

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 029**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2004 PCT/US2004/000923**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.08.2004 WO04065578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2004 E 04702174 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 1596834**

54 Título: **Micropartículas que comprenden polinucleótidos adsorbidos en la superficie de micropartículas o atrapados en el interior de las mismas**

30 Prioridad:

**14.01.2003 US 439940 P**

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

**05.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**O'HAGAN, DEREK y  
SINGH, MANMOHAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 615 029 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Micropartículas que comprenden polinucleótidos adsorbidos en la superficie de micropartículas o atrapados en el interior de las mismas

**Declaración de la solicitud relacionada**

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio respecto de prioridad a la solicitud de patente U.S. provisional N° 60/439.940, presentada el 14 de Enero de 2003.

**Campo de la invención**

- 10 La presente invención se refiere en general a composiciones farmacéuticas. En particular, la invención se refiere a micropartículas de polímero que tiene superficies adsorbentes, en las que se absorben agentes biológicamente activos, particularmente especies que contienen polinucleótidos, tales como constructos vectoriales (por ejemplo, constructos vectoriales de ADN y ARN) o adyuvantes (por ejemplo, oligonucleótidos CpG), a procedimientos de preparación de dichas micropartículas y a sus usos, incluyendo la inducción de respuestas inmunitarias celulares en animales vertebrados.

**Antecedentes**

- 15 Los vehículos particulados se han usado con antígenos adsorbidos o atrapados en intentos de provocar respuestas inmunes adecuadas. Dichos vehículos presentan múltiples copias de un antígeno seleccionado para el sistema inmune y promueven la captura y la retención de antígenos en los ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden mejorar la presentación de antígenos mediante la liberación de citoquinas.

- 20 Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 98/33487 de propiedad legalmente adquirida y la solicitud de patente US N° de serie 09/015.652, en tramitación, presentada el 29 de 1998, describen el uso de micropartículas con antígeno adsorbido y con antígeno encapsulado para estimular respuestas inmunológicas, incluyendo respuestas inmunológicas mediadas por células, así como procedimientos de fabricación de las micropartículas. Los polímeros usados para formar las micropartículas incluyen poli (láctido) y poli(láctido-co-glicólido), denominado también en la presente memoria "PLG".

- 25 La solicitud de patente internacional WO 00/06123, de propiedad legalmente adquirida, y la solicitud de patente US N° de serie 09/715.902, en tramitación, describen procedimientos de fabricación de micropartículas que tienen macromoléculas adsorbidas, incluyendo ADN, polipéptidos, antígenos y adyuvantes. 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. Las micropartículas que contienen detergentes aniónicos, tales como micropartículas de PLG con dodecil sulfato de sodio (SDS), se proponen para el uso de macromoléculas cargadas positivamente, tales como polipéptidos. Las micropartículas que contienen detergentes catiónicos, tales como micropartículas de PLG con CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), se proponen para el uso de macromoléculas cargadas negativamente, tales como ADN. Se describe también el uso de dichas micropartículas para estimular las respuestas inmunológicas, incluyendo respuestas inmunológicas mediadas por células.

- 35 Los documentos US2002002272, Fattal et al. Journal of Controlled Release, 53, 1-3, 1998, 137-143, WO013699, Denis-Mize et al. Gene Therapy, 7, 24, 2000, 2105-2112, O Hagen. Vaccine.2002.3389-3398, US20031138458 describen micropartículas con polinucleótidos adsorbidos en su superficie. El porcentaje de ADN cargado es de aproximadamente el 1% p/p con respecto al peso de las micropartículas.

- 40 En la actualidad, existe un deseo de aumentar los niveles de carga de ADN con relación a los de la técnica anterior, entre otras cosas, para reducir la cantidad de polímero que se administra al animal huésped.

**Sumario de la invención**

- 45 Según una realización de la presente invención, se proporcionan micropartículas, que comprenden: (a) un polímero que comprende un poli (ácido  $\alpha$ -hidroxi), un ácido polihidroxi butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido, o un policianoacrilato; (b) un tensioactivo catiónico; y (c) una primera especie que contiene polinucleótidos adsorbidos a las micropartículas, en el que la primera especie que contiene polinucleótidos constituye del 10 al 30 por ciento.

- 50 En varias realizaciones, las micropartículas se forman a partir de un poli (ácido  $\alpha$ -hidroxi), tal como un poli (láctido) ("PLA"), un copolímero de D,L-láctido y glicólido, tal como un poli(D,L-láctido-co-glicólido) ("PLG"), o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona. Los polímeros poli(D,L-láctido-co-glicólido) incluyen aquellos que tienen una relación molar de láctido/glicólido comprendida en el intervalo, por ejemplo, de 20:80 a 80:20, de 25:75 a 75:25, de 40:60 a 60:40 o de 55:45 a 45:55, y que tiene un intervalo de peso molecular comprendido, por ejemplo, en el intervalo de 5.000 a 200.000 Daltons, de 10.000 a 100.000 Daltons, de 20.000 Daltons a 70.000 Daltons, o de 40.000 a 50.000 Daltons.

En otros aspectos de la invención, se produce una composición de micropartículas que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Las micropartículas pueden tener opcionalmente una especie adicional, incluyendo una especie adicional que contiene polinucleótidos, que está: (a) adsorbida sobre la superficie de las micropartículas, (b) atrapada dentro de las micropartículas, (c) en solución, (d) adsorbida sobre una población separada de micropartículas, y/o (e) atrapada dentro de una población separada de micropartículas.

10 Por lo tanto, la invención abarca una diversidad de combinaciones en las que una única especie que contiene polinucleótidos es adsorbida sobre las micropartículas y opcionalmente es atrapada dentro de las micropartículas. Además, las micropartículas de la invención pueden tener especies adicionales que contienen polinucleótidos adsorbidas sobre las mismas o atrapadas en su interior. Además, especies distintas de las especies que contienen polinucleótidos, incluyendo productos farmacéuticos, hormonas, enzimas, mediadores de transcripción o de traducción, intermediarios de rutas metabólicas, inmunomoduladores, antígenos, incluyendo antígenos que contienen polipéptidos, adyuvantes incluyendo adyuvantes inmunológicos, o sus combinaciones, pueden ser adsorbidos sobre y/o atrapados dentro de las micropartículas. Por ejemplo, uno o más adyuvantes inmunológicos pueden ser adsorbidos sobre y/o atrapados dentro de las micropartículas.

15 Como ejemplos adicionales, puede proporcionarse una población adicional de micropartículas, (a) que tienen la misma especie que contiene polinucleótidos adsorbida sobre las mismas, (b) que tienen una especie que contiene polinucleótidos diferente adsorbida sobre las mismas o atrapadas en su interior, (c) que tienen especies distintas de las especies que contienen polinucleótidos, por ejemplo, uno o más adyuvantes inmunológicos, adsorbidas sobre las mismas o atrapadas en su interior. Como un ejemplo específico, puede proporcionarse una población de micropartículas de PLG que han adsorbido sobre las mismas una especie que contiene polinucleótidos, mientras que puede proporcionarse una población adicional de micropartículas de PLG, que tienen un adyuvante inmunológico adsorbido sobre las mismas y/o atrapado en su interior.

20 La presente invención se dirige también a composiciones inmunogénicas que comprenden una cantidad inmunoestimulante de una especie que contiene polinucleótidos y una cantidad inmunoestimulante de una composición adyuvante, tales como las descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones de la invención, la composición inmunogénica comprende un adyuvante oligonucleótido CpG en combinación con otra especie que contiene polinucleótidos, por ejemplo, un constructo vectorial, tal como un constructo vectorial de ARN, un vector pSINCP o un vector pCMV que codifica para un polipéptido antigénico. Una o ambas de las especies que contienen polinucleótidos pueden ser adsorbidas sobre la superficie de la micropartícula.

25 Las especies que contienen polinucleótidos pueden ser, por ejemplo, (a) adyuvantes inmunológicos que contienen polinucleótidos, tales como oligonucleótidos CpG, oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas, y ARNdc (ARN de doble cadena), (b) oligonucleótidos anti-sentido, y (c) una especie que contiene polinucleótidos que codifica para una especie que contiene polipéptidos.

30 Los ejemplos de especies que contienen polinucleótidos que codifican una especie que contiene polipéptidos incluyen, por ejemplo, (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica directamente un antígeno que contiene polipéptidos (por ejemplo, una molécula de ARNm) o (b) un constructo vectorial que codifica indirectamente un antígeno que contiene polipéptidos, por ejemplo, un constructo vectorial que expresa una secuencia de ácido nucleico heteróloga que, a su vez, codifica para un antígeno que contiene polipéptidos (por ejemplo, un constructo vectorial de ADN o un vector constructo de ARN).

35 Los antígenos que contienen polipéptidos pueden ser, por ejemplo, antígenos tumorales o antígenos provenientes de organismos patógenos, tales como virus, bacterias, hongos y/o parásitos. De esta manera, en algunas realizaciones, el antígeno que contiene polipéptidos se deriva de a partir un virus tal como, por ejemplo, virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (VHC), virus del herpes simple (HSV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus (CMV), virus de la gripe (por ejemplo, virus de la gripe A), y el virus de la rabia. En otras realizaciones, el antígeno que contiene polipéptidos se deriva a partir de una bacteria tal como, por ejemplo, cólera, difteria, tétanos, streptococcus (por ejemplo, streptococcus A y B), tos ferina, *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, meningitis A, B, C, W, Y), *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenza* (por ejemplo, *Haemophilus influenza* tipo B) y ántrax. En todavía otras realizaciones, el antígeno que contiene polipéptidos se deriva a partir de un parásito tal como, por ejemplo, un parásito de la malaria.

40 En otras realizaciones, la invención se refiere a procedimientos de administración de especies que contienen polinucleótidos a un animal huésped, que comprenden administrar al animal huésped cualquiera de las composiciones de micropartículas descritas anteriormente. El animal huésped es preferentemente un animal vertebrado, más preferentemente un mamífero y aún más preferentemente un ser humano.

La presente invención se dirige también a procedimientos para estimular una respuesta inmune en un animal huésped, que comprenden administrar al animal cualquiera de las composiciones de micropartículas descritas anteriormente en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune celular y/o humoral.

5 La presente invención se dirige a procedimientos para estimular una respuesta inmune Th1, o una respuesta CTL, o linfo proliferación, o producción de citoquinas en un animal huésped que comprende administrar al animal cualquiera de las composiciones de micropartículas inmunogénicas descritas en la presente memoria en una cantidad eficaz para inducir la respuesta inmune Th1 o la respuesta CTL o la linfo proliferación o la producción de citoquinas.

10 En otras realizaciones, la invención está dirigida a su uso para la fabricación de un medicamento para inmunización, que comprende administrar a un animal huésped una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones de micropartículas descritas anteriormente.

15 La presente invención está dirigida también a su uso para la fabricación de un medicamento para inmunizar un animal huésped contra, por ejemplo, un tumor o una infección viral, bacteriana o parasitaria, que comprende administrar al animal una composición de micropartículas inmunogénicas descritas en la presente memoria en una cantidad eficaz para inducir una respuesta protectora.

El suministro de las composiciones de micropartículas de la invención puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido, incluyendo inyección directa (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscularmente).

