

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 902**

51 Int. Cl.:

<b>A61P 33/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/104</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/39</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2012 PCT/US2012/034012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12145355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012 E 12773886 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2699318**

54 Título: **Método de administración de vacunas**

30 Prioridad:

**18.04.2011 US 201161476431 P**

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

**27.12.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)  
Boyd Graduate Studies Research Center  
Athens, GA 30602, US**

72 Inventor/es:

**HARN, DONALD A.;  
QUEIROZ, RAFAELLA y  
MCEWEN, LISA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 647 902 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**

Método de administración de vacunas

ANTECEDENTES

5 Las vacunas siguen siendo el principal recurso de salud pública para combatir enfermedades infecciosas. El objetivo de la administración de vacunas es presentar antígenos de vacuna de manera de mejorar la activación de células que presentan antígenos, la captación y el procesamiento de antígenos. Un objetivo adicional es reducir el número de vacunaciones requeridas para inducir una respuesta específica de vacunas efectiva, especialmente si una única dosis efectiva de una vacuna está disponible. Actualmente, los métodos de administración de vacunas convencionales utilizan alumbre. Las sales de aluminio, tales como alumbre, fueron autorizadas por primera vez para 10 su uso como adyuvantes en vacunas humanas en 1920. Rudra et al. (2010), PNAS, 107(2):622.627 describe un péptido de auto-ensamblaje que actúa como un adyuvante inmune y que se puede utilizar en la generación de vacunas. Existe una necesidad de modos de administración y adyuvantes mejorados que sean seguros para su uso en formulaciones de vacunas.

COMPENDIO

15 La presente invención está definida por las reivindicaciones. Así pues, la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende: (i) un hidrogel peptídico con la estructura principal de péptido RADARADARADARADA, donde el hidrogel peptídico con la estructura principal de péptido RADARADARADARADA es un líquido a temperatura ambiente y un gel en concentraciones salinas fisiológicas y/o temperaturas fisiológicas; (ii) uno o más antígenos; y (iii) uno o más adyuvantes. También se describe en la presente una composición que 20 incluye como un componente una matriz de suspensión que es un líquido a temperatura ambiente y un gel en concentraciones salinas fisiológicas y/o temperaturas fisiológicas y como otro componente uno o más antígenos. En algunos aspectos de la composición, la matriz de suspensión es un hidrogel peptídico. En algunos aspectos, el hidrogel peptídico incluye PURAMATRIX o un derivado del mismo. En algunos aspectos, el hidrogel peptídico incluye el soporte peptídico RADARADARADARADA o un derivado del mismo. En algunos aspectos de la 25 composición, la matriz de suspensión incluye MATRIGEL o un derivado de la misma.

En algunos aspectos de la composición, la composición incluye además uno o más adyuvantes. En algunos aspectos, un adyuvante incluye un agonista del receptor tipo Toll (TLR) y/o una citoquina. En algunos aspectos, un agonista del TLR incluye un agonista del TLR4. En algunos aspectos, un agonista del TLR incluye un agonista del TLR9. En algunos aspectos, un agonista del TLR9 incluye un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG.

30 En algunos aspectos de la composición, la composición incluye además un agonista del receptor tipo Toll (TLR) y/o una citoquina. En algunos aspectos, un agonista del TLR incluye un agonista del TLR4. En algunos aspectos, un agonista del TLR incluye un agonista del TLR9. En algunos aspectos, un agonista del TLR9 incluye un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG.

35 En algunos aspectos de la composición, el antígeno incluye un antígeno de hepatitis, un antígeno de influenza, un antígeno de esquistosomiasis y/o un antígeno de burkholderia o un fragmento antigénico de los mismos.

También se describe en la presente un método para producir una respuesta inmune en un sujeto, incluyendo el método administrar una composición tal como se describe en la presente al sujeto.

También se describe en la presente un método para inmunizar a un sujeto, incluyendo el método administrar una composición tal como se describe en la presente al sujeto.

40 También se describe en la presente un método para administrar uno o más antígenos inmunogénicos a un sujeto, incluyendo el método administrar una composición tal como se describe en la presente al sujeto.

También se describe en la presente un método para administrar uno o más antígenos terapéuticos a un sujeto, incluyendo el método administrar una composición tal como se describe en la presente al sujeto. En algunos aspectos de los métodos, el sujeto es un animal de cría o un animal de compañía. En algunos aspectos de los métodos, el sujeto es un ave de corral. En algunos aspectos de los, el sujeto es un humano. En algunos aspectos de los métodos, la administración de la composición incluye inyección subcutánea (sc) o inyección intramuscular (im). 45

En algunos aspectos de los métodos, la administración de la composición incluye la administración como una vacunación primaria y/o de refuerzo.

50 En algunos aspectos de los métodos, la administración de la composición incluye la administración como una vacunación de refuerzo después de una vacunación primaria con una vacuna polipeptídica o una vacuna de ADN plasmídico.

También se describe en la presente un método para producir una respuesta inmune anti-esquistosoma en un bovino, incluyendo el método administrar una composición que incluye como un componente una matriz de suspensión que es un líquido a temperatura ambiente y es un gel en condiciones fisiológicas y como otro componente uno o más antígenos de esquistosoma al bovino.

