

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 241**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2006 E 06851781 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 1954252**

54 Título: **Nanopartículas para su uso en composiciones inmunogénicas**

30 Prioridad:

02.12.2005 US 741860 P
21.02.2006 US 775265 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2016

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

WENDORF, JANET R.;
SINGH, MANMOHAN y
O'HAGAN, DEREK T.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 564 241 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas para su uso en composiciones inmunogénicas

Antecedentes

- 5 Se han usado vehículos en partículas con antígenos adsorbidos o inmovilizados en intentos de inducir respuestas inmunitarias adecuadas. Dichos vehículos presentan múltiples copias de un antígeno seleccionado al sistema inmunitario y se cree que promueven la inmovilización y retención de antígenos en ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden fagocitarse por macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígenos mediante liberación de citocinas.
- 10 Por ejemplo, la Publicación Internacional del mismo solicitante n.º WO 98/33487 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos relacionada n.º 2003/0049298 describen el uso de micropartículas con antígeno adsorbido y con antígeno encapsulado para estimular respuestas inmunológicas, incluyendo respuestas inmunológicas mediadas por células, así como procedimientos para preparar las micropartículas. Los polímeros usados para formar las micropartículas incluyen poli(lactida) y poli(lactida-co-glicólido) (PLG).
- 15 La Publicación Internacional del mismo solicitante n.º WO 00/06123 y WO 01/36599 y la Patente de Estados Unidos n.º 6.884.435 desvelan procedimientos para preparar micropartículas que tienen macromoléculas adsorbidas, incluyendo polinucleótidos y antígenos polipeptídicos. Las micropartículas comprenden, por ejemplo, un polímero tal como poli(alfa-hidroxiácido) (por ejemplo, PLG, un ácido polihidroxi butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y similares) y se forman usando, por ejemplo, detergentes catiónicos, aniónicos o no iónicos. Pueden usarse micropartículas que contienen detergentes aniónicos, tales como micropartículas de PLG que
- 20 contienen dodecil sulfato sódico (SDS), con macromoléculas con carga positiva, tales como polipéptidos. Pueden usarse micropartículas que contienen detergentes catiónicos, tales como micropartículas de PLG con CTAB (también conocido como cetrimida o bromuro de cetil trimetil amonio), con macromoléculas con carga negativa, tales como ADN. También se desvela el uso de dichas micropartículas para estimular respuestas inmunológicas, incluyendo respuestas inmunológicas mediadas por células.
- 25 El documento WO96/20698 desvela una forma de dosificación de liberación sostenida que comprende: nanopartículas que comprenden un núcleo polimérico biocompatible, biodegradable, que tiene un diámetro promedio de menos de aproximadamente 300 nm; teniendo las nanopartículas asociado o incorporado con las mismas al menos un agente bioactivo y/o al menos un agente modificador de superficie.
- 30 El documento WO 2004/060396 desvela nanopartículas incluyendo partículas de PLG que comprende DSS, y un excipiente de manitol:sacarosa.
- S.-Y Kim y col: "Oral immunization with helicobacter pylori-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles". *Helicobacter*, vol.4, n.º 1, 1999, páginas 33-39, XP002977235 desvela nanopartículas de PLG que contienen lisados de *H. pylori* preparados usando técnica de evaporación de disolvente/emulsión de agua en aceite-agua con alcohol polivinílico (PVA) como un estabilizante.
- 35 Z. Cui y col: "physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles". *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 29, n.º 6, 2003, páginas 689-700, XP008090137 desvela nanopartículas reconstituídas después de liofilización con diferentes concentraciones de crioprotector (sacarosa o lactosa).
- 40 J. Samuel y col: "Polymeric nanoparticles for targeted delivery of therapeutic vaccines to dendritic cells". *Proceedings of the international conference on mems, nano and smart systems*, 2003, XP010650296 desvela una formulación de nanopartículas de PLGA de BLP25 que indujo respuestas de linfocitos T potentes y efectos antineoplásicos en un modelo de cáncer de pulmón de ratón, indicando de este modo que las nanopartículas de PLGA que imitan ciertas características de los patógenos son sistemas de suministro eficaces para dirigir vacunas terapéuticas a CD y activación de respuestas de linfocitos T potentes.
- 45 M. Auvillain y col: "Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques". *S.T.P Pharma*, vol. 5, n.º 11, 1989, páginas 738-744, XP008090138 desvela que la conservación de vectores coloidales submicrométricos, nanopartículas y nanocápsulas habitualmente requiere desecación. La liofilización sigue siendo, sin embargo, el procedimiento ideal.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición de nanopartículas liofilizada esterilizada por filtración que comprende

- 50 (a) un polímero biodegradable seleccionado de un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxi-butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido, un policianoacrilato y combinaciones de los mismos,
- (b) un tensioactivo que es poli(alcohol vinílico),
- (c) un agente crioprotector que comprende una combinación de un alditol y un sacárido y

(d) un antígeno polipeptídico

en la que las nanopartículas dentro de la composición tienen un tamaño de partícula promedio Z de menos de 250 nm, menos de 200 nm o menos de 150 nm.

5 Dichas composiciones son útiles, por ejemplo, porque son inmunogénicas y porque forman fácilmente suspensiones de nanopartículas. Por ejemplo, tras mezclar composiciones de nanopartículas liofilizadas de la presente invención con agua destilada en una concentración de 0,005 g/ml (intervalo de 5-10 mg/ml), puede formarse espontáneamente una suspensión de nanopartículas inmunogénicas en la que el promedio de Z o valor de $D(v, 0,5)$ de dichas nanopartículas suspendidas es de menos de 250 nm, por ejemplo variando de 250 nm a 200 nm a 150 nm a 100 nm o menos.

10 Los antígenos pueden adsorberse, por ejemplo, en la superficie de las nanopartículas, inmovilizarse dentro de las nanopartículas o ambos. Los antígenos pueden derivar, por ejemplo, de células tumorales y de organismos patógenos tales como virus, bacterias, hongos y parásitos.

La invención también proporciona la composición de la invención, para su uso en

- 15 (i) un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria en un hospedador vertebrado, que comprende: combinar la composición con un líquido acuoso para formar una suspensión; y administrar la suspensión al hospedador en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria, o
- (ii) un procedimiento para inmunizar un hospedador vertebrado contra un tumor o un organismo patógeno, que comprende: combinar la composición con un líquido acuoso para formar una suspensión; y administrar la suspensión al hospedador en una cantidad eficaz para inducir una respuesta protectora, o
- 20 (iii) procedimiento para tratar un tumor o una infección por organismo patógeno en un huésped vertebrado, que comprende: combinar la composición con un líquido acuoso para formar una suspensión; y administrar la suspensión al huésped en una cantidad eficaz para inducir una respuesta de tratamiento.

25 En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden comprender componentes complementarios, tales como adyuvantes inmunológicos, que pueden, por ejemplo, adsorberse en la superficie de las nanopartículas, inmovilizarse dentro de las nanopartículas, o ambos. Los ejemplos de adyuvantes inmunológicos complementarios incluyen oligonucleótidos CpG, ARN bicatenario, toxinas termolábiles de *E. coli*, alumbre, compuestos de fosfatos de liposacáridos y miméticos de fosfatos de liposacáridos, entre otros.

30 Cuando se empleen dos antígenos, dos adyuvantes inmunológicos, o un antígeno y un adyuvante inmunológico, pueden, por ejemplo, (a) adsorberse en la misma población de nanopartículas, (b) adsorberse cada uno en poblaciones separadas de nanopartículas, (c) adsorberse uno en nanopartículas y el otro en solución, (d) adsorberse uno en nanopartículas y el otro inmovilizarse dentro de la misma población de nanopartículas, (e) adsorberse uno en una primera población de nanopartículas e inmovilizarse el otro dentro de una segunda población de nanopartículas, y así sucesivamente.

35 En otros aspectos, la presente invención proporciona procedimientos para producir composiciones de nanopartículas tales como las anteriores que comprenden: (a) combinar (i) un primer líquido que comprende dicho polímero biodegradable disuelto en un disolvente orgánico con (ii) un segundo líquido que comprende agua, tras lo cual se forma una suspensión de nanopartículas que comprenden dichos polímero biodegradable, (b) adsorber dicho antígeno en dichas nanopartículas para formar una suspensión de nanopartículas con antígeno adsorbido y (c) liofilizar dicha suspensión de nanopartículas con antígeno adsorbido.

40 También se desvelan procedimientos para suministrar las composiciones de nanopartículas a un animal huésped (por ejemplo, para fines terapéuticos, profilácticos o diagnósticos). El animal huésped es preferentemente un animal vertebrado, o más preferentemente un mamífero, y aún más preferentemente un ser humano. Puede realizarse suministro de las composiciones de nanopartículas de la invención por cualquier procedimiento conocido.

45 En aspectos adicionales, la presente invención proporciona kits que comprenden un primer recipiente que comprende la composición de nanopartículas liofilizadas de la invención, y opcionalmente que comprende además un segundo recipiente que comprende un medio líquido estéril útil para resuspender la composición de nanopartículas liofilizada en el primer recipiente.

50 En comparación con tecnologías basadas en micropartículas, tales como las descritas anteriormente en los antecedentes de la invención, las ventajas de la presente invención incluyen facilidad de preparación (por ejemplo, no es necesaria homogeneización de alto corte y porque las nanopartículas pueden esterilizarse por filtración, no es necesario que el proceso de preparación de nanopartículas sea estrictamente aséptico), y la capacidad de adsorber mayores niveles de antígenos y otras especies en la superficie de las nanopartículas, entre otras ventajas.

Estos y otros aspectos, realizaciones y ventajas de la presente invención resultarán más fácilmente evidentes para los expertos en la materia a la vista de la divulgación del presente documento.

55

La materia objeto que no está abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención reivindicada.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIGURA 1 representa gráficos de carga de BSA en micropartículas de PLG y nanopartículas a pH=5 y a pH=7.
La FIGURA 2 representa gráficos de carga de Me[eta]B 287 en micropartículas de PLG y nanopartículas a pH=5.

Descripción detallada de la invención

- 10 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de química, química polimérica, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª 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. HV, 5ª 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, 1997) y Seymour/Carraher's Polymer Chemistry, 5ª ed. (Marcel Dekker Inc., 2000).

Como se usa en la presente memoria descriptiva y cualquier reivindicación adjunta, las formas singulares "un" y "el" incluyen referencias plurales a no ser que el contenido claramente dicte otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, el término "nanopartícula" se refiere a una o más nanopartículas.

- 20 A no ser que se indique de otro modo o a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa, todos los porcentajes y las reacciones en el presente documento se proporcionan en peso.

A. DEFINICIONES

Al describir la presente divulgación, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

- 25 El término "nanopartícula" como se usan en el presente documento, se refiere a una partícula de menos de 1.000 nm de diámetro. Las nanopartículas dentro de las composiciones de la presente invención típicamente tienen una distribución de tamaños en la que el promedio de Z y/o el valor de $D(v,0,5)$ es menor de 250 nm, y más típicamente menor de 150 nm y en el que el promedio de Z y/o $D(v,0,9)$ es menor de 350 nm, y más típicamente menor de 200 nm.
- 30 El tamaño de las partículas puede determinarse (medirse) usando procedimientos disponibles en la técnica. Por ejemplo, el tamaño de las partículas puede determinarse usando espectroscopia de correlación fotónica, dispersión de luz dinámica o dispersión de luz cuasi elástica. Estos procedimientos se basan en la correlación del tamaño de las partículas 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 del disolvente que rodean a las partículas. Cuando mayor sea la partícula, más lento será el movimiento Browniano. La velocidad se define por el coeficiente de difusión de traslación (D). El valor medido se refiere a cómo se mueve una partícula dentro de un líquido (diámetro hidrodinámico). El diámetro que se obtiene es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión de traslación que la partícula.

- 40 El tamaño de partícula también puede determinarse usando dispersión de la luz estática, que mide la intensidad de la luz dispersada por partículas en una solución en un momento individual. La dispersión de 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 luz a un ángulo que es inversamente proporcional a su tamaño. Las partículas grandes generan un patrón de difracción a ángulos de dispersión bajos con alta intensidad, mientras que las partículas pequeñas dan lugar a señales de intensidad baja y ángulo amplio.
- 45 Pueden calcularse distribuciones de tamaño de partículas si la intensidad de la luz dispersada a partir de una muestra se mide en función del ángulo. La información angular se compara con un modelo de dispersión (por ejemplo, teoría de Mie) para calcular la distribución de tamaños.

- 50 En general, el tamaño de las partículas 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 producir un valor promedio para el diámetro de la partícula.

Para espectroscopia de correlación de fotones, el promedio Z (también denominada la media acumulativa o el diámetro hidrodinámico) se calcula típicamente a partir de análisis acumulativos (monomodales).

Para mediciones de dispersión de la luz estática (y también para espectroscopia de correlación de fotones en algunas realizaciones), pueden medirse parámetros de tamaños basados en 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 en el que el 50 % de las partículas (en volumen) en la composición, como se mide, tienen un tamaño que es menor que el valor $D(v,0,5)$, y el 50 % de las partículas en la composición tienen un tamaño que es mayor que el valor de $D(v,0,5)$. De forma similar, el $D(v,0,9)$ es un parámetro de tamaño cuyo valor se define como el punto en el que el 90 % (en volumen) de las partículas en la composición tienen un tamaño que es menor que el valor $D(v,0,9)$, y el 10 % de las partículas en la composición tienen un tamaño que es mayor que el valor de $D(v,0,9)$.

Como se define en el presente documento, una “suspensión de nanopartículas” es una fase líquida que contiene nanopartículas. Una “solución acuosa” es una solución que contiene agua, típicamente una solución que contiene más de 50 % en peso de agua, por ejemplo, de 50 a 75 a 90 a 95 % en peso o más agua. Una “suspensión de nanopartículas acuosas” es una fase líquida que contiene agua que contiene nanopartículas. Las suspensiones de nanopartículas acuosas de acuerdo con la invención típicamente contienen más del 50 % en peso de agua, por ejemplo del 50 al 75 al 90 al 95 % en peso o más de agua.

Las nanopartículas para su uso en el presente documento se forman típicamente a partir de polímeros que son esterilizables, sustancialmente no tóxicos y biodegradables. Dichos materiales incluyen poli(α -hidroxiácidos), ácidos polihidroxibutíricos, policaprolactonas, poliortoésteres, polianhídridos y policianoacrilatos (por ejemplo, polialquilcianoacrilato o “PACA”). Más típicamente, las nanopartículas para su uso con la presente invención son nanopartículas poliméricas derivadas de poli(α -hidroxiácidos), por ejemplo, de una poli(lactida) (“PLA”) tal como poli(D,L-lactida), un copolímero de lactida y glicólico, tal como un poli(D,L-lactida-co-glicólico) (“PLG”), o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Las nanopartículas poliméricas pueden derivar de cualquiera de diversos materiales de partida poliméricos que tienen una diversidad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros, tales como PLG, una diversidad de relaciones de monómero (por ejemplo, lactida:glicólico), cuya selección será principalmente opcional, dependiendo en parte de la especie coadministrada. Estos parámetros se analizan adicionalmente posteriormente.

El término “tensioactivo” viene de la expresión “agente activo en superficie”. Los tensioactivos se acumulan en interfaces (por ejemplo, en interfaces líquido-líquido, líquido-sólido y/o líquido-gas) y cambian las propiedades de esa interfaz. Como se usa en el presente documento, los tensioactivos incluyen detergentes, agentes de dispersión, agentes de suspensión, estabilizadores de emulsión.

Como se define en el presente documento, los “carbohidratos” incluyen monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, así como 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 reemplazo 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 polihídrico, es decir, un alcohol que comprende además un grupo aldehído (en cuyo caso el monosacárido es una aldosa) o un grupo ceto (en cuyo caso el monosacárido es una cetosa). Los monosacáridos típicamente contienen de 3 a 10 carbonos. Además, los monosacáridos tienen habitualmente la fórmula empírica $(CH_2O)_n$ en la que n es un número entero de tres o más, típicamente 3-10. Los ejemplos de aldosas de 3-6 carbonos incluyen gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, 2-desoxirribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, astrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa. Los ejemplos de cetosas de 3-6 carbonos incluyen dihidroxiacetona, eritrolosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa y tagatosa. Se encuentran normalmente monosacáridos de origen natural en la forma de isómero D, a diferencia de la forma L.

Un “oligosacárido” se refiere a un polímero monosacárido relativamente corto, es decir, uno que contiene de 2 a 30 unidades de monosacáridos. Un “polisacárido” es un polímero monosacárido que tiene una longitud mayor que los oligosacáridos (es decir, uno que contiene más de 30 unidades monosacáridas). Además, como se usa en el presente documento, el término “polisacárido” también se refiere a un polímero monosacárido que contiene dos o más monosacáridos ligados. Para evitar la ambigüedad, la segunda definición debe aplicarse en todo momento, a no ser que haya indicaciones explícitas de lo contrario. El término “polisacárido” también incluye derivados polisacáridos, tales como derivados polisacáridos funcionalizados con carboxilo y funcionalizados con amino, entre muchos otros. Los monosacáridos típicamente se ligan por enlaces glucosídicos. Los ejemplos específicos incluyen disacáridos (tales como sacarosa, lactosa, trehalosa, maltosa, gentiobiosa y celobiosa), trisacáridos (tales como rafinosa), tetrasacáridos (tales como estaquiosa) y pentasacáridos (tales como verbascosa).

