en el diseño de este ensayo, una diferencia de dos veces entre los títulos de SBA se considera insignificativa (por ejemplo, títulos de SBA de 512 y 1024 se consideran equivalentes, ya que son títulos de 1024 y 2048).

Los resultados de estos estudios se presentan en la Tabla 4 que sigue y se designan PLG/DSS(no GI)+MenB-30 min, PLG/DSS (no GI)+MenB-2 h, PLG/DSS(GI)+MenB-30 min, PLG/DSS(GI)+MenB-2 h.

También se inyectó y probó de este modo el contenido de los viales del Grupo I del Ejemplo 2 para cada uno de los antígenos 287-953, 961 y 936-741, después de inyectar agua para inyección para obtener concentraciones de micropartículas de 4 y 40 mg/ml a dosis de antígeno total por 100 µl de volumen de inyección de 1 y 10 µg por antígeno, respectivamente. Los resultados de estos estudios también se presentan en la Tabla 4 que sigue y se designan PLG/DSS/MenB STD.

También se inyectaron y probaron de este modo la combinación de tres antígenos adsorbida sobre hidróxido de aluminio (Alum/MenB). Se mezcló hidróxido de aluminio a 3 mg/ml con 100 µg/ml de cada uno de los tres antígenos, tampón histidina 10 mM y cloruro sódico 150 mM. Se dejó que los antígenos se adsorbieran sobre hidróxido de aluminio a 2 - 8 °C durante la noche. La formulación de Alum/MenB se caracterizó usando SDS-PAGE y los ratones se inmunizaron a 100 µl/ dosis correspondiente a 1 µg y 10 µg de cada antígeno por dosis. Los resultados de estos estudios también se presentan en la Tabla 4 que sigue y se designan Alum/MenB.

Como puede apreciarse de la Tabla 4, títulos bactericidas funcionales para proteínas Men B adsorbidas sobre micropartículas de PLG no irradiadas son similares a aquellos adsorbidos sobre micropartículas de PLG irradiadas con gamma para la mayor dosis de antígeno, pero a la menor dosis se observa alguna reducción en los títulos de BCA para ciertas cepas con irradiación gamma. Los dos periodos de incubación de 30 min y 2 horas produjeron respuestas de inmunogenicidad comparables. Los títulos de SBA para estas formulaciones también fueron comparables a antígenos adsorbidos sobre alumbre. Basándose en estos resultados, se identificaron 30 min como el periodo de incubación óptimo para la adsorción de antígenos de proteína MenB sobre las partículas de PLG.

TABLA 4. RESPUESTA DE INMUNOGENICIDAD *IN VIVO* MEDIDA COMO TÍTULOS DE SBA PARA ANTÍGENOS DE MENB.

| Descripción auxiliar       | Dosis | H44/76 | 5/99 | M4407 | NZ 98/254 | GB364 |
|----------------------------|-------|--------|------|-------|-----------|-------|
| PLG/DSS/MenB STD           | 10 ug | 8192   | 4096 | 1024  | 512       | 1024  |
| PLG/DSS(no-GI)+MenB-30min  | 10 ug | 16384  | 4096 | 1024  | 512       | 2048  |
| PLG/DSS(no-GI)+MenB-2hrs   | 10 ug | 32768  | 2048 | 2048  | 512       | 1024  |
| PLG/DSS(GI)+MenB-30min     | 10 ug | 16384  | 4096 | 2048  | 512       | 2048  |
| PLG/DSS(GI)+MenB-2hs       | 10 ug | 16384  | 1024 | 2048  | 512       | 1024  |
| Alumbre/MenB               | 10 ug | 65536  | 4096 | 2048  | 512       | 2048  |
| PLG/DSS/MenB STD           | 1 ug  | 8192   | 8192 | 256   | 128       | 2048  |
| PLG/DSS(no-GI)+MenB-30 min | 1 ug  | 16384  | 2048 | 1024  | 512       | 512   |
| PLG/DSS(no-GI)+MenB-2hs    | 1 ug  | 8192   | 2048 | 1024  | 512       | 512   |
| PLG/DSS(GI)+MenB-30 min    | 1 ug  | 8192   | 256  | 512   | 128       | 245   |
| PLG/DSS(GI)+MenB-2hs       | 1 ug  | 16384  | 256  | 512   | 256       | 128   |
| Alumbre/MenB               | 1 ug  | 8192   | 1024 | 256   | 128       | 512   |