20 Por lo tanto, según algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo la inmunización profiláctica y/o terapéutica, un animal huésped, por ejemplo, contra infecciones víricas, fúngicas, micoplasmáticas, bacterianas o por protozoos, así como contra tumores. Los usos de la presente invención para la fabricación de un medicamento se dirigen a conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un mamífero, preferentemente un ser humano. Los usos de la presente invención pueden practicarse también en animales, distintos de seres humanos, incluyendo aplicaciones de investigación biomédica.

25 Otras realizaciones de la presente invención se refieren a procedimientos de producción de las micropartículas anteriores. Por ejemplo, las micropartículas anteriores pueden producirse mediante un procedimiento que comprende: (a) formar una emulsión agua en agua ("w/o/w") que comprende el polímero y el tensioactivo catiónico; (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión, para formar las micropartículas; y (c) adsorber la especie que contiene polinucleótidos sobre las micropartículas.

30 Una ventaja particular de las micropartículas con especies que contienen polinucleótidos adsorbidas de la presente invención es la capacidad de generar respuestas inmunes en un sujeto vertebrado. Además de una respuesta de anticuerpos convencional, las composiciones descritas en la presente memoria pueden permitir, por ejemplo, la asociación de los antígenos expresados con moléculas MHC de clase I de manera que pueda montarse una respuesta inmune celular *in vivo* al antígeno de interés que estimula la producción de CTLs para permitir el futuro reconocimiento del antígeno. Además, puede provocarse una respuesta específica de antígeno por parte de las células T auxiliares. Por consiguiente, los usos de la presente invención para la fabricación de un medicamento están dirigidos a provocar respuestas inmunes celulares y/o humorales a una diversidad de antígenos. Como un ejemplo específico, los antígenos derivados de patógenos virales pueden inducir anticuerpos, epítopos de células T auxiliares y epítopos citotóxicos de células T. Dichos antígenos incluyen los codificados por virus humanos y animales y pueden corresponder a proteínas estructurales o no estructurales.

#### 40 **Descripción detallada de la invención**

45 A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención empleará procedimientos convencionales de química, química de polímeros, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pensilvania: 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 (2ª edición, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K. S., ed, CRC Press, 1997) y Seymour/Carraher's Polymer Chemistry (4ª edición, Marcel Dekker Inc., 1996).

50 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva y cualquiera de las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, el término "micropartículas" se refiere a una o más micropartículas, etc.

A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes y proporciones en la presente memoria se proporcionan en base al peso.

## A. Definiciones

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

5 El término "micropartículas", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una partícula de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, más típicamente de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, y todavía más típicamente de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las micropartículas de la presente invención pueden agregarse en masas más grandes bajo algunas circunstancias. Como un ejemplo específico, las micropartículas de la presente invención que tienen ADN adsorbido pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,5-2  $\mu\text{m}$  de diámetro antes de la liofilización, mientras que las mismas partículas pueden estar, por ejemplo, en agregados que tienen un diámetro de aproximadamente 5-15  $\mu\text{m}$  después de la liofilización. La micropartícula será generalmente de un diámetro que permita la administración parenteral o mucosal sin ocluir las agujas y los capilares. El tamaño de las micropartículas se determina fácilmente mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como espectroscopia de correlación de fotones, difracción láser y/o microscopía electrónica de barrido. El término "partícula" puede ser usado también para denotar una micropartícula tal como se define en la presente memoria.

15 Las micropartículas de polímero para uso en la presente invención se forman típicamente a partir de materiales que son esterilizables, sustancialmente no tóxicos y biodegradables. Dichos materiales incluyen polímeros biodegradables tales como poli(ácido  $\alpha$ -hidroxi), ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, poliortoéster, polianhídrido y policianoacrilato (por ejemplo, polialquilcianoacrilato o "PACA"). Más típicamente, las micropartículas para su uso con la presente invención son micropartículas de polímero derivadas a partir de un poli (ácidos  $\alpha$ -hidroxi), en particular, a partir de una poli(láctido) ("PLA") o un copolímero de D,L-láctido y glicólido, tal como una poli(D,L-láctido-co-glicólido) ("PLG"), o un copolímero de D,L-láctido y caprolactona. Las micropartículas de polímero pueden derivarse a partir de cualquiera de diversos materiales de partida poliméricos que tienen una diversidad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una diversidad de proporciones de monómeros: (por ejemplo, láctido:glicólido), cuya selección será en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de las especies co-administradas. Estos parámetros se describen más completamente a continuación.

30 El término "tensioactivo", tal como se usa en la presente memoria, incluye detergentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión y estabilizantes de la emulsión. Los tensioactivos catiónicos para su uso en las composiciones de micropartículas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bromuro de cetiltrimetilamonio o "CTAB" (por ejemplo, cetrimida), cloruro de benzalconio, DDA (dimetil dioctodecil bromuro de amonio), DOTAP (dioleoil-3-trimetilamonio -propano), etc. Los tensioactivos aniónicos incluyen, pero no se limitan a, SDS (dodecil sulfato de sodio), SLS (lauril sulfato de sodio), DSS (disulfosuccinato), alcoholes grasos sulfatados, etc. Los tensioactivos no iónicos incluyen, pero se limitan a, PVA, povidona (también como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitán, polisorbatos, monoéteres de glicol polioxiethylados, alquil fenoles polioxiethylados, poloxámeros, etc.

35 El término "macromolécula", tal como se usa en la presente memoria, se refiere, sin limitación, a un producto farmacéutico, un polinucleótido, un polipéptido, una hormona, una enzima, un mediador de transcripción o traducción, un intermediario en una ruta metabólica, un inmunomodulador, un antígeno, un adyuvante o sus combinaciones. Las macromoléculas particulares para uso con la presente invención se describen más detalladamente a continuación.

El término "farmacéutico" se refiere a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, agentes antivirales, factores de crecimiento, hormonas, etc.

40 El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que ayuda a, o modifica, la acción de un producto farmacéutico, incluyendo pero sin limitarse a adyuvantes inmunológicos, que aumenta o diversifica la respuesta inmune a un antígeno. Por lo tanto, los adyuvantes inmunológicos son compuestos que son capaces de potenciar una respuesta inmune a antígenos. Los adyuvantes inmunológicos pueden potenciar la inmunidad tanto humoral y celular.

45 Un "polinucleótido" es un polímero de ácido nucleico. En algunos casos, por ejemplo, oligonucleótidos CpG, el polinucleótido actúa como un adyuvante. En otros casos, por ejemplo, constructos vectoriales, el polinucleótido codifica para una o más proteínas o polipéptidos biológicamente activos (por ejemplo, inmunogénicos o terapéuticos). Un polinucleótido puede incluir tan solo 5, 6, 7 u 8 nucleótidos, por ejemplo, en el caso en el que el polinucleótido es un oligonucleótido CpG (los oligonucleótidos CpG varían ampliamente en tamaño, incluyendo, por ejemplo, 5, 10, 20, 50, 100, 200 o 500 nucleótidos, y así sucesivamente, siendo típicos 20-40 nucleótidos). Además, un "polinucleótido" puede incluir secuencias tanto de doble cadena como de cadena simple y se refiere, pero no se limita, a secuencias de ADNc vírico, ARNm procariota o eucariota, ARN y ADN genómico de ADN vírico (por ejemplo, ARN y ADN de virus y retrovirus) o procariota, y secuencias de ADN sintético. El término incluye también secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN. El término incluye además modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a una secuencia nativa, por ejemplo, en la que la molécula de ácido nucleico codifica para una proteína terapéutica o antigénica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a

través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de los huéspedes que producen los antígenos.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "ácido nucleico" se refiere a ADN, ARN, o quimeras formadas a partir de los mismos.

5 Una "especie que contiene polinucleótidos" es una molécula, al menos una parte de la cual es un polinucleótido. Los ejemplos incluyen nucleótidos CpG, constructos vectoriales de ARN, constructos vectoriales de ADN, etc.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. De esta manera, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares se incluyen dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como sus fragmentos están incluidos en la definición. Los términos incluyen también modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a una secuencia nativa, por ejemplo, de manera 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.

15 Una "especie que contiene polipéptidos" es una molécula, al menos una parte de la cual es un polipéptido. Los ejemplos incluyen polipéptidos, proteínas, incluyendo glicoproteínas, antígenos de sacáridos conjugados a proteínas portadoras, y así sucesivamente.

Por "antígeno" se entiende una molécula que contiene uno o más epítopos capaces de estimular el sistema inmune de un huésped para formar una respuesta inmune específica de antígeno celular cuando se presenta el antígeno, 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.

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

25 Típicamente, un epítipo lineal incluirá entre aproximadamente 5-15 aminoácidos. Los epítopos de una proteína determinada pueden identificarse 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) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, en el que los péptidos corresponden a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente US N°4.708.871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23: 709-715. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear 2-dimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, *supra*.

40 El término "antígeno", tal como se usa en la presente memoria, denota tanto antígenos subunidad, es decir, antígenos que están separados y discretos de un organismo entero o célula tumoral con los que el antígeno está asociado en la naturaleza, así como bacterias, virus, parásitos, hongos u otros patógenos o células tumorales muertos, atenuados o inactivados. Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotipo, o fragmentos de los mismos, y mimotopos peptídicos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, están incluidos también en la definición de antígeno, tal como se usa en la presente memoria.

45 De manera similar, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa una proteína inmunogénica, o determinante antigénico *in vivo*, tal como en aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, está incluido también en la definición de antígeno en la presente memoria.

Además, para los propósitos de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de los huéspedes que producen los antígenos.

50 Una "respuesta inmunológica" a un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a las moléculas presentes en la composición de interés. Para los propósitos de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpos, mientras que

una "respuesta inmunitaria celular" es una respuesta mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por parte de las 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 expresadas sobre las superficies de las células. Las CTLs ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por parte de las 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 sobre su superficie. Una "respuesta inmune celular" se refiere también a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras moléculas de este tipo producidas por células T activadas y/u otros glóbulos blancos, incluyendo los derivados de CD4 + y células T CD8 +.

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

La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante una serie de ensayos, tal como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, ensayando para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medición de la producción de citoquinas por las células T en respuesta a una re-estimulación con antígeno. Dichos 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; y los ejemplos a continuación.

El antígeno de interés puede provocar también una respuesta inmune 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  $\delta\gamma$  dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o la vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad, y/o mediar anticuerpo-complemento, o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para proporcionar protección a un huésped inmunizado. Dichas respuestas pueden determinarse usando inmunoensayos estándar y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayos y ensayos ELISA.

Una composición que contiene un antígeno seleccionado adsorbido a una micropartícula, muestra "inmunogenicidad mejorada" cuando posee una mayor capacidad para provocar una respuesta inmune que la respuesta inmunitaria provocada por una cantidad equivalente del antígeno cuando es suministrada sin asociación con la micropartícula. De esta manera, una composición puede mostrar "inmunogenicidad mejorada", por ejemplo, debido a que el antígeno es más fuertemente inmunogénico en virtud de la adsorción a la micropartícula, o debido a que se necesita una dosis más baja de antígeno para conseguir una respuesta inmune en el sujeto al que es administrado. Dicha inmunogenicidad mejorada puede determinarse, por ejemplo, mediante la administración de la composición de micropartículas/antígeno y los controles de antígeno, a animales y comparando los resultados del ensayo de ambos.

