

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 431**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2003 PCT/US2003/05017**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2003 WO03070909**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2003 E 03711136 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 1531796**

54 Título: **Micropartículas con moléculas que contienen polipéptidos adsorbidos**

30 Prioridad:

20.02.2002 US 358315 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**O'HAGAN, DEREK;
SINGH, MANMOHAN y
KAZZAZ, JINA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 607 431 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

Micropartículas con moléculas que contienen polipéptidos adsorbidos

Campo técnico

5 La invención se refiere a micropartículas biodegradables con moléculas que contienen polipéptidos adsorbidos que se forman sin el uso de agente tensioactivo, a procedimientos para preparar tales micropartículas, y usos de las mismas.

Antecedentes

10 Los vehículos particulados se han utilizado con antígenos adsorbidos o atrapados en intentos de provocar respuestas inmunológicas adecuadas. Tales vehículos presentan múltiples copias de un antígeno seleccionado para el sistema inmunológico y promueven la captura y retención de antígenos en los ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden mejorar la presentación de antígenos a través de la liberación de citoquinas.

15 Por ejemplo, la solicitud de patente internacional de propiedad común WO 98/33487 (PCT/US98/01738) y la solicitud de patente de Estados Unidos pendiente de tramitación nº de serie 09/015.652, presentada el 29 de enero 1998, describen el uso de micropartículas adsorbidas a antígeno y encapsuladas a antígeno para estimular las respuestas inmunológicas, incluidas las respuestas inmunológicas mediadas por células, así como procedimientos de fabricación de las micropartículas. Los polímeros utilizados para formar las micropartículas incluyen poli(láctido) y poli(láctido-co-glicólido), también referidas en el presente documento como "PLG".

20 La solicitud de patente internacional de propiedad común WO 00/06123 (PCT/US99/17308) y la Solicitud de patente de Estados Unidos pendiente de tramitación nº de serie 09/715.902 describen procedimientos de fabricación de micropartículas que tienen macromoléculas adsorbidas, incluyendo polinucleótidos y antígenos polipeptídicos. Las micropartículas comprenden, por ejemplo, un polímero tal como un poli(ácido alfa-hidroxi) (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. Se proponen micropartículas que contienen detergentes aniónicos, tales como las micropartículas de PLG con dodecil sulfato de sodio (SDS), para el uso de macromoléculas cargadas positivamente, tales como polipéptidos. Se proponen micropartículas que contienen detergentes catiónicos, tales como micropartículas de PLG con CTAB (también conocido como cetrimida o bromuro de cetil trimetil amonio), para el uso de macromoléculas cargadas negativamente, tales como ADN. También se desvela el uso de tales micropartículas para estimular las respuestas inmunológicas, incluidas las respuestas
25
30 inmunológicas mediadas por células.

En cada una de las referencias anteriores, sin embargo, se utilizan uno o más tensioactivos durante la preparación de las micropartículas de adsorbidas a macromoléculas. Desafortunadamente, el uso de tensioactivos puede plantear problemas toxicológicos que dan lugar a un mayor escrutinio regulador durante el registro del producto, entre otras consecuencias.

35 El documento WO 97/02810 describe una composición para la administración de un agente activo que comprende una pluralidad de partículas lamelares de un polímero biodegradable, que es al menos en parte cristalino, y un agente activo adsorbido a al menos la mayoría de las partículas.

Sumario de la invención

40 Los presentes inventores han encontrado inesperadamente que se pueden formar micropartículas con moléculas que contienen polipéptido adsorbido en ausencia de tensioactivo.

45 La invención se refiere a una composición de micropartículas que comprende: (a) micropartículas con un diámetro de 0,5 a 10 µm que comprenden un polímero, que es un poli(α-hidroxi ácido); y (b) una molécula que contiene el polipéptido adsorbido a las micropartículas, en la que la molécula que contiene el polipéptido es un antígeno, y en la que la composición de micropartículas se forma en ausencia de tensioactivo. La invención se refiere además a un procedimiento para producir una composición de micropartículas, el procedimiento que comprende: (a) formar micropartículas con un diámetro de 0,5 a 10 µm por un procedimiento de emulsión sin agente tensioactivo, las micropartículas que comprenden un polímero, que es un poli(α-hidroxi ácido); y (b) adsorber una molécula que contiene el polipéptido en la superficie de las micropartículas para formar la composición de micropartículas, en la que la molécula que contiene el polipéptido es un antígeno. La composición se forma en ausencia de cualquier
50 tensioactivo, incluyendo tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos y tensioactivos bipolares.

55 Los polímeros preferidos son los seleccionados entre el grupo que consiste en poli(L-láctido), poli(D,L-láctido) y poli(D,L-láctido-co-glicólido). Son más preferidos los polímeros poli(D,L-láctido-co-glicólido). Los polímeros de poli(D,L-láctido-co-glicólido) preferidos son los que tienen una relación molar de láctido/glicólido que oscila de 25:75 a 75:25, más preferentemente de 40:60 a 60:40, y que tiene un peso molecular que oscila de 10.000 a 100.000 Daltons, más preferentemente de 30.000 Daltons a 70.000 Daltons.

Los antígenos preferidos incluyen antígenos bacterianos y virales. Son especialmente preferidos los antígenos del VIH (como antígenos g41, gp120, gp140, p24gag y p55gag), antígenos de la meningitis B (como el antígeno 287 de la proteína recombinante de la meningitis B), antígenos de estreptococos (como el antígeno del estreptococo del grupo B), y los antígenos de hemaglutinina de la gripe A.

- 5 En algunas realizaciones, la composición de micropartículas se proporciona con una macromolécula biológicamente activa adicional, que puede estar unida o no unido a las micropartículas, y puede incluso estar atrapada dentro del polímero. Por ejemplo, la composición de micropartículas se puede proporcionar con un adyuvante, particularmente un adyuvante estimulante de Th1. Los adyuvantes preferidos incluyen oligonucleótidos CpG, LTK63, LTR72, MPL, 4-fosfatos de aminoalquilo glucosaminida (AGP), adyuvantes de imidazoquinolina, adyuvantes miméticos de lipopolisacárido, QS21, ARN de doble cadena (ARNdc) y sales de aluminio, incluyendo fosfato de aluminio.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se añade un excipiente farmacéuticamente aceptable a las composiciones de micropartículas anteriores.

De acuerdo con la invención, un antígeno se puede administrar a un sujeto vertebrado mediante la administración a un sujeto vertebrado de la composición de micropartículas anterior.

- 15 En otros aspectos de la invención, las composiciones de micropartículas anteriores se usan en el diagnóstico de enfermedades, en el tratamiento de enfermedades, en vacunas, y/o en el aumento de una respuesta inmunitaria.

Por ejemplo, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de micropartículas de la invención para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria celular y/o humoral en un sujeto vertebrado, que comprende administrar a un sujeto vertebrado una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de micropartículas como se ha descrito anteriormente.

- 20 Otro aspecto de la invención se refiere a la composición de micropartículas de la invención para su uso en la inmunización, que comprende administrar a un sujeto vertebrado una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de micropartículas anterior.

- 25 Preferentemente, la emulsión que se emplea en un procedimiento de producción de una composición de micropartículas de la invención es una emulsión de agua en aceite en agua que se forma por un procedimiento que comprende: (a) emulsionar una fase orgánica que comprende un polímero y el disolvente orgánico con una primera fase acuosa que comprende agua para formar una emulsión de agua en aceite; y (b) emulsionar una segunda fase acuosa que comprende agua con la emulsión formada en la etapa (a) para formar una emulsión de agua en aceite en agua. En general, estas composiciones de micropartículas se mezclan posteriormente con una molécula que contiene el polipéptido biológicamente activo, tal como los descritos anteriormente, para producir una composición biológicamente activa.

Aunque se prefieren las técnicas de doble emulsión como las anteriores, también se pueden usar técnicas de emulsión simple para formar las composiciones de micropartículas de la presente invención.

- 35 Una ventaja de la presente invención es que se puede formar composiciones de micropartículas para la administración a seres humanos, y en particular composiciones de micropartículas para la administración a seres humanos que contienen antígeno adsorbido, sin recurrir al uso de tensioactivos. La ausencia de agentes tensioactivos es beneficioso, entre otras cosas, debido a que la adición de agentes tensioactivos plantea problemas de toxicidad, problemas que se eluden con las composiciones de micropartículas de la presente invención.

- 40 Estas y otras realizaciones, aspectos y ventajas de la presente invención se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un aparato apropiado para la producción de las composiciones de micropartículas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

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

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, el término "micropartículas" se

refiere a una o más micropartículas, y similares.

A. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que estén definidos como se indica a continuación.

5 A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes y proporciones en la presente memoria descriptiva se dan sobre una base en peso.

10 El término "micropartículas" como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10 µm de diámetro. Preferentemente, la micropartícula será de un diámetro que permita la administración parenteral o mucosa sin ocluir agujas y capilares. El tamaño de las micropartículas se determina fácilmente por técnicas bien conocidas en la técnica, tales como espectroscopia de correlación de fotones, difracción láser y/o microscopía electrónica de barrido. El término "partícula" también se puede utilizar para representar una micropartícula según se define en el presente documento.

15 Las micropartículas de polímero descritas en el presente documento se pueden formar a partir de materiales que son esterilizables, no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen poli(α-hidroxi ácido), ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, poliortoéster, polianhídrido, PACA y policianoacrilato. Las micropartículas para su uso con la presente invención son micropartículas de polímero derivadas de un poli(α-hidroxi ácido), en particular, de una poli(láctido) ("PLA") o un copolímero de D,L-láctido y glicólido o ácido glicólico, tal como un poli(D,L-láctido-co-glicólido) ("PLG"), o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona. Las micropartículas de polímero se pueden derivar de materiales poliméricos de partida que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una variedad de relaciones de láctido:glicólido, cuya selección será en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de la molécula que contiene el polipéptido coadministrado. Estos parámetros se describen con más profundidad a continuación.