- 5 También se describe en la presente un método para producir una respuesta inmune anti-esquistosoma en un bovino, incluyendo el método administrar una composición tal como se describe en la presente al bovino, en donde uno o más antígenos incluyen un antígeno de esquistosoma.

- 10 También se describe en la presente un método de vacunación para la esquistosomiasis en un bovino, incluyendo el método administrar una composición que incluye como un componente una matriz de suspensión que es un líquido a temperatura ambiente y es un gel en condiciones fisiológicas y como otro componente uno o más antígenos de esquistosoma.

También se describe en la presente un método de vacunación para la esquistosomiasis en un bovino, incluyendo el método administrar una composición tal como se describe en la presente al bovino, en donde uno o más antígenos incluyen un antígeno de esquistosoma.

- 15 En algunos aspectos de los métodos, la composición incluye además uno o más adyuvantes. En algunos aspectos, un adyuvante incluye un agonista del receptor tipo Toll (TLR) y/o una citoquina. En algunos aspectos, un agonista del TLR incluye un agonista del TLR4 y/o TLR9. En algunos aspectos, un agonista del TLR9 incluye un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG. En algunos aspectos, un ODN de CpG incluye CpG bovino. En algunos aspectos, el adyuvante incluye la citoquina IL-12.

- 20 En algunos aspectos de los métodos, la composición incluye además un agonista del receptor tipo Toll (TLR) y/o una citoquina. En algunos aspectos, un agonista del TLR incluye un agonista del TLR4 y/o TLR9. En algunos aspectos, un agonista del TLR9 incluye un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG. En algunos aspectos de los métodos, un ODN de CpG incluye CpG bovino.

- 25 En algunos aspectos de los métodos, el antígeno de esquistosoma incluye un antígeno de *Schistosoma japonicum* o un fragmento antigénico del mismo.

En algunos aspectos de los métodos, el antígeno de esquistosoma incluye un polipéptido SjCTPI, un polipéptido SjCTPI-Hsp70, un polipéptido SjC23 y/o un polipéptido SjC23-Hsp70 o un fragmento antigénico de los mismos.

En algunos aspectos de los métodos, la administración de la composición incluye la administración como una vacunación primaria y/o de refuerzo.

- 30 En algunos aspectos de los métodos, la administración de la composición incluye la administración como vacunación de refuerzo después de una vacunación primaria con una vacuna de ADN plasmídico de SjCTPI-Hsp70.

En algunos aspectos de los métodos, el método incluye además la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos anti-esquistosoma.

- 35 En algunos aspectos de los métodos, el método demuestra al menos 45% de eficacia en la prevención de infección con un parásito de esquistosoma.

También se describen en la presente métodos para preparar la composición descrita en la presente.

El término "y/o" significa uno o más de los elementos enumerados o una combinación de cualquiera de dos o más de los elementos enumerados.

- 40 Las palabras "preferido" y "preferiblemente" se refieren a realizaciones que pueden proporcionar ciertos beneficios, en ciertas circunstancias. Sin embargo, otras realizaciones también pueden ser preferidas, en las mismas u otras circunstancias. Asimismo, la enumeración de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no pretende excluir otras realizaciones del alcance que se describe en la presente.

Las expresiones "comprende" y sus variantes no tienen un significado restrictivo cuando estos términos aparecen en la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

- 45 A menos que se especifique lo contrario, "uno", "una", "el", "la" y "al menos uno" se utilizan indistintamente y significan uno o más de uno.

También en la presente los rangos numéricos por criterios de valoración incluyen todos los números incluidos dentro de dicho rango (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5, etc.).

- 50 Cuando se proporciona un rango de valores, se comprende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor intermedio o establecido en ese rango establecido, se describe también en la presente.

Los límites superior e inferior de estos rangos menores pueden ser incluidos independientemente en los rangos más pequeños, y también se describen en la presente, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos de los límites, los rangos que excluyen cualquiera o ambos de aquellos límites incluidos también se describen en la presente.

- 5 Para cualquier método divulgado en la presente que incluye etapas específicas, las etapas pueden realizarse en cualquier orden posible. Y, en caso de que sea apropiado, cualquier combinación de dos o más etapas puede realizarse simultáneamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 La Figura 1 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgA. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

La Figura 2 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgM. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

La Figura 3 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgG. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

15 La Figura 4 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgG<sub>1</sub>. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

La Figura 5 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgG<sub>2a</sub>. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

20 La Figura 6 muestra titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg más altas después de una única vacunación (21 días). Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

25 La Figura 7 muestra titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg más altas después de una única vacunación (35 días). Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10; \*p<0.05 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

La Figura 8 muestra el perfil de citoquina veinticuatro horas después de una re-estimulación con HBsAg de esplenocitos. Los datos que se muestran son representativos de un experimento, n=5; \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

30 La Figura 9 muestra el perfil de citoquina cuarenta y ocho horas después de una re-estimulación con HBsAg de esplenocitos. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10 (n=5 sólo para adyuvantes); no se observó ninguna diferencia estadística (p<0.05) en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