Como se usa en el presente documento, el término “sacárido” abarca monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Una “especie que contiene sacáridos” es una molécula, al menos una parte de la cual es un sacárido. Los ejemplos incluyen agentes crioprotectores de sacáridos, antígenos de sacáridos, antígenos que comprenden sacáridos conjugados con péptidos vehículo, y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, un “agente crioprotector” es un agente que protege una composición de experimentar efectos adversos tras congelar y descongelar. Por ejemplo, en la presente invención, pueden añadirse agentes crioprotectores para evitar que se produzca aglomeración de nanopartícula sustancial cuando se resuspenden las composiciones liofilizadas de la invención.

Un “polinucleótido” es un polímero de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un “polinucleótido” puede incluir tan pocos como 5, 6, 7 u 8 nucleótidos.

Además, un “polinucleótido” puede incluir secuencias tanto monocatenarias como bicatenarias e incluye ADNc de ARNm vírico, procariota o eucariota, secuencias de ARN y ADN genómico de ADN vírico (por ejemplo virus y retrovirus de ARN y ADN) o ADN procariota, y secuencias de ADN sintéticas. El término también captura secuencias que incluyen cualquiera de los análogos básicos conocidos de ADN y ARN. El término incluye además modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a una secuencia nativa, por ejemplo, en las que la molécula de ácido nucleico codifica una proteína antigénica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de huéspedes que producen antígenos.

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

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

Una “especie que contiene polinucleótidos” es una molécula, al menos una parte de la cual es un polinucleótido. Los ejemplos incluyen construcciones de vectores de ARN, construcciones de vectores de ADN y así sucesivamente.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, se incluyen dentro de la definición péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros. La definición abarca tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones, tales como supresiones, ediciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a una secuencia nativa, por ejemplo, de modo que la proteína mantenga la capacidad para inducir una respuesta inmunológica o tenga un efecto terapéutico en un sujeto al que se administra la proteína.

Una “especie que contiene polipéptido” es una molécula, al menos una parte de la cual es un polipéptido. Los ejemplos incluyen polipéptidos, proteínas incluyendo glucoproteínas, antígenos sacáridos conjugados con proteínas vehículo, y así sucesivamente.

La expresión “producto farmacéutico” se refiere a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, agentes antivíricos, factores de crecimiento, hormonas, antígenos.

El término “adyuvante” se refiere a cualquier sustancia que ayude o modifique la acción de un producto farmacéutico, incluyendo adyuvantes inmunológicos, que aumentan o diversifican la respuesta inmunitaria a un antígeno. Por lo tanto, los adyuvantes inmunológicos son compuestos que son capaces de potenciar una respuesta inmunitaria a antígenos. Los adyuvantes inmunológicos pueden potenciar la inmunidad humoral y/o celular.

Por “antígeno” se entiende una molécula que contiene uno o más epítopos capaces de estimular el sistema inmunitario de un hospedador para realizar una respuesta inmunitaria específica de antígeno celular cuando se presente el antígeno, o una respuesta de anticuerpo humoral. Un antígeno puede ser capaz de inducir una respuesta celular y/o humoral por sí solo o cuando se presenta en combinación con otra molécula.

Un “epítipo” es la parte de una molécula antigénica o complejo antigénico que determina su especificidad inmunológica. Un epítipo está dentro del alcance de la presente definición de antígeno. Habitualmente, un epítipo es un polipéptido o polisacárido en un antígeno de origen natural. En antígenos artificiales puede ser una sustancia de bajo peso molecular tal como un derivado de ácido arsanílico. Un epítipo reaccionará específicamente *in vivo* o *in vitro* con, por ejemplo, anticuerpos homólogos o linfocitos T. Son descriptores alternativos determinante antigénico, agrupamiento estructural antigénico o agrupamiento hapténico.

Frecuentemente, un epítipo incluirá entre aproximadamente 5 y 15 aminoácidos. Los epítopos de una proteína dada pueden identificarse usando cualquier variedad de técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidas en este campo. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos en soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula proteica, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos aún están unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en este campo y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 4.708.871; Geysen y col. (1984) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998-4002); Geysen y col. (1986) (Molec. Immunol. 23: 709-715). De forma similar, se identifican fácilmente epítopos conformacionales 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*, mencionado anteriormente.

El término “antígeno” como se usa en el presente documento indica antígenos subunitarios, es decir, antígenos que están separados y son distintos de un organismo completo con el que se asocia el antígeno en la naturaleza, así como bacterias muertas, atenuadas o inactivadas, virus, parásitos u otros patógenos o células tumorales. Los

anticuerpos tales como anticuerpos antiidiotípicos, o fragmentos de los mismos, y mimótopos peptídicos sintéticos, que pueden imitar a un antígeno o determinante antigénico, también se capturan bajo la definición de antígeno como se usa en el presente documento.

5 De forma similar, 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.

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

15 Una “respuesta inmunológica” o “respuesta inmunitaria” a un antígeno o una composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular a moléculas presentes en la composición de interés. Para fines de la presente invención, una “respuesta inmunitaria humoral” se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una “respuesta unitaria 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 peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresan en las superficies de células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y centran la actividad de células efectoras no específicas contra células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC en su superficie. Una “respuesta inmunitaria celular” también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas tales producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, incluyendo los derivados de linfocitos T CD4+ y CD8+.

20 Una composición tal como una composición inmunogénica o una vacuna que induce una respuesta inmunitaria celular puede actuar 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 se dirige a, o cerca de, células que presentan antígenos en su superficie. Además, pueden generarse linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un huésped inmunizado.

25 La capacidad de un antígeno o una 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 linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, ensayando con respecto a linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o por medición de la producción de citocinas por linfocitos T en respuesta a reestimulación con antígeno. Dichos ensayos se conocen bien 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 posteriores.

30 Por lo 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 actuar para neutralizar la infecciosidad y/o mediar en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o anticuerpo-complemento para proporcionar protección a un huésped inmunizado. Dichas respuestas pueden determinarse usando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayos y ELISA.

35 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención presentan “inmunogenicidad potenciada” cuando poseen una mayor capacidad para inducir una respuesta inmunitaria que la respuesta inmunitaria inducida por una cantidad equivalente del antígeno en una composición diferente. Por lo tanto, una composición puede presentar “inmunogenicidad potenciada”, por ejemplo, porque la composición genera una respuesta inmunitaria más fuerte, o porque es necesaria una dosis menor de antígeno para conseguir una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra. Dicha inmunogenicidad potenciada puede determinarse, por ejemplo, administrando las composiciones de la invención, y controles de antígenos, a animales y comparando los resultados de ensayo de los dos.

40 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 de forma profiláctica (antes de la llegada del patógeno o trastorno en cuestión) o terapéutica (después de la llegada del mismo).

45 Las expresiones “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 entre sujetos, dependiendo, por ejemplo, de la especie, la edad y la condición general del sujeto; la gravedad de la afección que se trate; 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. Por lo tanto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" quedará típicamente en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

Por "sujeto vertebrado" o "animal vertebrado" se entiende cualquier miembro del subfilo cordados, incluyendo, sin limitación, mamíferos tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras, caballos y seres humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza tales como gallos y gallinas incluyendo pollos, pavos y otras aves gallináceas. La expresión no indica una edad particular. Por lo tanto, están abarcados animales tanto adultos como neonatos.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin provocar ningún efecto biológico indeseable excesivo en el individuo o interactuar de una manera excesivamente deletérea con ninguno de los componentes de la composición en la que está contenido.

El término "excipiente" se refiere a cualquier sustancia esencialmente adyuvante que pueda estar presente en la forma de dosificación final. Por ejemplo, el término "excipiente" incluye vehículos, aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, emolientes (potenciadores del flujo), ayudantes de compresión, colorantes, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersantes, formadores de película/revestimientos, saporíferos y tintas de impresión.

Por "pH fisiológico" o un "pH en el intervalo fisiológico" se entiende un pH en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0 inclusive, más típicamente en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6 inclusive.

Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción de vector" se refiere en general a cualquier ensamblaje que sea capaz de dirigir la expresión de una secuencia o secuencias de ácido nucleico o gen o genes de interés. Una construcción de vector típicamente incluye promotor/potenciador de la transcripción o elemento o elementos que definen un locus, u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación postraduccional del mensajero, o modificación postranscripcional de la proteína. Además, la construcción de vector típicamente incluye una secuencia que, cuando se transcribe, está unida operativamente con la secuencia o las secuencias o el gen o los genes de interés y actúa como una secuencia de inicio de la traducción. La construcción de vector puede incluir también opcionalmente una señal que dirige la poliadenilación, un marcador seleccionable, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Además, si la construcción de vector se coloca en un retrovirus, la construcción de vector puede incluir una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) y sitios de unión a cebador de cadena positiva y negativa apropiados para el retrovirus usado (si estos no están ya presentes).

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

Un tipo específico de construcción de vector de ADN es un plásmido, que es una molécula de ADN episómica circular capaz de replicar de forma autónoma dentro de una célula huésped. Típicamente, un plásmido es un ADN bicatenario circular, bucle en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. pCMV es un plásmido específico que se conoce bien en la técnica. Un vector pCMV preferido contiene el potenciador/promotor temprano inmediato de CMV y un terminador de 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 vectores de ADN, que se basan en virus de ARN. Estas construcciones de vectores de ADN típicamente comprenden un promotor que actúa 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 3'. La construcción del vector de ARN preferentemente comprende un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de la fiebre amarilla o alfavirus (por ejemplo, virus Sindbis, virus del Bosque de Semliki, virus de la encefalitis equina Venezolana o virus del Río Ross), que se ha modificado por el reemplazo de uno o más genes proteicos estructurales con una secuencia de ácido nucleico heteróloga seleccionada que codifica un producto de interés. Las construcciones de vectores de ARN pueden obtenerse por transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN. Los ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en virus Sindbis (pSIN) tales como pSINCP, descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.814.482 y 6.015.686, así como en las Publicaciones Internacionales n.º WO 97/38087, WO 99/18226 y WO 02/26209. La construcción de dichos vectores, en general, se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.814.482 y 6.015.686.

Otros ejemplos de construcciones de vectores incluyen construcciones de vectores de ARN (por ejemplo, construcciones de vectores de alfavirus) y similares. Como se usa en el presente documento, "construcción de vector de ARN", "replicón de vector de ARN" y "replicón" se refieren a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o autorreplicación *in vivo*, típicamente dentro de una célula diana. La construcción de vector de ARN se usa directamente, sin la necesidad de introducir ADN en una célula y transportarlo al núcleo en el que se produciría transcripción. Usando el vector de ARN para suministro directo al citoplasma de la célula hospedadora, se produce eficazmente replicación autónoma y traducción de la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

B. PROCEDIMIENTOS GENERALES

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones de nanopartículas de la presente invención contienen uno o más polímeros biodegradables, uno o más tensioactivos, uno o más agentes crioprotectores, uno o más antígenos y, opcionalmente, uno o más componentes complementarios, por ejemplo, uno o más adyuvantes inmunológicos, entre otros.

1. COMPOSICIONES DE NANOPARTÍCULAS

Los polímeros útiles para formar las composiciones de nanopartículas inmunogénicas descritas en el presente documento incluyen homopolímeros, copolímeros y mezclas de polímeros, tanto naturales como sintéticas. Dichos polímeros pueden derivar, por ejemplo de lo siguiente: ácido polihidroxibutírico (también conocido como polihidroxibutirato), ácido polihidroxivalérico (también conocido como polihidroxivalerato); ácido poliglicólico (PGA) (también conocido como poliglicólido); ácido poliláctico (PLA) (también conocido como polilactida); polidioxanona; policaprolactona; poliortoéster, policianoacrilatos; polianhídridos; y combinaciones de los mismos. Son más típicos poli(α -hidroxiácidos), tales como poli(L-lactida), poli(D,L-lactida) (ambos denominados PLA en el presente documento), poli(hidroxibutiratos), copolímeros de lactida y glicólico, tales como poli(D,L-lactida-co-glicólidos) (designados "PLG" en el presente documento) o copolímeros de D,L-lactida y caprolactona.

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

Cuando se emplean copolímeros, pueden estar disponibles copolímeros con una diversidad de relaciones monoméricas. Por ejemplo, cuando se usa PLG para formar las nanopartículas, una diversidad de relaciones molares de lactida:glicólido encontrarán uso en el presente documento, y la relación es en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de cualquier especie coadministrada adsorbida y/o inmovilizada y la velocidad de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero de PLG 50:50, que contiene D,L-lactida 50 % y glicólido 50 %, proporcionará un copolímero de reabsorción más rápida, mientras que PLG 75:25 se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10, aún más lentamente, debido al componente lactida aumentado. Las mezclas de nanopartículas con diversas relaciones de lactida:glicólido también puede encontrar uso en el presente documento para conseguir la cinética de liberación deseada. La velocidad de degradación de las nanopartículas de la presente invención también puede controlarse por factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero.

Cuando se usen los copolímeros de PLG son típicamente los que tienen una relación molar de lactida:glicólido que varía, 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 tienen un peso molecular que varía, 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 Dalton, entre otros.

Están disponibles en el mercado copolímeros de PLG con diversas relaciones de lactida:glicólido y pesos moleculares de varias fuentes incluyendo de Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL, Estados Unidos. Algunos copolímeros de PLG ejemplares incluyen: (a) RG 502, un PLG que tiene una relación molar de lactida:glicólido 50:50 y un peso molecular de 12.000 Da; (b) RG 503, un PLG que tiene una relación molar de lactida:glicólido 50:50 y un peso molecular de aproximadamente 34.000 Da; (c) RG 504, un PLG que tiene una relación molar de lactida:glicólido 50:50 y un peso molecular de aproximadamente 48.000 Da, (d) RG 752, un PLG que tiene una relación molar de lactida:glicólido 75:25 y un peso molecular de aproximadamente 22.000 Da; y (e) RG 755, un PLG que tiene una relación molar de lactida:glicólido 75:25 y un peso molecular de aproximadamente 68.000 Da. También pueden sintetizarse polímeros de PLG por policondensación sencilla del componente de ácido láctico usando técnicas bien conocidas en este campo, tales como las descritas en Tabata y col. (1988) (J. Biomed. Mater. Res. 22: 837-858).

Pueden prepararse nanopartículas de acuerdo con la invención usando cualquier procedimiento adecuado.

Por ejemplo, el procedimiento de nanoprecipitación, también denominado el procedimiento de desplazamiento de disolvente, es un ejemplo de un procedimiento adecuado para formar nanopartículas para su uso en la invención. Véase, por ejemplo, Patente Europea n.º 0274961B1 titulada "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules", Devissaguet y col., Patente de Estados Unidos n.º 5.049.322 del mismo título y Fessi y col., Patente de Estados Unidos n.º 5.118.528, "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles".

Como se adapta para la presente invención, un polímero se disuelve en un disolvente orgánico (por ejemplo, disolventes orgánicos hidrófilos tales como acetona, etanol). La solución orgánica resultante se combina con un disolvente adicional, que es miscible con el disolvente orgánico siendo al mismo tiempo no disolvente para el polímero, típicamente una solución acuosa. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, una solución tamponada, tal como por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una solución de tampón de citrato sódico/ácido etilendiamintetraacético (citrato sódico/EDTA). Estas últimas soluciones pueden (a) proporcionar una tonicidad, es decir, osmolaridad, que es esencialmente la misma que los fluidos fisiológicos normales y (b) mantener un pH compatible con las condiciones fisiológicas normales. En una realización particular, las características de tonicidad y/o pH de las composiciones de la presente invención pueden ajustarse después de la formación de nanopartículas.

La solución orgánica y la solución acuosa se combinan después en volúmenes relativos adecuados (por ejemplo 1:10 a 1:5 a 1:2 a 1:1 a 2:1 a 5:1 a 10:1, típicamente de 1:2 a 2:1, más típicamente aproximadamente 1:1). Por ejemplo, la solución 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, siendo al mismo tiempo significativamente menos soluble en la mezcla miscible del disolvente orgánico con el no disolvente, puede formarse una suspensión de nanopartículas prácticamente instantánea. Posteriormente, el disolvente orgánico puede eliminarse de la suspensión, por ejemplo, por evaporación en condiciones ambientales o evaporación con presión reducida y/o temperatura elevada.

La solución orgánica, la solución acuosa, o ambas también pueden contener diversas otras especies según se desee. Por ejemplo, en algunas realizaciones, es deseable inmovilizar una o más especies adicionales dentro de las nanopartículas o para proporcionar una o más especies adicionales en la interfaz de partícula-fluido. Dichas especies adicionales pueden incluir, por ejemplo, antígenos, tensioactivos, agentes crioprotectores, adyuvantes inmunológicos, y así sucesivamente. Estas especies se añaden típicamente (a) a la solución orgánica, si están en forma soluble en aceite o dispersable en aceite o (b) a la solución acuosa, si está en forma soluble en agua o dispersable en agua.