Tal como se usa en la presente memoria, "tratamiento" (incluyendo sus variaciones, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a cualquiera de entre (i) prevención de un patógeno o trastorno en cuestión (por ejemplo, cáncer o infección por un patógeno, tal como en una vacuna tradicional), (ii) reducción o eliminación de síntomas, y (iii) eliminación sustancial o completa del patógeno o trastorno en cuestión. El tratamiento puede efectuarse profilácticamente (antes del patógeno o trastorno en cuestión) o terapéuticamente (después de la llegada de los mismos).

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de una composición que comprende las micropartículas de la presente invención se refieren en la presente memoria a una cantidad suficiente de la composición de micropartículas para tratar o diagnosticar una afección de interés. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo, por ejemplo, de la especie, la edad y el estado general del sujeto; la gravedad de la afección a tratar; la especie particular adsorbida/atrapada de interés; en el caso de una respuesta inmunológica, la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos y el grado de protección deseado; y su modo de administración, entre otros factores. Una cantidad apropiada "eficaz" en cualquier caso individual puede ser determinada por una persona con conocimientos ordinarios en la materia. De esta manera, una "cantidad terapéuticamente eficaz" estará comprendida típicamente en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

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 denota una edad en particular. De esta manera, están cubiertos tanto los animales adultos como los recién nacidos.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede ser administrado a un individuo junto con la formulación de micropartículas sin causar ningún efecto biológico excesivamente indeseable en el individuo o sin interactuar de manera excesivamente perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

5 El término "excipiente" se refiere esencialmente a cualquier sustancia accesoria que pueda estar presente en la forma de dosificación acabada. Por ejemplo, el término "excipiente" incluye vehículos, aglutinantes, disgregantes, cargas (diluyentes), lubricantes, deslizantes (mejoradores de flujo), adyuvantes de compresión, colores, edulcorantes, conservantes, agentes de suspensión/dispersantes, formadores de película/revestimientos, aromas y tintas de impresión.

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

15 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "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 se conocen también como "oligonucleótidos CpG" en la técnica. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "motivo CpG" se refiere a una parte o partes de dinucleótido de un oligonucleótido que comprende un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanosina. Puede usarse también 5-metilcitosina en lugar de citosina.

20 Los oligonucleótidos que comprenden motivos CpG mezclados con antígenos han demostrado que inducen fuertes respuestas inmunes Th1. Roman et al., Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis et al., J. Immunol., 1998, 160, 870-876; Chu et al., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; y Moldoveanu et al., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224. Los dinucleótidos CpG no metilados son relativamente comunes en el ADN bacteriano, pero están infra-representados y metilados en el ADN de los vertebrados. Bird, Trends Genet., 1987, 3, 342-347. El ADN bacteriano o los oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG no metilados son conocidos también por inducir respuestas inmunes que incluyen, por ejemplo, proliferación de células B, secreción de interleuquinas -6 y e inmunoglobulina, y resistencia a apoptosis. Krieg et al., Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al., J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al., J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al., Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al., Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey et al., J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; 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; Publicación PCT WO 96/02555; Publicación PCT WO 98/16247; Publicación PCT WO 98/18810; Publicación PCT WO 98/40100; Publicación PCT WO 98/55495; Publicación PCT WO 98/37919; y Publicación PCT WO 98/52581.

35 Los oligonucleótidos CpG pueden prepararse usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos convencionales bien conocidas por las personas con conocimientos en la materia. Los oligonucleótidos CpG pueden comprender una cadena principal modificada, tal como un fosforotioato o ácido peptidnucleico, con el fin de conferir al oligonucleótido resistencia a las nucleasas. Las cadenas principales modificadas son bien conocidas para las personas con conocimientos en la materia. Los ácidos peptidnucleicos preferentes se describen en detalle en las patentes US N° 5.821.060, 5.789.573, 5.736.392 y 5.721.102, la patente japonesa N° 10231290, la patente europea N° 839.828 y las publicaciones PCT N° WO 98/42735, WO 98/42876, WO 98/36098, WO 98/27105, WO 98/20162, WO 98/16550, WO 98/15648, WO 98/04571, WO 97/41150, WO 97/39024 y WO 97/38013, cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria por referencia en su totalidad.

40 Los oligonucleótidos CpG comprenden típicamente entre aproximadamente 6 y aproximadamente 100 nucleótidos, más típicamente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 nucleótidos, más típicamente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 nucleótidos. Además, los oligonucleótidos CpG de la invención pueden comprender sustituciones de los restos de azúcar y los restos de base nitrogenada. Los oligonucleótidos preferentes CpG se divulgan, por ejemplo, en Krieg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 12631-12636, Klinman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2879-2883, Weiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 10833-10837, Chu et al., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631, Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15553-15558, Ballas et al., J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845, Cowdery et al., J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575, Halpern et al., Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78, Yamamoto et al., Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873, Stacey et al., J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122, 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, Roman et al., Nat. Med., 1997, 3, 849-854, Davis et al., J. Immunol., 1998, 160, 870-876, Lipford et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344, Moldoveanu et al., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Yi et al., J. Immunol., 1998, 160, 5898-5906, Publicación PCT WO 96/02555, Publicación PCT WO 98/16247, Publicación PCT WO 98/18810, Publicación PCT WO 98/40100, Publicación PCT WO 98/55495, Publicación PCT WO 98/37919, y Publicación PCT WO 98/52581 y WO 02/26209, de titularidad compartida.

Tal como se usa en la presente memoria, "ARNdc" se refiere a ARN de doble cadena, que puede ser obtenido a partir de



diversas fuentes. Una serie de organismos producen ARNdc naturalmente, incluyendo levaduras y virus. El ARNdc proveniente de dichas fuentes está compuesto generalmente de pares de bases intermitentes ácido riboguanílico-ácido ribocitidílico ([rG-rC]) y ácido riboadenílico-ácido poliribouridílico ([rA-rU]). Se cree que todos los virus, excepto los virus de ADN de cadena sencilla, producen ARNdc. El ARNdc vírico existe generalmente bien en forma de dúplex de cadenas de ARN complementarias o viene en forma de estructura secundaria intramolecular dentro de un ARN de cadena sencilla. Las fuentes víricas de ARN de doble cadena para virus ARNdc (genómico), virus ARNss (intermedios de transcripción), virus de ADNdc (transcripción simétrica seguida de hibridación ARN-ARN), y retrovirus (estructura secundaria en el ARNm vírico) son conocidas y se describen, por ejemplo, en Majde, J.A., J. Intenfer. Cytokine Res. (2000) 20:259-272 y Jacobs y Langland, Virology (1996) 219:339-349. Las fuentes particulares de ARNdc vírico incluyen, pero no se limitan a, ARNdc de células infectadas por mengovirus (Falcoff et al., Antimicrob. Agents Chemother. (1973)3: 590-598); ARNdc de reovirus y virus fúngicos (Field et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1967) 58: 1004-1010, De Benedetti et al., J. Virol. (1985)54: 408-413); ARNdc de retrovirus (Jacobs y Langland, Virology (1996) 219: 339-349), tal como de VIH-1 (Maitra et al., Virology (1994) 204: 823-827); ARNdc extraído de células infectadas por picornavirus (Falcoff et al., Antimicrob. Agents Chemother. (1973)3: 590-598); ARNdc de pulmones infectados con gripe (Majde et al., Microb. Patógeno. (1991)10: 105-115); ARNdc de células de plantas infectadas (Lin y Langenberg, Virology (1985) 142: 291-298); ARNdc de togavirus (Stollar, B. D., Crit. Rev. Biochem. (1975)3: 45-69); ARNdc de células infectadas con virus de la rubeola (Lee et al., Virology (1994) 200: 307-312); ARNdc de células infectadas con virus Semliki Forest (Lee et al., Virology (1994) 200: 307-312); ARNdc de células infectadas con virus de dengue (MacKenzie et al., Virology (1996) 220: 232-240); los ARNdc conocidos como Larifan (Riga, Letonia) y Ridostin ("Diapharam" NOP "VECTOR", Berdsk, Rusia). Cualquiera de estos diferentes ARNdc, así como los ARNdc de otras fuentes, encontrarán uso con las composiciones y los procedimientos de la presente memoria.

El ARNdc de células infectadas se obtiene fácilmente usando procedimientos estándar de extracción de ácido nucleico, tales como técnicas de extracción con fenol, y tal como se describe en varias de las publicaciones indicadas anteriormente. Véase, por ejemplo, Falcoff et al., Antimicrob. Agents Chemother. (1973)3: 590-598; Fayet et al., Prog. Immunobiol. Standard. (1972)5: 267-273; Majde et al., Microb. Pathogen. (1991)10: 105-115).

Se conocen también una serie de ARNdc sintéticos y encontrarán uso en la presente memoria y se sintetizan usando técnicas bien conocidas y descritas en la técnica. Dichos ARNdc sintéticos incluyen, pero no se limitan a, ácido poliriboinosínico-polirribocitidílico (poli[rI-rC]) y ácido poliriboguanílico-polirribocitidílico (poli[rG-rC]) (véase, por ejemplo, Michelson et al., Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol. (1967)6: 83-141); ácido poliriboadenílico-poliribouridílico (poli[rA-rU]); ARNdc de bajo peso molecular de composición de base mixta, tal como, pero sin limitarse a, un ARNdc sintético con 309 pb (Haines et al., J. Biol. Chem. (1992)267: 18315-18319); así como los ARNdc sintéticos mal emparejados descritos, por ejemplo, en las patentes US Nº 5.906.980 y 5.258.369. Además, Los ARNdc con cadenas principales modificadas pueden prepararse usando técnicas bien conocidas en la materia. Puede encontrarse información adicional, por ejemplo, en el documento PCT/US02/30423 de titularidad compartida.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "constructo vectorial" se refiere en general a cualquier conjunto que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o secuencias de ácido nucleico o gen o genes de interés. Un constructo vectorial incluye típicamente un promotor/potenciador transcripcional o elemento o elementos definidores de locus, u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios, tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación post-traducciona de mensajero, o modificación post-transcripcional de proteína. Además, el constructo vectorial incluye típicamente una secuencia que, cuando se transcribe, está unida operativamente a la secuencia o secuencias o gen o genes de interés y actúa como una secuencia de iniciación de la traducción. El constructo vectorial puede incluir también opcionalmente una señal que dirige la poliadenilación, un marcador seleccionable, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de traducción. Además, si el constructo vectorial se coloca en un retrovirus, el constructo vectorial puede incluir una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTRs), y sitios de unión de cebador de cadena positiva y negativa apropiados para el retrovirus usado (si estos no están ya presentes).

Tal como se usa en la presente memoria, un "constructo vectorial de ADN" se refiere a una molécula de ADN que es capaz de dirigir su propia amplificación o autorreplicación *in vivo*, típicamente dentro de una célula diana.

Un tipo específico de constructo vectorial de ADN es un plásmido, que es una molécula de ADN episomal circular capaz de replicación autónoma en una célula huésped. Típicamente, un plásmido es un ADN circular de doble cadena, que forma un bucle en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. pCMV es un plásmido específico que es bien conocido en la técnica. Un vector pCMV preferente es uno que contiene el potenciador/promotor temprano inmediato de CMV y un terminador de la hormona de crecimiento bovina. Se describe en detalle en Chapman, B. S., et al. 1991. "Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells." Nucleic Acids Res. 19:3979-86.