35 La Figura 10 muestra el perfil de citoquina setenta y dos horas después de una re-estimulación con HBsAg de esplenocitos. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10 (n=5 sólo para adyuvantes); \*\*p<0.01 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

40 La Figura 11 muestra una inmunidad mediada por células específicas de HBsAg mediante ELISpot en respuestas de células T específicas de HbsAg. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10; \*p<0.05 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

La Figura 12 muestra una inmunidad mediada por células T específicas de HBsAg mediante citometría de flujo. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10; \*\*p<0.01 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

45 La Figura 13 es una gráfica de radar que representa la prevalencia del equilibrio de citoquina ex vivo en un rango de subconjuntos de células de ratones inmunizados (n=10/grupo) 24 horas después de una inoculación primaria. Los valores de este eje pueden unirse para formar el área poligonal central que representa el equilibrio de citoquina general. El análisis de los ejes del cuadro de radar destaca la contribución de leucocitos para el equilibrio de citoquina total.

50 Las Figuras 14A y 14B son gráficas de radar que representan la prevalencia del equilibrio de citoquina ex vivo en un rango de subconjuntos de células de ratones inmunizados (n=10/grupo) 48 horas después de una inoculación primaria. La Fig. 14A presenta TNF e IFN gamma. La Fig. 14B presenta IL-5 e ILL-4. Cada eje exhibe la proporción de cada categoría de equilibrio de citoquina. Los valores de cada eje pueden unirse para formar el área poligonal

central que representa el equilibrio de citoquina general. El aumento o disminución de las áreas poligonales centrales refleja una contribución mayor o menor del equilibrio de citoquina regulatorio o inflamatorio en cada grupo.

5 La Figura 15 es una gráfica de radar que representa la prevalencia del equilibrio de citoquina ex vivo en un rango de subconjuntos de células de ratones inmunizados (n=10/grupo) 72 horas después de una inoculación primaria. Los valores de este eje pueden unirse para formar el área poligonal central que representa el equilibrio de citoquina general. El análisis de los ejes del cuadro de radar destaca la contribución de leucocitos para el equilibrio de citoquina total.

10 Las Figuras 16A a 16D son comparaciones de anticuerpos específicos de rHepBag inducidos en ratones inmunizados (n=10/grupo) entre 14 y 35 días después de la inoculación principal. El refuerzo se realizó 28 días después de la inmunización principal y los niveles de anticuerpos específicos de rHepBag se determinaron mediante ensayo ELISA. La Figura 16A presenta datos de 14 días, la Fig. 16B presenta datos de 21 días, la Fig. 16C presenta datos de 28 días y la Fig. 16D presenta datos de 35 días. La significación estadística en  $P \leq 0.05$  se representó mediante letras superíndice 'a', 'b' y 'c' para comparaciones con rHepBag, rHepBag en Alhydrogel® y rHepBag en Freund, respectivamente.

15 Las Figuras 17A a 17D muestran una relación IgG1:IgG2a después de la inmunización de ratones (n=10/grupo) con rHepBag más adyuvantes entre 14 y 35 días. El refuerzo se realizó 28 días después de la inmunización principal y los niveles de anticuerpos específicos de rHepBag se determinaron mediante ensayo ELISA. La Figura 17A presenta datos de 14 días, la Fig. 17B presenta datos de 21 días, la Fig. 17C presenta datos de 28 días y la Fig. 17D presenta datos de 35 días.

20 Las Figuras 18A y 18D muestran titulaciones de IgG anti-NP aumentadas en dos cepas de ratones vacunados con rNP. La Fig. 18A muestra titulaciones en ratones C57BL/6. La Fig. 18B muestra titulaciones en ratones Balb/c. Los sueros se recogieron cuatro semanas después de la última vacunación (4wplv).

25 Las Figuras 19A y 19B muestran titulaciones de IgG anti-influenza en ratones C57Bl/6 vacunados con WIV PR8. La Fig. 19A y Fig. 19B representan resultados de dos experimentos independientes. Los sueros se recogieron cuatro semanas después de la última vacunación (4wplv).

Las Figuras 20A y 20B muestran una protección aumentada de un desafío letal en ratones C57Bl/6 vacunados con WIV PR8. La Fig. 20A muestra los resultados de un experimento independiente con un desafío letal en 30 LD<sub>50</sub>. La Fig. 20B muestra los resultados de un experimento independiente con un desafío letal en 1000 LD<sub>50</sub>.

30 Las Figuras 21A-21C muestran titulaciones de IgG anti-burkholderia aumentadas en ratones inmunizados con un cóctel de tres antígenos de proteína de burkholderia recombinante con tres adyuvantes diferentes (alumbre, CFA o gel PURAMTRIX). La Fig. 21A muestra titulaciones de IgG de la proteína anti-burkholderia 4-9 en ratones inmunizados. La Fig. 21B muestra titulaciones de IgG de la proteína anti-burkholderia 22-11 en ratones inmunizados. La Fig. 21C muestra titulaciones de IgG de la proteína anti-burkholderia 42 en ratones inmunizados.