25 El término "tensoactivo" como se usa en el presente documento incluye detergentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, y estabilizantes de la emulsión. Los tensoactivos aniónicos que se han propuesto en el pasado para su uso en formulaciones de micropartículas incluyen, pero no se limitan a, SDS (dodecil sulfato de sodio), SLS (lauril sulfato de sodio), DSS (disulfosuccinato), alcoholes grasos sulfatados, y similares. Los tensoactivos catiónicos que se han propuesto incluyen, pero no se limitan a, cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio, o "CTAB"), cloruro de benzalconio, DDA (bromuro de dimetil dioctodecil amonio), DOTAP (dioleoil-3-trimetilamonio-propano), y similares. Los tensoactivos no iónicos que se han propuesto incluyen, pero no están limitados a, PVA, povidona (también conocida como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitán, polisorbatos, monoéteres de glicol polioxiethylados, alquil fenoles polioxiethylados, poloxámeros, y similares.

35 En la presente memoria descriptiva, una composición se encuentra "libre de tensoactivo" o presenta una "ausencia de tensoactivo" dentro de una composición cuando la composición contiene solo cantidades insignificantes de impurezas o de un agente tensoactivo. Tal como se usa en el presente documento, una cantidad "insignificante" de agente tensoactivo significa que la composición contiene una relación de tensoactivo a polímero en peso a peso de menos de 0,00001:1.

40 El término "macromolécula" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a, sin limitación, un producto farmacéutico, un polinucleótido, un polipéptido, una molécula que contiene el polipéptido, una hormona, una enzima, un mediador de la transcripción o la traducción, un intermediario en una vía metabólica, un inmunomodulador, un antígeno, un adyuvante, o combinaciones de los mismos.

El término "farmacéutico" se refiere a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, agentes antivirales, factores de crecimiento, hormonas, y similares, descritos en más detalle a continuación.

45 El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que ayuda o modifica la acción de un producto farmacéutico, incluyendo pero no limitado a adyuvantes inmunológicos, que aumentan o diversifican la respuesta inmunitaria a un antígeno.

50 Un "polinucleótido" es un polímero de ácido nucleico, que normalmente codifica una proteína o polipéptido biológicamente activos (por ejemplo, inmunogénico o terapéutico). Dependiendo de la naturaleza del polipéptido codificado por el polinucleótido, un polinucleótido puede incluir hasta solo 10 nucleótidos, por ejemplo, en el que el polinucleótido codifica un antígeno. Además, un "polinucleótido" puede incluir secuencias tanto de doble cadena como de cadena sencilla y se refiere, pero no se limita a, ADNc de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias de ARN y ADN genómico de ADN vírico (por ejemplo, virus y retrovirus de ARN y ADN) o procariota, y especialmente secuencias de ADN sintéticas. El término también engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN. El término además incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a una secuencia nativa, preferentemente tal que la molécula de ácido nucleico codifica una proteína terapéutica o antigénica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de hospedadores que producen los antígenos.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no se limita a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, dentro de la definición, se incluyen péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares. En la definición se incluyen tanto proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a una secuencia nativa, preferentemente tal que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica o tenga un efecto terapéutico sobre un sujeto al que se administra la proteína.

Por "antígeno" se entiende una molécula que contiene uno o más epítopos capaces de estimular el sistema inmunológico del hospedador para dar una respuesta inmunitaria específica del antígeno celular cuando el antígeno se presenta de acuerdo con la presente invención, o una respuesta de anticuerpo humoral. Un antígeno puede ser capaz de provocar una respuesta celular o humoral por sí mismo o cuando está presente en combinación con otra molécula. Normalmente, un epítipo incluirá de aproximadamente 3 a 15 aminoácidos, generalmente de aproximadamente 5 a 15 aminoácidos. Los epítopos de una proteína dada se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Human Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales se pueden determinar, por ejemplo, sintetizando simultáneamente un gran número de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos aún están unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la materia y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4.708.871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23: 709-715. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente mediante la determinación de la conformación espacial de los aminoácidos tales como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols, supra*.

El término "antígeno" tal como se utiliza en el presente documento representa tanto antígenos de subunidades, es decir, antígenos que están separados y son discretos de un organismo completo con el cual el antígeno está asociado en la naturaleza, así como bacterias, virus, parásitos, u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotípicos, o fragmentos de los mismos, y mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o un determinante antigénico, también están englobados bajo la definición de antígeno como se usa en el presente documento. Del mismo modo, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa una proteína terapéutica o inmunogénica, o un determinante antigénico *in vivo*, tal como en terapia génica y aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, también se incluye en la definición de antígeno en el presente documento.

Además, para los fines de la presente invención, los antígenos pueden derivar de cualquiera de varios virus, bacterias, parásitos y hongos conocidos, así como cualquiera de los diversos antígenos tumorales. Además, para los fines de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de los hospedadores que producen los antígenos.

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

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

La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar con una serie de ensayos, tales como por linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, analizando para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto

sensibilizado, o midiendo la producción de citoquinas por las células T en respuesta a la reestimulación con el antígeno. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151: 4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2369-2376.

5 Por lo tanto, una respuesta inmunológica tal como se utiliza en el presente documento puede ser una que estimule la producción de CTLs, y/o la producción o activación de células T auxiliares. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. Por lo tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por las células B; y/o la activación de células T supresoras y/o células T $\gamma\delta$ dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad, y/o mediar el anticuerpo-complemento, o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para proporcionar protección a un hospedador inmunizado. Tales respuestas se pueden determinar usando inmunoensayos y ensayos de neutralización convencionales, bien conocidos en la técnica.

15 Una composición que contiene un antígeno seleccionado adsorbido a una micropartícula, muestra "inmunogenicidad mejorada" cuando posee una mayor capacidad para provocar una respuesta inmunitaria que la respuesta inmunitaria provocada por una cantidad equivalente del antígeno cuando se administra sin asociación con la micropartícula. Por lo tanto, una composición puede mostrar "mayor inmunogenicidad" porque el antígeno es más fuertemente inmunogénico en virtud de la adsorción a la micropartícula, o porque es necesaria una dosis de antígeno más baja para lograr una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra. Dicha mayor inmunogenicidad se puede determinar mediante la administración de la composición de micropartículas/antígeno, y controles de antígeno a animales y comparando, por ejemplo, los títulos de anticuerpos contra los dos usando ensayos convencionales tales como radioinmunoensayo y ELISA, bien conocidos en la técnica.

20 Los términos "cantidad eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de una composición como se proporciona en el presente documento, se refieren a una cantidad suficiente de la composición para tratar o diagnosticar una afección de interés. Por ejemplo, estas expresiones pueden referirse a una cantidad suficiente para proporcionar una respuesta deseada, tal como una respuesta inmunológica, y un efecto profiláctico o terapéutico correspondiente, o en el caso de la administración de una proteína terapéutica, una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento del sujeto, tal como se define a continuación. Como se señala más adelante, la cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, la edad, y la condición general del sujeto, la gravedad de la afección que está siendo tratada, el polipéptido particular de interés, el modo de administración, y similares. Una cantidad apropiada "eficaz" en cualquier caso individual se puede determinar por un experto normal en la técnica usando experimentación de rutina.

25 Por "sujeto 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. El término no representa una edad en particular. Así, se pretende que estén cubiertos tanto animales adultos como recién nacidos.

30 Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable. Por ejemplo, un material "farmacéuticamente aceptable" se puede administrar a un individuo junto con la formulación de micropartículas sin causar ningún efecto biológico indeseable en el individuo o interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

35 El término "excipiente" se refiere a sustancias que se proporcionan habitualmente dentro de las formas farmacéuticas terminadas, e incluyen vehículos, aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, deslizantes (potenciadores de flujo), adyuvantes de compresión, colores, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersión, formadores/recubrimientos de película, aromas 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 ambos inclusive, más normalmente en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6, ambos inclusive.

40 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo las variaciones de los mismos, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a cualquiera de (i) la prevención de infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción o eliminación de los síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. El tratamiento se puede efectuar profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" se refiere a ADN, ARN, o quimeras formadas de los mismos.

55 Tal como se usa en el presente documento, la frase "oligonucleótido que comprende al menos un motivo CpG" se refiere a un polinucleótido que comprende al menos un dinucleótido CpG. Los oligonucleótidos que comprenden al menos un motivo CpG pueden comprender múltiples motivos CpG. Estos oligonucleótidos también se conocen en la técnica como "oligonucleótidos CpG". En la presente memoria descriptiva, la frase "motivo CpG" se refiere a una

porción de dinucleótido de un oligonucleótido que comprende un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanosina. También se puede utilizar 5-metilcitosina en lugar de citosina.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan composiciones que tratan, incluyendo la inmunización profiláctica y/o terapéuticamente, un animal hospedador frente a infecciones por virus, hongos, micoplasmas, bacterias, o protozoos, así como tumores. Las composiciones de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un mamífero, preferentemente un ser humano. Las composiciones de la presente invención también se pueden utilizar en mamíferos distintos de seres humanos, por ejemplo en aplicaciones de investigación biomédica.