En algunas realizaciones, se añaden una o más especies adicionales después de la formación de nanopartículas (y típicamente después de la retirada del disolvente orgánico, así como después de las etapas de lavado, si las hubiera). Por ejemplo, pueden añadirse agentes para ajustar la tonicidad o el pH, antígenos, tensioactivos, agentes crioprotectores, adyuvantes inmunológicos y así sucesivamente. Frecuentemente, estas especies adicionales se añaden a las nanopartículas como una solución o dispersión acuosa. Estas especies pueden estar, por ejemplo, en solución o acumularse en la interfaz de partícula-solución, por ejemplo, adsorberse en la superficie de la nanopartícula (véase, por ejemplo, los Ejemplos posteriores en los que diversos antígenos se adsorben en la superficie de la nanopartícula). El contenido de especies adsorbidas puede determinarse usando técnicas convencionales.

Una vez que se ha proporcionado suspensión de la composición deseada, puede usarse tal cual o liofilizarse para su uso posterior.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden esterilizarse por filtración después de la formación de nanopartículas. Por ejemplo, las composiciones pueden esterilizarse por filtración en cualquier momento después de la formación de nanopartículas, tales como por ejemplo, después de la formación de nanopartículas pero antes de la adsorción de cualquier especie inmunológica (por ejemplo, un adyuvante y/o un antígeno inmunológico), después de la adsorción de cualquier especie inmunológica y antes de la liofilización, y así sucesivamente.

En general, las micropartículas dentro de las composiciones, tanto antes como después de la liofilización, tienen un promedio de Z y/o un tamaño de $D(v,0,5)$ de menos de 250 nm, por ejemplo que varían de 250 nm a 200 nm, a 150 nm a 100 nm o menos.

Tomando las nanopartículas formadas usando PLG como ejemplo, hay varias ventajas de las técnicas de la presente invención, en comparación con técnicas de formación de micropartículas (por ejemplo, las descritas en referencias citadas en la sección de Antecedentes mencionada anteriormente y en Singh, M., y col. (2004) (J. Pharm. Sci. 93(2): 273-282)). Un primer beneficio es la facilidad de preparación. El procedimiento de nanopartículas es una técnica de una única etapa y no necesita homogeneización de alto corte, solamente agitación magnética. Además, el proceso de preparación de partículas de micropartícula completa es típicamente aséptico, mientras que, debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas pueden esterilizarse por filtración después de la preparación de partículas, lo que conduce a requisitos de producción menos estrictos.

Además, el tipo de disolvente orgánico usado con los procedimientos es diferente. El procedimiento de nanopartículas puede realizarse usando acetona mientras que el procedimiento de micropartículas típicamente implica el uso de diclorometano (DCM) como un disolvente. La Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) clasifica DCM como un disolvente de Clase 2 y tiene límites establecidos acerca de las cantidades de disolvente residual permisible que pueden estar presentes en productos farmacéuticos, mientras que la acetona es un disolvente de Clase 3 para el que la FDA ha establecido límites superiores en las cantidades permisibles.

2. TENSIOACTIVOS

Como se ha indicado anteriormente los tensioactivos para su uso en la divulgación incluyen detergentes, agentes de dispersión, agentes de suspensión, estabilizantes de la emulsión.

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

10 Las composiciones de acuerdo con la divulgación pueden contener cantidades muy diversas de tensioactivo. En general, la cantidad de tensioactivo será eficaz para promover la suspensión de nanopartículas aceptable (y resuspensión después de la liofilización). La relación en peso de tensioactivo frente al polímero biodegradable puede variar, por ejemplo, de menos de 0,001:1 a 0,5:1 o más, por ejemplo, de 0,005:1 a 0,1:1, entre otras relaciones. En general, se usan tensioactivos iónicos en relaciones más bajas que los tensioactivos no iónicos.

De acuerdo con la invención, el tensioactivo es poli(alcohol vinílico).

3. AGENTES CRIOPROTECTORES

20 Como se ha indicado anteriormente, pueden añadirse agentes crioprotectores a las composiciones de la presente invención para prevenir que se produzca aglomeración de nanopartículas sustancial cuando se resuspenden composiciones liofilizadas de acuerdo con la invención.

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

30 Las composiciones de acuerdo con la divulgación pueden contener cantidades ampliamente diversas de agente crioprotector, dependiendo de la cantidad que sea eficaz para evitar la aparición de aglomeración de nanopartículas sustancial cuando se resuspenden las composiciones liofilizadas de la invención. La relación en peso del tensioactivo con respecto al polímero biodegradable puede variar, por ejemplo, de menos de 0,01:1 a 0,5:1 o más, por ejemplo, de 0,05:1 a 0,1:1, entre otras relaciones.

35 De acuerdo con la invención, el agente crioprotector comprende una combinación de un alitol y un sacárido.

4. ANTÍGENOS

40 Las composiciones de la invención incluyen uno o más antígenos polipeptídicos, cada antígeno una cantidad eficaz (por ejemplo, una cantidad eficaz para uso en procedimientos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico de acuerdo con la invención). Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir infecciones provocadas por cualquiera de los patógenos enumerados posteriormente.

Los antígenos para su uso con la divulgación incluyen uno o más de los siguientes antígenos expuestos posteriormente, o antígenos derivados de uno o más de los patógenos expuestos posteriormente:

A. ANTÍGENOS BACTERIANOS

45 Los antígenos bacterianos adecuados para su uso en la divulgación incluyen proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos, y vesículas de la membrana externa que pueden aislarse, purificarse o derivar de una bacteria. Además, los antígenos bacterianos incluyen lisados bacterianos y formulaciones de bacterias inactivadas. Pueden producirse antígenos bacterianos por expresión recombinante. Los antígenos bacterianos incluyen preferentemente epítomos que están expuestos en la superficie de la bacteria durante al menos un estadio de su ciclo vital. Los antígenos bacterianos están preferentemente conservados entre múltiples serotipos. Los antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de una o más de las bacterias expuestas posteriormente así como los ejemplos de antígenos específicos identificados posteriormente.

Neisseria meningitidis: los antígenos de *meningitidis* incluyen proteínas (tales como las identificadas en los documentos WO99/24578; WO99/36544; WO99/57280; WO00/22430; Tettelin y col. (2000) Science 287: 1809-1815; WO96/29412; y Pizza y col. (2000) Science 287:1816-1820), sacáridos (incluyendo un polisacárido,

- oligosacárido o lipopolisacárido), o vesículas de 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 serogrupo de *N. meningitidis* tal como A, C, W135, Y y/o B. Pueden seleccionarse antígenos proteicos de *meningitidis* de adhesiones, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de Fe y proteínas asociadas a membrana (preferentemente proteína membrana externa integral).
- 5 *Streptococcus pneumoniae*: los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* incluyen un sacárido (incluyendo un polisacárido o un oligosacárido) y/o una proteína de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos sacáridos 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. Pueden seleccionarse antígenos proteicos de una proteína identificada en los documentos WO 98/18931; WO 98/18930; Patente de Estados Unidos n.º 6.699.703; Patente de Estados Unidos n.º 6.800.744; WO 97/43303; y WO 97/37026. Pueden seleccionarse proteínas de *Streptococcus pneumoniae* de la familia de Triada de Poli Histidina (PhtX), la familia de Proteínas de Unión a Colina (CbpX), truncados de CbpX, familia de LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas de truncado de CbpX-truncado de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 o Sp133.
- 10 *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* de Grupo A): los antígenos de *Streptococcus* de Grupo A incluyen proteínas identificadas en los documentos WO 02/34771 y WO 2005/032582 (incluyendo GAS 40), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluyendo las descritas en el documento WO 02/094851; y Dale (1999) Vaccine 17: 193-200, y Dale (1996) vaccine 14(10): 944-948), proteína de unión a fibronectina (Sfb1), proteína asociada a hemo Estreptocócico (Shp) y Estreptolisina S (SagA).
- 15 *Moraxella catarrhalis*: los antígenos de *Moraxella* incluyen antígenos identificados en los documentos WO 02/18595; y WO 99/58562, antígenos proteicos 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 combinación con antígeno pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.
- 25 *Staphylococcus aureus*: los antígenos de *Staphylococcus aureus* incluyen polisacáridos capsulares de *S. aureus* tipo 5 y 8 opcionalmente conjugados con exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante no tóxica, tales como StaphVAX™, y antígenos derivados de proteínas superficiales, invasinas (leucocidina, quinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben el envolvimiento factocítico (cápsula, Proteína A), carotenoides, producción de catalasa, Proteína A, coagulasa, factor de coagulación y toxinas de daño a membrana (opcionalmente destoxificadas) que lisan membranas de células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina).
- 30 *Staphylococcus epidermidis*: los antígenos de *S. epidermidis* incluyen antígeno asociado a limo (SAA).
- Clostridium tetani* (Tétanos): los antígenos del tétanos incluyen toxoide tetánico (TT), preferentemente usado como una proteína vehículo en conjunción/conjugado con las composiciones de la presente invención.
- 35 *Corynebacterium diphtheriae* (Difteria): los antígenos de difteria incluyen toxina diftérica, preferentemente destoxificada, tal como CRM₁₉₇. Adicionalmente, los antígenos capaces de modular, inhibir o asociarse con ribosilación de ADP se contemplan para combinación/coadministración/conjugación con las composiciones de la presente invención. Los toxoides diftéricos pueden usarse como proteínas vehículo.
- Haemophilus influenzae B* (Hib): los antígenos de Hib incluyen un antígeno sacárido de Hib.
- 40 *Pseudomonas aeruginosa*: los antígenos de *Pseudomonas* incluyen endotoxina A, proteína Wzz, LPS de *P. aeruginosa*, más particularmente LPS aislados de PAO1 (serotipo O5), y Proteínas de Membrana Externa, incluyendo Proteínas de Membrana Externa F (OprF) (Price y col. (2001) Infect Immun. 69(5): 3510-3515).
- Legionella pneumophila*. Los antígenos bacterianos pueden derivar de *Legionella pneumophila*.
- 45 *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de Grupo B): los antígenos de *Streptococcus* de grupo B incluyen antígenos proteicos y sacáridos, tales como los identificados en los documentos WO 02/34771; WO 03/093306; WO 04/041157; y WO 2005/002619 (incluyendo las proteínas GBS 59, GBS 67, GBS 80, GBS 104, GBS 276, GBS 322, e incluyendo antígenos sacáridos derivados de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII).
- 50 *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 de reducción modificable (Rmp) y preparaciones de vesículas de membranas externas (OMV) (véase, 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 L₁, L₂ y L₃ (asociados con *Lymphogranuloma venereum*), 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, incluyendo PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), DnaK (CT396), CT398, OmpH-like (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823), MurG (CT761), CT396 y CT761, y combinaciones específicas de estos antígenos.

5 *Treponema pallidum* (Sífilis): los antígenos de sífilis incluyen antígeno TmpA.

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

Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*: los antígenos incluyen una repetición trisacárida y otros antígenos derivados de *Enterococcus* proporcionados en la Patente de Estados Unidos n.º 6.756.361.

10 *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).

15 *E. coli*: los antígenos de *E. coli* pueden derivar de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

20 *Bacillus anthracis* (carbunco): los antígenos de *B. anthracis* están opcionalmente destoxificados 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 de carbunco.

Yersinia pestis (peste): los antígenos de la peste 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).

25 *Mycobacterium tuberculosis*: los antígenos de tuberculosis incluyen lipoproteínas, LPS, antígenos de BCG, una proteína de fusión del antígeno 85B (Ag85B) y ESAT-6 formulado opcionalmente en vesículas lipídicas catiónicas (Olsen y col. (2004) Infect. Immun. 72(10): 6148-6150), antígenos asociados con 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).

30 *Rickettsia*: los antígenos incluyen proteínas de membrana externa, incluyendo la proteína A y/o B de membrana externa (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 Supl: 81-91).

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

35 *Chlamydia pneumoniae*: los antígenos incluyen los identificados en los documentos WO 02/02606 y WO 05/084306, incluyendo 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 específicos de O O1 Inaba, 0139 de *V. cholera*, antígenos de la vacuna IEM108 (Liang y col. (2003) Infect. Immun. 71(10): 5498-5504), y toxina de *Zonula occludens* (Zot).

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

45 *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 con P39 y P13 (una proteína integral de membrana, Noppa y col. (2001) Infect. Immun. 69(5): 3323-3334), Proteína de Variación Antigénica VlsE (Lawrenz y col. (1999) J. Clin. Microbiol. 37(12): 3997-4004).

Porphyromonas gingivalis: los antígenos incluyen proteína de membrana externa (OPM) de *P. gingivalis*.

Klebsiella: los antígenos incluyen OMP, incluyendo OMP A, y polisacáridos opcionalmente conjugados con toxoide del tétanos.

50

Otros antígenos bacterianos incluyen antígenos capsulares, antígenos polisacáridos o antígenos proteicos de cualquiera de los anteriores. Los antígenos bacterianos adicionales también incluyen preparaciones de vesículas de membrana externa (OMV). Adicionalmente, los antígenos incluyen versiones vivas, atenuadas y/o purificadas de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas. Los antígenos pueden derivar de bacterias gram negativas o gram positivas. Los antígenos pueden derivar de bacterias aerobias o anaerobias.

Adicionalmente, cualquiera de los sacáridos derivados de bacterias anteriores (polisacáridos, LPS, LOS u oligosacáridos) pueden conjugarse con otro agente u otro antígeno, tal como una proteína vehículo (por ejemplo, CRM₁₉₇). Dicha conjugación puede ser conjugación directa efectuada por aminación reductora de restos carbonilo en el sacárido a grupos amino en la proteína, como se proporciona en la Patente de Estados Unidos n.º 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 engarce, tal como, con succinamida u otros enlaces proporcionados en Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, 1ª ed., Academic Press (1996) y Wong, S. S., CRC, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, 1ª ed., CRC-Press (1991).

B. ANTÍGENOS VÍRICOS

Los antígenos víricos adecuados para su uso en la divulgación incluyen virus inactivado (o muerto), virus atenuado, formulaciones de virus divididos, formulaciones de subunidades purificadas, proteínas víricas que pueden aislarse, purificarse o derivarse de un virus, y Partículas de Tipo Vírico (VLP). Los antígenos víricos pueden derivar de virus propagados en cultivo celular u otro sustrato o expresarse de forma recombinante. Los antígenos víricos preferentemente incluyen epítomos que se exponen en la superficie del virus durante al menos un estadio de su ciclo vital. Los antígenos víricos están preferentemente conservados entre múltiples serotipos o aislados. Los antígenos víricos incluyen antígenos derivados de uno o más de los virus expuestos posteriormente así como los ejemplos de antígenos específicos identificados posteriormente.

Orthomyxovirus: los antígenos víricos pueden derivar de un *Orthomyxovirus*, tal como Gripe A, B y C. Los antígenos de *Orthomyxovirus* pueden seleccionarse de una o más de las proteínas víricas, incluyendo hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de la 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.

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

Virus *Paramyxoviridae*: los antígenos víricos pueden derivar de virus *Paramyxoviridae*, tales como Neumovirus (VSR), Paramixovirus (PIV) y Morbillivirus (Sarampión).

Pneumovirus: los antígenos víricos pueden derivar de un *Pneumovirus*, tales como virus sincitial respiratorio (VSR), virus sincitial respiratorio bovino, virus de neumonía de ratón y virus de rinotraqueítis de pavo. Preferentemente, el *Pneumovirus* es VSR. Los antígenos de *Pneumovirus* pueden seleccionarse de una o más de las siguientes proteínas, incluyendo proteínas de superficie de fusión (F), Glucoproteína (G) y proteína Hidrófoba Pequeña (SH), proteínas de la matriz M y M2, proteínas de la nucleocápsida N, P y L y proteínas no estructurales NS1 y NS2. Los antígenos de *Pneumovirus* preferidos incluyen F, G y M. Véase por ejemplo Johnstone y col. (2004) J. Gen. Virol. 85(Pt 11): 3229-3238. Los antígenos de *Pneumovirus* también pueden formularse en o derivar de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus VSR/PIV pueden comprender componentes tanto de VSR como de PIV.

Paramixovirus: los antígenos víricos pueden derivar de un *Paramixovirus*, tal como virus Paragripal tipos 1-4 (PIV), Paperas, virus Sendai, virus de simio 5, virus paragripal bovino y virus de enfermedad de Newcastle. Preferentemente, el Paramixovirus es PIV o Paperas. Pueden seleccionarse antígenos de *Paramixovirus* 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 la Matriz (M). Las proteínas de Paramixovirus preferidas incluyen HN, F1 y F2. Los antígenos de paramixovirus también pueden formularse en o derivar de virus quiméricos. Por ejemplo, los virus VSR/PIV quiméricos pueden comprender componentes tanto de VSR como de PIV. Las vacunas de paperas disponibles en el mercado incluyen virus de paperas atenuados vivos, bien en una forma monovalente o bien en combinación con vacunas de sarampión y rubéola (MMR).

Morbillivirus: los antígenos víricos pueden derivar de un *Morbillivirus*, tal como 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), fosfoproteína de polimerasa (P) y Matriz (M). Las vacunas de sarampión disponibles en el mercado incluyen virus de sarampión atenuados vivos, típicamente en combinación con paperas y rubéola (MMR).