35 Las Figuras 22A y 22B muestran las titulaciones de anticuerpos de la proteína CCA anti-esquistosoma de IgG en ratones inmunizados con CCA en un adyuvante completo de Freund (Fig. 22A) y CCA en MATRIGEL más CpG (Fig. 22B).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 La presente invención está definida por las reivindicaciones. En la presente se describen composiciones y métodos que proporcionan una administración de vacunas mejorada, proporcionando una administración sostenida y focal mejorada del antígeno en el sitio de administración de la vacuna; mejorando la activación celular que presenta antígenos y la captación y el procesamiento de antígenos. También se describen en la presente uno o más agentes inmunogénicos se administran en una composición que incluye un componente de matriz de suspensión que es un líquido a temperatura ambiente y/o concentraciones salinas bajas y un gel en concentraciones salinas fisiológicas y/o temperaturas fisiológicas. La gelación puede inducirse mediante la temperatura corporal fisiológica de un vertebrado, tal como un mamífero o un ave. Dicha temperatura puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 25° Celsius (C), al menos aproximadamente 30° Celsius, al menos aproximadamente 32° Celsius, al menos aproximadamente 35° Celsius, al menos aproximadamente 37° Celsius, al menos aproximadamente 39° Celsius o al menos aproximadamente 40°. La gelación puede ser inducida por las concentraciones salinas fisiológicas. La gelación puede realizarse en presencia de concentraciones milimolares de sal, por ejemplo, por una concentración salina mayor que aproximadamente 0.05 molar (M).

55 Por lo tanto, la composición de la vacuna se gelifica o polimeriza después de la administración a un sujeto, localizando los antígenos de la vacuna en un único sitio donde las células que presentan antígenos innatas pueden migrar y comenzar a absorber los antígenos de la vacuna. Idealmente, la matriz de suspensión, que es un material biocompatible, no inducirá reacciones indeseadas en el cuerpo como resultado del contacto con fluidos o tejido corporales, tales como muerte de tejido, formación de tumores, reacción alérgica, reacción a cuerpos extraños (rechazo), reacción inflamatoria, respuesta del anticuerpo o coagulación de la sangre, por ejemplo. Una matriz de suspensión también puede denominarse en la presente un "hidrogel de polímero biomédico", un "hidrogel biomédico",

un “polímero biomédico”, un “hidrogel de polímero”, un “hidrogel de polímero biocompatible”, un “hidrogel biocompatible”, un “polímero biocompatible” o un “hidrogel”. Tal como se utiliza en la presente, un “hidrogel” es una red tridimensional de macromoléculas hidrófobas reticuladas capaces de hincharse e incorporar aproximadamente 20 por ciento a aproximadamente 95 por ciento en peso de agua. Un hidrogel es un gel en el cual el constituyente líquido es agua. Tal como se utiliza en la presente, un gel es un material tipo gelatina sólido que tiene propiedades en el rango de suave y flojo a duro y fuerte. Un gel es un sistema reticulado sustancialmente diluido que no exhibe flujo cuando se encuentra en el estado estacionario. En peso, los geles son en su mayoría líquidos, pero se comportan como sólidos debido a una red reticulada tridimensional dentro del líquido. Es la reticulación dentro del fluido la que proporciona la estructura (dureza) a un gel. De este modo, los geles son una dispersión de moléculas de un líquido dentro de un sólido en el cual el sólido es la fase continua y el líquido es la fase discontinua. El hidrogel es una red de cadenas de polímero que son hidrófobas, a veces encontrado como un gel coloidal en el cual el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son polímeros sintéticos o naturales altamente absorbentes (pueden contener más de 99.9% de agua). Los hidrogeles también poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su importante contenido de agua.

Cualquiera de una amplia variedad de hidrogeles de polímero biomédicos disponibles para su uso en tecnologías médicas puede utilizarse con los métodos y composiciones descritos en la presente.

La matriz de suspensión puede ser natural, tal como por ejemplo, fibrina, colágeno, elastina, agarosa, metilcelulosa, hialuronano y otros polímeros derivados de forma natural. La matriz de suspensión puede ser MATRIGEL o un derivado de la misma. MATRIGEL es un extracto de membrana basal de células de ratones e incluye laminina, colágeno IV, entactina, nidógeno y proteoglicanos. La invasión de células tumorales en MATRIGEL se ha utilizado para estudiar la implicación de receptores de matrices extracelulares y enzimas degradadoras de matriz en el avance e invasión tumoral y MATRIGEL también se ha utilizado como un modelo de angiogénesis in vitro e in vivo (ensayo de tapón MATRIGEL) para estudiar la actividad de citoquinas angiogénicas y anti-angiogénicas y otras sustancias. MATRIGEL está disponible comercialmente como Matriz BD Matrigel™. Ver en Internet [bdbiosciences.com/cellculture/ecm/ecmtypes/index.jsp](http://bdbiosciences.com/cellculture/ecm/ecmtypes/index.jsp).