B. Procedimientos generales

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que se pueden formar micropartículas, y se pueden conseguir una adsorción excelente de moléculas de antígeno que contiene el polipéptido a las micropartículas, sin el uso de agentes tensioactivos. Como resultado, las composiciones de micropartículas de la presente invención se pueden utilizar como sistema de administración para administrar moléculas de antígeno que contiene el polipéptido biológicamente activo a un sujeto con el fin de tratar profiláctica o terapéuticamente y/o diagnosticar una amplia variedad de enfermedades. Si bien no se desea estar ligado por la teoría, se cree que los materiales poliméricos utilizados en conexión con la presente invención (por ejemplo, PLG) normalmente tienen grupos cargados negativamente, que dan a las micropartículas de la presente invención una carga neta negativa. Esta carga neta negativa conduce a la repulsión entre las micropartículas, estabilizando las micropartículas tras su formación. Por otra parte, esta carga también atrae las regiones cargadas positivamente de las moléculas de antígeno que contiene el polipéptido, mejorando la adsorción de las moléculas de antígeno que contiene el polipéptido a las micropartículas.

Muchos ejemplos de realización dentro de la presente solicitud de patente se refieren a composiciones que contienen micropartículas con moléculas de antígeno que contiene el polipéptido adsorbido.

Una ventaja de las micropartículas con moléculas de antígeno de polipéptido adsorbido es su demostrada capacidad para generar respuestas inmunológicas mediadas por células en un sujeto vertebrado. Por lo tanto, además de una respuesta de anticuerpos convencional, el sistema descrito en el presente documento puede mantener, por ejemplo, la asociación de los antígenos expresados con moléculas del MHC de clase I tal que se puede montar una respuesta inmunitaria celular *in vivo* al antígeno de interés que estimula la producción de CTLs para permitir el futuro reconocimiento del antígeno. Además, los procedimientos pueden provocar una respuesta específica de antígeno por células T auxiliares. En consecuencia, la presente invención encontrará uso con cualquier molécula de antígeno que contenga el polipéptido para el que se desean respuestas inmunológicas celulares y/o humorales, preferentemente antígenos derivados de patógenos virales y bacterianos que pueden inducir anticuerpos, epítomos de células T auxiliares y epítomos de células T citotóxicas. Tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, aquellos codificados por virus humanos y animales y pueden corresponder tanto a proteínas estructurales como no estructurales.

Por lo tanto, la capacidad de los antígenos/micropartículas de la invención para provocar una respuesta inmunitaria mediada por células contra un antígeno seleccionado proporciona una herramienta poderosa contra la infección por una amplia variedad de patógenos. De acuerdo con ello, las composiciones de antígeno/micropartículas de la presente invención se pueden incorporar en composiciones de vacunas.

Las micropartículas de la presente invención son particularmente útiles para la inmunización contra virus intracelulares que normalmente provocan respuestas inmunológicas pobres. Por ejemplo, la presente invención encontrará uso para estimular una respuesta inmunitaria contra una amplia variedad de polipéptidos de la familia del virus del herpes, incluyendo proteínas derivadas del virus del herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2, tales como las glicoproteínas de HSV-1 y HSV-2 gB, gD y gH; antígenos derivados del virus de la varicela zoster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV) incluyendo CMV gB y gH; y antígenos derivados de otros virus herpes humanos, tales como HHV6 y HHV7. (Véase, por ejemplo, Chee et al., Cytomegaloviruses (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169, para una revisión del contenido codificante de proteínas de citomegalovirus; McGeoch et al., J. Gen. Virol. (1988) 69:1531-1574, para una discusión de las diversas proteínas codificadas por HSV-1; la patente de Estados Unidos n.º 5.171.568 para una discusión de las proteínas de HSV-1 y HSV-2 gB y gD y los genes que codifican las mismas; Baer et al., Nature (1984) 310:207-211, para la identificación de secuencias de codificación de proteínas en un genoma de EBV; y Davison y Scott, J. Gen. Virol. (1986) 67:1759-1816, para una revisión del VZV).

Los antígenos de la familia del virus de la hepatitis, incluyendo el virus de hepatitis A (HAV), el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la hepatitis delta (HDV), el virus de la hepatitis E (HEV) y el virus de la hepatitis G (HGV), también se pueden utilizar convenientemente en las técnicas descritas en el presente documento. A modo de ejemplo, la secuencia genómica viral del HCV es conocida, al igual que los procedimientos para obtener la secuencia. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90/14436. El genoma del VHC codifica varias proteínas virales, incluyendo E1 (también conocida como E) y E2 (también conocida como E2/NSI) y una proteína de la nucleocápside N-terminal (denominada del "núcleo") (véase,

Houghton et al., *Hepatology* (1991) 14: 381-388, para una discusión de las proteínas del VHC, incluidas E1 y E2). Cada una de estas proteínas, así como fragmentos antigénicos de las mismas, encontrará uso en la presente composición y procedimientos.

5 Del mismo modo, se conoce la secuencia para el antígeno δ de HDV (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.378.814) y este antígeno también se puede utilizar convenientemente en la presente composición y procedimientos. Además, los antígenos derivados del HBV, tales como el antígeno del núcleo, el antígeno de superficie, sAg, así como las secuencias de presuperficie, pre-S1 y pre-S2 (anteriormente denominadas pre-S), así como combinaciones de las anteriores, tales sAg/pre-S1, SAG/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2 y pre-S1/pre-S2, encontrarán uso en el presente documento. Véase, por ejemplo, "HBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study" en Mackett, M. y Williamson, J.D., *Human Vaccines and Vaccination*, pp. 159-176, para una discusión de la estructura del HBV; y las patentes de Estados Unidos n.º 4.722.840, 5.098.704, 5.324.513; Beames et al., *J. Virol.* (1995) 69:6833-6838, Birnbaum et al., *J. Virol.* (1990) 64:3319-3330; y Zhou et al., *J. Virol.* (1991) 65:5457-5464.

15 Los antígenos derivados de otros virus también encontrarán uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención, tales como, sin limitación, proteínas de miembros de las familias Picornaviridae (por ejemplo, poliovirus, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por ejemplo, virus de la rubéola, virus del dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, etc.); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe de los tipos A, B y C, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-II; VIH-1 (también conocidos como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), incluyendo pero no limitado a los antígenos de los aislados VIH_{IIB}, VIH_{SF2}, VIH_{LAV}, VIH_{LAI}, VIH_{MN}); VIH-ICM235, VIH-1US4; VIH-2; virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), entre otros. Además, los antígenos también pueden proceder de virus del papiloma humano (VPH) y virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. Véase, por ejemplo, *Virology*, 3ª Edición (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2nd Edition (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus.

25 Más en particular, las proteínas de la envuelta gp120 o gp140 de cualquiera de los anteriores aislados del VIH, incluidos los miembros de los diversos subtipos genéticos del VIH, son conocidas y han sido presentadas (véase, por ejemplo, Myers et al., Base de datos de Los Alamos, Los Alamos National Laboratory, Los Álamos, Nuevo México (1992); Myers et al., *Human Retroviruses and Aids*, 1990, Los Alamos, Nuevo México: Los Alamos National Laboratory; y Modrow et al., *J. Virol.* (1987) 61: 570-578, para una comparación de las secuencias de la envuelta de una variedad de aislados del VIH) y los antígenos derivados de cualquiera de estos aislados encontrarán uso en los presentes procedimientos. Además, la invención es igualmente aplicable a otras proteínas inmunogénicas derivadas de cualquiera de los diversos aislados del VIH, incluyendo cualquiera de las diversas proteínas de la envuelta tales como gp160 y gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas derivadas de las regiones pol y tat.

35 El virus de la gripe es otro ejemplo de un virus para el que la presente invención será particularmente útil. Específicamente, las glicoproteínas de la envuelta HA y NA de la gripe A son de particular interés para generar una respuesta inmunitaria. Se han identificado numerosos subtipos de HA de la gripe A (Kawaoka et al., *Virology* (1990) 179:759-767; Webster et al., "Antigenic variation among type A influenza viruses," p. 127-168. In: P. Palese y D.W. Kingsbury (ed.), *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, Nueva York). Así, también se pueden utilizar las proteínas derivadas de cualquiera de estos aislados en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento.

45 Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento también encontrarán uso con numerosos antígenos bacterianos, tales como los derivados de organismos que causan la difteria, el cólera, la tuberculosis, el tétanos, la tos ferina, la meningitis, y otros estados patógenos, incluyendo, sin limitación, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* (A, B, C, y), *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, y *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus influenzae* tipo B (HIB), *Helicobacter pylori*, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de antígenos de *Neisseria meningitidis* B se describen en las siguientes solicitudes de patente de propiedad conjunta: PCT/US99/09346; PCT IB98/01665; y PCT IB99/00103. Los ejemplos de antígenos parasitarios incluyen los derivados de organismos que causan la malaria y la enfermedad de Lyme.

50 Antígenos adicionales, que no son necesariamente exclusivos de los que se enumeran en otra parte de esta solicitud, incluyen los siguientes:

- Un antígeno de proteína de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como los de las Refs. 1-7 a continuación.
- una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como los descritos en las Refs. 8, 9, 10, 11, etc., a continuación.
- 55 - un antígeno de sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W135 y/o Y, como el oligosacárido descrito en la Ref. 12 a continuación del serogrupo C (véase también ref. 13).
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo, Refs. 14, 15, 16).
- un antígeno de *N. gonorrhoea* (por ejemplo, Refs. 1, 2, 3).
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo, Refs. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).
- 60 - un antígeno de *Chlamydia trachomatis* (por ejemplo, Ref. 24).

- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como un virus inactivado (por ejemplo, Refs. 25, 26).
- un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o del núcleo (por ejemplo, Refs. 26, 27).
- un antígeno del virus de la hepatitis C (por ejemplo, Ref. 28).
- 5 – un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 (por ejemplo, Refs. 29 y 30).
- un antígeno de la difteria, tales como el toxoide diftérico (por ejemplo, el capítulo 3 de la Ref. 31) por ejemplo, el mutante CRM₁₉₇ (por ejemplo, Ref. 32).
- 10 – un antígeno del tétanos, tal como un toxoide del tétanos (por ejemplo, capítulo 4 de la Ref. 31).
- un antígeno de proteína de *Helicobacter pylori* tal como CagA (por ejemplo, Ref. 33), VacA (por ejemplo, Ref. 33), NAP (por ejemplo, Ref. 34), HopX (por ejemplo, Ref. 35), HopY (por ejemplo, Ref. 35) y/o ureasa.
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B (por ejemplo, Ref. 13).
- un antígeno de *Porphyramonas gingivalis* (por ejemplo, Ref. 36).
- 15 – antígeno(s) de la polio (por ejemplo, Refs. 37, 38), tales como IPV o OPV.
- antígeno(s) de la rabia (por ejemplo, Ref. 39), tal como virus inactivado liofilizado (por ejemplo, Ref. 40, RabAvert™).
- antígenos del sarampión, las paperas y/o la rubéola (por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la Ref. 31).
- antígeno(s) de la gripe (por ejemplo, capítulo 19 de la Ref. 31), tales como las proteínas de la superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- 20 – un antígeno de *Moraxella catarrhalis* (por ejemplo, Ref. 41).
- un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) (por ejemplo, Refs. 42, 43)
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) (por ejemplo, Refs. 43,44, 45).
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, Ref. 46).
- 25 – composiciones que comprenden uno o más de estos antígenos.

Quando se usa un antígeno de sacárido o carbohidrato, se conjuga con una proteína portadora con el fin de potenciar la inmunogenicidad (por ejemplo, Refs. 47 a 56). Proteínas portadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como los toxoides diftérico o tetánico. El toxoide CRM₁₉₇ de la difteria es particularmente preferido. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* (por ejemplo, Ref. 57), péptidos sintéticos (por ejemplo, Refs. 58, 59), proteínas de choque térmico (por ejemplo, Ref. 60), proteínas de la tos ferina (por ejemplo, Refs. 61, 62), proteína D de *H. influenzae* (por ejemplo, Ref. 63), la toxina A o B de *C. difficile* (por ejemplo, Ref. 64), etc. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC sea mayor que 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior). Los sacáridos de diferentes serogrupos de *N. meningitidis* se pueden conjugar con las mismas proteínas portadoras o proteínas portadoras diferentes.

Se puede utilizar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier enlazador adecuado cuando sea necesario.

Los antígenos de proteínas tóxicas se pueden desintoxicar cuando sea necesario (por ejemplo, detoxificación de la toxina de la tos ferina por medios químicos y/o físicos (Ref. 30).

Véase: Solicitud de patente internacional 99/24578 (Ref. 1); Solicitud de patente internacional WO99/36544 (Ref. 2); Solicitud de patente internacional WO99/57280 (Ref. 3); Solicitud de patente internacional WO00/22430 (Ref. 4); Tettelin et al., (2000) Science 287:1809-1815 (Ref. 5); Solicitud de patente internacional WO96/29412 (Ref. 6); Pizza et al. (2000) Science 287:1816-1820 (Ref. 7); Solicitud de patente internacional PCT/IB01/00166 (Ref. 8); Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096 (Ref. 9); Fukasawa et al. (1990) Vaccine 17:2951-2958 (Ref. 10); Rosenqvist et al. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333 (Ref. 11); Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698 (Ref. 12); Costantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263 (Ref. 13); Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332 (Ref. 14); Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v (Ref. 15); Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207 (Ref. 16); Solicitud de patente internacional presentada el 3 de julio de 2001 que reivindica la prioridad del documento GB-0016363.4 (Ref. 17); Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21: 385-389 (Ref. 18); Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406 (Ref. 19); Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3):S524-S527 (Ref. 20); Solicitud de patente internacional WO99/27105 (Ref. 21); Solicitud de patente internacional WO00/27994 (Ref. 22); Solicitud de patente internacional WO00/37494 (Ref. 23); Solicitud de patente internacional WO99/28475 (Ref. 24); Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188 (Ref. 25); Iwarson (1995) APMIS 103:321-326 (Ref. 26); Gerlich et al. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 & 79-80 (Ref. 27); Hsu et al. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915 (Ref. 28); Gustafsson et al. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355 (Ref. 29); Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238 (Ref. 30); Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0 (Ref. 31); Del Giudice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70 (Ref. 32); Solicitud de patente internacional WO93/18150 (Ref. 33); Solicitud de patente internacional WO99/53310 (Ref. 34); Solicitud de patente internacional WO98/04702 (Ref. 35); Ross et al. (2001) Vaccine 19:4135-4142 (Ref. 36); Sutter et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308 (Ref. 37); Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126 (Ref. 38); Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl:S2-6 (Ref. 39); MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16;47(1):12, 19 (Ref. 40); McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107 (Ref. 41); Schuchat (1999)

Lancet 353(9146):51-6 (Ref. 42); Solicitudes de patente de GB 0026333.5, 0028727.6 y 0105640.7 (Ref. 43); Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii (Ref. 44); Ferretti et al. (2001) PNAS USA 98:4658-4663 (Ref. 45); Kuroda et al. (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; véase también las páginas 1218-1219 (Ref. 46); Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-196 (Ref. 47); Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36 (Ref. 48); Buttery & Moxon (Ref. 49); Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii (Ref. 50); Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567 (Ref. 51); European patent 0 477 508 (Ref. 52); Patente de Estados Unidos n.º 5.306.492 (Ref. 53); Solicitud de patente internacional WO98/42721 (Ref. 54); Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN: 3805549326, en particular el vol. 10:48-114 (Ref. 55); Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 y 012342335X (Ref. 56); solicitud de patente europea 0372501 (Ref. 57); solicitud de patente europea 0378881 (Ref. 58); solicitud de patente europea 0427347 (Ref. 59); Solicitud de patente internacional WO93/17712 (Ref. 60); Solicitud de patente internacional WO98/58668 (Ref. 61); solicitud de patente europea 0471177 (Ref. 62); Solicitud de patente internacional WO00/56360 (Ref. 63); solicitud de patente internacional WO00/61761 (Ref. 64).

Cuando antígeno de la difteria está incluido en la composición se prefiere incluir también el antígeno del tétanos y antígenos de la tos ferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos se prefiere incluir también antígenos de la difteria y de la tos ferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de la tos ferina se prefiere incluir también antígenos de la difteria y del tétanos.

Es fácilmente evidente que la presente invención se puede utilizar para ofrecer una amplia variedad de moléculas de antígeno que contiene el polipéptido y por lo tanto para tratar y/o diagnosticar un gran número de enfermedades.

La adsorción de moléculas de antígeno que contiene el polipéptido a la superficie de las micropartículas adsorbentes tiene lugar mediante cualquier mecanismo de unión-interacción, incluyendo, pero no limitado a, enlace iónico, enlace de hidrógeno, enlace covalente, Van der Waals, y la unión a través de interacciones hidrófilas/hidrófobas.

Los polímeros biodegradables para fabricar micropartículas para su uso con la presente invención están fácilmente disponibles en el mercado en, por ejemplo, Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. Por ejemplo, los polímeros útiles para formar las micropartículas son poli(α -hidroxi ácido) tales como poli(L-láctido), poli(D,L-láctido) (ambos conocidos como "PLA" en el presente documento), poli(hidroxibutirato), copolímeros de D,L-láctido y glicólido, tal como poli(D,L-láctido-co-glicólido) (designado como "PLG" en el presente documento) o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona. Polímeros particularmente preferidos para su uso en esta invención son los polímeros PLA y PLG. Estos polímeros están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y el peso molecular apropiado para un uso dado se determina fácilmente por un experto en la técnica. Así, por ejemplo, para el PLA, un peso molecular adecuado será del orden de aproximadamente 2000 a 5000. Para el PLG, los pesos moleculares adecuados generalmente variarán de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 200.000, preferentemente de aproximadamente 15.000 a aproximadamente 150.000.

Si se usa un copolímero tal como PLG para formar las micropartículas, una variedad de relaciones molares de láctido:glicólido encontrarán uso en el presente documento y la relación es, en gran medida, una cuestión de elección, dependiendo en parte de la molécula de antígeno que contiene el polipéptido coadministrado y la tasa de la degradación deseada. Por ejemplo, un polímero de PLG 50:50, que contiene el 50 % de D,L-láctido y el 50 % de glicólido, proporcionará un copolímero de resorción rápida mientras que el PLG 75:25 se degrada más lentamente, y el 85:15 y 90:10, aún más lentamente, debido al aumento del componente láctido. Es fácilmente evidente que una relación adecuada de láctido:glicólido se determina fácilmente por un experto en la técnica en base, por ejemplo, a la naturaleza del antígeno y del trastorno en cuestión. La tasa de degradación de las micropartículas de la presente invención también se puede controlar por factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero. Los copolímeros de PLG con diferentes relaciones de láctido: glicólido y de pesos moleculares están disponibles en el mercado en diferentes fuentes que incluyen a Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. Algunos copolímeros de PLG ejemplares incluyen: (a) RG 502, un PLG que tiene una relación molar de láctido/glicólido de 50:50 y un peso molecular de 12.000 Da; (b) RG 503, un PLG que tiene una relación molar de láctido/glicólido de 50:50 y un peso molecular de 34.000 Da; (c) RG 504, un PLG que tiene una relación molar de láctido/glicólido de 50:50 y un peso molecular de 48.000 Da, (d) RG 752, un PLG que tiene una relación molar de láctido/glicólido de 75:25 y un peso molecular de 22.000 Da; y (e) RG 755, un PLG que tiene una relación molar de láctido/glicólido de 75:25 y un peso molecular de 68.000 Da. Los polímeros de PLG también se pueden sintetizar por policondensación simple del componente de ácido láctico usando técnicas bien conocidas en la materia, como se describe en Tabata et al., J. Biomed. Mater. Res. (1988) 22: 837-858. Los copolímeros de PLG preferidos actualmente son aquellos que tienen una relación molar de láctido/glicólido que oscila de 25:75 a 75:25, más preferentemente de 40:60 a 60:40, y que tienen un peso molecular que oscila de 10.000 a 100.000 Daltons, más preferentemente de 20.000 Daltons a 70.000 Daltons.