#### EJEMPLO 6. ACTIVIDAD BACTERICIDA MEDIADA POR EL COMPLEMENTO EN RATONES - SEGUNDO ESTUDIO

En un segundo estudio se comparó RG503 con un polímero de PLG de mayor peso molecular, RG505, usando condiciones identificadas en el primer estudio. Con el fin de entender el efecto del peso molecular de PLG sobre las formulaciones de PLG, los polímeros de PLG RG503 ( $M_w$  35 kDa) y RG505 ( $M_w$  69 kDa) (R. Zange y col., Eur J Pharm Biopharm 44: 149-157 (1997)) se compararon para el efecto de irradiación gamma sobre la inmunogenicidad de formulaciones de PLG/MenB.

Antes de la inmunización, tres antígenos de MenB bacterianos (es decir, 287-953, 961c y 936-741) se añadieron independientemente con agua para inyección a viales de composiciones de micropartículas irradiadas con gamma (Grupo II) preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2, para obtener concentración de micropartículas de 4 mg/ml o 40 mg/ml y concentraciones de antígeno deseadas (1 y 10 µg por dosificaciones de antígeno por 100 µl, respectivamente). Los viales se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se usaron para inmunizaciones de animales (ratones CD-1). Cada animal se inmunizó con 100 µl de volumen de cada vial (correspondiente a dosificaciones de antígeno de 1 ó 10 µg por dosificación de antígeno) intramuscularmente dos veces a un intervalo de 4 semanas.

Se midieron los títulos de actividad bactericida en suero (SBA) en los ratones después de 2 semanas para cinco

cepas (H44/76, 5/99, M4407, NZ 98/254 y GB364) usando el método publicado previamente en Malyala y col. (J. Pharm Sci., 97:1155-1164 (2008)). Los resultados de estos estudios se presentan en la Tabla 5 que sigue y se designan PLG 15kGy GI 30 min y PLG 25kGy GI 30 min.

También se inyectó y probó de este modo el contenido de los viales del Grupo I del Ejemplo 2 para cada uno de los antígenos 287-953, 961c y 936-741, después de inyectar agua para inyección para obtener concentraciones de micropartículas de 4 y 40 mg/ml a dosis de antígeno total por 100 µl de volumen de inyección de 1 y 10 µg por antígeno, respectivamente. Los resultados de estos estudios también se presentan en la Tabla 3 que sigue y se designan PLG no GI durante la noche.

Como puede apreciarse de la Tabla 5, los títulos de SBA son comparables para los dos polímeros de PLG. Mientras que la adsorción de proteína 961c sobre las partículas irradiadas fue inferior a las partículas de control, los títulos de SBA contra las cepas de *N. meningitidis* (5/99 y GB364) correspondientes fueron equivalentes entre las partículas tratadas y sin tratar. Similar al primer estudio, la irradiación gamma no tuvo un efecto sobre la inmunogenicidad de los antígenos MenB administrados con micropartículas de PLG tratadas frente a de control.

TABLA 5. RESPUESTA DE INMUNOGENICIDAD *IN VIVO* MEDIDA COMO TÍTULOS DE SBA PARA ANTÍGENOS DE MENB.