Picornavirus: los antígenos víricos pueden derivar de *Picornavirus*, tales como Enterovirus, Rinovirus, Heparnavirus, Cardiovirus y Aftovirus. Se prefieren antígenos derivados de Enterovirus, tales como Poliovirus.

- 5 *Enterovirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un *Enterovirus*, tal como Poliovirus tipos 1, 2 o 3, virus Coxsackie A tipos 1 a 22 y 24, virus Coxsackie B tipos 1 a 6, virus Echovirus (ECHO) tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 y Enterovirus 68 a 71. Preferentemente, el *Enterovirus* es poliovirus. Los antígenos de enterovirus se seleccionan preferentemente de una o más de las siguientes proteínas de la Cápsida VP1, VP2, VP3 y VP4. Las vacunas de la poliomielitis disponibles en el mercado incluyen Vacuna de la Poliomielitis Inactivada (IPV) y vacuna de poliovirus Oral (OPV).
- 10 *Heparnavirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un *Heparnavirus*, tal como virus de la Hepatitis A (VHA). Las vacunas de VHA disponibles en el mercado incluyen vacuna de VHA inactivada.
- 15 *Togavirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un *Togavirus*, tal como un *Rubivirus*, un *Alfavirus* o un *Arterivirus*. Se prefieren antígenos derivados de *Rubivirus*, tales como virus de la Rubéola. Pueden seleccionarse antígenos de *Togavirus* 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 de Rubéola disponibles en el mercado incluyen un virus adaptado al frío vivo, típicamente en combinación con vacunas de paperas y sarampión (MMR).
- 20 *Flavivirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un *Flavivirus*, tales como encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), Dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), Fiebre Amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo Occidental, encefalitis de St. Louis, encefalitis de verno-estival ruso, 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 de TBE disponible en el mercado incluye vacunas de virus inactivados.
- 25 *Pestivirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un *Pestivirus*, tal como diarrea vírica bovina (BVDV), fiebre porcina clásica (CSFV) o enfermedad de la frontera (BDV).
- 30 *Hepadnavirus*: los antígenos víricos pueden derivar 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 del núcleo (HBc, HBe). Las vacunas de VHB disponibles en el mercado incluyen vacunas subunitarias que comprenden la proteína de antígeno de superficie S.
- 35 *Virus de la Hepatitis C*: los antígenos víricos pueden derivar de un virus de la Hepatitis C (VHC). Los antígenos de VHC pueden seleccionarse de uno o más de E1, E2, E1/E2, poliproteína NS345, poliproteína de núcleo NS 345, núcleo y/o péptidos de las regiones no estructurales (Houghton y col. (1991) *Hepatology* 14: 381-388).
- 40 *Rhabdovirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un *Rhabdovirus*, tal como *Lyssavirus* (virus de la Rabia) y *Vesiculovirus* (VSV). Los antígenos de *Rhabdovirus* pueden seleccionarse de glucoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína grande (L) y proteínas no estructurales (NS). Las vacunas de virus de la Rabia disponibles en el mercado comprenden virus muertos cultivados en células diploides humanas o células de pulmón de mono rhesus fetal.
- 45 *Caliciviridae*: los antígenos víricos pueden derivar de *Caliciviridae*, tales como virus Norwalk y virus de tipo Norwalk, tales como Virus de Hawái y Virus de la Montaña Nevada.
- 50 *Coronavirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un Coronavirus, SARS, coronavirus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis de ratón (MHV) y virus de gastroenteritis transmisible porcina (TGEV). Los antígenos de Coronavirus pueden seleccionarse de púa (S), envoltura (E), matriz (M), nucleocápsida (N), y glucoproteína de Hemaglutinina esterasa (HE). Preferentemente, el antígeno de Coronavirus deriva de un virus de SARS. Los antígenos víricos de SARS se describen en el documento WO 04/92360;
- 55 *Retrovirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un Retrovirus, tal como un *Oncovirus*, un *Lentivirus* o un *Spumavirus*. Los antígenos de Oncovirus pueden derivar de HTLV-1, HTLV-2 o HTLV-5. Los antígenos de Lentivirus pueden derivar de VIH-1 o VIH-2. Los antígenos de Retrovirus pueden seleccionarse de gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpu, y vpr. Los antígenos de VIH pueden seleccionarse de gag (p24gag y p55gag), env (gp160 y gp41), pol, tat, nef, rev vpu, miniproteínas, (preferentemente p55 gag y gp140v delete). Los antígenos de VIH pueden derivar de una o más de las siguientes cepas: VIH_{IIIb}, VIH_{SF2}, VIH_{LAV}, VIH_{LAI}, VIH_{MN}, VIH-1_{CM235}, VIH-1_{US4}.
- 60 *Reovirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un Reovirus, tal como un Ortorreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus, o un Coltivirus. Los antígenos de Reovirus pueden seleccionarse de proteínas estructurales λ 1, λ 2, λ 3, μ 1, μ 2, σ 1, σ 2, o σ 3, o proteínas no estructurales σ NS, μ NS, o σ 1s. Los antígenos de Reovirus preferidos pueden derivar 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.
- 65 *Parvovirus*: los antígenos víricos pueden derivar de un Parvovirus, tal como Parvovirus B 19. Los antígenos víricos pueden seleccionarse de VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 y NS-2. Preferentemente, el antígeno de Parvovirus es proteína de la cápsida VP-2.

Virus de la hepatitis delta (VHD): los antígenos víricos pueden derivar de VHD, particularmente antígeno δ de VHD (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.378.814).

Virus de la hepatitis E (VHE): los antígenos víricos pueden derivar de VHE.

Virus de la hepatitis G (VHG): los antígenos víricos pueden derivar de VHG.

5 *Herpesvirus Humano*: los antígenos víricos pueden derivar de un Herpesvirus Humano, tal como los Virus del Herpes Simple (VHS), virus de Varicela zoster (VZV), virus de Epstein-Barr (VEB), Citomegalovirus (CMV), Herpesvirus Humano 6 (HHV6), Herpesvirus Humano 7 (HHV7) y Herpesvirus Humano 8 (HHV8). Los antígenos de Herpesvirus Humano pueden seleccionarse de proteínas tempranas inmediatas (α), proteínas tempranas (β) y
10 proteínas tardías (γ). Los antígenos de VHS pueden derivar de cepas VHS-1 o VHS-2. Los antígenos de VHS pueden seleccionarse de glucoproteínas gB, gC, gD y gH, proteína de fusión (gB) o proteínas de escape inmunitario (gC, gE o gI). Los antígenos de VZV pueden seleccionarse de proteínas del núcleo, de nucleocápsida, de tegumento o de envoltura. Una vacuna de VZV atenuada viva está disponible en el mercado. Los antígenos de VEB pueden
15 seleccionarse de proteínas antigénicas tempranas (EA), antígeno de cápsida vírica (VCA) y glucoproteínas del antígeno de membrana (MA). Los antígenos del CMV pueden seleccionarse de proteínas de la cápsida, glucoproteínas de envoltura (tales como gB y gH) y proteinasa del tegumento.

Papovavirus: los antígenos pueden derivar de Papovavirus, tales como Papilomavirus y Poliomaivirus. Los Papilomavirus 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 de VPH derivan de los serotipos 6, 11, 16 o 18. Los antígenos del VPH pueden
20 seleccionarse de proteínas de la cápsida (L1) y (L2), o E1 - E7, o fusiones de las mismas. Los antígenos del VPH se formulan preferentemente en partículas de tipo vírico (VLP). Los virus poliomaivirus incluyen virus BK y virus JK. Los antígenos de Poliomaivirus pueden seleccionarse de VP1, VP2 o VP3.

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

C. ANTÍGENOS FÚNGICOS

Los antígenos fúngicos para su uso en la divulgación pueden derivar de uno o más de los hongos expuestos posteriormente.

30 Los antígenos fúngicos pueden derivar de Dermatofitos, incluyendo:

Epidermophyton floccosum, *Microsporium audouini*, *Microsporium canis*, *Microsporium distortum*, *Microsporium equinum*, *Microsporium gypsum*, *Microsporium nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton tonsurans*,
35 *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum*, y/o *Trichophyton faviforme*.

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

Se conocen en la técnica procesos para producir antígenos fúngicos (véase Patente de Estados Unidos n.º 6.333.164). En un procedimiento preferido, una fracción solubilizada extraída y separada de una fracción insoluble que puede obtenerse de células fúngicas de las que se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular, caracterizada por que el proceso comprende las etapas de: obtener células fúngicas vivas; obtener células fúngicas de las que se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado parcialmente la pared celular; estallar las células fúngicas de las que se ha eliminado sustancialmente o al menos se ha eliminado
55 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 polipeptídicos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Dichos antígenos pueden proporcionar profilaxis o terapia para ETS tales como clamidia, herpes genital, hepatitis (tal como VHC), verrugas genitales, gonorrea, sífilis y/o chancroide (véase documento WO 00/15255). Los antígenos pueden derivar de una o más ETS víricas o bacterianas. Los antígenos de ETS víricas para su uso en la invención pueden derivar de, por ejemplo, VIH, virus del herpes simple (VHS-1 y VHS-2), papilomavirus humano (VPH) y hepatitis (VHC). Los antígenos de ETS bacterianas para su uso en la invención puede derivar de, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *E. coli* y *Streptococcus agalactiae*. Se han descrito anteriormente ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos.

E. ANTÍGENOS RESPIRATORIOS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos polipeptídicos derivados de un patógeno que provoca enfermedad respiratoria. Por ejemplo los antígenos respiratorios pueden derivar de un virus respiratorio tal como Ortomixovirus (gripe), Neumovirus (VSR), Paramixovirus (PIV), Morbilivirus (sarampión), Togavirus (Rubéola), VZV y Coronavirus (SARS). Los antígenos respiratorios pueden derivar de una bacteria que provoca enfermedad respiratoria, tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Moraxella catarrhalis*. Se han descrito anteriormente ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos.

F. ANTÍGENOS DE VACUNAS PEDIÁTRICAS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos polipeptídicos adecuados para su uso en sujetos pediátricos. Los sujetos pediátricos son típicamente de menos de aproximadamente 3 años de edad, o menos de aproximadamente 2 años de edad, o menos de aproximadamente 1 año de edad. Los antígenos pediátricos pueden administrarse múltiples veces a lo largo de 6 meses, 1, 2 o 3 años. Los antígenos pediátricos pueden derivar de un virus que puede dirigirse a poblaciones pediátricas y/o un virus a cuya infección son susceptibles las poblaciones pediátricas. Los antígenos víricos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de Ortomixovirus (gripe), Neumovirus (VSR), Paramixovirus (PIV y Paperas), Morbilivirus (sarampión), Togavirus (Rubéola), Enterovirus (poliomielitis), VHB, Coronavirus (SARS) y virus de Varicela zoster (VZV), virus de Epstein Barr (VEB). Los antígenos bacterianos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pyogenes* (Estreptococcus de Grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* (Tétanos), *Cornynebacterium diphtheriae* (Difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* (Estreptococcus de Grupo B), y *E. coli*. Se han descrito anteriormente ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos.

G. ANTÍGENOS ADECUADOS PARA SU USO EN INDIVIDUOS ANCIANOS O INMUNOCOMPROMETIDOS

Las composiciones de la invención pueden incluir uno o más antígenos polipeptídicos adecuados para su uso en individuos ancianos o inmunocomprometidos. Dichos individuos pueden necesitar vacunarse con más frecuencia, con mayores dosis o con formulaciones con adyuvantes para mejorar su respuesta inmunitaria a los antígenos diana. Los antígenos que pueden ser diana para uso en individuos ancianos o inmunocomprometidos incluyen antígenos derivados de uno o más de los siguientes patógenos: *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (Estreptococcus de Grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Clostridium tetani* (Tétanos), *Cornynebacterium diphtheriae* (Difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (Estreptococcus de Grupo B), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Clamydia pneumoniae*, Ortomixovirus (gripe), Neumovirus (VSR), Paramixovirus (PIV y Paperas), Morbilivirus (sarampión), Togavirus (Rubéola), Enterovirus (poliomielitis), VHB, Coronavirus (SARS), virus de Varicela zoster (VZV), virus de Epstein Barr (VEB), Citomegalovirus (CMV). Se han descrito anteriormente ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos.

H. ANTÍGENOS ADECUADOS PARA SU USO EN VACUNAS DE ADOLESCENTES

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

I. ANTÍGENOS TUMORALES

Las composiciones de la divulgación pueden incluir uno o más antígenos tumorales o cancerosos. Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales que contienen péptidos, tales como un antígeno tumoral polipeptídico o antígenos tumorales glucoproteicos. Un antígeno tumoral puede ser también, por ejemplo, un

antígeno tumoral que contenga un sacárido, tal como un antígeno tumoral glucolípido o un antígeno tumoral gangliósido. Un antígeno tumoral puede ser además, por ejemplo, un antígeno tumoral que contiene un polinucleótido que expresa un antígeno tumoral que contiene un polipéptido, por ejemplo, una construcción de vector de ARN o una construcción de vector de ADN, tal como ADN plasmídico.

- 5 Los antígenos tumorales incluyen (a) antígenos tumorales que contiene polipéptidos, incluyendo polipéptidos (que pueden variar, por ejemplo, de 8 a 20 aminoácidos de longitud, aunque las longitudes fuera de este rango también son comunes), lipopolipéptidos y glucoproteínas, (b) antígenos tumorales que contienen sacáridos, incluyendo polisacáridos, mucinas, gangliósidos, glucolípidos y glucoproteínas y (c) polinucleótidos que expresan polipéptidos antigénicos.
- 10 Los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, (a) moléculas de longitud completa asociadas con células cancerosas, (b) homólogos y formas modificadas de los mismos, incluyendo moléculas con partes suprimidas, añadidas y/o sustituidas, y (c) fragmentos de los mismos. Pueden proporcionarse antígenos tumorales en forma recombinante. Los antígenos tumorales incluyen, por ejemplo, antígenos restringidos a clase I reconocidos por linfocitos CD8+ o antígenos restringidos a clase II reconocidos por linfocitos CD4+.
- 15 Se conocen en la técnica numerosos antígenos tumorales incluyen: (a) antígenos de cáncer-testículo tales como NY-ESO-1, Ssx2, SCP1 así como polipéptidos de la familia RAGE, BAGE, GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que pueden usarse, por ejemplo, para abordar melanoma, tumores de pulmón, de cabeza y cuello, NSCLC, de mama, gastrointestinal y de vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo p53 (asociado con diversos tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado con, por ejemplo, melanoma, cáncer pancreático y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, melanoma), caspasa-8 (asociado con, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, por ejemplo, cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina (asociado con, por ejemplo, melanoma), TCR (asociado con, por ejemplo, linfoma no de Hodgkin de linfocitos T), BCR-*abl* (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica),
- 20 triosafosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT, (c) antígenos sobreexpresados, por ejemplo, Galectina 4 (asociada con, por ejemplo, cáncer colorrectal), Galectina 9 (asociada con, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociada con, por ejemplo, diversas leucemias), anhidrasa carbónica (asociada con, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociada con, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociada con, por ejemplo, melanoma), HER-2/*neu* (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, de colon, de pulmón y ovárico), alfa-fetoproteína (asociada con, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociada con, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociada con, por ejemplo, cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica de telomerasa, MUC-1 (asociada con, por ejemplo, cáncer de mama y ovárico), G-250 (asociado con, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, de colon), y antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto
- 25 gastrointestinal tales como cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanoma-melanocitos tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa-1/TRP1 y proteína relacionada con tirosinasa-2/TRP2 (asociada con, por ejemplo, melanoma), (e) antígenos asociados a próstata tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados con por ejemplo cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados con mieloma y linfomas de linfocitos B, por ejemplo) y (g) otros antígenos tumorales, tales como antígenos que contienen polipéptido y sacárido incluyendo (i) glucoproteínas tales como sialil Tn y sialil Le^x (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama y cáncer de mama y colorrectal), así como diversas mucinas; pueden acoplarse glucoproteínas con una proteína vehículo (por ejemplo, MUC-1 puede acoplarse con KLH); (ii) lipopolipéptidos (por ejemplo, MUC-1 unida a un resto lipídico); (iii) polisacáridos (por ejemplo, hexasacárido sintético Globo H), que pueden estar
- 30 acoplados con una proteína vehículo (por ejemplo, con KLH), (iv) gangliósidos tales como GM2, GM12, GD2, GD3 (asociados con, por ejemplo, cerebro, cáncer de pulmón, melanoma), que también pueden acoplarse con proteínas vehículo (por ejemplo, KLH).

Otros antígenos tumorales incluyen p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos de virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos de papilomavirus humano (VPH), incluyendo E6 y E7, antígenos de virus de la hepatitis B y C, antígenos de virus linfotrópico de linfocito T humanos, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS.

55 Se describen estos así como otros componentes celulares por ejemplo en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2002/0007173 y referencias citadas en la misma.

Los antígenos que contienen polinucleótidos de acuerdo con la presente invención típicamente comprenden polinucleótidos que codifican antígenos polipeptídicos de cáncer tales como los enumerados anteriormente. Los antígenos que contienen polinucleótidos preferidos incluyen construcciones de vector ADN o ARN, tales como

60 vectores plasmídicos (por ejemplo, pCMV), que son capaces de expresar antígenos polipeptídicos de cáncer *in vivo*.