Las micropartículas se preparan usando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas formas de realización, en el presente documento se pueden utilizar las técnicas de doble emulsión/evaporación del disolvente, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 3.523.907 y Ogawa et al., Chem. Pharm., para elaborar las micropartículas. Estas técnicas implican la formación de una emulsión primaria que consiste en gotas de solución de polímero, que se mezcla posteriormente con una fase acuosa continua que contiene un estabilizador/tensioactivo de partículas.

En otras realizaciones, las micropartículas también se pueden formar usando secado por pulverización y coacervación tal como se describe en, por ejemplo, Thomasin et al., *J. Controlled Release* (1996) 41:131; la patente de Estados Unidos n.º 2,800,457; Masters, K. (1976) *Spray Drying*, 2ª Ed. Wiley, Nueva York; técnicas de revestimiento por suspensión en aire, tales como revestimiento en bandeja y revestimiento Wurster, según lo descrito por Hall et al., (1980) *The AWurster Process® in Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications* (A.F. Kydonieus, ed.), vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida y Deasy, P.B., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1988) S(2): 99-139; y gelificación iónica como se describe, por ejemplo, por Lim et al., *Science* (1980) 210: 908-910.

En realizaciones preferidas, se puede utilizar una técnica de evaporación de disolvente de emulsión de agua en aceite en agua modificada (w/o/w) para formar las micropartículas. Técnicas de este tipo se han descrito, por ejemplo, en O'Hagan et al., *Vaccine* (1993) 11: 965-969, documento PCT/US99/17308 (documento WO 00/06123) de O'Hagan et al., y Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10: 362. Estas técnicas, sin embargo, se modifican para su uso en conexión con la presente invención. Específicamente, a diferencia de estas técnicas, las emulsiones de w/o/w de la presente invención se forman en ausencia de agentes tensioactivos (incluyendo detergentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión y estabilizadores de la emulsión).

Más específicamente, un polímero particular de interés, tal como PLG, se disuelve en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, cloruro de dimetilo (también denominado cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo, y similares. El polímero normalmente se proporcionará en una solución de aproximadamente un 1-30 %, preferentemente de aproximadamente un 2-15 %, más preferentemente de aproximadamente un 3-10 % y lo más preferentemente, una solución de aproximadamente un 4-6 %, en disolvente orgánico. La solución de polímero se combina entonces con un primer volumen de una solución acuosa y se emulsiona para formar una emulsión de o/w. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, o una solución tamponada tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una solución tampón de citrato de sodio/ácido etilendiaminotetraacético (citrato sódico/EDTA). Estas últimas soluciones pueden (a) proporcionar una tonicidad, es decir, una osmolalidad, que es esencialmente la misma que los fluidos fisiológicos normales y (b) mantener un pH compatible con las condiciones fisiológicas normales. Como alternativa, las características de tonicidad y/o de pH de las composiciones de la presente invención se pueden ajustar después de la formación de micropartículas y antes de la administración.

Preferentemente, la relación en volumen de la solución de polímero a la solución acuosa varía de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1, y es más preferentemente de aproximadamente 10:1. La emulsificación preferentemente se lleva a cabo usando cualquier equipo apropiado para esta tarea, y normalmente es un dispositivo de alto cizallamiento tal como, por ejemplo, un homogeneizador.

Preferentemente se combina un volumen de la emulsión de o/w con un segundo volumen mayor de solución acuosa, que también puede ser, por ejemplo, agua desionizada, solución salina normal, o una solución tamponada. La relación del segundo volumen de solución acuosa al volumen de la emulsión de o/w normalmente oscila de aproximadamente 2:1 a 10:1, y más normalmente es de aproximadamente 4:1. A continuación, la mezcla se homogeneiza para producir una emulsión doble de w/o/w. Entonces se evaporan los disolventes orgánicos.

Los parámetros de formulación se pueden manipular para permitir la preparación de pequeñas micropartículas del orden de 0,2 µm (200 nm) a micropartículas más grandes de 50 µm o incluso más grandes. Véase, por ejemplo, Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10: 362-368; McGee et al., *J. Microencap.* (1996). Por ejemplo, la reducción de la agitación da lugar a micropartículas más grandes, así como un aumento del volumen de fase interna y un aumento en la concentración de polímero. Las partículas pequeñas se producen por el aumento de la agitación, así como bajos volúmenes de fase acuosa y baja concentración de polímero.

Un aparato preferido para realizar las etapas anteriores se ilustra esquemáticamente en la Fig. 1. Con referencia ahora a la Fig. 1, se muestra un conjunto de tanque de fabricación, generalmente designado por el número 102. El conjunto de tanque 102 está diseñado para ser un "sistema cerrado", de tal manera que se mantiene un entorno aséptico durante el procesamiento. Todas las piezas y partes de los equipos se seleccionan preferentemente para que se puedan limpiar en el sitio y en autoclave. Todos los filtros 104a-d preferentemente son filtros de fluoropolímero como filtros todo de fluoropolímero Super-Cheminert™ de Pall Corporation. Inicialmente, se filtra una solución acuosa, tal como un agua desionizada 106 y una solución de polímero orgánico, tal como una solución de PLG en cloruro de metileno 108, y se introduce en el tanque 110 donde se mezclan continuamente con el mezclador 112. Entonces la mezcla se alimenta de a través de un homogeneizador en línea 114 (por ejemplo, homogeneizador en línea autoclavable de alta velocidad y alto cizallamiento, tal como el Kinematica MT 5000), formando una emulsión de o/w. La emulsión se enfría, por ejemplo mediante un condensador refrigerado por agua 116, después de salir del homogeneizador en línea 114, después de lo cual se devuelve al tanque 110. Después de que los contenidos se hayan emulsionado en la medida deseada, se añade solución acuosa adicional, tal como agua desionizada 106, al tanque 110, con lo cual se forma la emulsión de w/o/w al volver a introducir los contenidos a través del mezclador en línea 114. La emulsión de w/o/w resultante se purga con nitrógeno a través del distribuidor 119 para eliminar el disolvente orgánico. El vapor del disolvente cargado de nitrógeno se filtra y se enfría en un condensador 120, capturando el disolvente en el recipiente 122. Cuando la emulsión sea algo inestable, puede ser deseable eliminar el disolvente simultáneamente con la mezcla en línea.

El tamaño de partícula se puede determinar mediante, por ejemplo, dispersión de luz láser, usando por ejemplo, un espectrómetro que incorpora un láser de helio-neón. En general, el tamaño de partícula se determina a temperatura ambiente e implica múltiples análisis de la muestra en cuestión (por ejemplo, 5-10 veces) para dar un valor medio para el diámetro de partícula. El tamaño de partícula también se determina fácilmente usando microscopía electrónica de barrido (SEM).

Después de la preparación, las micropartículas se pueden almacenar como están o se liofilizaron para su uso futuro. Con el fin de adsorber moléculas de antígeno que contiene el polipéptido a las micropartículas, la preparación de micropartículas se puede mezclar simplemente con la molécula de antígeno que contiene el polipéptido de interés y la formulación resultante se puede liofilizar de nuevo antes de su uso.

Normalmente, se añaden moléculas de antígeno que contiene el polipéptido a las micropartículas para producir micropartículas con moléculas de antígeno que contiene el polipéptido adsorbido que tiene una relación peso a peso de molécula de antígeno que contiene el polipéptido a micropartículas de aproximadamente 0,0001:1 a 0,25:1, más normalmente de 0,001:1 a 0,1:1, incluso más normalmente de 0,05:1 a 0,01:1. El contenido de molécula de antígeno que contiene el polipéptido de las micropartículas se puede determinar usando técnicas convencionales.

Además de micropartículas con moléculas de antígeno que contiene el polipéptido adsorbido, las composiciones de la presente invención también pueden incluir una variedad de otras macromoléculas (incluyendo moléculas adicionales que contienen el polipéptido, productos farmacéuticos, polinucleótidos, hormonas, enzimas, mediadores de la transcripción o la traducción, intermedios de vías metabólicas, inmunomoduladores, antígenos, adyuvantes o combinaciones de los mismos). Por ejemplo, las micropartículas de la presente invención pueden tener macromoléculas atrapadas o encapsuladas adicionales dentro de ellas, adsorbidas sobre sus superficies, o incluidas en solución o en suspensión. Macromoléculas adicionales particularmente preferidas son adyuvantes.