Una matriz de suspensión puede ser sintética, tal como por ejemplo, un hidrogel peptídico sintético o un soporte peptídico de auto-ensamblaje (sapéptido). Los soportes de sapéptidos se forman a través de un ensamblaje espontáneo de oligopéptidos en hoja beta auto-complementarios en condiciones fisiológicas que producen un material de hidrogel. Estos péptidos cortos (típicamente aproximadamente 8, aproximadamente 12, aproximadamente 16, aproximadamente 24 o aproximadamente 32 residuos de aminoácidos con secuencias de repetición interna) se auto-ensamblan en una solución salina acuosa en matrices tridimensionales. Los péptidos se caracterizan por ser anfífilicos, tener residuos de aminoácido hidrófobos e hidrófilicos; mayores que 12 aminoácidos y preferiblemente al menos 16 aminoácidos; complementariamente y estructuralmente compatibles. La complementariedad se refiere a la capacidad de los péptidos de interactuar a través de pares ionizados y/o enlaces de hidrógeno que se forman entre sus cadenas laterales hidrófobas y estructuralmente compatibles se refiere a la capacidad de péptidos complementarios de mantener una distancia constante entre sus estructuras principales de péptidos. Los péptidos que tienen estas propiedades participan en las interacciones intermoleculares que resultan en la formación y estabilización de las hojas beta en el nivel estructural secundario y filamentos entrelazados en el nivel estructural terciario. Ejemplos incluyen, a modo no taxativo, miembros de la familia de los péptidos, RAD16-I ((RADA)(4)), RAD16-II ((RARADADA)(2)), KFE-8 ((FKFE)(2)) o KLD-12 ((KLDL)(3)). Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos 5,670,483; Holmes et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(12):6728-33; Yokoi et al., 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*; 102(24):8414-9; Liu et al., 2012, *Nanoscale*; 4(8):2720-7 y BD PuraMatrix™ Peptide Hydrogel, Guidelines for Use, Catalog Number 354250 (SPC-354250-G rev 2.0; BD Biosciences, Bedford, MA). En algunos aspectos, un hidrogel peptídico incluye los bloques de construcción de auto-ensamblaje del soporte peptídico de arginina-alanina-aspartato-alanina (RADA). En algunos aspectos, el hidrogel peptídico incluye RADARADARADARADA o un derivado del mismo. En algunos aspectos, el hidrogel peptídico incluye PURAMATRIX o un derivado del mismo. Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos 5,670,483; Holmes et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(12):6728-33; Yokoi et al., 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*; 102(24):8414-9; Liu et al., 2012, *Nanoscale*; 4(8):2720-7, y BD PuraMatrix™ Peptide Hydrogel, Guidelines for Use, Catalog Number 354250 (SPC-354250-G rev 2.0; BD Biosciences, Bedford, MA).

Un hidrogel de polímero biomédico puede ser un hidrogel de polietilenglicol (PEG) que se polimeriza espontáneamente in vivo.

Una matriz de suspensión, además de volverse gel a una temperatura corporal de un vertebrado o mamífero y/o concentraciones salinas fisiológicas, puede ser un polímero sintético biorreabsorbible que se degrada y disuelve con el tiempo. Dichos compuestos se degradan de forma natural en el cuerpo mediante hidrólisis y son absorbidos como monómeros solubles en agua. Ejemplos incluyen, ácido poliláctico, poliláctido (PLA), poli (ácido L-láctico), poli-D-láctido, ácido poliglicólico (PGA), poliglicólido y sus copolímeros (poli(ácido láctico-co-glicólico) con ácido láctico, homo- y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, poli (ácido DL-láctico/glicina) copolímeros, poli (ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), espumas porosas de poli(ácido DL-láctico-co-glicólico), poli[ox(1-oxo-1,2-etanodiilo)] de poli(aminoácidos) ((C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub>; Biovek), poli(glicólido-co-caprolactona), poli(carbonato de glicólido-co-trimetileno), polidioxanona (PDO, PDS), poli-p-dioxanona, caprolactona (también denominada 2-oxepanona), épsilon-caprolactona, 6-hexanolactona, hexano-6-lactona, poliglactina 910 de 1-oxa-2-

oxocicloheptano, polianhídridos y películas de poliortoéster formadas a partir de poli (ácido D,L-láctico-co-glicólico, 88:12) (PLGA) o a partir de una mezcla 50/50 (p/p) de PLGA y poli (ácido L-láctico) (PLLA). Ver, por ejemplo, Schakenraad and Dijkstra, 1991, *Clin Mater*, 7(3):253-69; Mooney et al., 1997, *J Biomed Mater Res*; 37(3):413-20 y Lu et al., 2000, *Biomaterials*; 21(18):1837-45.

- 5 Las composiciones tal como se describen en la presente incluyen uno o más agentes antigénicos (también denominados en la presente inmunógenos). Un agente antigénico puede ser cualquiera de una gran variedad de agentes que se administran a un sujeto para provocar una respuesta inmune en el sujeto. Un agente antigénico puede ser un inmunógeno derivado de un patógeno. El agente antigénico puede ser, por ejemplo, un antígeno de péptido o proteína, un antígeno viral o polipéptido, un virus inactivado, un virus recombinante, un antígeno bacteriano o parasitario, una célula completa, una célula genéticamente modificada, un antígeno asociado a tumor o una célula tumoral o un antígeno de carbohidrato. En algunas aplicaciones un antígeno no es una célula viva. Un agente antigénico puede ser un antígeno soluble.