| Vacuna                     | PLG   | Dosis | H44/76 | 5/99   | M4407 | NZ 98/254 | GB364 |
|----------------------------|-------|-------|--------|--------|-------|-----------|-------|
| PLG no-GI durante la noche | RG503 | 1 ug  | 32768  | 512    | 512   | 256       | 512   |
| PLG 15kGy GI 30min         | RG503 | 1 ug  | ≥32768 | 512    | 512   | 256       | 512   |
| PLG 25kGy GI 30min         | RG503 | 1 ug  | ≥32768 | 2048   | 512   | 256       | 256   |
|                            |       |       |        |        |       |           |       |
| PLG no-GI durante la noche | RG505 | 1 ug  | 8192   | 2048   | 512   | 256       | 1024  |
| PLG 15kGy GI 30min         | RG505 | 1 ug  | >32768 | 2048   | 4096  | 4096      | 1024  |
| PLG 25kGy GI 30min         | RG505 | 1 ug  | 16384  | 1024   | 512   | 256       | 512   |
|                            |       |       |        |        |       |           |       |
| PLG no-GI durante la noche | RG503 | 10 ug | 16384  | 4096   | 2048  | 512       | 2048  |
| PLG 15kGv GI 30min         | RG503 | 10 ug | >32768 | 8192   | 1024  | 512       | 512   |
| PLG 25kGv GI 30min         | RG503 | 10 ug | >32768 | 16384  | 2048  | 512       | 1024  |
|                            |       |       |        |        |       |           |       |
| PLG no-GI durante la noche | RG505 | 10 ug | 8192   | 4096   | 1024  | 512       | 1024  |
| PLG 15kGy GI 30min         | RG505 | 10 ug | >32768 | 8192   | 1024  | 512       | 4096  |
| PLG 25kGv GI 30min         | RG505 | 10 ug | >32768 | ≥65536 | 512   | 512       | 4096  |
|                            |       |       |        |        |       |           |       |
| Alumbre/MenB               | ---   | 20 ug | >32768 | 4096   | 256   | 128       | 512   |

Así, los presentes inventores han desarrollado un enfoque de dos etapas en el que las micropartículas de hPLG se sintetizan, liofilizan e irradian con gamma en una primera etapa. En una segunda etapa que se produce antes de la inmunización, las partículas se reconstituyen e incuban con antígenos estériles para permitir la adsorción superficial de proteínas sobre las micropartículas.

Los estudios precedentes demuestran una estrategia escalable para la esterilización terminal de las formulaciones basadas de PLG para su uso como vacunas. Las partículas de PLG pueden liofilizarse a granel y esterilizarse a granel para su uso en una vacuna comercial. Esta estrategia para la esterilización de formulaciones de vacuna puede vencer la necesidad de fabricación aséptica, reduciendo así el coste de desarrollo y aumentando la facilidad de fabricación. Además, la adsorción de antígenos antes de la inmunización permite usar partículas de PLG esterilizadas para antígenos de múltiples vacunas. Esta estrategia es, en particular, de gran valor para los países desarrollados y para epidemias en las que los sistemas de administración tales como micropartículas de PLG pueden ser almacenadas y mantenerse a granel. Además, pueden usarse partículas irradiadas con una variedad de antígenos, aumentando así la versatilidad de las formulaciones de PLG.

#### EJEMPLO 7. PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS (CON Y SIN COMPUESTO 47)

El compuesto 47 se prepara como se ha descrito en el Ejemplo 44 del documento WO 2010/144734. Las micropartículas se preparan usando una técnica de emulsión única de aceite en agua (o/w). Brevemente, se añaden 4 ml de disolución al 15 % en peso/volumen de PLG RG503 (disponible de Boehringer Ingelheim) con 6 mg del compuesto 47, para 1 % de carga con respecto a PLG, en diclorometano a 33 ml de agua que contienen 6 mg de sulfosuccinato de dioctilo (ajustado a pH 7,2). La mezcla se homogeneiza durante un minuto a 24.000 rpm usando el homogeneizador Ultra Turrex T-25 de IKA seguido de homogenización durante seis minutos a 12.900 rpm usando el homogeneizador Omni Macro. La emulsión se agita durante 3-4 horas a 150 rpm en una campana extractora química ventilada para evaporar el diclorometano. Se sintetizan micropartículas sin el compuesto 47 como se ha descrito anteriormente, excepto que no se añade el compuesto 47 durante la síntesis de micropartículas. Todas las suspensiones de micropartículas se filtran usando un filtro de 53 micrómetros.