- Los antígenos tumorales pueden derivar, por ejemplo, de componentes celulares mutados o alterados. Después de la alteración, los componentes celulares ya no realizan sus funciones regulares, y por lo tanto la célula puede experimentar crecimiento descontrolado. Los ejemplos representativos de componentes celulares alterados incluyen ras, p53, Rb, proteína alterada codificada por el gen de tumor de Wilms, ubiquitina, mucina, proteína codificada por los genes de DCC, APC y MCC, así como receptores o estructuras de tipo receptor tales como neu, receptor de hormona tiroidea, receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de insulina, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el receptor del factor estimulante de colonias (CSF). Estos componentes celulares, así como otros, se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.693.522 y referencias citadas en la misma.
- Pueden usarse antígenos bacterianos y víricos, junto con las composiciones de la presente invención para el tratamiento de cáncer. En particular, pueden usarse proteínas vehículo, tales como CRM₁₉₇, toxoide del tétanos o antígeno de *Salmonella typhimurium* junto con/en conjugación con compuestos de la presente invención para el tratamiento de cáncer. Las terapias de combinación de antígenos de cáncer mostrarán eficacia y biodisponibilidad aumentada en comparación con terapias existentes.
- Puede encontrarse información adicional sobre antígenos de cáncer o tumorales, 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 (supl 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; Chau 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; Gaudemack (1996) Immunotechnology 2: 3-9; documento WO 91/02062; Patente de Estados Unidos n.º 6.015.567; WO 01/08636; WO 96/30514; Patente de Estados Unidos n.º 5.846.538; y Patente de Estados Unidos n.º 5.869.445.

Antígenos adicionales también pueden incluir una preparación de vesícula de membrana externa (OMV).

- Se proporcionan procedimientos de formulación y antígenos (especialmente antígenos tumorales) adicionales en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0202680. Véase también Patente de Estados Unidos n.º 6.884.435.

J. REFERENCIAS DE ANTÍGENOS

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

- 1 Publicación Internacional n.º WO 99/24578.
- 2 Publicación Internacional n.º WO 99/36544.
- 3 Publicación Internacional n.º WO 99/57280.
- 4 Publicación Internacional n.º WO 00/22430.
- 5 Tettelin y col. (2000) Science 287: 1809-1815.
- 6 Publicación Internacional n.º WO 96/29412.
- 7 Pizza y col. (2000) Science 287: 1816-1820.
- 8 Publicación Internacional n.º 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 Constantino y col. (1992) Vaccine 10: 691-698.
- 13 Constantino 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 Jedrzejas (2001) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 187-207.
- 17 Publicación Internacional n.º 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(Supl 3): S524-S527.
- 21 Publicación Internacional n.º WO 99/27105.
- 22 Publicación Internacional n.º WO 00/27994.
- 23 Publicación Internacional n.º WO 00/37494.
- 24 Publicación Internacional n.º WO 99/28475.
- 25 Bell (2000) Pediatr. Infect. Dis. J. 19: 1187-1188.
- 26 Iwarson (1995) APMIS 103: 321-326.
- 27 Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Supl: 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.
 5 31 Plotkin, S.A. y col., Vaccines, 4ª ed., W.B. Saunders Co. (2004)
 32 Del Giudice y col. (1998) Mol. Aspects Med. 19: 1-70.
 33 Publicación Internacional n.º WO 93/018150.
 34 Publicación Internacional n.º WO 99/53310.
 35 Publicación Internacional n.º WO 98/04702.
 36 Ross y col. (2001) Vaccine 19: 135-142.
 10 37 Sutter y col. (2000) Pediatr. Clin. North Am. 47: 287-308.
 38 Zimmerman y Spann (1999) Am. Fam. Physician 59: 113-118, 125-126.
 39 Dreensen (1997) Vaccine 15 Supl: S2-S6.
 40 MMWR Morb. Mortal Wkly Rep. (1998) 16: 47(1): 12, 19.
 41 McMichael (2000) Vaccine 19 Supl 1: S101-S107.
 15 42 Schuchat (1999) Lancet 353(9146): 51-56.
 43 Solicitudes 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.
 20 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 Supl 2: S28-S36.
 50 Buttery y Moxon (2000) J. R. Coil Physicians Long 34: 163-168.
 51 Ahmad y Chapnick (1999) Infect. Dis. Clin. North Am. 13: 113-133.
 25 52 Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47: 663-667.
 53 Patente Europea n.º EP 0 477 508B1.
 54 Patente de Estados Unidos n.º 5.306.492.
 55 Publicación Internacional n.º WO 98/42721.
 56 Cruse y col. (eds.) Conjugate Vaccines, particularmente vol. 10: 48-114.
 30 57 Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, 1ª ed., Academic Press (1996).
 58 Publicación de Patente Europea n.º 0 372 501.
 59 Publicación de Patente Europea n.º 0 378 881.
 60 Publicación de Patente Europea n.º 0 427 347.
 61 Publicación Internacional n.º WO 93/17712.
 35 62 Publicación Internacional n.º WO 98/58668.
 63 Publicación de Patente Europea n.º 0 471 177.
 64 Publicación Internacional n.º WO 00/56360.
 65 Publicación Internacional n.º WO 00/67161.

5. COMPONENTES COMPLEMENTARIOS OPCIONALES, INCLUYENDO ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS

- 40 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden incluir una amplia diversidad de componentes complementarios opcionales.

Dichos componentes complementarios pueden administrarse, por ejemplo, simultáneamente con las composiciones que contienen nanopartículas, por ejemplo, en la misma composición o en una composición separada. En otra realización, pueden administrarse componentes complementarios antes o después de la administración de las composiciones que contienen nanopartículas. Cuando se administran en la misma composición, los componentes complementarios pueden adsorberse en la superficie de las nanopartículas, inmovilizarse dentro de las nanopartículas, disolverse o dispersarse en solución mientras no están unidos a las nanopartículas, adsorberse en o inmovilizarse dentro de otro grupo de nanopartículas, y así sucesivamente.

Dichos componentes complementarios incluyen: (a) productos farmacéuticos tales como antibióticos y agentes antivíricos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, vasodilatadores, fármacos cardiovasculares, psicotrópicos, neurolépticos, antidepresivos, fármacos antiparkinsonianos, bloqueadores beta, bloqueadores del canal de calcio, inhibidores de bradiquinina, inhibidores de ACE, vasodilatadores, inhibidores de prolactina, esteroides, antagonistas hormonales, antihistamínicos, antagonistas de serotonina, heparina, agentes quimioterapéuticos, antineoplásicos y factores de crecimiento, incluyendo PDGF, EGF, KGF, IGF-1 e IGF-2, FGF, (b) hormonas incluyendo hormonas peptídicas tales como insulina, proinsulina, hormona del crecimiento, GHRH, LHRH, EGF, somatostatina, SNX-111, BNP, insulintropina, ANP, FSH, LH, PSH y hCG, hormonas esteroideas gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterona), hormona estimulante del tiroides, inhibina, colecistoquinina, ACTH, CRF, dinorfinas, endorfinas, endotelina, fragmentos de fibronectina, galanina, gastrina, insulintropina, glucagón, fragmentos de proteínas de unión a GTP, guanilina, las leucoquininas, magainina, mastoparanos, dermaseptina, sistemina, neuromedinas, neurotensina, pancreastatina, polipéptido pancreático, sustancia P, secretina, timosina (c) enzimas, (d) mediadores de la transcripción o traducción y (e) intermedios en rutas metabólicas, y (f) inmunomoduladores, tales como cualquiera de las diversas citocinas incluyendo interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3, interleucina 4 e interferón gamma.

En una realización preferida, las composiciones de la invención incluyen un adyuvante inmunológico. Los adyuvantes para su uso con la invención incluyen uno o más de los siguientes expuestos a continuación:

A. COMPOSICIONES QUE CONTIENEN MINERALES

5 Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos (véase, por ejemplo, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M. F. y Newman, M. J. eds.) (Nueva York: Plenum Press) 1995, Capítulos 8 y 9), o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso del fosfato), tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo gel, cristalina, amorfa) y con adsorción a la sal o las sales que se prefieran. 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 modo que la dosis de Al^{3+} está entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

15 En una realización, el adyuvante basado en aluminio para su uso en la presente invención es alumbre (sulfato potásico de aluminio ($AlK(SO_4)_2$)), o un derivado de 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.

20 Otro adyuvante basado en aluminio para su uso en formulaciones de vacuna de la presente invención es adyuvante de hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$) y oxihidróxido de aluminio cristalino ($AlOOH$), que es un adsorbente excelente, que tiene un área de superficie de aproximadamente $500\text{ m}^2/\text{g}$. En otra realización, el adyuvante basado en aluminio es adyuvante de fosfato de aluminio ($AlPO_4$) o hidroxifosfato de aluminio, que contiene grupos fosfato en lugar de algunos o todos los grupos hidroxilo de adyuvante de hidróxido de aluminio. Los adyuvantes de fosfato de aluminio preferidos proporcionados en el presente documento son amorfos y solubles en medios ácidos, básicos y neutros.

25 En otra realización, el adyuvante comprende tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio. En una realización más particular del mismo, el adyuvante tiene una mayor cantidad de fosfato de aluminio que de hidróxido de aluminio, tal como una relación de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o mayor de 9:1, en peso de fosfato de aluminio frente a hidróxido de aluminio. En otra realización, están presentes sales de aluminio en la vacuna 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.

30 En general, el adyuvante o los adyuvantes basados en aluminio preferidos, o relación de múltiples adyuvantes basados en aluminio, tales como fosfato de aluminio frente a hidróxido de aluminio se seleccionan por optimización de atracción electroestática entre moléculas de modo que el antígeno porte una carga opuesta al adyuvante al pH deseado. Por ejemplo, el adyuvante de fosfato de aluminio ($\text{iep} = 4$) adsorbe lisozima, pero no albúmina a pH 7,4. Si la albúmina fuera la diana, se seleccionaría adyuvante de hidróxido de aluminio ($\text{iep} 11,4$). Como alternativa, el pretratamiento de hidróxido de aluminio con fosfato reduce su punto isoeléctrico, haciéndolo un adyuvante preferido para antígenos más básicos.

B. EMULSIONES EN ACEITE

40 Las composiciones de emulsión en aceite y formulaciones adecuadas para su uso como adyuvantes (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo o componentes de la pared celular bacteriana) incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (Escualeno 5 %, Tween 80 0,5 % y Spa 0,5 %, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidificador). Véase documento WO 90/14837. Véase también, Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680; Frey y col. (2003) Vaccine 21: 4234-4237. MF59 se usa como el adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente del virus de la gripe FLUAD™.

45 Son adyuvantes particularmente preferidos para su uso en las composiciones emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Son emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en el presente documento emulsiones de escualeno/agua que contienen opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE, tales como emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene Escualeno 4-5 % p/v, Tween 80™ 0,25-1,0 % p/v (polioxietilensorbitán monooleato) y/o Span 85™ (sorbitán trioleato) 0,25-1,0 % y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión de aceite en agua submicrométrica conocida como "MF59" (documento WO 90/14837; Patente de Estados Unidos n.º 6.299.884; Patente de Estados Unidos n.º 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.) (Nueva York: Plenum Press) 1995, pp. 277-296). MF59 contiene Escualeno 4-5 % p/v (por ejemplo 4,3 %), Tween 80™ 0,25-0,5 % p/v y Span 85™ 0,5 % p/v y opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE, formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador tal como microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 $\mu\text{g}/\text{dosis}$, más preferentemente 0-250 $\mu\text{g}/\text{dosis}$ y más preferentemente, 0-

100 µg/dosis. Como se usa en el presente 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 indica una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 µg de MTP-PE por dosis, y así sucesivamente. MF69, otras emulsión de aceite en agua submicrométrica para uso en el presente documento, contiene Escualeno 4-3 % p/v, Tween 80™ 0,25 % p/v y Span 85™ 0,75 % p/v y opcionalmente MTP-PE. Otra emulsión más de aceite en agua submicrométrica más es MF75, también conocida como SAF, que contiene escualeno 10 %, Tween 80™ 0,4 %, polímero en bloque con pluronic 5 % L121, y thr-MDP, también microfluidificado en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP indica una formulación de MF75 que incluye MTP, tal como de 100 a 400 µg de MTP-PE por dosis.

Se describen en detalle emulsiones de aceite en agua submicrométricas, procedimientos para prepararlas y agentes inmunoestimulantes, tales como péptidos de muramilo, para uso en las composiciones, en el documento WO 90/14837; Patente de Estados Unidos n.º 6.299.884; y Patente de Estados Unidos n.º 6.451.325.

También pueden 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 en la invención. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos de triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia serie de especies vegetales. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol de Molina *Quillaia saponaria* se han estudiado ampliamente como adyuvantes. Las saponinas también pueden obtenerse en el mercado de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen adyuvante STIMULON® (Antigenics, Inc., Lexington, MA).

Se han purificado composiciones de saponina usando Cromatografía en Capa Fina de Alto Rendimiento (HP-TLC) y Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de Fase Inversa (RP-HPLC). Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Se desvela un procedimiento de producción de QS21 en la Patente de Estados Unidos n.º 5.057.540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol (véase el documento WO 96/33739).

Pueden usarse combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas únicas denominadas Complejos Inmunoestimulantes (ISCOM). Los ISCOM típicamente incluyen también un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de Quil A, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en los documentos EP 0 109 942, WO 96/11711 y WO 96/33739. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de un detergente o detergentes adicionales. Véase documento WO 00/07621.

Puede encontrarse una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina en Barr y col. (1998) Adv. Drug Del. Rev. 32: 247-271. Véase también Sjolander y col. (1998) Adv. Drug Del. Rev. 32: 321-338.

D. VIROSOMAS Y PARTÍCULAS DE TIPO VÍRICO (VLP)

Los virosomas y Partículas de Tipo Vírico (VLP) también son adecuados como adyuvantes. Estas estructuras contienen en general una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Son en general no patógenos, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma vírico nativo. Las proteínas víricas pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas de virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la Hepatitis B (tales como proteínas del núcleo de la cápsida), virus de la Hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, Rotavirus, virus de Fiebre Aftosa, Retrovirus, virus Norwalk, virus del Papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Qβ (tales como proteínas de cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal como proteína p1 de retrotransposición Ty). Se analizan VLP 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 analizan adicionalmente en, por ejemplo, Gluck y col. (2002) Vaccine 20: B10-B16. Se usan virosomas de la gripe reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV) como el sistema de suministro de antígenos subunitarios en el producto trivalente intranasal INFLEXAL™ (Mischler y Metcalfe (2002) Vaccine 20 Supl 5: B17-B23) y el producto INFLUVAC PLUS™.

E. DERIVADOS BACTERIANOS O MICROBIANOS

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

(1) Derivados no tóxicos de lipopolisacárido (LPS) enterobacteriano: dichos 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 o 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. Dichos “partículas pequeñas” de 3dMPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros (véase documento EP 0 689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados de aminoalquil glucoasaminida fosfato, por ejemplo, RC-529. Véase Johnson y col. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2273-2278.

(2) Derivados de Lípido A: los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. 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 inmunoestimuladores: los oligonucleótidos inmunoestimuladores o moléculas poliméricas adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia que contiene una citosina no metilada seguida de guanosina y unida por un enlace fosfato). También se ha mostrado que el ARN bicatenario bacteriano u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimulantes. Los CpG pueden incluir modificaciones de nucleótidos/análogos tales como modificaciones de fosforioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Opcionalmente, la guanosina puede reemplazarse con un análogo tal como 2'-desoxi-7-desazaguanosina. Véase Kandimalla y col. (2003) *Nucl. Acids Res.* 31(9): 2393-2400; documentos WO 02/26757; y WO 99/62923 para ejemplos de posibles sustituciones análogas. El efecto adyuvante de oligonucleótidos de CpG se analiza adicionalmente en Krieg (2003) *Nat. Med.* 9(7): 831-835; McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32: 179-185; documentos WO 98/40100; Patente de Estados Unidos n.º 6.207.646; Patente de Estados Unidos n.º 6.239.116; y Patente de Estados Unidos n.º 6.429.199.

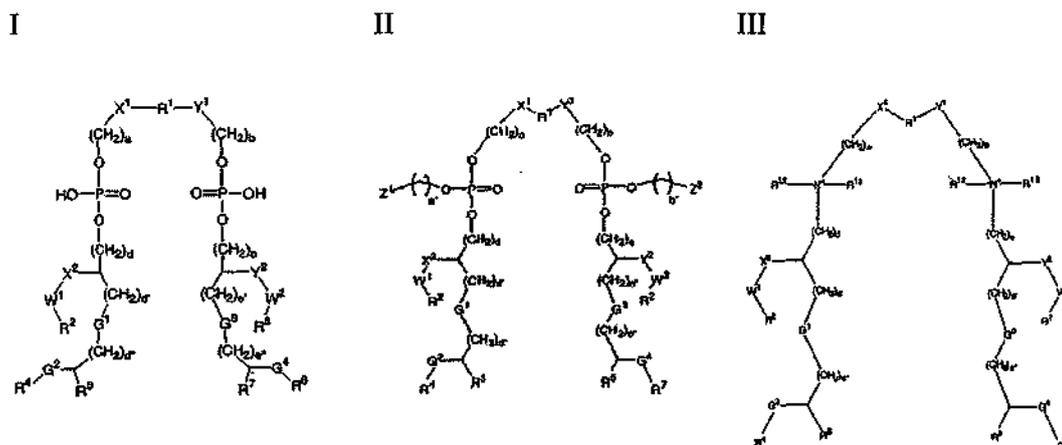
La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Véase Kandimalla y col. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* 31 (parte 3): 654-658. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria de Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN CpG-B. Se analizan ODN CpG-A y CpG-B 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 CpG-A.

Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para reconocimiento de receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias oligonucleotídicas CpG en sus extremos 3' para formar “inmunómeros”. Véase, 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 WO 03/035836.

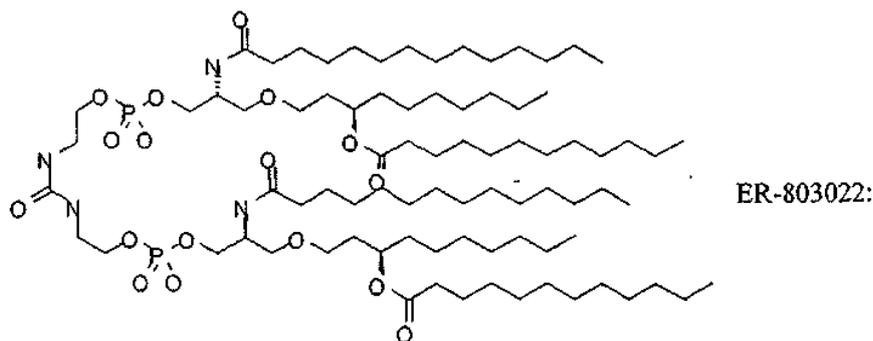
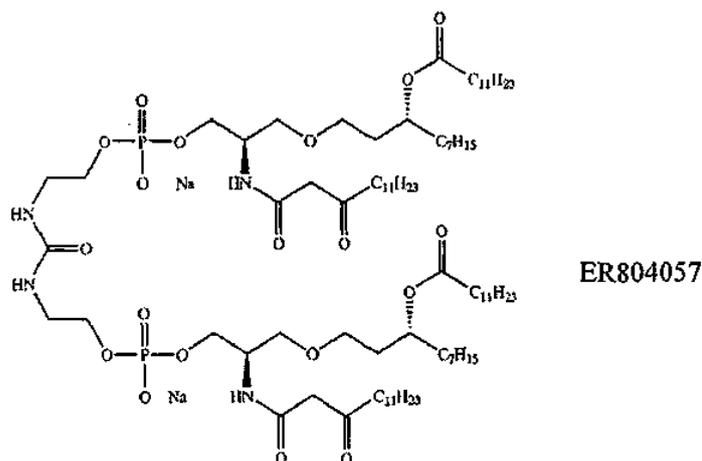
Los oligonucleótidos inmunoestimulantes y moléculas poliméricas también incluyen estructuras de cadena principal polimérica alternativas tales como cadenas principales de polivinilo (Pitha y col. (1970) *Biochem. Biophys. Acta* 204(1): 39-48; Pitha y col. (1970) *Biopolymers* 9(8): 965-977), y cadenas principales de morfolina (Patente de Estados Unidos n.º 5.142.047; Patente de Estados Unidos n.º 5.185.444). Se conocen en la técnica una diversidad de otros análogos de polinucleótidos con carga y sin carga. Se conocen en la técnica numerosas modificaciones de cadena principal, incluyendo enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos y carbamatos) y enlaces con carga (por ejemplo, fosforioatos y fosforoditioatos).

(4) Toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de las mismas: pueden usarse toxinas de ribosilación de ADP bacterianas y derivados detoxificados de las mismas como adyuvantes en la invención. Preferentemente, la proteína deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina termolábil de *E. coli* “LT”), cólera (“CT”) o tosferina (“PT”). El uso de toxinas que ribosilan ADP detoxificadas como adyuvantes de mucosa se describen en el documento WO 95/17211 y como adyuvantes parentales en el documento WO 98/42375. Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72 y LTR192G. El uso de toxinas que ribosilan ADP y derivados detoxificados 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 que ribosilan ADP expuestas en Domenighini y col. (1995) *Mol. Microbiol.* 15(6): 1165-1167.

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



como se define en el documento WO 03/011223, tales como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', 'ER 803022' o 'ER 804057' por ejemplo:



5

F. INMUNOMODULADORES HUMANOS

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

10 G. BIOADHESIVOS Y MUCOADHESIVOS

También pueden usarse como adyuvantes bioadhesivos y mucoadhesivos. Los 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 ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También pueden usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención (véase documento WO 99/27960).

15

H. LIPOSOMAS

Se describen ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes en la Patente de Estados Unidos n.º 6.090.406; Patente de Estados Unidos n.º 5.916.588; y Publicación de Patente de EP n.º EP 0 626 169.

5 I. FORMULACIONES DE POLIOXIETILEN ÉTER Y POLIOXIETILEN ÉSTER

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

Se seleccionan polioxietilen éteres preferidos del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril éter (lauret 9), polioxietilen-9-esteoril éter, polioxietilen-8-esteoril éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter y polioxietilen-23-lauril éter.

J. POLIFOSFACENO (PCPP)

15 Se describen formulaciones de PCPP adecuadas para su uso como adyuvantes, 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. PÉPTIDOS DE MURAMILO

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

L. COMPUESTOS DE IMIDAZOQUINOLINA

Los ejemplos de compuestos de imidazoquinolina adecuados para su uso como adyuvantes incluyen imiquimod y sus análogos, que se describen adicionalmente en Stanley (2002) Clin. Exp. Dermatol. 27(7): 571-577; Jones (2003) Curr. Opin. Investig. Drugs 4(2): 214-218; y Patentes de Estados Unidos n.º 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.

M. COMPUESTOS DE TIOSEMICARBAZONA

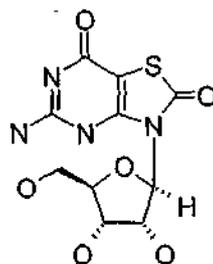
Los ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona adecuados para su uso como adyuvantes, así como procedimientos de formulación, fabricación y exploración de dichos compuestos, incluyen los descritos en el documento WO 04/60308. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células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

N. COMPUESTOS DE TRIPTANTRINA

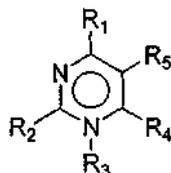
Los ejemplos de compuestos de triptantrina adecuados para su uso como adyuvantes, así como procedimientos para formular, fabricar y explorar dichos compuestos, incluyen los descritos en el documento WO 04/64759. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- α .

O. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS

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

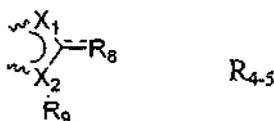


40 y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en la Patente de Estados Unidos n.º 6.924.271; la Publicación de Estados Unidos n.º 2005/0070556; y la Patente de Estados Unidos n.º 5.658.731; (f) un compuesto que tiene la fórmula:

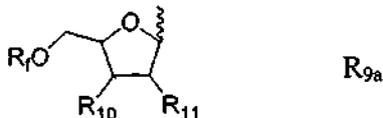


en la que:

- 5 cada R_1 y R_2 es, independientemente, H, halo, $-NR_aR_b$, $-OH$, 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, o es 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_4 y R_5 es, independientemente, H, halo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, $-C(O)R_d$, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, o se unen juntos para formar un anillo de 5 miembros como en R_{4-5} :



- 10 consiguiéndose la unión en los enlaces indicados mediante un \sim
 cada X_1 y X_2 es, independientemente, N, C, O, o S;
 R_8 es H, halo, $-OH$, alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , alquino C_{2-6} , $-OH$, $-NR_aR_b$, $-(CH_2)_n-O-R_c$, $-O$ -(alquilo C_{1-6}), $-S(O)_pR_e$ 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:

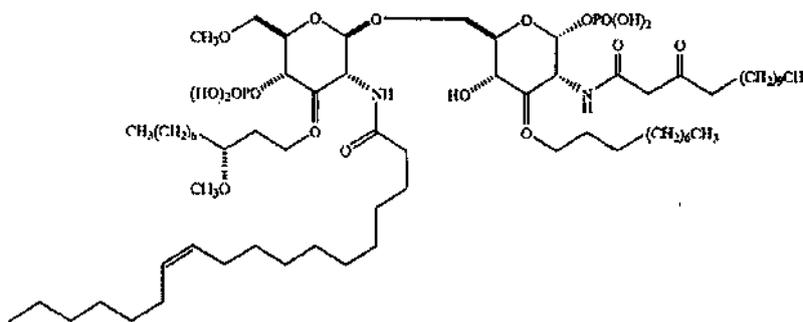


- 15 consiguiéndose la unión en el enlace indicado mediante un \sim
 cada R_{10} y R_{11} es, independientemente, H, halo, alcoxi C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} sustituido, $-NR_aR_b$ u $-OH$;
 cada R_a y R_b es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, $-C(O)R_d$, arilo C_{6-10} ;
 cada R_c es, independientemente, H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido;
 20 cada R_d es, independientemente, H, halo, 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;
 25 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, o 3;
 cada p es, independientemente, 0, 1, o 2; o

- 30 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 UNIDOS A UNA ESTRUCTURA BÁSICA ACÍCLICA QUE CONTIENE FOSFATO

Los adyuvantes que contienen lípidos unidos a una estructura básica acíclica que contiene fosfato incluyen el antagonista de TLR4, E5564 (Wong y col. (2003) J. Clin. Pharmacol. 43(7):735-742; US2005/0215517):



Q. INMUNOPOTENCIADORES DE MOLÉCULA PEQUEÑA (SMIPS)

Los SMIP incluyen:

- 5 • 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;
- 10 • 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;
- 15 • 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol;
- acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]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;
- 20 • 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.

25 R. PROTEASOMAS

Un adyuvante es una preparación de proteasoma proteica de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram negativa en combinación con una preparación de liposacáridos derivada de una segunda bacteria Gram negativa, en la que las preparaciones de liposacáridos y proteasomas de proteínas de membrana externa forman un complejo adyuvante no covalente estable.

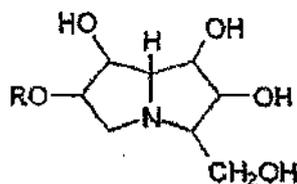
- 30 Dichos complejos incluyen "IVX-908", un complejo comprendido por membrana externa y lipopolisacáridos de *Neisseria meningitidis*. Se han usado como adyuvantes para vacunas de la gripe (documento WO 02/072012).

S. OTROS ADYUVANTES

Se desvelan otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes 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)).

Las sustancias adyuvantes útiles adicionales incluyen:

- Metil inosin 5'-monofosfato ("MIMP") (Signorelli y Hadden (2003) Int. Immunopharmacol. 3(8): 1177-1186).
- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada (documento WO 2004/064715), tal como uno que tiene la fórmula:



40

en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo sencillos o ramificados, no sustituidos o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal o derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-di-*epi*-casuarina.

- 5 • 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, incluyendo: compuestos de Acilpiperazina, compuestos de Indoleidona, compuestos de Tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de Benzociclodiona, compuestos de Aminoazavinilo, compuestos de Aminobencimidazol quinolinona (ABIQ) (Patente de Estados Unidos n.º 6.605.617; documento WO 02/18383), compuestos de Hidrafalamida, compuestos de Benzofenona, compuestos de Isoxazol, compuestos de Esterol, compuestos de Quinazolinona, compuestos de Pirrol (documento WO 2004/018455), compuestos de Antraquinona, compuestos de Quinoxalina, compuestos de Triazina, compuestos de Pirazalopirimidina y compuestos de Benzazol (documento WO03/082272).
- 10 • Loxoribina (7-*alil*-8-oxoguanosina) (Patente de Estados Unidos n.º 5.011.828).
- 15 • Una formulación de un lípido catiónico y un colípido (habitualmente neutro), tal como aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanaminio bromuro-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio bromuro-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren formulaciones que contienen sales de (\pm)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(sin-9-tetradeceniloxi)-1-propanaminio (Patente de Estados Unidos n.º 6.586.409).

20 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvante pueden usarse 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 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 esterol) (documento WO 98/57659); (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (véase documentos EP 0 835 318; EP 0 735 898; y EP 0 761 231); (6) SAF, que contiene Escualeno 10 %, Tween 80 0,4 %, polímero en bloque de pluronic 5 % L121 y thr-MDP, bien microfluidificado en una emulsión submicrométrica o agitado vorticialmente para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor; (7) sistema de adyuvante de Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene Escualeno 2 %, Tween 80 0,2 % y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), trehalosa dimicolato (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 no tóxico de LPS (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).

35 Las sales de aluminio y MF59 son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas de la gripe inyectables. Las toxinas bacterianas y bioadhesivos son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas suministradas por vía mucosa, tales como vacunas nasales.

6. ADMINISTRACIÓN

40 Una vez formuladas (y resuspendidas, si es necesario), las composiciones de nanopartículas de la invención pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección (que puede ser sin aguja). A este respecto, las composiciones de nanopartículas pueden proporcionarse liofilizadas en un vial u otro recipiente que se proporciona con un septo u otro medio adecuado para proporcionar un medio de resuspensión (por ejemplo, Agua para Inyección) y para extraer la suspensión resultante. También puede proporcionarse para inyección una jeringa adecuada.

45 Las composiciones pueden inyectarse por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intraarterial o por vía intraperitoneal, por ejemplo. Otros modos de administración incluyen administración nasal, mucosa, intraocular, rectal, vaginal, oral y pulmonar, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas.

50 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden usarse para suministro dirigido específico de sitio. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones puede usarse para dirigir al pulmón, el hígado, el bazo, la circulación sanguínea o la médula ósea.

Las composiciones de nanopartículas de la presente invención generalmente incluirán uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, pueden usarse vehículos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol. Pueden estar presentes otros excipientes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes biológicas. Un tampón biológico puede ser prácticamente cualquier solución que sea farmacológicamente aceptable y que proporciona a la formulación el pH deseado, es decir, un pH en el intervalo fisiológico. Los ejemplos incluyen solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada con Hank. Dependiendo de la forma de dosificación final, también pueden introducirse otros excipientes conocidos en la técnica, incluyendo aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, emolientes (potenciadores de flujo), ayudas de compresión, colorantes, edulcorantes,

conservantes, agentes de suspensión/dispersión, formadores de película/revestimientos, saporíferos y tintas de impresión.

El tratamiento puede realizarse de acuerdo con un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis. Un programa de múltiple dosis es uno en el que puede proporcionarse un ciclo de administración primario, por ejemplo, con 1-10 dosis separadas, seguido de otras dosis proporcionadas en intervalos temporales posteriores, elegidos para mantener y/o reforzar la respuesta terapéutica, por ejemplo a 1-4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una dosis o dosis posteriores después de varios meses. El régimen de dosificación también se determinará, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del criterio del practicante.

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

7. KITS

La presente invención abarca kits que pueden simplificar la administración de cantidades apropiadas de principios activos a un sujeto. Un kit típico de la invención comprende una forma de dosificación unitaria de una composición de nanopartículas liofilizada de la invención, preferentemente en un recipiente sellado. Los kits de la invención pueden comprender además vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse para administrar uno o más principios activos. Por lo tanto, en una realización particular, el kit comprende además un recipiente sellado de un vehículo adecuado en el que la composición de nanopartículas puede disolverse para formar una solución estéril sin partículas que es adecuada para la administración, y un dispositivo que puede usarse para administrar el principio activo. Los ejemplos de dichos dispositivos incluyen jeringas, bolsas de goteo, parches e inhaladores.

C. EXPERIMENTAL

A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos. Todas las nanopartículas en las que el tensioactivo no es PVA quedan fuera del alcance reivindicado.

Se han realizado intentos de asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debería tenerse en cuenta, por supuesto, algún error y desviación experimental.

La sacarosa, manitol, glucosa, trehalosa, dextrano (PM = 70.000), Albúmina de Suero Bovino (BSA) y ovoalbúmina, clara de huevo de pollo (ovoalbúmina u OVA), polivinilpirrolidona (PM= 40.000), carboximetilcelulosa (PM=90.000), Pluronic F68 (también conocido como poloxámero 188) y todos los otros productos químicos fueron de Sigma Chemicals (St. Louis, MO). El alcohol polivinílico (PM= 15.000) fue de ICN Biomedicals (ahora MP Biomedicals, Irvine, CA). La acetona fue de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ).

Los antígenos de la gripe (FluCC) y el antígeno de serotipo B de *Neisseria meningitidis* (Men B 287) fueron de Chiron Vaccines. El candidato a vacuna del serotipo B de *Neisseria meningitidis* recombinante derivada de *Escherichia coli*, Men B 287 (Chiron Vaccines, IRIS, Chiron, S.r.l., Siena, Italia) se aisló y purificó como se ha descrito previamente (M. Comanducci, y col. (2002) J. Exp. Med. 195: 1445-1454). GBS1 fue de Chiron Vaccines y se identificó y purificó como se ha descrito previamente (D. Maione y col. (2005) Science 309: 148-150).