- 10 Una composición tal como se describe en la presente puede incluir como un agente antigénico cualquiera de la gran variedad de agentes inmunogénicos disponibles como componentes de vacuna. Dichas vacunas pueden incluir, a modo no taxativo, componentes de vacunas antigénicos dirigidos contra varias enfermedades infecciosas, virales y parasitarias y componentes de vacuna anti-tumor. Las vacunas anti-tumor incluyen, a modo no taxativo, vacunas de péptidos, vacunas de células completas, vacunas de células completas genéticamente modificadas, vacunas de proteínas recombinantes o vacunas en base a la expresión de antígenos asociados a tumor por vectores virales recombinantes. Un agente antigénico puede ser un antígeno soluble.

- 15 Un agente antigénico incluye un antígeno bacteriano de, por ejemplo, un antígeno de *Haemophilus influenza*, virus de influenza tipos A o B, *Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* (tal como, por ejemplo, PA).

- 20 Un agente antigénico incluye un antígeno parasitario de, por ejemplo, un parásito de malaria o un parásito de esquistosoma. Los antígenos de malaria incluyen, a modo no taxativo, antígenos de las especies de plasmodium *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*. Los parásitos de esquistosoma incluyen, a modo no taxativo, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma haematobium*. Un antígeno de esquistosoma puede ser una proteína de triosa fosfato isomerasa (CTPI) de esquistosoma o un fragmento o derivado antigénico de la misma, incluyendo, a modo no taxativo, una proteína CTPI de *S. japonicum*, *S. monsoni* o *S. haematobium* o un fragmento o derivado antigénico de la misma. Un antígeno de esquistosoma puede ser una proteína de membrana integral de 23 kDa de tetraspina esquistosoma (C23) o un fragmento o derivado antigénico de la misma, incluyendo, a modo no taxativo, una proteína C23 de *S. japonicum*, *S. monsoni* o *S. haematobium* o un fragmento o derivado antigénico de la misma. Dicho antígeno de esquistosoma puede ser un polipéptido quimérico, fusionado a uno o más determinantes antigénicos adicionales, tales como, por ejemplo, una proteína de choque de calor o un fragmento o derivado antigénico de la misma, incluyendo, a modo no taxativo, la proteína 70 de choque de calor de bovino (Hsp70). Los antígenos de esquistosoma incluyen, por ejemplo, los péptidos SjCTPI, SjCTPI-Hsp70, SjC23 y SjC23-Hsp70. Los antígenos pueden ser de cualquiera de una variedad de otros parásitos, incluyendo, a modo no taxativo, protozoario quinetopláctido, tal como por ejemplo, protozoario de los géneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Trypanosoma* y *Wallaceina*. El protozoario puede ser del género *Trypanosoma*, incluyendo, a modo no taxativo, a *T. cruzi*, *T. brucei*, *T.b. gambiense* y *T.b. rhodesiense*. El protozoario puede ser del género *Leishmania*, incluyendo, por ejemplo, *Leishmania major*. Enfermedades de tripanosoma que pueden destacarse incluyen tripanosomiasis (enfermedad del sueño africana y enfermedad de Chagas de América del Sur, provocadas por especies de *Trypanosoma*) y leishmaniasis (provocadas por especies de *Leishmania*).

- 25 Un agente antigénico incluye un antígeno viral de, por ejemplo, hepatitis, tal como por ejemplo, hepatitis C, hepatitis B o hepatitis A, influenza, por ejemplo, el M2, hemaglutinina, proteínas de y/o neuraminidasa de un virus de influenza, incluyendo, por ejemplo, influenza A (incluyendo, a modo no taxativo, los subtipos H5N1 y H1N1), influenza B e influenza C, virus sincitial respiratorio (RSV), rabia, virus del papiloma, sarampión, rubéola, varicela, rotavirus, polio, virus de la varicela zóster (VZV) y virus de ARN de hebras negativas, tales como por ejemplo, un virus de la familia Paramyxoviridae. Ejemplos de un virus de la familia Paramyxoviridae incluyen, a modo no taxativo, virus parainfluenza humano 1, virus parainfluenza humano 2, virus parainfluenza humano 3, virus parainfluenza humano 4, virus parainfluenza 5, virus de paperas, virus del sarampión, metapneumovirus humano, virus sincitial respiratorio humano, virus rinderpest del virus sincitial respiratorio bovino, virus del moquillo canino, virus del moquillo de las focas, virus de la enfermedad de Newcastle, pneumovirus aviar, virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPRV), virus Sendai, virus de Menangle, paramixovirus tipo Tupaia, virus Tioman, Tuhokovirus 1, Tuhokovirus 2, Tuhokovirus 3, virus Hendra, virus Nipah, virus Fer-de-Lance, virus Nariva, virus Salem, virus J, virus Mossman y virus Beilong.