Se conocen otros constructos vectoriales de ADN, que están basados en virus de ARN. Estos constructos vectoriales de ADN comprenden típicamente un promotor que funciona en una célula, eucariota 5' de una secuencia de ADNc para la

que el producto de transcripción es un constructo vectorial de ARN (por ejemplo, un replicón de vector de ARN de alfavirus), y una región 3' de terminación. El constructo vectorial de ARN comprende preferentemente un genoma de ARN de un picornavirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, virus de la fiebre amarilla o alfavirus (por ejemplo, virus Sindbis, virus Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana o virus del río Ross), que ha sido modificado mediante la sustitución de uno o más genes de proteínas estructurales con una secuencia heteróloga de ácido nucleico seleccionada que codifica para un producto de interés. Los constructos vectoriales de ARN pueden obtenerse mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN. Los ejemplos específicos incluyen plásmidos basados en virus Sindbis (pSIN) tales como pSINCP, descritos, por ejemplo, en las patentes US 5.814.482 y 6.015.686, así como en las solicitudes de patente internacionales WO 97/38087, WO 99/18226 y WO 02/26209, de propiedad legalmente adquirida. La construcción de dichos vectores, en general, se describe en las patentes US 5.814.482 y 6.015.686. Brevemente, el ARN se obtiene a partir de un virus de ARN, a continuación, se sintetiza el ADNc mediante amplificación por PCR usando cebadores apropiados para los genes particulares o las porciones del virus de ARN, cuyos cebadores pueden contener también sitios de restricción adicionales, según sea necesario. A continuación, los fragmentos de ADNc se clonan en un plásmido y se transforman en un huésped apropiado, tal como *E. coli*. Las colonias positivas se cultivan para la purificación del plásmido y, a continuación, los plásmidos se ensamban en el vector deseado con una parte que tiene ADN heterólogo, tal como un gen deseado que codifica para un antígeno.

Otros ejemplos de constructos vectoriales incluyen constructos vectoriales de ARN (por ejemplo, constructos vectoriales de alfavirus) y similares.

Tal como se usa en la presente memoria, "constructo vectorial de ARN", "replicón de vector de ARN" y "replicón" se refieren a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o autorreplicación *in vivo*, típicamente dentro de una célula diana. El constructo vectorial de ARN se usa directamente, sin el requisito de la introducción de ADN en una célula y el transporte al núcleo, donde se produciría la transcripción. Al usar el vector de ARN para el suministro directo al citoplasma de la célula huésped, la replicación y la traducción autónomas de la secuencia de ácido nucleico heterólogo ocurren de manera eficiente.

En algunas realizaciones, el constructo vectorial de ARN se obtiene mediante transcripción *in vitro* a partir de un constructo vectorial basado en ADN. Por ejemplo, el constructo vectorial de ARN puede derivarse del genoma de un alfavirus, más preferentemente del virus Sindbis (SIN), virus Semliki Forest (SFV), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), o virus del río Ross (RRV). O el constructo vectorial de ARN puede derivarse de un virus distinto de un alfavirus. Dichos otros virus usados para la derivación de constructos vectoriales de ARN incluyen virus de ARN de cadena positiva, por ejemplo, picornavirus, flavivirus, rubivirus o coronavirus. Las composiciones y los procedimientos para la transcripción *in vitro* de vectores de ARN basados en alfavirus se proporcionan en detalle en otros sitios (véanse la patente US 5.842.723, el documento WO 02/26209, de propiedad legalmente adquirida, y Polo et al, 1999, PNAS 96:4598-603).

Un replicón de vector de ARN derivado de alfavirus contiene típicamente los siguientes elementos: las secuencias 5' virales necesarias en cis para la replicación (denominadas también 5' CSE), secuencias que, cuando se expresan, codifican para proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activo (por ejemplo, de nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), las secuencias virales 3' necesarias en cis para la replicación (denominadas también 3' CSE), y un trazo de poliadenilato. Un replicón de vector de ARN derivado de alfavirus puede contener también un promotor de "región de unión" subgenómico vírico, secuencias a partir de uno o más genes de proteínas estructurales o porciones de los mismos, molécula o moléculas de ácido nucleico extrañas que son de un tamaño suficiente para permitir la producción de virus viable, así como secuencia o secuencias heterólogas a ser expresadas.

#### B. Procedimientos generales

Tal como se ha indicado anteriormente, diversas realizaciones de la presente invención se refieren a micropartículas que comprenden: (a) un polímero biodegradable, por ejemplo, uno que comprende un poli (ácido  $\alpha$ -hidroxi), un ácido polihidroxi butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido o un policianoacrilato; (b) un tensioactivo catiónico; y (c) una primera especie que contiene polinucleótidos adsorbidos en las micropartículas, en el que la primera especie que contiene polinucleótidos constituye al menos el 5 por ciento del peso total de las micropartículas, más típicamente del 10 al 30 por ciento, e incluso más típicamente del 10 al 20 por ciento.

Los presentes inventores han encontrado inesperadamente que las especies que contienen polinucleótidos pueden ser adsorbidas en micropartículas a niveles altos. Por ejemplo, los presentes inventores han preparado micropartículas que contienen el 8, 12, 16 y 20% en peso de una especie que contiene polinucleótidos adsorbidos (es decir, un constructo vectorial que codifica para polipéptido-antígeno, más específicamente un ADN de plásmido pCMV). Quizás incluso más inesperadamente, se encontró que los niveles de adsorción incrementados de las especies que contienen polinucleótidos resultaban en un incremento correspondiente en la inmunogenicidad observada tras la inyección en animales huésped (es decir, ratones).

En muchas realizaciones, la especie que contiene polinucleótidos codifica para una especie que contiene polipéptidos, tal como un antígeno que contiene polipéptidos. Como resultado, las micropartículas de la presente invención son particularmente útiles para la inmunización contra virus intracelulares que normalmente provocan respuestas inmunes pobres.

5 Por ejemplo, la presente invención encontrará uso para estimular una respuesta inmune contra una amplia diversidad de antígenos que contienen polipéptidos de la familia herpesvirus, incluyendo proteínas derivadas de virus herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2, tales como HSV-1 y HSV -2 glicoproteínas gB, gD y gH; antígenos derivados del virus de la varicela zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV) incluyendo CMV gB y gH; y antígenos derivados de otros herpesvirus humanos tales como HHV6 y HHV7. (Véase, por ejemplo Chee et al., *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169, para un análisis del contenido codificador de proteína del citomegalovirus; McGeoch et al., *J. Gen. Virol.* (1988) 69: 1531-1574, para una discusión de las diversas proteínas codificadas por HSV-1; la patente US N° 5.171.568 para una discusión de las proteínas de HSV-1 y HSV-2 gB y gD y los genes que codifican para las mismas; Baer et al., *Nature* (1984) 310: 207-211, para la identificación de secuencias codificadoras de proteínas en un genoma de EBV; y Davison y Scott, *J. Gen. Virol.* (1986) 67: 1859-16, para una revisión de VZV).

15 Los antígenos de la familia del virus de la hepatitis, incluyendo virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis delta (HDV), virus de la hepatitis E (HEV) y virus de la hepatitis G (HGV), pueden ser usados también convenientemente en las técnicas descritas en la presente memoria. A modo de ejemplo, la secuencia genómica viral de HCV es conocida, así como los procedimientos para obtener la secuencia. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO 89/04669; WO 90/11089 y WO 90/14436. El genoma del VHC codifica para varias proteínas virales, incluyendo E1 (conocida también como E) y E2 (conocida también como E2/NSI) y una proteína de nucleocápside N-terminal (denominada "core") (véase, Houghton et al., *Hepatology* (1991) 14: 381-388, para una discusión de las proteínas del VHC, incluyendo E1 y E2). Cada una de estas proteínas, así como sus fragmentos antígenicos, encontrará uso en la composición y los procedimientos de la presente memoria.

25 De manera similar, la secuencia para el antígeno  $\delta$  de HDV es conocida (véase, por ejemplo, la patente US N° 5.378.814) y este antígeno puede usarse también convenientemente en la composición y los procedimientos de la presente memoria. Además, los antígenos derivados de HBV, tales como el antígeno core, el antígeno de superficie, sAg, así como las secuencias presuperficie, pre-S1 y pre-S2 (anteriormente denominadas pre-S), así como sus combinaciones, tales sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2 y pre-S1/pre-S2, encontrarán uso en la presente memoria. Véase, por ejemplo, *HBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study* in Mackett, M. y Williamson, J.D., *Human Vaccines and Vaccination*, pp. 159-176, para una discusión de la estructura de HBV; y las patentes US N° 4.722.840, 5.098.704, 5.324.513, incorporadas a la presente memoria por referencia, en su totalidad; Beames et al., *J. Virol.* (1995) 69: 6833-6838, Bimbaum et al., *J. Virol.* (1990)64: 3319-3330; y Zhou et al., *J. Virol.* (1991)65: 5457-5464.

35 Los antígenos derivados de otros virus encontrarán también uso en las composiciones y los procedimientos de la presente invención, tales como, sin limitación, proteínas a partir de miembros de las familias Picornaviridae (por ejemplo, poliovirus, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por ejemplo, virus de la rubeola, 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 tipos A, B y C, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-II; VIH-1 (conocido también como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), incluyendo pero sin limitarse a los antígenos de los aislados VIH<sub>IIB</sub>, HIV<sub>SF2</sub>, HIV<sub>LAV</sub>, HIV<sub>LA1</sub>, HIV<sub>MN</sub>); VIH-1<sub>CM235</sub>, VIH-1<sub>US4</sub>; VIH-2; virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV) entre otros. Además, los antígenos pueden derivarse también a partir de virus del papiloma humano (VPH) y los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. Véase, por ejemplo *Virology*, 3ª Edición (W. K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2ª Edición (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus.

45 Más particularmente, las proteínas de envoltura gp120 o gp140 de cualquiera de los aislados de VIH anteriores, incluyendo los miembros de los diversos subtipos genéticos de VIH, son bien conocidos y se ha informado acerca de los mismos (véase, por ejemplo, Myers et al., *Los Alamos Database*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 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 envoltura de una variedad de aislados de VIH) y los antígenos derivados de cualquiera de estos aislados encontrarán uso en los procedimientos de la presente invención. Además, la invención es igualmente aplicable a otras proteínas inmunogénicas derivadas a partir de cualquiera de los diversos aislados de VIH, incluyendo cualquiera de las diversas proteínas de envoltura tales como gp160 y gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas derivadas a partir de las regiones pol y tat.

50 El virus de la gripe es otro ejemplo de un virus para el que la presente invención será particularmente útil. Específicamente, las glicoproteínas de envoltura HA y NA de la gripe A son de particular interés para generar una respuesta inmune. Se han identificado numerosos subtipos HA de gripe A se han identificado (Kawaoka et al., *Virology* (1990) 179: 759-767; Webster et al., "Antigenic variation among type A influenza viruses", p. 127-168. En: P. Palese y

D.W. Kingsbury (ed.), Genetics of influenza viruses. Springer-Verlag, Nueva York). De esta manera, las proteínas derivadas a partir de cualquiera de estos aislados pueden usarse también en las composiciones y los procedimientos descritos en la presente memoria.