Una vez se producen las micropartículas con moléculas de antígeno que contiene el polipéptido adsorbido, se formulan en composiciones farmacéuticas, incluyendo vacunas, para tratar y/o diagnosticar una amplia variedad de trastornos, como se ha descrito anteriormente. Las composiciones generalmente incluirán uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se pueden usar vehículos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, etc. En tales vehículos pueden estar presentes otros excipientes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes biológicas, y similares. Un tampón biológico puede ser virtualmente cualquier sustancia que sea farmacológicamente aceptable y que proporcione a la formulación el pH deseado, es decir, un pH en el intervalo fisiológico. Los ejemplos de soluciones tampón incluyen fosfato salino (PBS), solución salina tamponada Tris, solución salina tamponada de Hank, y similares. También se pueden introducir otros excipientes conocidos en la técnica en la forma de dosificación final, incluyendo ligantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, deslizantes (mejoradores de flujo), adyuvantes de compresión, colores, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersión, formadores/recubrimientos de película, aromas y tintas de impresión.

Los adyuvantes se pueden usar para mejorar la eficacia de las composiciones farmacéuticas. Los adyuvantes se pueden administrar simultáneamente con las micropartículas de la presente invención, por ejemplo, en la misma composición o en composiciones separadas. Como alternativa, el adyuvante se puede administrar antes o después de las composiciones de micropartículas de la presente invención. En algunas formas de realización, el adyuvante, tal como un adyuvante inmunológico, se puede encapsular en la micropartícula. Los adyuvantes, como cualquier macromolécula, se pueden encapsular dentro de las micropartículas usando cualquiera de los varios procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 3.523.907; Ogawa et al., Chem. Pharm. Bull. (1988) 36:1095-1103; O'Hagan et al., Vaccine (1993) 11:965-969 y Jefferey et al., Pharm. Res. (1993) 10:362. Como alternativa, se pueden adsorber algunos adyuvantes, en particular adyuvantes que contienen el polipéptido, sobre la micropartícula como se ha descrito anteriormente.

Los adyuvantes inmunológicos incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) otras formulaciones de emulsiones de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59 (Publicación Internacional n.º WO90/14837; capítulo 10 en Vaccine design: the subunit an adjuvant approach, Eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995), que contiene el 5 % de escualeno, el 0,5 % de Tween 80, y el 0,5 % de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no se requiere) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el micro fluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene el 10 % de escualeno, el 0,4 % de Tween 80, el 5 % de polímero L121 bloqueado con Pluronic, y thr-MDP (véase a continuación), ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande, y (c) el sistema adyuvante Ribij (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene el 2 % de escualeno, el 0,2 % de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DetoxJ) (para una discusión adicional de las emulsiones submicrométricas de aceite en agua adecuadas para su uso en esta invención, véase la solicitud de patente de propiedad común n.º 09/015.736, presentada el 29 de enero de 1998); (3) se pueden usar adyuvantes de saponina, tales como Quil A, o QS21 (por ejemplo, StimulonJ (Cambridge

- Bioscience, Worcester, MA)) o partículas generadas a partir de ellas tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), ICOMS que pueden estar desprovistos de detergente adicional, por ejemplo, el documento WO00/07621; (4) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citoquinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) por ejemplo, documento GB-2220221, documento EP-A-0689454, opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos neumocócicos, por ejemplo, documento WO00/56358; (7) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua, por ejemplo, documento EP-A-0835318, documento EP-A-0735898, documento EP-A-0761231; (8) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (Roman et al., Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner et al., PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis et al., J. Immunol. 1988, 160, 870-876; Chu et al., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford et al., Eur. J. Immunol. 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu et al., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg et al., Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al., J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al., J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al., Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al., Jpn. J.; Stacey et al., J. Immunol, 1996, 157, 2116-2122; Messina et al., J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi et al., J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi et al., J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi et al., J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; y Yi et al., J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906; solicitudes de patente internacional WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581), es decir, que contiene al menos un dinucleótido CG, opcionalmente usando 5-metilcitosina en lugar de citosina; (9) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno, por ejemplo, documento WO99/52549; (10) un tensioactivo de éster de sorbitán de polioxietileno en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) o un tensioactivo de alquil éter o éster de polioxietileno en combinación con al menos un agente tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO01/21152); (11) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) (documento WO00/62800); (12) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica, por ejemplo, documento WO00/23105; (13) una saponina y una emulsión aceite en agua, por ejemplo documento WO99/11241; (14) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide), por ejemplo, documento WO98/57659; (15) mutantes detoxificados de una toxina bacteriana de ribosilación de ADP, tales como una toxina del cólera (CT), una toxina la tos ferina (PT), o una toxina lábil al calor de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63 (en la que la lisina se sustituye por el aminoácido de tipo silvestre en posición 63), LT-R72 (en la que la arginina se sustituye por el aminoácido de tipo silvestre en posición 72), CT-S109 (en la que la serina se sustituye por el aminoácido de tipo silvestre en posición 109), y PT-K9/G129 (en la que la lisina se sustituye por el aminoácido de tipo silvestre en posición 9 y la glicina se sustituye en posición 129) (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO93/13202 y WO92/19265); (16) 4-fosfatos de aminoalquilglucosaminida (AGP), véase, por ejemplo, Johnson, D.A. et al.; Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999 Aug 2; 9(15):2273-8, (17) imidazoquinolinas tales como imiquimod (R-837) y resiquimod (R-848), véase, por ejemplo, Vasilakos, J.P. et al.; Cell. Immunol., 25 de Agos. de 2000; 204 (1): 64-74, (18) miméticos de lipopolisacáridos, incluyendo fosfolípidos no sacáridos (por ejemplo, análogos simplificados de lípido A que carecen de un disacárido) descritos en Hawkins, L.D. et al; J. Pharmacol. Exp. Ther., febrero de 2002; 300 (2): 655-61, y (19) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición.
- Los péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamo (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1',2'-dipalmitoil-sn-glicerol-3-hidroxfosforiloxi) etilamina (MTP-PE), etc.

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

- Las composiciones comprenderán una "cantidad terapéuticamente eficaz" de la molécula de antígeno que contiene el polipéptido (así como cualquier otra macromolécula) de interés. Es decir, se incluirá una cantidad suficiente de la molécula de antígeno que contiene el polipéptido para tratar o diagnosticar una afección de interés. La cantidad exacta necesaria variará, por ejemplo, dependiendo del sujeto que está siendo tratado; la edad y el estado general del sujeto a tratar; la gravedad de la afección a tratar; en el caso de una respuesta inmunológica, la capacidad del sistema inmunológico del sujeto para sintetizar anticuerpos; el grado de protección deseado y la molécula de antígeno que contiene el polipéptido particular seleccionado y su modo de administración, entre otros factores. Una cantidad eficaz apropiada se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. Por lo tanto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" normalmente caerá en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos rutinarios. Para un antígeno de polipéptido, una dosis eficaz normalmente oscilará de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg, preferentemente de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 1 mg, más preferentemente de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg y más preferentemente de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 50 µg del antígeno administrado por dosis.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo, por inyección. Las composiciones se pueden inyectar por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular. Otros modos de administración incluyen por vía nasal, mucosa, rectal, vaginal, administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas.

El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. Un programa

de dosis múltiple es uno en el que un curso primario de administración puede ser con 1-10 dosis separadas, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores, elegidos para mantener y/o reforzar la respuesta terapéutica, por ejemplo en 1-4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una(s) dosis subsiguiente(s) después de varios meses. El régimen de dosificación también estará determinado, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del criterio médico.

Además, si se desea un tratamiento profiláctico, por ejemplo, en las vacunas, las composiciones de la presente invención generalmente se administran antes de la infección primaria con el patógeno de interés. Si se desea un tratamiento terapéutico, por ejemplo, la reducción de síntomas o de recurrencias, las composiciones de la presente invención generalmente se administran con posterioridad a la infección primaria.

10 C. Parte experimental

A continuación se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo a efectos ilustrativos. El alcance de la presente invención es como se establece en las reivindicaciones. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permiten algunos errores y desviaciones experimentales.

15 **Ejemplo 1**

Preparación de partículas de PLG sin agente tensioactivo

2,5 ml de PBS se homogeneizaron con 10 ml de RG503 al 6 % (un polímero de PLG que tiene una relación molar de láctido/glicólido de 50:50 y un peso molecular de 34.000 Daltons, disponible en Boehringer Ingelheim) en cloruro de dimetilo con una pequeña sonda del homogeneizador IKA (Alemania) a 23.000 rpm durante 2 minutos. Esta emulsión de o/w primaria se añade a 50 ml de agua desionizada, seguido de homogeneización con una sonda de 10 mm del homogeneizador Omni benchtop (LabTek Inc, EE.UU.) a 15.000 rpm durante 30 minutos en un baño de hielo. El recipiente se selló con cinta de Teflon con el homogeneizador insertado en el líquido para evitar la evaporación del disolvente durante la homogeneización. Se retira la cinta de teflón, y esta emulsión de w/o/w secundaria se deja agitar durante toda la noche para permitir la evaporación del disolvente. El día siguiente, se mide el tamaño de partícula usando un Malvern Master Sizer. El intervalo de tamaños normalmente es de 0,5 a 1 µm.