Ejemplo 1. Preparación de nanopartículas y micropartículas

Con el procedimiento de nanoprecipitación (véase Fessi, H., F. Puisieux, y J. P. Devissaguet, "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules," Patente Europea n.º 0274961B1, correspondiente a Devissaguet y col. Patente de Estados Unidos n.º 5.049.322), se crearon partículas que variaban en tamaño de 100 nm a 500 nm. Específicamente, se crearon partículas de ~100 a ~120 nm disolviendo RG503, un polímero de PLG que tiene una relación molar de lactida/glicólido 50:50 y un peso molecular de ~30 kDalton, disponible de Boehringer Ingelheim, en acetona (0,5 % p/vol) y añadiendo esta solución en gotas a un volumen igual de agua con agitación magnética a 600 rpm y permitiendo que la acetona se evapore. En un caso se empleó RG 752, un PLG que tiene una relación molar de lactida/glicólido 75:25 y un peso molecular de ~20 kDalton, disponible de Boehringer Ingelheim.

Se crearon nanopartículas de tamaños diferentes ajustando la concentración de PLG inicial en la fase orgánica o cambiando el disolvente de acetona a THF. Aumentando la concentración de PLG se aumentó el tamaño de partículas, mientras que el cambio de acetona a THF también aumentó el tamaño de partículas. Ha habido varios informes en la bibliografía que analizaron los parámetros que permiten la preparación de nanopartículas de diversos tamaños (P. D. Scholes y col. (1993) J. Control Release 25: 145-153; L. Peltonen y col. (2002) AAPS PharmSciTech 3: E32; P. Wehrle y col. (1995) Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut. 41: 19-26). Por ejemplo, se prepararon partículas pequeñas (~120 nm) con 25 ml de PLG 0,5 % (p/v) en acetona añadida a 25 ml de agua. Se prepararon partículas de tamaño intermedio (~180 nm) con 25 ml de PLG 0,5 % (p/v) en tetrahidrofurano (THF) añadido a 25 ml de agua. Se prepararon partículas grandes (~230 nm) con 12,5 ml de PLG 4 % (p/v) en acetona añadida a 40 ml de

agua.

Se prepararon micropartículas con dioctilo sulfosuccinato sódico (DSS) 0,05 %, de tamaño ~1 µm, mediante una emulsión doble previamente establecida, procedimiento de evaporación de disolvente (véase Singh, M., y col. (2004) J. Pharm. Sci., 93(2): 273-282), que difiere significativamente del procedimiento de preparación de nanopartículas. Específicamente, se usó una técnica de emulsión de agua/aceite/agua para formar las micropartículas. El PLG se disolvió en diclorometano (DCM) (6 % p/volumen) y se añadió a una fase acuosa de solución salina tamponada con fosfato (agua:aceite 1:4) (v:v) y se homogeneizó durante 2 minutos. Esta emulsión de agua en aceite se añadió después a agua que contenía DSS (emulsión de agua en aceite:agua 1:4) (v:v) y se homogeneizó en un baño de hielo a alta velocidad durante 10 minutos. La suspensión resultante se agitó de forma magnética para permitir que el DCM se evaporara. Las micropartículas tenían un tamaño promedio (D(volumen, 50 %)) de 0,83 µm y un (D(volumen, 90 %)) de 1,24 µm.

Una ventaja para las nanopartículas en comparación con las micropartículas fue la facilidad de preparación. El procedimiento de nanopartículas se basó en una única fase y no necesitó homogeneización de alto corte, solamente agitación magnética. El tipo de disolvente orgánico usado con los dos procedimientos fue diferente. El procedimiento de nanopartículas usó acetona, en comparación con el más tóxico DCM usado en el procedimiento de micropartículas. La Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) clasifica DCM como un disolvente de Clase 2 y limita su uso en productos farmacéuticos. La acetona es disolvente de Clase 3 y la FDA tiene límites mayores sobre la cantidad de disolvente residual permisible.

Ejemplo 2. Esterilización por filtración de nanopartículas

Como se ha indicado previamente, una ventaja de las nanopartículas más pequeñas es que pueden esterilizarse por filtración después de la preparación de partículas. En este Ejemplo, se prepararon nanopartículas en el intervalo de 110 a 230 nm y se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,2 µm Pall Acrodisc. El tamaño de las nanopartículas se midió con un Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Reino Unido) para partículas de menos de 500 nm. Se midieron las partículas mayores y agregados con un Horiba LA-930 (Irvine, CA, Estados Unidos). Este instrumento se basa en dispersión de la luz estática para determinar el tamaño de partículas, mientras que Zetasizer usó dispersión de la luz dinámica para detectar las partículas más pequeñas.

El potencial zeta se midió con el Zetasizer con una concentración diluida típica de 0,2 mg/ml de PLG es un diluyente específico. Para las nanopartículas de 120 nm, el potencial zeta en Citrato Sódico 10 mM fue -39 m V y en Fosfato Sódico 10 mM, pH=7,0, fue de -48 mV. El potencial zeta estuvo en el intervalo esperado para el PLG aniónico.

Se midió la concentración de PLG antes y después de la esterilización por filtración colocando 1 ml de cada muestra, que se liofilizó, en un vial prepesado, y se determinó el contenido de PLG por la masa restante. En general, solamente las nanopartículas más pequeñas (~120 nm) tenían concentraciones de PLG comparables a los valores previos a la esterilización por filtración, sin observarse sustancialmente ningún cambio en el tamaño de las partículas. Véase Tabla 1. Los niveles de endotoxina (LAL) de las nanopartículas esterilizadas por filtración estaban en el intervalo de 0,48-0,96 UE/ml. Como puede verse, solamente las micropartículas pequeñas (~120 nm) tenían concentraciones de PLG comparables a los valores previos a la esterilización por filtración, sin ningún cambio en el tamaño de partículas. El tamaño de las partículas de 181 nm esterilizadas por filtración no se determinó.

TABLA 1

PLG	Antes de la Esterilización por Filtración		Después de la Esterilización por Filtración	
	Tamaño (nm)	Contenido de PLG (mg/ml)	Tamaño (nm)	Contenido de PLG (mg/ml)
RG503	124,3	5,3	119,9	4,9
RG503	118,0	6,0	116,1	5,3
RG503	181,4	5,3	-	0,5
RG752	158,6	4,9	148,3	2,6
RG503	122,4	5,9	119,7	5,4

Ejemplo 3. Resuspensión de nanopartículas después de liofilización

Una desventaja de las nanopartículas en relación con micropartículas es que, después de la liofilización, no se resuspenden necesariamente hasta el tamaño que tenían antes de la liofilización. En el presente ejemplo, se pipetearon tensioactivos y/o agentes crioprotectores en las suspensiones de nanopartículas inmediatamente antes de la liofilización. Las suspensiones se colocaron en viales de vidrio y se congelaron a -80 °C durante 30 minutos. La liofilización se llevó a cabo en un sistema de liofilización Labconco, Freezone 4.5 (Kansas City, MO, Estados Unidos)

ES 2 564 241 T3

actuando a -49 °C y en vacío menor de 133×10^{-4} kPascales. Después de la liofilización, se resuspendieron 5-10 mg de nanopartículas en 1 ml de agua y se midieron. Antes de la medición del tamaño de las nanopartículas, la muestra se diluyó 50 µl en 2 ml.

- 5 Como se ve a partir de la Tabla 2 posterior, pueden añadirse excipientes que permiten que se resuspendan las nanopartículas liofilizadas, sin un aumento inaceptable del tamaño (por ejemplo, sin agregación significativa). Por ejemplo, puede usarse un tensioactivo para resuspender las nanopartículas (por ejemplo, PVA, 131 % p/p (p de PVA/p de PLG)). Además, la cantidad de tensioactivo puede reducirse usando combinaciones de tensioactivos y agentes crioprotectores. Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen PVA 10 % (p/p) PVA con sacarosa 3 % (p/vol) y manitol 4 % (p/vol), PVA 10 % (p/p) con trehalosa 5 % (p/vol) y manitol 2,5 % (p/vol) y DSS 0,5 % (p/p) con trehalosa 5 % (p/vol) y manitol 2,5 % (p/vol).
- 10

TABLA 2

Excipiente	Tamaño Inicial (nm)	Tamaño después de la liofilización (nm)	Comportamiento
Ninguno	125	113461	agregado
sacarosa 10 % (p/v)	127	25666	agregado
sacarosa 4 % (p/v) + manitol 3 % (p/v)	125	64659	agregado
DSS 0,5 % (p/p)	~ 120	102000	agregado
DSS 5 % (p/p)	~ 120	127,000	agregado
DSS 0,5 % (p/p)/sacarosa 4 % + manitol 3 % (p/v)	112	25237	agregado
DSS 0,05 % (p/p)/trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	~ 120	37000	agregado
DSS 0,1 % (p/p)/trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	~ 120	18000	agregado
DSS 0,25 % (p/p)/trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	~ 120	22000	agregado
manitol 10 % (p/v)	127	26100	agregado
dextrano 10 % (p/v)	127	21359	agregado
glucosa 5 % (p/v)	~ 120	28000	agregado
trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	~ 120	55000	agregado
Pluronic F-68 100 % (p/p)	~ 120	64000	agregado
Pluronic F-68 131 % (p/p)	~ 120	74000	agregado
Pluronic F-68 10 % (p/p)/sacarosa 4 % + manitol 3 % (p/v)	~ 120	61000	agregado
CMC 66 % (p/p)	127	26572	agregado
CMC 131 % (p/p)	~ 120	14000	agregado
CMC 10 % (p/p)/sacarosa 4 % + manitol 3 % (p/v)	~ 120	25000	agregado
PVP 66 % (p/p)	127	25758	agregado
PVP 100 % (p/p)	~ 120	133	resuspendido
PVP 131 % (p/p)	~ 120	137	resuspendido
PVP 10 % (p/p)/sacarosa 4 % + manitol 3 % (p/v)	~ 120	30000	agregado
PVA 10 % (p/p)	127	18507	agregado
PVA 66 % (p/p)	127	441	agregado
PVA 100 % (p/p)	~ 120	148	resuspendido
PVA 131 % (p/p) (PVA 5 mg/ml)	127	155	resuspendido

(continuación)

Excipiente	Tamaño Inicial (nm)	Tamaño después de la liofilización (nm)	Comportamiento
PVA 10 % (p/p) / sacarosa 4 % + manitol 3 % (p/v)	121	146	resuspendido
DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	112	143	resuspendido
PVA 10 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	122	140	resuspendido

Más particularmente, los azúcares por sí solos dieron como resultado agregación de nanopartículas. El tensioactivo por sí solo (es decir, PVA) permitió la resuspensión de nanopartículas. Se consiguieron resultados de resuspensión mejorados con formulaciones que contenían azúcares y tensioactivo. Los azúcares cumplen adicionalmente dos funciones importantes para una formulación de vacuna liofilizada. Con antígenos proteicos, se ha mostrado que la sacarosa y la trehalosa ayudan a estabilizar las proteínas durante el proceso de liofilización (J. F. Carpenter y col. (1997) Pharm. Res. 14: 969-975). El manitol es un agente de masificación que se usa como armazón para evitar el colapso de la torta durante el proceso de liofilización (X. Tang y M. J. Pikal (2004) Pharm. Res. 21: 191-200). Con la adición de azúcares apropiados, por ejemplo, sacarosa y manitol o trehalosa y manitol, la cantidad de PVA necesaria se redujo al 10 % (p/p). Con una formulación típica que contiene de 10 a 20 mg/ml de PLG esto es equivalente a 1-2 mg/ml de PVA. Con CMC 10 % (p/p), PVP o Pluronic F68 y sacarosa y manitol, se agregaron las partículas. La combinación y concentración de azúcares satisfacen el requisito de isotonicidad, forman una torta elegante después de la liofilización, y sirven para estabilizar el antígeno proteico. Las osmolaridad de un producto de vacuna debería estar en el intervalo de 280 a 330 mOsm/l. Las concentraciones de sacarosa y manitol o trehalosa y manitol usadas con el PVA están en el intervalo de osmolaridad apropiado y conducen a una torta liofilizada que es del mismo tamaño que el volumen líquido inicial. También se descubrió que DSS proporciona resuspensión adecuada a una concentración suficiente en trehalosa y manitol.

También se analizaron nanopartículas grandes (221 nm) y pequeñas (122 nm) tras la resuspensión usando diversas concentraciones de PVA (PLG p/p) más sacarosa 4 % (p/v) y manitol 3 % manitol (p/v). El contenido de PLG fue de 5 mg/ml. La cantidad de alcohol polivinílico (PVA) asociado con el sedimento frente a libre en solución se midió separando en primer lugar la fase sólida de la suspensión por centrifugación (Eppendorf 5415D, 20 minutos a 13200 rpm) y retirando la fracción del sobrenadante. Ambas mezclas se hidrolizaron durante una noche en NaOH 2 N, se neutralizó el pH y se analizó una alícuota de la solución transparente siguiendo un procedimiento previamente descrito (J. H. Finley (1961) Anal. Chem. 33: 1925-1927); E. Allemann y col. (1998) Adv. Drug Delivery Rev. 34: 171-189), en el que se mezclaron 0,2 ml de la solución de ensayo con 1,00 ml de ácido bórico 4 % p/p y 0,20 ml de una solución de yodo (I₂ 1,27 % p/p y KI 2,5 % p/p) y la absorbancia se leyó a 644 nm y se comparó con una curva de calibración con linealidad > 0,995 (R²).

Los resultados se presentan en la Tabla 3. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que el PVA adicional necesario para resuspender las nanopartículas más pequeñas se debe más probablemente principalmente a su mayor área de superficie en comparación con las nanopartículas mayores, aunque también hubo probablemente un efecto debido a la partición del PVA entre la superficie y la solución.

TABLA 3

Nanopartículas Pequeñas (122 nm)			
Concentración de PVA	PVA total (µg de PVA/mg de PLG)	tamaño final	sedimento (µg de PVA/mg de PLG)
PVA 1 % (p/p)	10	47 µm	8
PVA 3 % (p/p)	30	24 µm	13
PVA 5 % (p/p)	50	15 µm	18
PVA 7 % (p/p)	70	393 nm	25
PVA 10 % (p/p)	100	149 nm	35
Nanopartículas Grandes (221 nm)			
Concentración de PVA	PVA total (µg de PVA/mg de PLG)	tamaño final	sedimento (µg de PVA/mg de PLG)
PVA 1 % (p/p)	10	17 µm	6
PVA 3 % (p/p)	30	260 nm	11
PVA 5 % (p/p)	50	243 nm	17
PVA 7 % (p/p)	70	241 nm	20
PVA 10 % (p/p)	100	240 nm	24

Ejemplo 4. Eficacia de absorción de proteínas para nanopartículas y micropartículas

Para la misma masa de partículas, las nanopartículas tienen un área de superficie mucho mayor en comparación con micropartículas. En este caso, las nanopartículas permiten una carga proteica más eficaz por masa de partícula en comparación con las micropartículas de 1 μm . Esto permite el suministro de la misma cantidad de antígeno proteico con menos PLG (y en consecuencia menos tensioactivo total).

Se añadió un antígeno modelo, albúmina de suero bovino (BSA), a la suspensión de nanopartículas o micropartículas con el tampón apropiado y se agitó en un balancín de laboratorio a 4 °C durante una noche. Las nanopartículas se separaron por centrifugación. Los sedimentos se hidrolizaron durante una noche a 25 °C con NaOH 0,2 N. La concentración de proteínas en el sobrenadante y en el sedimento hidrolizado se determinó por un ensayo de BCA™ (dePierce, Rockford, IL, Estados Unidos). Como se muestra en la FIGURA 1, BSA mostró eficacia de carga aumentada en las nanopartículas, en comparación con las micropartículas, a dos valores de pH, después de 24 horas de adsorción. La eficacia de carga aumentada permitió hasta 3,5 % de adsorción (p de BSA / p de PLG) en las nanopartículas, en comparación con una carga máxima de 1,5 % (p de BSA/ p de PLG) para las micropartículas.

Esta adsorción potenciada fue particularmente notable a pH = 7, cuando las micropartículas eran esencialmente resistentes a la adsorción, mientras que las nanopartículas permitieron que se produjera adsorción significativa. Por lo tanto, puede verse que las nanopartículas permitieron adsorción significativa en condiciones de adsorción de otro modo desfavorables. Esto puede ser útil para formulaciones de partículas en las que es necesario que el pH se ajuste a un valor particular, por ejemplo, para potenciar la estabilidad de los antígenos, entre otras razones.

Un antígeno de *Neisseria meningitidis* serotipo B (es decir, Men B 287) también se adsorbió en nanopartículas y micropartículas. En particular, el antígeno Men B 287 se añadió a la suspensión de nanopartículas o micropartículas en tampón citrato 10 mM a pH = 5,0 y se agitó en un balancín de laboratorio a 4 °C durante una noche. Las micropartículas se separaron por centrifugación. Los sedimentos se hidrolizaron durante una noche a 25 °C con NaOH 0,2 N. Las concentraciones de proteínas en el sobrenadante y en el sedimento hidrolizado se determinaron por un ensayo de BCA™ (Pierce). Como se ve a partir de la FIGURA 2, como con la BSA, las nanopartículas presentaron adsorción potenciada de Men B 287 en comparación con las micropartículas.