Las composiciones y los procedimientos descritos en la presente memoria encontrarán uso también con numerosos antígenos bacterianos, tales como los derivados a partir de organismos que causan difteria, cólera, tuberculosis, ántrax, tétanos, tos ferina, meningitis y otros estados patógenos, incluyendo, sin limitación, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* (Por ejemplo A, B, C, Y, W, por ejemplo, W<sub>135</sub>), *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* y *Haemophilus influenzae*. *Haemophilus influenzae* tipo B (HIB), *Helicobacter pylori* y sus combinaciones. Los ejemplos de antígenos de *Neisseria meningitidis* B se divulgan en las siguientes solicitudes de patente de propiedad legalmente adquirida: PCT/US99/09346; PCT IB98/01665 y PCT IB99/00103. Los ejemplos de antígenos parasitarios incluyen los derivados a partir de organismos que causan malaria y enfermedad de Lyme.

Los antígenos adicionales para su uso con la invención, no necesariamente exclusivamente los enumerados en otra parte de la presente solicitud, incluyen los siguientes: (a) un antígeno de proteína a partir de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como los de las referencias 1-7, más adelante; (b) una preparación de vesícula de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis* serogrupo B, tal como las divulgadas en las referencias 8, 9, 10, 11, etc., más adelante; (c) un antígeno de sacárido de *N. meningitidis* serogrupo A, C, W<sub>135</sub> y/o Y, tal como el oligosacárido divulgado en la referencia 12, más adelante, del serogrupo C (véase también la referencia 13); (d) un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, referencias 14, 15, 16]. (e) un antígeno de *N. gonorrhoeae* [por ejemplo, referencias 1, 2, 3]; (e) un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, referencias 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]; (f) un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, referencia 24]; (g) un antígeno de virus de hepatitis A, tal como virus inactivado [por ejemplo, referencias 25, 26]; (h) un antígeno de virus de la hepatitis B, tal como antígenos de superficie y/o de núcleo [por ejemplo, referencias 26, 27]; (i) un antígeno de virus de la hepatitis C [por ejemplo, referencia 28]; (J) un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como pertussis holotoxina (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, referencias 29 y 30]; (k) un antígeno de difteria, tal como toxoide diftérico [por ejemplo, capítulo 3 de la referencia 31], por ejemplo, el mutante CRM<sub>197</sub> [por ejemplo, referencia 32]; (l) un antígeno de tétanos, tal como un toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 4 de la referencia 31]; (m) un antígeno de proteína de *Helicobacter pylori* tal como CagA [por ejemplo, referencia 33], VacA [por ejemplo, referencia 33], NAP [por ejemplo, referencia 34], HopX [por ejemplo, referencia 35], HopY [por ejemplo, referencia 35] y/o ureasa; (n) un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, referencia 13]; (o) un antígeno de *Porphyramonas gingivalis* [por ejemplo referencia 36]; (P) antígeno o antígenos de la polio [por ejemplo, referencias 37, 38] tales como IPV u OPV; (Q) antígeno o antígenos de la rabia [por ejemplo, referencia 39] tal como virus inactivado liofilizado [por ejemplo, referencia 40, RabAvert™]; (r) antígenos de sarampión, paperas y/o de rubeola [por ejemplo, capítulos 9, 10 y 11 de la referencia 31]; (s) antígeno o antígenos de la gripe [por ejemplo, capítulo 19 de la referencia 31], tales como las proteínas de superficie hemaglutinina y/o neuraminidasa; (t) un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [Por ejemplo, time 41]; (u) un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo del grupo B) [por ejemplo, referencias 42, 43]; (v) un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (Estreptococo del grupo A) [por ejemplo, referencias 43, 44, 45]; (w) un antígeno de *Staphylococcus aureus* [por ejemplo, referencia 46]; y (x) composiciones que comprenden uno o más de estos antígenos. Cuando se usa un antígeno de sacárido o carbohidrato, se conjuga preferentemente con una proteína portadora con el fin de mejorar la inmunogenicidad [por ejemplo, referencias 47 a 56]. Las proteínas portadoras preferentes son toxinas o toxoides bacterianos, tales como los toxoides diftérico o tetánico. El toxoide diftérico CRM<sub>197</sub> es particularmente preferente. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [por ejemplo, referencia 57], péptidos sintéticos [por ejemplo, referencias 58, 59], proteínas de choque térmico [por ejemplo, referencia 60], proteínas de pertussis [por ejemplo, referencias 61, 62], proteína D de *H. Influenzae* [por ejemplo referencia 63], toxina A o B de *C. difficile* [por ejemplo referencia 64], etc. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, es preferente 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 mayor). Los sacáridos de serogrupos diferentes de *N. meningitidis* pueden conjugarse con las mismas o diferentes proteínas portadoras. Puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector adecuado, cuando sea necesario. Los antígenos de proteínas tóxicas pueden ser detoxificados cuando sea necesario (por ejemplo detoxificación de toxina de pertussis por medios químicos y/o medios [referencia 30]. Véanse: la solicitud de patente internacional 99/24578 [referencia 1]; la solicitud de patente internacional WO99/36544 [referencia 2]; la solicitud de patente internacional WO99/57280 [referencia 3]; la solicitud de patente internacional WO00/22430 [referencia 4]; Tettelin et al., (2000) Science 287:1809-1815 [referencia 5]; la solicitud de patente internacional WO96/29412 [referencia 6]; Pizza et al. (2000) Science 287:1816-1820 [referencia 7]; la solicitud de patente internacional PCT/IB01/00166 [referencia 8]; Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096 [referencia 9]; Fukasawa et al. (1990) Vaccine 17:2951-2958 [referencia 10]; Rosenqvist et al. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333 [referencia 11]; Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698 [referencia 12]; Costantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263 [referencia 13]; Watson (2000) Padiatr Infect Dis J 19:331-332 [referencia 14]; Rubin (2000) Padiatr Clin North Am 47:269-285, v [referencia 15]; Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207 [referencia 16]; la solicitud de patente internacional presentada el 3 de Julio de 2001 que reivindica prioridad con respecto a GB-0016363.4 [referencia 17]; Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389 [referencia 18]; Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406 [referencia 19]; Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis.

181(Suppl 3):S524-S527 [referencia 20]; la solicitud de patente internacional WO99/27105 [referencia 21]; la solicitud de patente internacional WO00/27994 [referencia 22]; la solicitud de patente internacional WO00/37494 [referencia 23]; la solicitud de patente internacional WO99/28475 [referencia 24]; Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188 [referencia 25]; Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326 [referencia 26]; Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80 [referencia 27]; Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915 [referencia 28]; Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355 [referencia 29]; Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238 [referencia 30]; Vaccines (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0 [referencia 31]; Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70 [referencia 32]; la solicitud de patente internacional WO93/18150 [referencia 33]; la solicitud de patente internacional WO99/53310 [referencia 34]; la solicitud de patente internacional WO98/04702 [referencia 35]; Ross et al. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142 [referencia 36]; Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308 [referencia 37]; Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126 [referencia 38]; Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6 [referencia 39]; *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19 [referencia 40]; McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107 [referencia 41]; Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6 [referencia 42]; las solicitudes de patente GB 0026333.5, 0028727.6 & 0105640.7 [referencia 43]; Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii [referencia 44]; Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98:4658-4663 [referencia 45]; Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; véanse también las páginas 1218-1219 [referencia 46]; Ramsay et al. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196 [referencia 47]; Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36 [referencia 48]; Buttery & Moxon (2000) *JR Coll Physicians London* 34:163-168 [referencia 49]; Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii [referencia 50]; Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567 [referencia 51]; la patente europea 0 477 508 [referencia 52]; la patente US Nº 5.306.492 [referencia 53]; la solicitud de patente internacional WO98/42721 [referencia 54]; *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114 [referencia 55]; Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 & 012342335X [referencia 56]; la solicitud de patente europea 0372501 [referencia 57]; la solicitud de patente europea 0378881 [referencia 58]; la solicitud de patente europea 0427347 [referencia 59]; la solicitud de patente internacional WO93/17712 [referencia 60]; la solicitud de patente internacional WO98/58668 [referencia 61]; la solicitud de patente europea 0471177 [referencia 62]; la solicitud de patente internacional WO00/56360 [referencia 63]; la solicitud de patente internacional WO00/61761 [referencia 64].

Cuando se incluye antígeno de difteria en la composición, es preferente incluir también antígeno del tétanos y antígenos de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos, es preferente incluir también antígenos de difteria y de pertussis. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de pertussis, es preferente incluir también antígenos de difteria y de tétanos.

Los antígenos adicionales incluyen antígenos dirigidos a la peste, la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, la viruela, la fiebre tifoidea, tifus, el virus de la leucemia felina y la fiebre amarilla.

Las micropartículas de la presente invención pueden usarse para suministrar una amplia diversidad de especies además de las especies que contienen polinucleótidos adsorbidos en la superficie. Dichas especies adicionales incluyen: (a) antígenos, tales como los antígenos que contienen polipéptidos indicados anteriormente, (b) productos farmacéuticos tales como antibióticos y agentes antivirales, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, vasodilatadores, fármacos cardiovasculares, psicotrópicos, neurolépticos, antidepresivos, fármacos antiparkinsonianos, bloqueadores beta, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la bradicinina, inhibidores de ECA, vasodilatadores, inhibidores de prolactina, esteroides, antagonistas de hormonas, antihistamínicos, antagonistas de serotonina, heparina, agentes quimioterapéuticos, antineoplásicos y factores de crecimiento, incluyendo pero sin limitarse a PDGF, EGF, KGF, IGF-1 e IGF-2, FGF, (c) hormonas incluyendo hormonas peptídicas tales como insulina, proinsulina, hormona del crecimiento, GHRH, LHRH, EGF, somatostatina, SNX-111, BNP, insulintropina, ANP, FSH, LH, PSH y hCG, hormonas esteroides gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterona), hormona estimulante de tiroides, inhibina, colecistoquinina, ACTH, CRF, dinorfinas, endorfinas, endotelina, fragmentos de fibronectina, galanina, gastrina, insulintropina, glucagón, fragmentos de proteínas de unión a GTP, guanilina, leukocininas, magainina, mastoparans, dermaseptina, sistemina, neuromedinas, neurotensina, pancreastatina, polipéptido pancreático, sustancia P, secretina, timosina, etc., (d) enzimas, (e) mediadores de transcripción o de traducción, (f) intermedios en vías metabólicas, (g) inmunomoduladores, tales como cualquiera de las diversas citoquinas incluyendo interleuquinas -1, interleuquinas -2, interleuquinas -3, interleuquinas -4 y gamma-interferón, y (h) adyuvantes (véase a continuación).

Dichas especies adicionales pueden ser adsorbidas, por ejemplo, sobre las superficies de las micropartículas junto con las especies que contienen polinucleótidos, atrapadas dentro de las micropartículas, disueltas o dispersadas en solución, pero no unidas a las micropartículas, y/o adsorbidas o atrapadas dentro de otro grupo de micropartículas.

En algunas realizaciones, las composiciones de micropartículas de la presente invención pueden usarse para la administración dirigida específica de sitio. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones de micropartículas puede usarse para dirigir las al pulmón, hígado, bazo, circulación sanguínea o médula ósea.