El tamaño de partícula de las micropartículas dentro de cada suspensión resultante se mide usando un medidor del tamaño de partículas Horiba LA-930. En esta etapa (antes de la liofilización) se desean formulaciones de micropartículas con un tamaño medio diana de 0,5-5 µm.

5 Para determinar el contenido de PLG, se añade 1 ml de la suspensión de micropartículas a viales de centello previamente pesados y los viales se liofilizan usando la liofilizadora de mesa Labconco. El contenido de PLG se calcula como la diferencia entre los viales liofilizados y vacíos. La recuperación de PLG para todas las formulaciones de PLG tiene como objetivo >70 %.

10 El compuesto 47 se analiza por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) usando un sistema de Water Acquity usando la columna C18 XTerra (Waters Corporation) y un gradiente del 90 % de agua + 0,1 % de TFA/10 % de acetonitrilo + 0,1 % de TFA al 100 % de acetonitrilo + 0,1 % de TFA en seis minutos.

15 Para determinar la concentración del compuesto 47, se mezclan 100 µl de la suspensión de partículas descrita anteriormente con 900 µl de DMSO y se analizan por RP-HPLC. La recuperación del compuesto 47 se determina basándose en la concentración del compuesto 47 en la suspensión de partículas con un objetivo de >75 %.

20 Para determinar la eficiencia de encapsulación, se diluyen 100 µl de la suspensión de micropartículas descrita anteriormente a 1 ml con HCl 10 mM y se balancea durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga la suspensión de partículas resultante. A continuación, el sedimento se disuelve en 1 ml de DMSO y se analiza en un sistema de RP-UPLC para determinar la cantidad de compuesto 47 encapsulado. El sobrenadante también se analiza en el sistema de RP-UPLC para determinar la cantidad de compuesto 47 no encapsulado. La cantidad de compuesto 47 encapsulado en micropartículas tiene como objetivo > 90 %.

## 25 **EJEMPLO 8. PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES DE MICROPARTÍCULAS DE CONTROL CON ANTÍGENO ADSORBIDO (CON Y SIN COMPUESTO 47)**

30 Se adsorbe antígeno de MenB 287-953 sobre las partículas a 2-8 °C durante la noche con tampón histidina 10 mM, pH 5,5, a una concentración final de antígeno de 100 µg/ml (que por último lugar se corresponde con 10 µg de antígeno por dosis). La adsorción del antígeno de MenB se realiza en las siguientes composiciones de micropartículas:

35 Adsorción 1: Se proporcionan micropartículas del compuesto 47 encapsulado con 1 % de carga del compuesto 47 con respecto a PLG en una cantidad que suministra 250 µg/ml del compuesto 47 para las partículas.

Adsorción 2: Se proporcionan micropartículas sin compuesto 47 encapsulado en una cantidad que da un contenido de PLG igual al suministrado en Adsorción 1.

40 La adsorción del antígeno de MenB sobre las micropartículas se caracteriza por SDS-PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie, y por el sistema Experion (Bio-Rad). Véase Malyala y col., J. Pharm. Sci. 97:1155-1164 (2008).

Entonces se forman formulaciones liofilizadas en viales de borosilicato vidrio de 6 ml del siguiente modo:

45 Vial 1: La suspensión de micropartículas formada en Adsorción 1 se añade a un vial en una cantidad correspondiente a 350 µg del compuesto 47 (14 dosis de 25 µg del compuesto 47), junto con 63 mg de manitol, 21 mg de sacarosa y 5 % en peso/peso de PVA con respecto a PLG, y se liofiliza (usando una liofilizadora de estantes Virtis).