Un agente antigénico puede incluir uno o más inmunógenos derivados de patógenos infecciosos para aves de corral.

Dichos inmunógenos pueden derivarse de, por ejemplo, virus de bronquitis infecciosa (IBV), virus de enfermedad de Newcastle (NDV), enfermedad de Marek (MDV), virus de enfermedad bursal infecciosa (IBD), laringotraqueítis infecciosa (ILT), reovirus aviar, cólera, viruela aviar, micoplasmosis, Coriza de pollos y pavos, influenza aviar, encefalomielititis aviar (AE), rinotraqueítis aviar (ART), hepatitis viral del pato, enteritis hemorrágica, parvovirus de ganso, Paramixovirus 3, virus de anemia en pollos (CAV), *E. coli*, *Erysipelas*, *Reimerella*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, coccidiosis, virus del síndrome de la caída de la postura (EDS), virus de rinotraqueítis de pavo (TRTV) y Poxvirus.

Un agente antigénico puede incluir uno o más inmunógenos derivados de patógenos infecciosos para bovino, incluyendo, a modo no taxativo, vacas domésticas, búfalo de agua, búfalo africano, bisonte y yak. Dichos inmunógenos pueden derivarse de, por ejemplo, vacuna contra la enfermedad respiratoria bovina (BRD) incluyendo, a modo no taxativo, BVDV tipos I y II, vacuna contra el virus del herpes bovino 1 (BHV-1) incluyendo, a modo no taxativo, vacunas de subunidades que no resultarían en virus latentes, vacuna contra *Haemophilus somnus*, vacuna contra *Mannheimia haemolytica*, vacuna contra *Mycoplasma bovis*, vacuna contra el rotavirus bovino, vacuna contra *Escherichia coli* K99, vacuna contra coronavirus bovino (BCV), vacuna contra *Clostridium chauvoei* (pierna negra), vacuna contra *Clostridium septicum*, vacuna contra *Clostridium sordelli* (edema maligno), vacuna contra *Clostridium novyi* (enfermedad negra), vacuna contra *Clostridium perfringens* (enterotoxemia), vacuna contra queratoconjuntivitis bovina infecciosa (conjuntivitis) incluyendo, a modo no taxativo, *Moraxella bovis*, clamidia, micoplasma, acoleplasma o vacunas contra el virus de rinotraqueítis bovina infecciosa (IBR), vacunas contra la mastitis incluyendo, a modo no taxativo, vacuna contra *Escherichia coli* J5.

Un agente antigénico puede incluir uno o más inmunógenos derivados de patógenos infecciosos para cerdos, incluyendo, a modo no taxativo, circovirus porcino tipo 2 (PCV2), síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), micoplasma respiratorio, *Streptococcus suis*, coronavirus porcino, rotavirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica (K88), *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP) e influenza porcina.

Un agente antigénico puede incluir uno o más inmunógenos derivados del género *Burkholderia*, un grupo de bacterias en forma de bastoncillos aeróbicas obligadas, motiles, gram negativas virtualmente ubicuas que incluyen patógenos de animales/humanos y plantas, así como algunas especies ambientalmente importantes. *Burkholderia* es mejor conocida por sus miembros patogénicos. *Burkholderia mallei* es responsable por el muermo, una enfermedad que ocurre mayormente en caballos y animales relacionados. *Burkholderia pseudomallei* es el agente causante de melioidosis (también denominada enfermedad de Whitmore), una enfermedad infecciosa predominantemente de climas tropicales que pueden infectar humanos o animales, especialmente en el sudeste de Asia y norte de Australia. *Burkholderia cepacia* es un patógeno importante de infecciones pulmonares en gente con fibrosis quística. Debido a su resistencia a antibióticos y la alta tasa de mortalidad de sus enfermedades asociadas, *Burkholderia mallei* y *Burkholderia pseudomallei* son consideradas posibles agentes biológicos de uso bélico dirigidos a animales de cría y humanos. Los antígenos de *Burkholderia* incluyen, por ejemplo, cualquiera de las tres proteínas recombinantes de *Burkholderia* (la proteína de *Burkholderia* 4-9, la proteína de *Burkholderia* 22-11 y la proteína de *Burkholderia* 42). Dichos antígenos de *Burkholderia* pueden administrarse de manera separada o como un cóctel de cualquiera de dos o tres antígenos.

Un agente antigénico puede ser uno o más de aquellos utilizados actualmente en la combinación de vacunas contra sarampión-paperas-rubéola (MMR) y sarampión-paperas-rubéola-varicela (MMRV).