Los polímeros biodegradables para la fabricación de micropartículas para su uso en la presente invención están comercialmente disponibles, de manera sencilla, por ejemplo, en Boehringer Ingelheim, Alemania y Birmingham

- Polymers, Inc., Birmingham, AL. Por ejemplo, los polímeros útiles para formar las micropartículas de la presente memoria incluyen homopolímeros, copolímeros y polímeros mezclados derivados a partir de los siguientes: ácido polihidroxitirico (conocido también como polihidroxitirato); ácido polihidroxi valérico (conocido también como polihidroxivalerato); ácido poliglicólico (PGA) (conocido también como poliglicólido); ácido poliláctico (PLA) (conocido también como poliláctido); polidioxanona; policaprolactona; poliortoéster; y polianhídrido. Más preferentes son los poli ( $\alpha$ -hidroxi ácidos), tales como poli (L-láctido), poli (D,L-láctido) (conocidos ambos como "PLA" en la presente memoria), poli (hidroxibutiratos), copolímeros de D,L-láctido y glicólido, tales como poli (D,L-láctido-co-glicólido) (designados como "PLG" en la presente memoria) o copolímeros de D,L-láctido y caprolactona. Los polímeros particularmente preferentes para uso en la presente memoria son los polímeros PLA y PLG.
- Estos polímeros están disponibles en una diversidad de pesos moleculares, y el peso molecular apropiado para un uso determinado es determinado fácilmente por una persona con conocimientos en la materia. De esta manera, por ejemplo, para PLA, un peso molecular adecuado estará comprendido en el intervalo de aproximadamente 2000 a 5000. Para PLG, los pesos moleculares adecuados oscilarán generalmente entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 200.000, típicamente de aproximadamente 15.000 a aproximadamente 150.000
- Si se usa un copolímero, puede haber disponibles polímeros con una diversidad de proporciones de monómeros. Por ejemplo, cuando se usa PLG para formar las micropartículas, una diversidad de proporciones molares de láctido:glicólido encontrarán uso en la presente memoria, y la relación es, en gran medida, un problema de elección, dependiendo en parte de la especie absorbida/atrapada co-administrada y de la velocidad de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero PLG 50:50, que contiene un 50% de D,L-láctido y un 50% de glicólido proporcionará un copolímero de resorción rápida, mientras que PLG 75:25 se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10, incluso más lentamente, debido al aumento en el componente láctido. Es evidente que una persona con conocimientos en la materia determina fácilmente una relación adecuada de láctido:glicólido en base, por ejemplo, a la naturaleza del antígeno y el trastorno en cuestión. Además, las mezclas de micropartículas con proporciones variables de láctido:glicólido pueden encontrar uso en la presente memoria con el fin de conseguir la cinética de liberación deseada. La velocidad de degradación de las micropartículas de la presente invención puede ser contralada también mediante factores tales como el peso molecular y la cristalinidad del polímero. Los copolímeros PLG con proporciones láctido:glicólido y pesos moleculares variables están comercialmente disponibles a partir de una serie de fuentes, incluyendo 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 50:50 de láctido/glicólido y un peso molecular de 12.000 Da; (b) RG 503, un PLG que tiene una relación molar de 50:50 de láctido/glicólido y un peso molecular de 34.000 Da; (c) RG 504, un PLG que tiene una relación molar de 50:50 de láctido/glicólido y un peso molecular de 48.000 Da; (d) RG 752, un PLG que tiene una relación molar 75:25 de láctido/glicólido y un peso molecular de 22.000 da; y (e) RG 755, un PLG que tiene una relación molar 75:25 de láctido/glicólido y un peso molecular de 68.000 Da. Los polímeros de PLG pueden sintetizarse también mediante policondensación simple del componente de ácido láctico usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como las descritas en Tabata et al., *J. Biomed. Mater. Res.* (1988)22: 837-858.
- Cuando se usan, los polímeros poli (D,L-láctido-co-glicólido) son típicamente aquellos que tienen una relación molar láctido/glicólido comprendida entre 20:80 y 80:20, típicamente de 40:60 a 60:40, y que tienen un molecular peso que varía de 10.000 a 100.000 Daltons, típicamente de 20.000 Daltons a 70.000 Daltons.
- Las micropartículas de polímero se preparan usando cualquiera de los diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, pueden usarse técnicas de emulsión doble/evaporación de disolvente, tales como las descritas en la patente US N° 3.523.907 y Ogawa et al., *Chem. Pharm. Bull.* (1988) 36:1095-1103 para fabricar las micropartículas. Estas técnicas implican la formación de una emulsión primaria que consiste en gotitas de solución de polímero, que se mezclan subsiguientemente con una fase acuosa continua que contiene un estabilizador de partícula/tensioactivo.
- En otras realizaciones, las micropartículas pueden formarse también usando un secado por pulverización y coacervado tal como se describe, por ejemplo, en Thomasin et al., *J. Controlled Release* (1996) 41:131; la patente US N° 2.800.457; Masters, K (1976) *Spray Drying* 2ª Ed. Wiley, Nueva York; técnicas de revestimiento en suspensión aérea, tales como revestimiento en bandeja y revestimiento Wurster, tal como se describe en Hall et al. (1980) *The "Wurster Process" in Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications* (A.F. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida y Deasy, P.B., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1988) S(2):99-139; y gelificación iónica tal como se describe, por ejemplo, en Lim et al., *Science* (1980) 210:908-910.
- En realizaciones preferidas, puede usarse un sistema de evaporación de disolvente agua-en-aceite-en-agua (w/o/w) para formar las micropartículas, según las líneas descritas por O'Hagan et al., *Vaccine* (1993) 11:965-969, PCT/US99/17308 (WO 00/06123) de O'Hagan et al., y Jeffery et al., *Pharm. Res.* (1993) 10:362.
- En general, un polímero de interés, tal como PLG, se disuelve en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, dimetilcloruro (denominado también cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo y similares. El

polímero se proporcionará en una solución aproximadamente al 1-30%, preferentemente aproximadamente al 2-15%, más preferentemente aproximadamente al 3-10% y todavía más preferentemente aproximadamente al 4-8%, en disolvente orgánico. A continuación, la solución de polímero se combina con un primer volumen de solución acuosa y se emulsiona para formar una emulsión de aceite/agua. 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 sódico/ácido etilendiaminotetracético (citrato sódico/EDTA). Estas últimas soluciones pueden (a) proporcionar una tonicidad, es decir, osmolalidad, que es esencialmente la misma que la de los fluidos fisiológicos normales y (b) mantener un pH compatible con las condiciones fisiológicas normales. De manera alternativa, las características de tonicidad y/o de pH de las composiciones de la presente invención pueden ajustarse después de la formación de las micropartículas y antes de la administración. Cuando una o más especies deben ser atrapadas dentro de las micropartículas, las especies pueden añadirse a la solución de polímero o a la solución acuosa. Preferentemente, la relación de volumen de la solución de polímero respecto a la solución acuosa varía de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 20:1, más preferentemente aproximadamente de 10:1. La emulsificación se lleva a cabo usando cualquier equipamiento apropiado para esta tarea y, típicamente, es un aparato de alto cizallamiento, tal como, por ejemplo, un homogeneizador.

En algunas realizaciones, uno o más componentes están atrapados dentro de las micropartículas. Por ejemplo, el componente o los componentes puede introducirse mediante la adición del mismo: (a) a la solución de polímero, si está en forma soluble en aceite o dispersable en aceite, o (b) a la solución acuosa, si están en una forma soluble en agua o dispersable en agua.

A continuación, un volumen de la emulsión o/w se combina preferentemente con un segundo volumen mayor de una solución acuosa, que contiene típicamente un agente tensioactivo. La relación en volumen de la solución acuosa a la emulsión o/w oscila típicamente entre aproximadamente 2:1 y 10:1, más típicamente de aproximadamente 4:1. Los ejemplos de tensioactivos adecuados para la práctica de la invención se han enumeran anteriormente. Las personas con conocimientos ordinarios en la materia pueden seleccionar fácilmente agentes tensioactivos apropiados para el tipo de especie a adsorber. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas en presencia de tensioactivos cargados, tales como tensioactivos aniónicos o catiónicos, pueden producir micropartículas con una superficie que tiene una carga neta negativa o positiva, que puede adsorber una amplia diversidad de moléculas. Por ejemplo, micropartículas fabricadas con tensioactivos aniónicos, tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), por ejemplo, micropartículas SDS-PLG, adsorben especies cargadas positivamente, por ejemplo, especies que contienen polipéptidos tales como proteínas. De manera similar, las micropartículas fabricadas con tensioactivos catiónicos, tales como CTAB, por ejemplo, micropartículas PLG/CTAB, adsorben especies cargadas negativamente, por ejemplo, especies que contienen polinucleótidos, tales como ADN. Cuando la especie a ser adsorbida tiene regiones de carga positiva y negativa, los agentes tensioactivos catiónicos o aniónicos o no iónicos pueden ser apropiados. En la presente invención, los tensioactivos catiónicos son preferentes. Ciertas especies pueden adsorberse más fácilmente en micropartículas que tienen una combinación de tensioactivos. Además, en algunos casos, puede ser deseable añadir tensioactivo a la solución orgánica anterior.

Cuando se usa un agente tensioactivo catiónico tal como CTAB, se proporciona típicamente en una solución aproximadamente al 0,00025-1%, más típicamente una solución aproximadamente al 0,0025-0,1%. En general, se usa una relación de peso a peso de tensioactivo a polímero comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,0001:1 a aproximadamente 0,5:1, más típicamente de aproximadamente 0,001:1 a aproximadamente 0,1:1, e incluso más típicamente de aproximadamente 0,0025:1 a aproximadamente 0,05:1.

A continuación, la mezcla se homogeneiza para producir una doble emulsión w/o/w estable. Cada una de las etapas de homogeneización anteriores se lleva a cabo típicamente a una temperatura ambiente (es decir, 25°C) o más baja, más típicamente más baja, por ejemplo, mientras se enfría en un baño de hielo.

A continuación, los disolventes orgánicos se evaporan.

Los parámetros de formulación pueden manipularse para permitir la preparación de pequeñas micropartículas del orden de 0,05  $\mu\text{m}$  (50 nm) a micropartículas más grandes de 50  $\mu\text{m}$  o incluso más grandes. Véase, por ejemplo, Jeffery et al., Pharm. Res. (1993)10: 362-368; McGee et al., J. Microencap. (1996). Por ejemplo, la agitación reducida resulta en micropartículas más grandes, al igual que un aumento del volumen de fase interna y un aumento en la concentración de polímero. Las partículas pequeñas se producen con una mayor agitación, así como volúmenes de fase acuosa bajos, altas concentraciones de estabilizantes de emulsión y una reducción en la concentración de polímero.

El tamaño de partícula puede determinarse, por ejemplo, mediante 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 se determina también fácilmente usando microscopía electrónica de barrido (SEM).

Después de la preparación, las micropartículas pueden almacenarse como están o liofilizadas para uso futuro. Con el fin de adsorber las especies deseadas en las micropartículas, la preparación de micropartículas puede mezclarse simplemente con las especies de interés y la formulación resultante puede liofilizarse antes de su uso, si se desea. El contenido de las especies adsorbidas puede determinarse usando técnicas estándar.