25 **Ejemplo 2 (referencia)**

Preparación de partículas de PLG con el 0,05 % y el 0,5 % en peso:peso de DSS a PLG

2,5 ml de PBS se homogeneizaron con 10 ml de RG503 al 6 % (un polímero de PLG que tiene una relación molar de láctido/glicólido de 50:50 y un peso molecular de 34.000 Daltons, disponible en Boehringer Ingelheim) en cloruro de dimetilo con una pequeña sonda del homogeneizador IKA (Alemania) a 23.000 rpm durante 2 minutos. Esta emulsión de o/w primaria se añade a 50 ml de agua desionizada, que contiene 6 µg/ml o 60 µg/ml de DSS para el 0,05 % y el 0,5 %, respectivamente. Esto va seguido de homogeneización con una sonda de 10 mm del homogeneizador Omni benchtop (LabTek Inc, EE.UU.) a 15.000 rpm durante 30 minutos en un baño de hielo. El recipiente se selló con cinta de Teflon con el homogeneizador insertado en el líquido para evitar la evaporación del disolvente durante la homogeneización. Se retira la cinta de teflón, y esta emulsión de w/o/w secundaria se deja agitar durante toda la noche para permitir la evaporación del disolvente. El día siguiente, se mide el tamaño de partícula usando un Malvern Master Sizer. El intervalo de tamaños normalmente es de 0,5 a 1 µm.

35 **Ejemplo 3 (referencia)**

Preparación de partículas de PLG (formulación convencional)

2,5 ml de PBS se homogeneizaron con 10 ml de RG503 al 6 % (un polímero de PLG que tiene una relación molar de láctido/glicólido de 50:50 y un peso molecular de 34.000 Daltons, disponible en Boehringer Ingelheim) en cloruro de dimetilo con una pequeña sonda del homogeneizador IKA (Alemania) a 23.000 rpm durante 2 minutos. Esta emulsión de o/w primaria se añade a 50 ml de agua desionizada, que contiene el 1 % en peso:vol de DSS. Esto va seguido de homogeneización con una sonda de 10 mm del homogeneizador Omni benchtop (LabTek Inc, EE.UU.) a 10.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Esta emulsión de w/o/w secundaria se dejó durante toda la noche bajo agitación para permitir la evaporación del disolvente. El día siguiente, se mide el tamaño de partícula usando un Malvern Master Sizer. El intervalo de tamaños normalmente es de 0,5 a 1 µm.

40 **Ejemplo 4**

Adsorción de proteínas a las formulaciones de PLG

Las partículas de PLG preparadas con el 0 %, el 0,05 % y el 0,5 % en p:p de DSS (de los Ejemplos 1 y 2 más arriba) se adsorbieron a la proteína 287 de la meningitis B, (grupo de purificación de proteínas Chiron, Siena, Italia, Vol. 287 Science, 1816 (2000)) como sigue:

Unión directa a las partículas de PLG con el 0 %, el 0,05 % y el 0,5 % de DSS:

1. Se midió el volumen de la suspensión para cada formulación en los Ejemplos 1 y 2 y se estimó el contenido de PLG dividiendo el peso inicial de PLG por el volumen total.
2. Para cada formulación, se puso un volumen específico que contiene 200 mg de PLG en un tubo de 30 ml de centrífuga y se añadieron 2 mg de proteína 287.
3. El tampón se ajustó a citrato 10 mM mediante la adición de 1 ml de citrato 100 mM a pH 4,75 y el volumen total se llevó hasta a 10 ml con agua DI.
4. El tubo se dejó meciendo en un agitador de laboratorio a 4 °C durante toda la noche.
5. El día siguiente, se retiró una alícuota de 2 ml para el análisis y la suspensión restante se tomó en alícuotas en viales, cada uno que contiene 12 dosis de 1 µg o 10 µg de proteína en PLG por dosis.
6. Se añadieron 216 µl de una solución del 25 % en peso:vol de manitol en agua a cada vial antes de la liofilización.

Ejemplo 5 (Referencia)

Adsorción de proteínas a la formulación de PLG/DSS preparada por el procedimiento convencional

1. La suspensión en el Ejemplo 3 se lavó con 250 ml de agua centrifugando dos veces.
2. El sedimento se resuspende en 15 ml de agua DI y se sonicó en un sonicador de baño de agua durante 2 minutos.
3. Se puso 5 ml de la suspensión (que contiene 200 mg de PLG) en un tubo de 30 ml de centrífuga y se añadió 2 mg de proteína 287.
4. El tampón se ajusta mediante la adición de 1 ml de PBS 10X y el volumen se llevó hasta 10 ml con agua DI.
5. La suspensión se dejó mecer en un agitador de laboratorio durante toda la noche a 4 °C.
6. El día siguiente, una alícuota de 1 ml se retiró para el análisis y la suspensión restante se transfirió a un peso molecular de 12-14. Se corta el tubo de diálisis y se dializó frente a 4 cambios de 4 l de agua DI cada uno.
7. Se midió el volumen total y se retiró una alícuota de 1 ml para su análisis. La suspensión restante se dividió en alícuotas en viales, cada una que contiene 1 µg o 10 µg de proteína en PLG.
8. Se añadieron 216 µl de una solución del 25 % de manitol en agua DI a cada vial antes de la liofilización.

Ejemplo 6

Caracterización

1. Se dializó 1 ml de cada suspensión (del Ejemplo 4, etapa 5) en un peso molecular de 12-14. Se corta el tubo de diálisis frente a 2 cambios de 4 l de agua cada uno, durante toda la noche, y se liofiliza.
2. El 1 ml restante de cada suspensión (del Ejemplo 4, etapa 5) y la parte alícuota del Ejemplo 5, etapa 6, se lavaron cada uno con 30 ml de agua por centrifugación y se liofilizaron.
3. Se liofilizó una alícuota de 1 ml del Ejemplo 5, etapa 7.
4. 5 mg de cada formulación liofilizada de las etapas 1, 2 y 3 anteriores, se hidrolizaron con 1 ml cada uno de NaOH 0,2 N/5 % de SDS, y se midió el contenido de proteína mediante el ensayo Micro BCA de Pierce, EE.UU.
5. Se resuspendieron 10 mg cada uno de las partículas sin lavar (de las etapas 1 y 3 anteriores) en 1 ml de PBS y se dejó meciendo a 37 °C durante una hora y se determinó liberación de estallido midiendo la proteína en el sobrenadante mediante el ensayo Micro BCA de Pierce, EE.UU.

Formulación	Lavado después de la adsorción	Sin lavar después de la adsorción		
		% de carga en peso:peso	% de liberación en 1 hora	D50-90 de tamaño en µm
0 % de DSS/287	0,63	1	65	0,82-1,2

(continuación)

Formulación	Lavado después de la adsorción	Sin lavar después de la adsorción		
0,05 % de DSS/287	0,85	1	56	0,9-1,5
0,5 % de DSS/287	0,61	1	29	3,8-9, 3
Formulación convencional/287	0,87	1	40	9-28

Ejemplo 7

Datos *in vivo*

- 5 Grupos de 10 ratones CD1 cada uno, fueron inmunizados por vía intramuscular con 100 µl que contiene 10 µg o 1 µg de la proteína adsorbida en partículas de PLG del Ejemplo 4, etapa 5 y del Ejemplo 5, etapa 7 a intervalos de 0, 3 y 5 semanas y los sueros se recogieron a las 5 y 7 semanas.

10 Se realizó el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas diseñado para medir anticuerpo específico de MenB en el suero de los ratones en la semana 5 y 7. La proteína purificada 287 se revistió sobre placas de fondo en U Nunc Maxisorp (Nalgene Nunc International) a 1 µg/ml. Los sueros se analizaron a diluciones de 1:100 y 1:400 seguido de tres diluciones en serie. Se utilizó IgG de ratón dirigido contra cabra conjugado a peroxidasa de rábano (CALTAG diluido 1:40.000) como segundo anticuerpo. Después de incubar durante una hora a 37 °C, las placas se lavaron para eliminar el anticuerpo no unido. Se utilizó sustrato TMB (Kirkegaard y Perry Laboratories, KPL) para revelar las placas y la reacción de color se bloqueó después de 15 minutos por adición de HCl 2 N. Los títulos presentados, la media geométrica de los títulos (GMT) junto con la desviación típica (STE), son el recíproco de las diluciones de suero que proporcionaron una densidad óptica a 450 nm de 0,5 unidades de absorbancia de ELISA.

Formulación	Dosis	2 semanas después de la 2ª		2 semanas después de la 3ª	
		GMT	STE	GMT	STE
0 % de DSS/287	1 µg	407	331	1.159	2.389
	10 µg	4.324	1.771	7.138	2.223
0,05 % de DSS/287	1 µg	889	390	3.314	473
	10 µg	7.586	3.494	10.274	3.016
0,5 % de DSS/287	1 µg	1.380	2.369	2.316	1.253
	10 µg	1.963	1.573	4.551	1.175
Formulaciones convencionales	1 µg	334	510	1.288	586
	10 µg	1.779	1.340	4.020	1.457