La resuspensión después de la adsorción y liofilización de antígenos también fue una característica importante de ciertas composiciones de la invención. En este ejemplo, se añadieron proteínas, específicamente, BSA, Ovoalbúmina, FluCC, Men B 287, Men B 287 o GBS1 a la suspensión de nanopartículas en tampón de Histidina a pH 5 y se agitaron en un balancín de laboratorio a 4 °C durante una noche. El tamaño de partículas inicial fue de ~120 nm. Se añadieron agentes tensioactivos y crioconservantes de acuerdo con la Tabla 3, y la mezcla se liofilizó. Después de liofilización se resuspendieron 5-10 mg de nanopartículas en 1 ml de agua y se midieron. Las nanopartículas se separaron por centrifugación. La cantidad restante en el sobrenadante (no adsorbido) se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño de HPLC, absorbancia a 214 nm. Como puede verse a partir de la Tabla 4, las nanopartículas con proteínas adsorbidas sustancialmente conservaron su tamaño pequeño y tienen alta eficacia de adsorción de proteínas para cargas diana de 1 % (p/p) y 5 % (p/p).

TABLA 4

Proteína Adsorbida	Excipiente	Tamaño final	% Adsorbido
OVA 1 % (p/p)	DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	173 nm	98
BSA 1 % (p/p)	DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	143 nm	100
BSA 5 % (p/p)	DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	134 nm	71
BSA 1 % (p/p)	PVA 10 % (p/p) / sacarosa 4 % + manitol 3 % (p/v)	216 nm	94
FluCC 1 % (p/p)	DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	242 nm	100
Men B 287 1 % (p/p)	DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	4850 μm	85
Men B 287 5 % (p/p)	DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	167 nm	95
Men B 287 1 % (p/p)	PVA 10 % (p/p) / sacarosa 4 % + manitol 3 % (p/v)	192 nm	77
Men B 287 5 % (p/p)	PVA 10 % (p/p) / sacarosa 4 % + manitol 3 % (p/v)	169 nm	80
GBS1 1 % (p/p)	DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	23 μm	99
GBS1 5 % (p/p)	DSS 0,5 % (p/p) / trehalosa 5 % + manitol 2,5 % (p/v)	201 nm	93

La cantidad de proteína asociada con las nanopartículas después de la liofilización (% de proteína adsorbida) fue alta, variando de 71 % a 100 %, al examinar el efecto de la concentración de proteínas, y se descubrió que eran más fáciles de resuspender niveles de carga de proteínas mayores (p de proteína/p de PLG). La mezcla de excipientes de PVA resuspendió nanopartículas con antígeno Men B 287 al menor nivel de carga mientras que la mezcla de excipientes de DSS no. De forma similar, para el antígeno GBS1, la mezcla de excipientes de DSS, la formulación cargada con proteína al 5 % mayor se resuspendió, mientras que la carga 1 % menor no. BSA se resuspendió a cargas tanto menores como mayores. La resuspensión con adsorción de proteínas parece depender por lo tanto de la proteína, y puede evaluarse para cada antígeno proteico. La disponibilidad de múltiples combinaciones de excipientes diferentes ofrece flexibilidad en el caso de que una combinación no sea suficiente para una proteína particular.

Ejemplo 5. Estudios *in vivo*

Se preparó una suspensión de micropartículas como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1. Para los grupos 3-6 y 9-12 en las Tablas 5 y 6 posteriores, se añadió Men B 287 a la suspensión de micropartículas o nanopartículas a una carga diana de 1 % o 5 % (p de 287/p de PLG) en tampón de histidina 10 mM a pH 5,5 y se agitó en un balancín de laboratorio a 4 °C durante una noche. Se añadieron agentes tensioactivos y crioprotectores y se liofilizó la mezcla.

Para los Grupo 3 y 9, Men B 287 se adsorbió a una carga de 1 % (p de 287/p de PLG) solamente con el DSS 0,05 % (p/p de PLG) de la preparación de partículas inicial como tensioactivo y sacarosa 4 % (p/volumen) y manitol 3 % (p/volumen) como un crioprotector. Para los Grupos 4 y 10, Men B 287 se adsorbió a una carga de 1 % (p de 287/p de PLG) con la adición de PVA 10 % (p de PVA/p de PLG) más sacarosa 4 % (p/volumen) y manitol 3 % (p/volumen). Para los Grupos 5 y 11, se adsorbió Men B 287 a carga del 5 % (p de 287/p de PLG) con la adición de DSS 0,5 % (p de DSS/p de PLG) más trehalosa 5 % (p/volumen) y manitol 2,5 % (p/volumen). Para los Grupos 6 y 12, se adsorbió Men B 287 a una carga del 5 % (p de 287/p de PLG) con la adición de PVA 10 % (p de PVA/p de PLG) más sacarosa 4 % (p/volumen) y manitol 3 % (p/volumen). Después de la liofilización, se reconstituyeron micropartículas correspondientes a una dosis total de 1 µg y 10 µg de Men B 287, respectivamente, con 1,2 ml de Agua para Inyección. Las muestras reconstituidas se midieron con un Zetasizer 3000HSA para las nanopartículas y un Horiba LA 930 para las micropartículas. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Para los Grupos 2 y 8, se mezcló una emulsión de MF59 (Chiron Vaccines) con 2X PBS y 1 µg o 10 µg de Men B 287 inmediatamente antes de la inmunización.

Para los Grupos 1 y 7 se añadió Men B 287 a hidróxido de aluminio (Chiron Vaccines) en tampón de histidina 10 mM a pH 5,5 más NaCl 9 mg/ml y se agitó en un balancín de laboratorio a 4 °C durante una noche con una concentración de alumbre de 2 mg/ml.

Para todos los grupos, las muestras se inyectaron a 1 M en grupos de 10 ratones CD-1 hembra los días 0, 21 y 35. Para los grupos 3-6 y 9-12, se reconstituyeron micropartículas o nanopartículas liofilizadas con Agua para Inyección. Los grupos 1, 2, 7 y R se usaron como se ha descrito. El día 49, se analizan los títulos de ELISA del suero (IgG, IgG1, IgG2a) como se describe en Singh, M., y col. (2004) (J. Pharm. Set. 93(2): 273-282), y se analizó la actividad bactericida del suero (SBA) como se describe en Pizza, M., y col. (2000) (Science 287(5459): 1816-1820). 2996 fue la cepa de MenB usada para análisis de SBA. Los resultados se presentan en la Tabla 6 posterior.

El estudio *in vivo* descubre que las nanopartículas y micropartículas son comparables para ambas dosis basándose en los títulos en suero y SBA. El MF59 a la dosis alta es significativamente diferente para IgG que todos los otros grupos (p < 0,05 con ensayo de t de student de dos colas suponiendo varianza desigual). Los títulos de IgG de grupos 1 y 4 son significativamente diferentes del grupo 6 (p < 0,05 con ensayo de t de student de dos colas suponiendo varianza desigual), sin embargo este resultado no es cierto para el SBA, que es el criterio de valoración más importante del estudio.

TABLA 5

Grupo	Formulación	Tamaño* (nm)	pH
1	Alumbre/287, 1 µg	-	5,8
2	MF59/287, 1 µg	-	-
3	PLG/MP/287, 1 µg	805	5,0
4	PLG/NP/287/carga 1 %/PVA, 1 µg	158	5,0
5	PLG/NP/287/carga 5 %/DSS, 1 µg	149	5,0
6	PLG/NP/287/carga 5 %/PVA, 1 µg	149	5,0
7	Alumbre/287, 10 µg	-	5,5
8	MF59/287, 10 µg	-	-
9	PLG/MP/287, 10 µg	790	5,8

(continuación)

Grupo	Formulación	Tamaño* (nm)	pH
10	PLG/NP/287/carga 1 %/PVA, 10 µg	123	5,3
11	PLG/NP/287/carga 5 %/DSS, 10 µg	140	5,5
12	PLG/NP/287/carga 5 %/PVA, 10 µg	160	5,3

* el tamaño es después de la liofilización

TABLA 6

1	Alumbre/287, 1 µg	130	2.035	51	64
2	MF59/287, 1 µg	1.889	2.829	304	128
3	PLG/MP/287, 1 µg	1.023	1.861	36	64
4	PLG/NP/287/carga 1 %/PVA, 1 µg	326	1.008	168	32
5	PLG/NP/287/carga 5 %/DSS, 1 µg	758	2.663	94	64
6	PLG/NP/287/carga 5 %/PVA, 1 µg	2.466	7.824	312	64
7	Alumbre/287, 10 µg	2.252	15.496	142	128
8	MF59/287, 10 µg	29.743	18.253	6.569	2048
9	PLG/MP/287, 10 µg	8.340	19.258	628	256
10	PLG/NP/287/carga 1 %/PVA, 10 µg	7.567	20.575	565	128
11	PLG/NP/287/carga 5 %/DSS, 10 µg	1.986	9.197	160	64
12	PLG/NP/287/carga 5 %/PVA, 10 µg	4.348	15.746	373	128

REIVINDICACIONES

1. Una composición de nanopartículas liofilizada esterilizada por filtración que comprende
- 5 (a) un polímero biodegradable seleccionado de un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido, un policianoacrilato y combinaciones de los mismos,
 (b) un tensioactivo que es poli(alcohol vinílico),
 (c) un agente crioprotector que comprende una combinación de un alditol y un sacárido y
 (d) un antígeno polipeptídico
- en la que las nanopartículas dentro de la composición tienen un tamaño de partícula promedio Z menor de 250 nm, menor de 200 nm o menor de 150 nm.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el antígeno comprende antígeno derivado de célula tumoral, o un antígeno derivado de organismo patógeno.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que el antígeno deriva de un organismo patógeno seleccionado de un virus, una bacteria, un hongo y un parásito.
- 15 4. La composición de la reivindicación 2, en la que el antígeno deriva de un organismo patógeno seleccionado de virus de la hepatitis, varicela, poliovirus, sarampión, paperas, rubéola, virus de la gripe, *Neisseria meningitidis*, tosferina, *Haemophilus influenzae* tipo b, VIH y *Streptococcus pneumoniae*.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el antígeno está adsorbido en las superficies de las nanopartículas, o en la que el antígeno está retenido dentro de las nanopartículas.
- 20 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición comprende un poli(α -hidroxiácido) seleccionado de poli(lactida), poli(glicólido), poli(lactida-co-glicólido) y combinaciones de los mismos.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición comprende un poli(lactida-co-glicólido) que tiene una relación molar de lactida:glicólido que varía de 40:60 a 60:40.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un adyuvante inmunológico.
- 25 9. La composición de la reivindicación 8, en la que el adyuvante inmunológico se adsorbe en la superficie de las nanopartículas suspendidas, o en la que el adyuvante inmunológico está retenido dentro de las nanopartículas suspendidas.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que el adyuvante inmunológico se selecciona de oligonucleótidos CpG, ARN bicatenario, toxinas termolábiles de *E. coli*, alumbre y compuestos de fosfato de liposacárido.
- 30 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en
- (i) un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria en un hospedador vertebrado, que comprende: combinar la composición con un fluido acuoso para formar una suspensión; y administrar la suspensión al huésped en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria, o
- 35 (ii) un procedimiento para inmunizar a un huésped vertebrado contra un tumor o un organismo patógeno, que comprende: combinar la composición con un fluido acuoso para formar una suspensión; y administrar la suspensión al huésped en una cantidad eficaz para inducir una respuesta protectora, o
- (iii) un procedimiento para tratar un tumor o una infección de organismo patógeno en un huésped vertebrado, que comprende: combinar la composición con un fluido acuoso para formar una suspensión; y administrar la suspensión al huésped en una cantidad eficaz para inducir una respuesta de tratamiento.
- 40 12. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicha suspensión se inyecta en dicho huésped vertebrado.
13. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho huésped vertebrado es un ser humano.
- 45 14. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria celular, una respuesta inmunitaria de Th1 o una respuesta inmunitaria de CTL.
- 50 15. Un procedimiento de producción de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende: (a) combinar (i) un primer líquido que comprende dicho polímero biodegradable disuelto en un disolvente orgánico con (ii) un segundo líquido que comprende agua, tras lo cual se forma una suspensión de nanopartículas que comprende dicho polímero biodegradable, (b) adsorber dicho antígeno en dichas nanopartículas para formar una suspensión de nanopartículas con antígeno adsorbido y (c) liofilizar dicha suspensión de nanopartículas con antígeno adsorbido.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicho agente crioprotector se añade inmediatamente antes de la liofilización.
17. El procedimiento de la reivindicación 15 o reivindicación 16, que comprende además esterilizar por filtración dicha suspensión de nanopartículas y dicho antígeno antes de adsorber dicho antígeno en dichas nanopartículas.
- 5 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, que comprende además esterilizar por filtración dicha suspensión de nanopartículas con antígenos adsorbidos antes de la liofilización.
- 10 19. Un kit que comprende un primer recipiente que comprende la composición de nanopartículas liofilizada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y que comprende además opcionalmente un segundo recipiente que comprende un medio líquido estéril útil para resuspender la composición de nanopartículas liofilizada en el primer recipiente.
20. El kit de la reivindicación 19, que comprende además una jeringa.

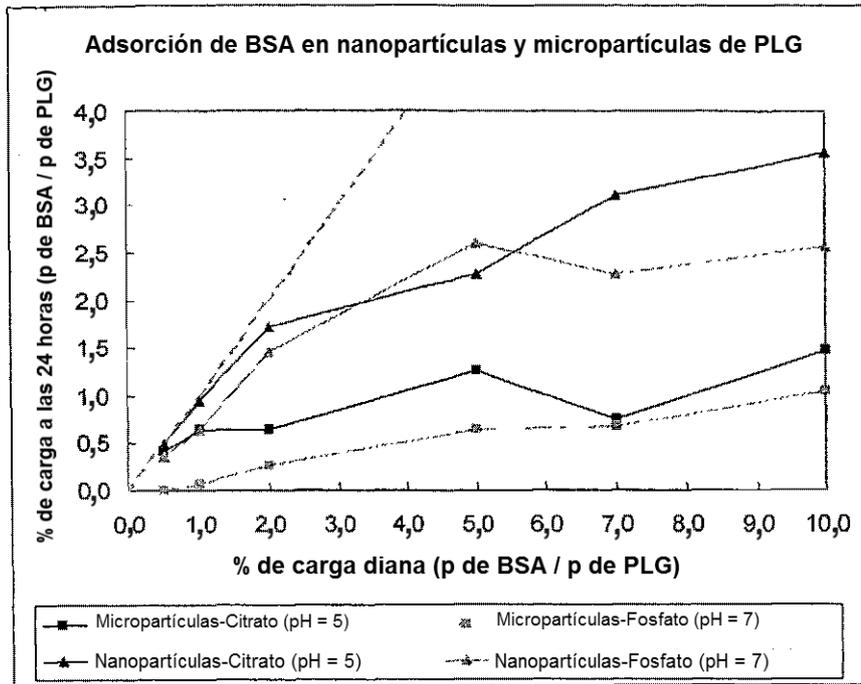


Fig. 1

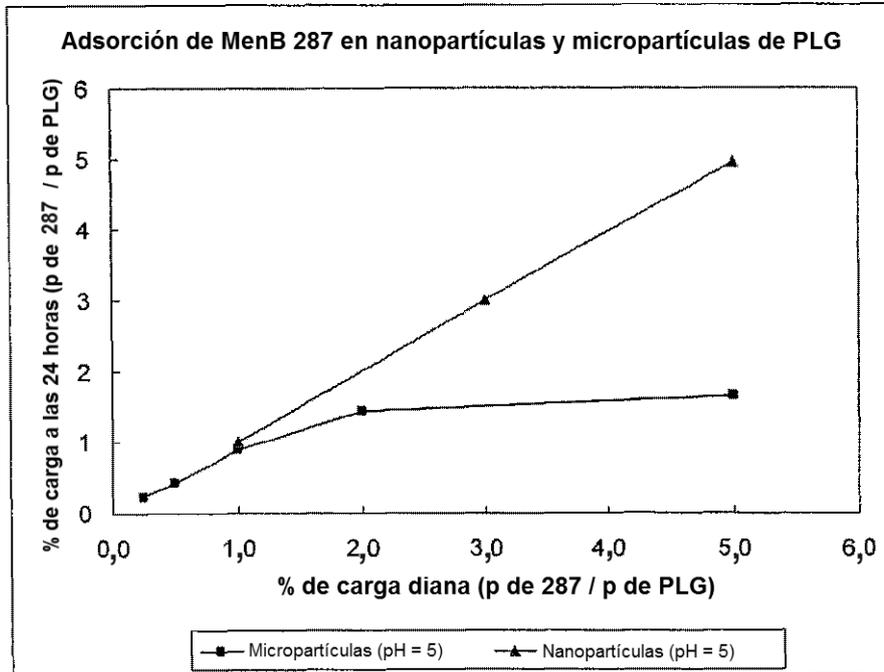


Fig. 2