5 Por ejemplo, las especies que contienen polinucleótidos pueden añadirse a las micropartículas para producir micropartículas con especies que contienen polinucleótidos adsorbidas que tienen una relación peso-peso de típicamente 0,1:1 a 0,25:1.

10 Las micropartículas de polímero de la presente invención pueden tener una diversidad de especies atrapadas o encapsuladas dentro de las mismas, y pueden tener también una diversidad de especies adsorbidas sobre las mismas. De esta manera, por ejemplo, una persona con conocimientos en la materia puede preparar, según la invención, micropartículas que tienen adyuvantes adsorbidos y/o antígenos polipeptídicos adsorbidos, además de especies que contienen polinucleótidos adsorbidos. Una persona con conocimientos en la materia pueden preparar también, según la invención, micropartículas que tienen, por ejemplo, adyuvantes encapsulados, antígenos polipeptídicos encapsulados y/o especies que contienen polinucleótidos encapsulados.

15 Una vez producidas las especies con micropartículas adsorbidas, se formulan en composiciones farmacéuticas, incluyendo vacunas, para tratar y/o diagnosticar una amplia diversidad de trastornos. Las composiciones incluirán generalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, pueden usarse vehículos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, etc. Otros excipientes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes biológicas y similares, pueden estar presentes en dichos vehículos. Un tampón biológico puede ser virtualmente cualquier solución 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 incluyen solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada de Hank y similares. Pueden introducirse también 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/dispersantes, formadores de películas/revestimientos, aromas y tintas de impresión.

20 Pueden usarse adyuvantes para mejorar la eficacia de las composiciones de micropartículas. Los adyuvantes pueden administrarse simultáneamente con las micropartículas de la presente invención, por ejemplo, en la misma composición o en composiciones separadas. De manera alternativa, puede administrarse un adyuvante antes o después de las composiciones de micropartículas de la presente invención. En algunas realizaciones, el adyuvante, tal como un adyuvante inmunológico, es encapsulado en la micropartícula. De manera alternativa, el adyuvante puede ser adsorbido sobre la micropartícula.

30 Los adyuvantes inmunológicos incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alúmina), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59 (publicación internacional N° WO90/14837; Capítulo 10 en Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no es necesario) formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero Pluronic bloqueado L121, y thr-MDP (véase a continuación) microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometido a agitación vorticial para generar una emulsión con un tamaño de partícula más grande, y (c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, 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 (Detox™) (para una discusión adicional de las emulsiones submicrométricas aceite-en-agua adecuadas para su uso en la presente invención, véase la solicitud de patente N° 09/015.736, de propiedad legalmente adquirida, presentada el 29 de Enero de 1998); (3) pueden usarse adyuvantes de saponina, tales como Quil A, o QS21 (por ejemplo, Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)) o partículas generadas a partir de los mismos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), cuyos ICOMS 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 interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) fosfolípidos, por ejemplo, compuestos monofosforil lípido A, incluyendo monofosforil lípido A (MPL) y sus derivados, tales como MPL 3-O-desacilado (3dMPL), por ejemplo, documentos GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente en ausencia sustancial de alúmina cuando se usa con sacáridos de neumococos, por ejemplo, WO00/56358; (7) combinaciones de 3dMPL, por ejemplo, con QS21 y/o emulsiones de aceite-en-agua, por ejemplo, documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (8) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG, descritos anteriormente; (9) un éter de polioxietileno o un éster de



polioxietileno, por ejemplo, el documento WO99/52549; (10) un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) O un éter de polioxietileno alquilo o tensioactivo de éster 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 de 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 que ribosila ADP, tal como una toxina del cólera (CT), una toxina pertussis (PT), o una toxina termo-lábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63 (donde la lisina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 63), LT-R72 (donde la arginina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 72), CT-S109 (donde la serina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 109), y PT-K9/G129 (donde la lisina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 9 y la glicina sustituida en la posición 129) (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO93/13202 y WO92/19265); (16) adyuvantes que comprenden ARNdc, descritos anteriormente; y (17) 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-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

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

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por inyección (que puede ser sin aguja). Las composiciones pueden inyectarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intradérmica o intramuscular. Otros modos de administración incluyen la administración nasal, mucosal, intraocular, rectal, vaginal, 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 puede proporcionarse un curso primario de administración, por ejemplo, con 1-10 dosis separadas, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores, elegidos para mantener y/o reforzar la respuesta terapéutica, por ejemplo en 1-4 meses para una segunda dosis y, si es necesario, una dosis subsiguiente o dosis subsiguientes después de varios meses. El régimen de dosificación vendrá determinado también, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del criterio del médico.

Además, si se desea la prevención de la enfermedad, las micropartículas se administran generalmente antes de la infección primaria con el patógeno de interés. Si se desea el tratamiento, por ejemplo, la reducción de los síntomas o las recurrencias, las micropartículas se administran generalmente después de la infección primaria.

### C. Parte experimental

A continuación, se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen con propósitos ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención, en modo alguno.

Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a las cifras usadas (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero, por supuesto, deberían permitirse algunos errores y desviaciones experimentales.

#### **Ejemplo 1**

##### **Preparación de micropartículas**

Se emulsionan 16,6 ml de 6% p/v RG504 (un polímero PLG que tiene una relación molar de 50:50 de láctido/glicólido y un peso molecular de 42-45 kDaltons, disponible de Boehringer Ingelheim) en cloruro de dimetilo, en un baño de hielo, con 1,5 ml de tampón TE usando la sonda de 10 mm de un homogeneizador de mesa Omni durante 3 minutos a 10.000 rpm. A esta emulsión o/w primaria se añaden 70 ml de una solución de agua destilada que contiene 10 mg de CTAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), seguido de homogeneización durante 15 minutos a 10.000 rpm, también en un baño de hielo. Esto resulta en la formación de una emulsión w/o/w, que se agita posteriormente con un agitador magnético durante la noche, permitiendo que el cloruro de metileno se evapore. Después de agitación durante la noche, permanecen 72 ml de una suspensión, que contienen 1 g de PLG (14 mg PLG/ml) y 10 mg de CTAB (0,14 mg de CTAB/ml), o 1% de CTAB con relación a PLG (denominado en la presente memoria una "suspensión de CTAB al 1%").

Este procedimiento se repite, excepto que se proporcionan 40 mg de CTAB en la solución de agua destilada. Esto produce una suspensión que contiene 1 g de PLG (14 mg de PLG/ml) y 40 mg de CTAB (0,56 mg PLG/ml), o 4% de CTAB vis-à-vis con PLG (denominado en la presente memoria una "suspensión de CTAB al 4%").

**Ejemplo 2**

**Absorción de ADN sobre la superficie de las micropartículas**

5 Se preparan soluciones de 2 mg/ml y de 4 mg/ml de ADN en 1x tampón TE. En este ejemplo, el ADN es un plásmido pCMVgag que codifica para proteína p53 gag de VIH bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus. Se prepara una primera mezcla (denominada "1% CTAB, 4% de ADN") combinando 7,15 ml de la suspensión de CTAB al 1% (que contiene 100 mg de PLG) con 2 ml de la solución de ADN de 2 mg/ml (que contiene 4 mg de ADN). Se permite que la adsorción se lleve a cabo agitando suavemente con un agitador magnético durante 6 horas a 4°C, seguido de liofilización.

10 Se prepara una segunda mezcla (denominada como "1% de CTAB, 8% de ADN") combinando 7,15 ml de la suspensión de CTAB al 1% (que contiene 100 mg de PLG) con 2 ml de la solución de ADN de 4 mg/ml (que contiene 8 mg de ADN), seguido de agitación y liofilización.

Se crean mezclas adicionales, tal como se indica en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1.

	Suspensión 1% de CTAB	Suspensión 4% de CTAB	Solución de ADN de 2 mg/ml	Solución de ADN de 4 mg/ml
1% de CTAB, 4% de ADN	7,15 ml		2 ml	
1% de CTAB, 8% de ADN	7,15 ml			2 ml
1% de CTAB, 12% de ADN	7,15 ml			3 ml
1% de CTAB, 16% de ADN	7,15 ml			4 ml
1% de CTAB, 20% de ADN	7,15 ml			5 ml
4% de CTAB, 4% de ADN		7,15 ml	2 ml	
4% de CTAB, 8% de ADN		7,15 ml		2 ml
4% de CTAB, 12% de ADN		7,15 ml		3 ml
4% de CTAB, 16% de ADN		7,15 ml		4 ml
4% de CTAB, 20% de ADN		7,15 ml		5 ml

15 El tamaño de las micropartículas se determina en un medidor de tamaños Malvern Master después de la liofilización. Los tamaños medidos fueron de 15 micrómetros o menos.

**Ejemplo 3**

**Cuantificación de ADN sobre la superficie de las micropartículas**

20 El contenido total de ADN se analizó re-suspendiendo 10 mg de las micropartículas de NaOH 0,2 N liofilizadas y realizando una lectura de la solución clara después de la hidrólisis a 260 nm. Los resultados se proporcionan en la Tabla 2 a continuación. Se analizó la liberación de ADN in vitro re-suspendiendo 10 mg de las micropartículas liofilizadas en 1 ml de PBS y agitando a 37°C. El sobrenadante se ensayó después de 24 horas para determinar el contenido de ADN mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm.

25 La cantidad de ADN adsorbido (cargado) en las micropartículas después de 24 horas se calcula restando la cantidad de ADN en el sobrenadante del contenido total de ADN. La eficiencia de carga se calculó en base a la cantidad de ADN adsorbido con relación al ADN que se añade a la suspensión de CTAB (denominado "ADN diana"). Los resultados se proporcionan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2.

	Carga de ADN diana (%p)	Eficiencia de carga (%)

1% de CTAB, 4% de ADN	4	76
1% de CTAB, 8% de ADN	8	72
1% de CTAB, 12% de ADN	12	68
1% de CTAB, 16% de ADN	16	54
1% de CTAB, 20% de ADN	20	54
4% de CTAB, 4% de ADN	4	88
4% de CTAB, 8% de ADN	8	78
4% de CTAB, 12% de ADN	12	76
4% de CTAB, 16% de ADN	16	64
4% de CTAB, 20% de ADN	20	62

#### Ejemplo 4

##### Protocolo de inmunización

5 Se preparan formulaciones inyectables de ADN mediante la suspensión de micropartículas liofilizadas de cada uno de los grupos anteriores (en el que la cantidad específica de cada grupo es la cantidad que se requiere para proporcionar 10 µg de ADN) en 0,1 ml de agua para inyección. A continuación, la formulación inyectable de ADN se inyecta por vía intramuscular a ratones Balb-C. Se inyectan también 10 g de ADN solo a los ratones como control. Cada formulación se inyecta en 10 ratones. Los ratones recibieron dosis de refuerzo después de cuatro semanas.