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de micropartículas que comprende: (a) micropartículas con un diámetro de 0,5 a 10 μm que comprenden un polímero, que es un poli(α -hidroxi ácido); y (b) una molécula que contiene polipéptido adsorbido a las micropartículas, en la que la molécula que contiene polipéptido es un antígeno, y en la que la composición de micropartículas se forma en ausencia de tensioactivo.
2. La composición de micropartículas de la reivindicación 1, en la que el poli(α -hidroxi ácido) se selecciona entre el grupo que consiste en poli(L-láctido), poli(D,L-láctido) y poli(D,L-láctido-co-glicólido).
3. La composición de micropartículas de la reivindicación 2, en la que el polímero utilizado durante la formación de las micropartículas es poli(L-láctido) y/o poli(D,L-láctido) con un peso molecular de 2000 a 5000 Daltons.
- 10 4. La composición de micropartículas de la reivindicación 2, en la que el polímero comprende poli(D,L-láctido-co-glicólido).
5. La composición de micropartículas de la reivindicación 4, en la que el poli(D,L-láctido-co-glicólido) tiene una relación molar de láctido/glicólido que oscila de 25:75 a 75:25 y un peso molecular que oscila de 10.000 a 100.000 Daltons.
- 15 6. La composición de micropartículas de la reivindicación 4, en la que el poli(D,L-láctido-co-glicólido) tiene una relación molar de láctido/glicólido que oscila de 40:60 a 60:40 y un peso molecular que oscila de 20.000 Daltons a 70.000 Daltons.
7. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el antígeno comprende un polisacárido conjugado con un polipéptido.
- 20 8. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el antígeno se selecciona entre los antígenos del VIH, antígenos de la meningitis B, antígenos de estreptococos, antígenos del virus de la hepatitis B, antígenos del virus de la hepatitis C, antígenos de *Haemophilus influenza* de tipo B, antígenos de la tos ferina, antígenos de la difteria, antígenos del tétanos, antígenos de *Helicobacter pylori* y antígenos de hemaglutinina de la gripe A.
- 25 9. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en antígeno gp41 del VIH, antígeno gp120 del VIH, antígeno gp140 del VIH, antígeno p24gag del VIH, antígeno p55gag del VIH, antígeno de la proteína 287 recombinante de la meningitis B, y antígeno de estreptococos del grupo B.
- 30 10. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. La composición de micropartículas de la reivindicación 10, que comprende además una macromolécula biológicamente activa adicional seleccionada entre el grupo que consiste en un polinucleótido, un polinucleósido, un producto farmacéutico, una hormona, una enzima, un mediador de la transcripción o la traducción, un intermediario en una vía metabólica, un inmunomodulador, y un adyuvante.
- 35 12. La composición de micropartículas de la reivindicación 11, en la que la macromolécula biológicamente activa adicional es un adyuvante.
13. La composición de micropartículas de la reivindicación 12, en la que el adyuvante es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en oligonucleótidos CpG, adyuvantes de ARN de doble cadena, adyuvantes de 4-fosfato de aminoalquil glucosaminida, adyuvantes de imidazoquinolina, adyuvantes miméticos de lipopolisacárido,
- 40 adyuvantes de saponina, adyuvantes de la toxina termolábil de *E. coli*, adyuvantes de monofosforil lípido A y sales de aluminio.
14. La composición de micropartículas de la reivindicación 13, en la que el adyuvante es fosfato de aluminio.
15. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 para su uso en el diagnóstico de una enfermedad.
- 45 16. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 para su uso en el tratamiento de una enfermedad.
17. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 para su uso en una vacuna.
18. La composición de micropartículas para su uso según la reivindicación 17, en la que la vacuna es una vacuna parenteral.
- 50 19. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 para su uso en el aumento

de una respuesta inmunitaria.

- 5 20. Un procedimiento de producción de una composición de micropartículas, procedimiento que comprende: (a) formar micropartículas con un diámetro de 0,5 a 10 μm por un procedimiento de emulsión sin agente tensioactivo, las micropartículas que comprenden un polímero, que es un poli(α -hidroxi ácido); y (b) adsorber una molécula que contiene el polipéptido en la superficie de las micropartículas para formar la composición de micropartículas, en la que la molécula que contiene el polipéptido es un antígeno.
21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el procedimiento de emulsificación comprende: (a) formar una emulsión que comprende un disolvente orgánico, agua y el polímero; y (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión para formar micropartículas.
- 10 22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que la emulsión es una emulsión de agua en aceite en agua que se forma por un procedimiento que comprende: (a) emulsionar una fase orgánica que comprende el polímero y el disolvente orgánico con una primera fase acuosa que comprende agua para formar una emulsión de agua en aceite; y (b) emulsionar una segunda fase acuosa que comprende agua con la emulsión formada en la etapa (a) para formar una emulsión de agua en aceite en agua.
- 15 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que las etapas emulsionantes se llevan a cabo en un homogeneizador de alto cizallamiento.
24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 20-23, en el que el polímero utilizado durante la formación de las micropartículas es poli(L-láctido) y/o poli(D,L-láctido) con un peso molecular de 2000 a 5000 Daltons.
- 20 25. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 20-23, en el que el polímero es un poli(D,L-láctido-co-glicólido).
26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que el poli(D,L-láctido-co-glicólido) tiene una relación molar de láctido/glicólido que oscila de 25:75 a 75:25 y un peso molecular que oscila de 10.000 a 100.000 Daltons.
- 25 27. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que el polímero es un poli(D,L-láctido-co-glicólido) que tiene una relación molar de láctido/glicólido que oscila de 40:60 a 60:40 y un peso molecular que oscila de 20.000 Daltons a 70.000 Daltons.
- 30 28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 20-27, en el que el antígeno se selecciona entre los antígenos del VIH, antígenos de la meningitis B, antígenos de estreptococos, antígenos del virus de la hepatitis B, antígenos del virus de la hepatitis C, antígenos de *Haemophilus influenza* de tipo B, antígenos de la tos ferina, antígenos de la difteria, antígenos del tétanos, antígenos de *Helicobacter pylori* y antígenos de hemaglutinina de la gripe A.
- 35 29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 20-27, en el que el antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en antígeno gp41 del VIH, antígeno gp120 del VIH, antígeno gp140 del VIH, antígeno p24gag del VIH, antígeno p55gag del VIH, antígeno de la proteína 287 recombinante de la meningitis B, y antígeno de estreptococos del grupo B.
30. Una composición de micropartículas formada por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 20-29.
31. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 20-29, en el que la relación de peso a peso de la molécula que contiene el polipéptido adsorbido al polímero oscila entre 0,001:1 y 0,1:1.
- 40 32. La composición de micropartículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y 30, en la que la relación de peso a peso de la molécula que contiene el polipéptido adsorbido al polímero oscila entre 0,01:1 y 0,05:1.

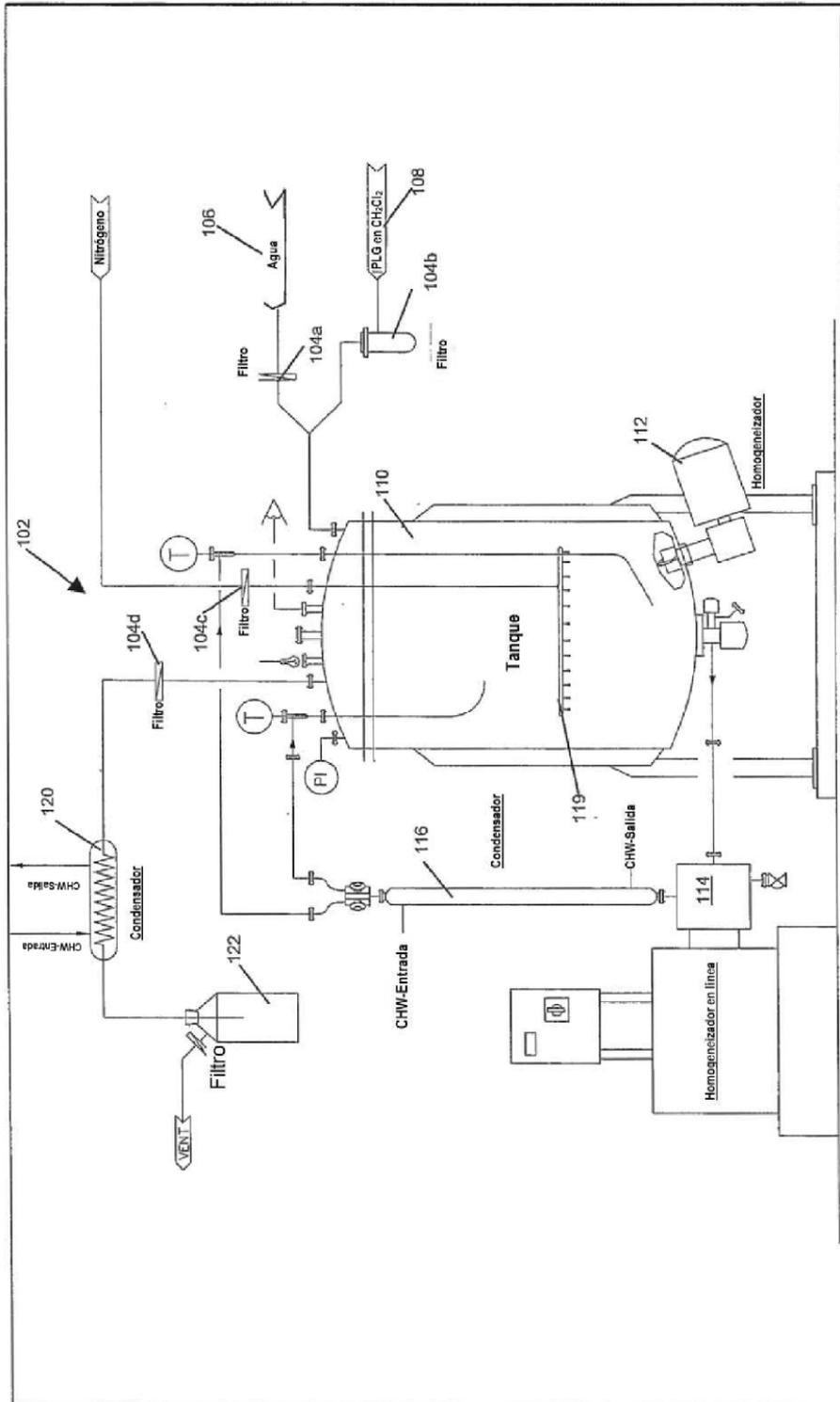


Fig. 1