50 Vial 2: Para una co-formulación liofilizada, la suspensión de micropartículas formada en Adsorción 2 (PLG sin compuesto 47 encapsulado) se añade a un vial en una cantidad igual al mismo contenido de PLG que en Vial 1, junto con la suspensión del compuesto 47 en una cantidad correspondiente a 350 µg del compuesto 47, 63 mg de manitol, 21 mg de sacarosa y 5 % en peso/peso de PVA con respecto a PLG, y el contenido se liofiliza. La suspensión del compuesto 47 se prepara como se describe en la solicitud de patente internacional nº PCT/US2010/060621, presentada el 15 de diciembre de 2010.

55 Vial 3: Para una formulación de control, la suspensión de micropartículas formada en Adsorción 2 (PLG sin compuesto 47 encapsulado) se añade a un vial en una cantidad igual al mismo contenido de PLG que en Vial 1, junto con 63 mg de manitol y 21 mg de sacarosa y 5 % en peso/peso de PVA con respecto a PLG, y el contenido se liofiliza.

60 El contenido de humedad se determina usando el método de valoración de Karl-Fischer y se mide con un objetivo de <5 % para todas las formulaciones liofilizadas.

65 Se usa el sistema Endosafe PTS (Charles River Labs) para determinar el contenido de endotoxinas en las formulaciones liofilizadas con un objetivo de <1 UE/dosis.

**EJEMPLO 9. PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES DE MICROPARTÍCULAS IRRADIADAS CON ANTÍGENO ADSORBIDO (CON Y SIN COMPUESTO 47)**

Se preparan micropartículas como se ha descrito en el Ejemplo 7. Las formulaciones se forman en viales de vidrio de borosilicato de 6 ml del siguiente modo:

Vial 4: Se añaden micropartículas del compuesto 47 encapsulado con 1 % de carga del compuesto 47 con respecto a PLG a un vial en una cantidad correspondiente a 350 µg del compuesto 47 (14 dosis de 25 µg del compuesto 47), junto con 63 mg de manitol, 21 mg de sacarosa y 5 % en peso/peso de PVA con respecto a PLG, y se liofilizan (usando una liofilizadora de estantes Virtis).

Vial 5: Micropartículas sin compuesto 47 encapsulado se añaden a un vial en una cantidad igual al mismo contenido de PLG que en Vial 4, junto con la suspensión del compuesto 47 en una cantidad correspondientes a 350 µg del compuesto 47, 63 mg de manitol, 21 mg de sacarosa y 5 % en peso/peso de PVA con respecto a PLG, y se liofilizan (usando una liofilizadora de estantes Virtis). La suspensión del compuesto 47 se prepara como se ha descrito en la solicitud de patente internacional nº PCT/US2010/060621, presentada el 15 de diciembre de 2010.

Vial 6: Se añaden micropartículas sin compuesto 47 encapsulado a un vial en una cantidad igual al mismo contenido de PLG que en Vial 4, junto con 63 mg de manitol, 21 mg de sacarosa y 5 % en peso/peso de PVA con respecto a PLG, y se liofilizan (usando una liofilizadora de estantes Virtis).

Después de la liofilización, se purgan los viales 4-6 con nitrógeno y se tratan con irradiación gamma de 25 kGy y se guardan a 2 - 8 °C. Se añade antígeno de MenB 287-953 con agua para inyección a una concentración final de antígeno de 100 µg/ml (que por último lugar se corresponde con 10 µg de antígeno por dosis) a cada uno de los viales de composiciones de micropartículas irradiadas con gamma. Los viales se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la adsorción de proteínas.

Las suspensiones de micropartículas con dosis de 10 µg de antígeno se someten posteriormente al procedimiento basado en RP-HPLC como se ha descrito en Malyala y col. (J. Pharm. Sci., 97:1155-1164 (2008)) para determinar el % de adsorción para el antígeno de MenB sobre las composiciones de micropartículas irradiadas. Específicamente, se inyectan 100 µl del sobrenadante sobre una columna C4 4,6 mm x 150mm (Waters) con un instrumento Waters 2690/432 (Bedford, MA). Se establecen curvas de calibración lineal en el intervalo de 10-200 µg/ml con proteína de Men B, y se calcula la cantidad de proteína presente en el sobrenadante. Entonces se resta la cantidad total de proteína no unida de la cantidad total de proteína añadida inicialmente y se usa la diferencia para calcular la eficiencia de carga real.