#### Ejemplo 5

##### 10 Inmunoensayo

15 Dos semanas después de la segunda inmunización (seis semanas en total), se recogió la sangre heparinizada y se recuperó el plasma mediante centrifugación. Se midieron los anticuerpos anti-VIH mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) como se indica a continuación. Los pocillos de placas de microtitulación se revistieron con proteína VIH-1.SF2 p55gag recombinante a 5 microgramos/ml en PBS, 50 microlitros por pocillo, y se incubaron a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron seis veces con tampón de lavado (PBS, 0,3% de Tween 20) y se bloquearon a 37°C durante 1 h con 200 microlitros por pocillo de tampón de bloqueo (PBS, 0,3% de Tween 20,5% de suero de cabra). Las muestras de ensayo se diluyeron 1:25 y, a continuación, se diluyeron en serie tres veces en tampón de bloqueo. La solución de bloqueo se aspiró y, a continuación, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con 70 microlitros por pocillo de cada dilución de plasma. Después de lavarse seis veces, las placas se incubaron durante 1 h a 37°C anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:8.000). Después de seis lavados, las placas se desarrollaron con sustrato TMB durante 15 minutos. La reacción se detuvo con HCl 2 N y las densidades ópticas (DO) se midieron a una longitud de onda de 450 nm. El título se calculó que era el recíproco de la dilución a la que se consiguió una DO<sub>450nm</sub> de 0,5.

Los resultados se resumen en la Tabla 3 siguiente:

25

Tabla 3.

Formulación	GMT	Superior	Inferior
PLG/1% CTAB, 4% p55 DNA, 10 µg	2.011	1.582	2.556
PLG/1% CTAB, 8% p55 DNA, 10 µg	1.100	522	2.318
PLG/1% CTAB, 12% p55 DNA, 10 µg	1.328	963	1.831
PLG/1% CTAB, 16% p55 DNA, 10 µg	2.517	1.908	3.321
PLG/1% CTAB, 20% p55 DNA, 10 µg	2.341	1.822	3.007
PLG/4% CTAB, 4% p55 DNA, 10 µg	143	67	308
PLG/4% CTAB, 8% p55 DNA, 10 µg	765	536	1.094
PLG/4% CTAB, 12% p55 DNA, 10 µg	292	217	391
PLG/4% CTAB, 16% p55 DNA, 10 µg	443	345	568
PLG/4% CTAB, 20% p55 DNA, 10 µg	525	276	1.001
VIH p55 DNA, 10 µg	343	191	617

5 Tal como puede verse a partir de la tabla anterior, las micropartículas PLG-CTAB con el ADN adsorbido indujeron títulos de anticuerpos significativamente mejorados en ratones en comparación con el ADN desnudo. Además, para cada carga diana de ADN (4%, 8%, 12%, 16% y 20%), las micropartículas PLG con 1% de CTAB mostraron títulos de anticuerpos significativamente mejorados en ratones con relación a las micropartículas PLG con 4% de CTAB.

### Ejemplo 6

#### Ensayo CTL

10 Los bazos de los ratones inmunizados se recogieron también a las 6 semanas y se llevó a cabo un ensayo "immunospot" ligado a enzima (ELISPOT) estándar. Brevemente, se preparan suspensiones unicelulares a partir del bazo y la concentración se ajusta a  $3 \times 10^7$  células/ml. Se añaden 100 µl de la suspensión de células a la primera fila de placas de 96 pocillos PVDF (difluoruro de polivinilideno), que han sido revestidas previamente durante la noche con la IFN-γ anti-ratón de rata (Pharmingen). Después de incubación durante la noche a 37°C, las placas se lavan y se añade anti-IFN-γ biotilado (Pharmingen). Después de incubar las placas a temperatura ambiente durante 2 h y lavarlas, se añade avidina-peroxidasa (Pharmingen), y las placas se incuban durante 30 min a 37°C y se lavan. Las placas se desarrollan con solución de aminoetil carbazol (Sigma) durante 30 minutos. El desarrollo de color se detiene lavando con agua del grifo. Se realiza un recuento de las manchas en un lector Zeiss ELISPOT.

15 Los datos se presentan en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4.

	GMT	SE
1% de CTAB, 4% de ADN, 10 µg	564	110
1% de CTAB, 8% de ADN, 10 µg	633	103
1% de CTAB, 12% de ADN, 10 µg	1.077	278
1% de CTAB, 16% de ADN, 10 µg	1.576	152
1% de CTAB, 20% de ADN, 10 µg	782	352
4% de CTAB, 4% de ADN, 10 µg	--	--

(Cont.)

4% de CTAB, 8% de ADN, 10 µg	264	169
4% de CTAB, 12% de ADN, 10 µg	731	190
4% de CTAB, 16% de ADN, 10 µg	517	99
4% de CTAB, 20% de ADN, 10 µg	507	160
VIH p55 DNA, 10 µg	498	230

5 Tal como puede verse a partir de la tabla anterior, las micropartículas PLG-CTAB con el ADN adsorbido resultaron en una mayor inducción de CTL en ratones en comparación con el ADN desnudo. Además, para todas las cargas diana de ADN (4%, 8%, 12%, 16% y 20%), las micropartículas de PLG con 1% CTAB mostraron una inducción de CTL significativamente mejorada con relación a las micropartículas de PLG con 4% CTAB.

**REIVINDICACIONES**

1. Micropartículas que comprenden: (a) un polímero biodegradable seleccionado de entre un poli (ácido alfa-hidroxi), un ácido polihidroxi butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido y un policianoacrilato; (b) un tensioactivo catiónico; y (c) una primera molécula que contiene polinucleótidos adsorbidos sobre la superficie de las micropartículas, en el que la primera molécula que contiene polinucleótidos adsorbidos constituye entre el 10 y el 30 por ciento del peso total de las micropartículas.
2. Micropartículas según la reivindicación 1, en las que el tensioactivo catiónico comprende bromuro de cetiltrimetilamonio.
3. Micropartículas según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en las que las micropartículas tienen un diámetro comprendido entre 200 nanómetros y 20 micrómetros.
4. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que el polímero comprende un ácido polihidroxi butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhídrido o un policianoacrilato.
5. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que el polímero comprende un poli (ácido  $\alpha$ -hidroxi).
6. Micropartículas según la reivindicación 5, en las que el polímero comprende un poli (ácido  $\alpha$ -hidroxi) seleccionado de entre poli (L-láctido), poli (D,L-láctido) y poli (láctido-co-glicólido).
7. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en las que la primera molécula que contiene polinucleótido es un adyuvante inmunológico, comprende un oligonucleótido CpG o ARNdc, codifica un antígeno que contiene polipéptido, o es un constructo vectorial que codifica un antígeno que contiene polipéptido.
8. Micropartículas según la reivindicación 7, en las que el constructo vectorial es un constructo vectorial de ARN.
9. Micropartículas según la reivindicación 7, en las que el constructo vectorial es un constructo vectorial de ADN.
10. Micropartículas según la reivindicación 9, en las que el constructo vectorial de ADN es un plásmido.
11. Micropartículas según la reivindicación 10, en las que el plásmido es pCMV.
12. Micropartículas según la reivindicación 9, en las que el constructo vectorial de ADN es un plásmido basado en virus de ARN.
13. Micropartículas según la reivindicación 12, en las que el plásmido basado en virus de ARN es un plásmido basado en alfavirus.
14. Micropartículas según la reivindicación 13, en las que el plásmido basado en alfavirus es un plásmido basado en virus Sindbis.
15. Micropartículas según la reivindicación 14, en las que el plásmido es pSINCP.
16. Micropartículas según la reivindicación 9, en las que el constructo vectorial de ADN comprende un promotor 5' eucariótico de ADNc viral que inicia dentro de una célula la síntesis 5' a 3' de ARN a partir de ADNc, en las que el ARN comprende un constructo vectorial que se amplifica de manera autónoma en una célula, en las que el constructo vectorial expresa una secuencia de ácido nucleico heteróloga.
17. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 7-16, en las que el antígeno que contiene polipéptidos se deriva a partir de un organismo patógeno o un tumor.
18. Micropartículas según la reivindicación 17, en las que el organismo patógeno se selecciona de entre un virus, una bacteria, un hongo y un parásito.
19. Micropartículas según la reivindicación 17, en las que el organismo patógeno se selecciona de entre VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, meningitis B, *Haemophilus influenza* tipo B, tos ferina, difteria, tétanos y virus de la gripe A.
20. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 7-16, en las que el antígeno que contiene polipéptidos se deriva a partir de VIH gp120, VIH gp140, VIH gp160, VIH p24gag o VIH p55gag.
21. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende además una molécula que contiene polinucleótidos, una molécula que contiene polipéptidos, una molécula que contiene polisacáridos, una hormona,

una enzima, o un adyuvante inmunológico, atrapados en el interior de las micropartículas.

22. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende además una segunda molécula que contiene polinucleótidos, una molécula que contiene polipéptidos, una molécula que contiene polisacáridos, una hormona, una enzima o un adyuvante inmunológico, adsorbidos en las micropartículas.

5 23. Micropartículas según la reivindicación 21 o 22, en las que las micropartículas comprenden además un antígeno que contiene polipéptidos.

24. Micropartículas según la reivindicación 21 o 22, en las que las micropartículas comprenden además una molécula que contiene polinucleótidos.

10 25. Micropartículas según la reivindicación 21 o 22, en las que las micropartículas comprenden además un adyuvante inmunológico.

26. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en las que las micropartículas comprenden del 0,1 al 10% en peso de tensioactivo catiónico.

15 27. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en las que el tensioactivo catiónico está presente durante la formación de las micropartículas, y en las que no se lleva a cabo una etapa de eliminación del tensioactivo catiónico después de la formación de las micropartículas.

20 28. Micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en las que una primera parte del tensioactivo catiónico se une al polímero, en las que una segunda parte del tensioactivo catiónico forma un complejo con la primera molécula que contiene polinucleótidos, en las que el complejo se adsorbe sobre la superficie de las micropartículas, y en las que la primera parte del tensioactivo y la segunda parte del tensioactivo comprenden el mismo tensioactivo o tensioactivos diferentes.

29. Micropartículas según la reivindicación 28, en las que las partes de tensioactivo primera y segunda comprenden el mismo tensioactivo.

25 30. Un procedimiento de producción de las micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, que comprende: (a) formar una emulsión agua/aceite/agua que comprende el polímero y el tensioactivo catiónico; (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión, para formar las micropartículas; y (c) adsorber la primera molécula que contiene polinucleótido en las micropartículas.

31. Procedimiento según la reivindicación 30, en la que las micropartículas no se someten a una etapa de eliminación de tensioactivo catiónico después de la formación de las micropartículas.

32. Micropartículas fabricadas según el procedimiento de la reivindicación 30 o la reivindicación 31.

30 33. Una composición de micropartículas que comprende las micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-29 y 32 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

34. Composición de micropartículas según la reivindicación 33, que comprende además un adyuvante inmunológico.

35 35. Composición de micropartículas según la reivindicación 34, en la que el adyuvante inmunológico se selecciona de entre oligonucleótidos CpG, MF59, ARNdc, toxinas termolábiles de E. coli, compuestos de fosfolípidos y sales de aluminio.

36. Composición de micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 33-35, en la que la composición de micropartículas es una composición inyectable.

40 37. Composición de micropartículas que comprende: (a) las micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-29 y 32, y (b) micropartículas adicionales que comprenden un polímero biodegradable y un adyuvante inmunológico adsorbido sobre la superficie de las micropartículas adicionales.

38. Composición de micropartículas que comprende: (a) las micropartículas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-29 y 32, y (b) micropartículas adicionales que comprenden un polímero biodegradable y un adyuvante inmunológico atrapado en el interior de las micropartículas adicionales.