La eficiencia de adsorción de proteínas después de la reconstitución de partículas también se mide por SDS-PAGE semi-cuantitativa. Las micropartículas con proteína adsorbida se separan del medio de adsorción por centrifugación y la cantidad de proteína no unida restante en el sobrenadante se mide por SDS-PAGE. Esencialmente, se cargan 10 µl del sobrenadante correspondiente al 10 % de sobrenadante total. Se establecen curvas de calibración lineal en el intervalo de 0,5-10 µg/ml con proteína de MenB, y se calcula la cantidad de proteína presente en el sobrenadante. Entonces se resta la cantidad total de proteína no unida de la cantidad total de proteína añadida inicialmente y la diferencia se usa para calcular la eficiencia de carga real ( $R^2$  de toda la curva de regresión estándar fueron superiores a 0,98). La eficiencia de la adsorción de proteínas sobre partículas irradiadas con  $\gamma$  se compara con la adsorción de proteínas sobre las partículas no irradiadas.

**EJEMPLO 10. ESTUDIO DE RATÓN *IN VIVO* - ENSAYO BACTERICIDA**

Las formulaciones de micropartículas descritas en los Ejemplos 8 y 9 se reconstituyen en 1,4 ml de agua para inyección con mezcla suave antes de las inmunizaciones. Los viales 1-3 están listos para uso, mientras que los viales 4-6 se incuban con antígeno de proteína durante 30 minutos, como se ha descrito en el Ejemplo 9, antes de uso (reconstitución). Se inyectan 100 µl de cada formulación por ratón, correspondiente a 10 µg de antígeno de MenB y en el caso de formulaciones que contienen el compuesto 47, 25 µg de adyuvante. Cada ratón se inmuniza intramuscularmente (50 µl en dos sitios) en los días 0 y 21. En algunos casos, los ratones también pueden inmunizarse en el día 35. Cada ratón se sangra dos semanas después de la inmunización final.

Para ratones inyectados con antígeno de MenB, los sueros reunidos se analizan para el ensayo bactericida contra la cepa NZ98 de MenB dos semanas después de la inmunización final.

Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solo y que pueden hacerse modificaciones.

## Reivindicaciones

### 1. Un kit que comprende

- 5 (a) un primer envase sellado y una composición de micropartículas seca estéril contenida dentro de dicho primer envase sellado, comprendiendo dicha composición de micropartículas micropartículas biodegradables de blanco que comprenden un polímero biodegradable, en el que dicho primer envase sellado está configurado para permitir la introducción y eliminación de fluido estéril; y
- 10 (b) un segundo envase sellado que está configurado para permitir la introducción y eliminación de fluido estéril, conteniendo dicho segundo envase sellado una composición antigénica estéril que comprende un antígeno.
2. El kit de la reivindicación 1, en el que dicho primer envase sellado comprende un tabique.
3. El kit de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha composición de micropartículas se irradia con gamma.
- 15 4. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas micropartículas biodegradables comprenden poli(lactida-co-glicolida).
5. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que tras la adición de agua a dicho primer recipiente en una cantidad de forma que la composición de micropartículas tenga una concentración de 25 mg/ml, se forma una suspensión en la que las micropartículas tienen un valor de D(v,0,5) que está entre 0,5 y 5  $\mu$ m.
- 20 6. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha composición de micropartículas es una composición de micropartículas liofilizada, opcionalmente en el que dicha composición de micropartículas liofilizada comprende además un agente crioprotector.
- 25 7. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho primer recipiente es un recipiente de dosis única que comprende entre 4 y 50 mg de dichas micropartículas, y 5 y 150 mg de uno o más excipientes farmacéuticos.
- 30 8. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha composición de micropartículas comprende micropartículas cargadas.
9. El kit de la reivindicación 8, en el que dichas micropartículas cargadas comprenden una especie cargada, además de dicho polímero biodegradable, opcionalmente en el que la especie cargada está seleccionada de un detergente aniónico y un detergente catiónico.
- 35 10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que tras la adición de agua a dicho primer recipiente en una cantidad tal que la composición de micropartículas esté en una concentración de 25 mg/ml, se forma una suspensión en la que las micropartículas tienen un potencial zeta que es superior a + 20 mV o inferior a - 20 mV a pH fisiológico.
- 40 11. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha composición de micropartículas comprende además un adyuvante inmunológico.
- 45 12. El kit de la reivindicación 11, en el que dicho adyuvante inmunológico está seleccionado de análogos de monofosforil lípido A, potenciadores inmunitarios de molécula pequeña, muramil tripéptido fosfatidiletanolamina y tocoferoles.
- 50 13. El kit de la reivindicación 11, en el que dicho adyuvante inmunológico es un activador de un receptor similar a Toll (TLR), opcionalmente en el que dicho TLR está seleccionado de receptor similar a Toll 2 (TLR 2), receptor similar a Toll 7 (TLR 7), receptor similar a Toll 8 (TLR8), o una combinación de los mismos.
- 55 14. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dicha composición antigénica es un composición liofilizada.
15. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que dicha composición antigénica comprende un antígeno seleccionado de un antígeno que contiene péptido y un antígeno que contiene polinucleótido.
- 60 16. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además un líquido acuoso estéril, una jeringa, o ambos.
17. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la composición antigénica estéril es un fluido acuoso; en el que dicha composición de micropartículas se combina y mezcla con dicho fluido acuoso; y en el que la combinación se administra a un sujeto vertebrado en el plazo de 30 minutos desde la mezcla.
- 65

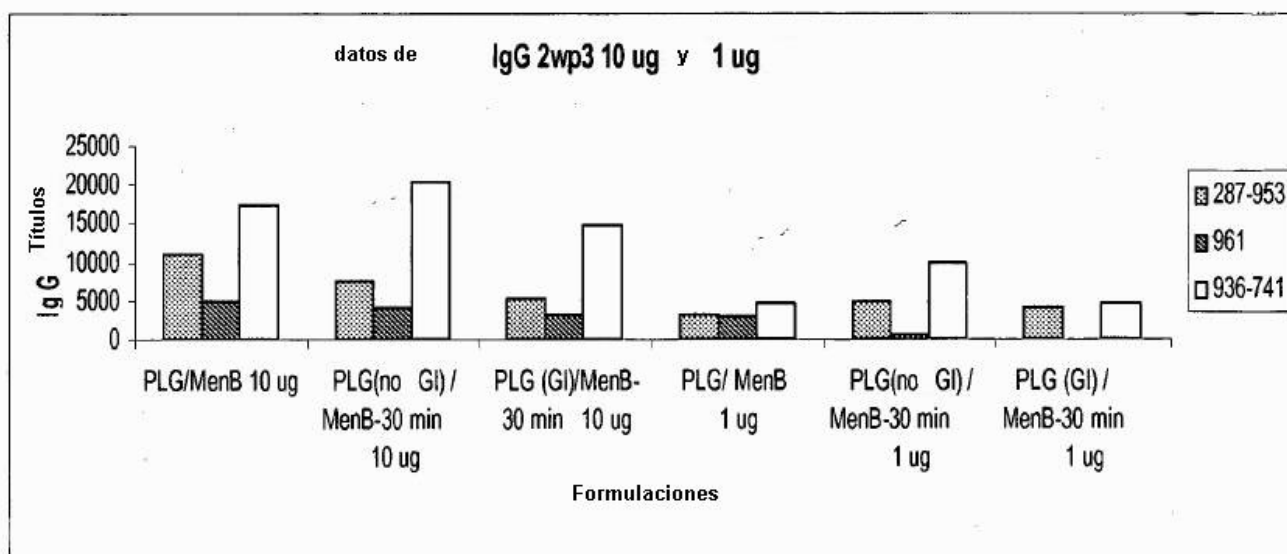


Fig. 1