El agente antigénico puede ser una vacuna de polinucleótidos, es decir, el agente antigénico se administra como un constructo de vector, tal como un plásmido que resulta en la expresión de un antígeno de polipéptido tras la administración a un sujeto. Tal como se utiliza en la presente, el término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos, e incluye ARN y ADN de una sola hebra y de doble hebra. Un polinucleótido puede obtenerse directamente de una fuente natural o puede prepararse con la ayuda de técnicas recombinantes, enzimáticas o químicas. Un polinucleótido puede ser lineal o circular en topología. Un polinucleótido puede ser, por ejemplo, una porción de un vector, tal como un vector de expresión o de clonación o un fragmento. Un polinucleótido puede incluir secuencias de nucleótidos que tienen diferentes funciones, incluyendo, por ejemplo, regiones codificadoras y regiones no codificadoras tales como regiones reguladoras. Puede utilizarse cualquier vector o vehículo de administración adecuado. Varios vectores están disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o bacteriófago. Un vector puede ser un vector de expresión. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio de endonucleasa de restricción apropiado utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector incluyen generalmente, a modo no taxativo, una o más secuencias de señales, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligadura estándar que son conocidas por los expertos en la técnica.

Una composición tal como se describe en la presente puede ser útil como una vacuna. La vacuna puede ser una vacuna profiláctica o protectora.

Una composición tal como se describe en la presente puede incluir uno o más compuestos con actividad adyuvante.

Dicho adyuvante estimula el sistema inmune y aumenta la respuesta a un antígeno de vacuna, sin tener ningún efecto antigénico específico en sí. Un adyuvante actúa para acelerar, prolongar o mejorar las respuestas inmunes específicas del antígeno cuando se utiliza en combinación con antígenos de vacuna específicos. Compuestos o composiciones adecuados para este propósito incluyen, a modo no taxativo, un adyuvante en base a aluminio, tal como, por ejemplo, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio (también denominado como alumbre), hidroxilo-fosfato de aluminio e hidroxilo-fosfato-sulfato de aluminio y adyuvantes que no son de aluminio, tales como, por ejemplo, QS21, MF59, Lípido-A, liposomas neutrales, micropartículas, una citoquina tal como, por ejemplo, IL-12, aceites de plantas, aceites de animales, emulsión de aceite en agua o agua en aceite en base a, por ejemplo, un aceite mineral, tal como Bayol F™ o Marcol 52™, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, un aceite vegetal tal como, por ejemplo, acetato de vitamina E, a saponina, escualeno, un aminoácido lipidado ("LAA") y/o un agonista del TLR.

Un componente del adyuvante puede ser un ligando del receptor de tipo Toll (TLR). Los TLR en mamíferos fueron identificados por primera vez en 1997. Constituyen la primera línea de defensa contra muchos patógenos y juega un papel crucial en la función del sistema inmune innato. Existen muchas subclases conocidas de receptores de tipo Toll, incluyendo, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12, TLR13, TLR14, TLR15 y TLR16 y sus ligandos exhiben una variación estructural importante. Un agonista del TLR es un ligando molecular para uno de los varios receptores de tipo Toll (TLR). Los TLR conocidos incluyen: TLR1 (los ligandos del TLR1 incluyen lipoproteínas de triacilo); TLR2 (los ligandos del TLR2 incluyen lipoproteínas, peptidoglicanos Gram positivos, ácidos lipoteicoicos, hongos y glicoproteínas virales); TLR3 (los ligandos del TLR3 incluyen ARN de doble hebra, como los que se encuentran en ciertos virus y poli I:C); TLR4 (los ligandos del TLR4 incluyen lipopolisacárido y glicoproteínas virales); TLR5 (los ligandos del TLR5 incluyen flagelina); TLR6 (los ligandos del TLR6 incluyen lipoproteínas de diacilo); TLR7 (los ligandos del TLR7 incluyen pequeños modificadores inmunes sintéticos (tales como imiquimod, R-848, loxorribina y bropirimina) y ARN de una sola hebra); TLR8 (los ligandos del TLR8 incluyen pequeños compuestos sintéticos y ARN de una sola hebra) y TLR9 (los ligandos del TLR9 incluyen motivos de ADN de CpG no metilados). Los ligandos del TLR están ampliamente disponibles comercialmente.

Los agonistas del TLR preferidos incluyen agonistas del TLR2, agonistas del TLR4, agonistas del TLR7, agonistas del TLR8 y agonistas del TLR9. LR2 forma parte en el reconocimiento de un amplio arreglo de moléculas microbianas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como micoplasma y levadura. Ligandos del TLR2 incluyen lipoglicanos, lipopolisacáridos, ácidos lipoteicoicos y peptidoglicanos.

TLR4 reconoce lipopolisacárido (LPS) Gram-negativo y lípido A, su resto tóxico. Agonistas del TLR4 incluyen, a modo no taxativo, lipopolisacárido (LPS), glicoproteínas virales, lípido monofosforílico A (MPL) (Anderson et al., 2010, *Colloids Surf B Biointerfaces*; 75(1):123-32), emulsión estable de adyuvante de lípido glucopiranosilo (GLA-SE) (Coler et al., 2010, *PLoS One*; 5(10):e13677) y el derivado sintético del lípido A hexaacilado, denotado como adyuvante de lípido glucopiranosilo (GLA) (Coler et al., 2011, *PLoS One*; 6(1):e16333).

TLR9 se activa mediante secuencias que contienen CpG no metilado, incluyendo aquellas encontradas en ADN bacteriano u oligonucleótidos sintéticos (ODN). Dicho CpG no metilado que contiene secuencias está presente con gran frecuencia en ADN bacteriano, pero raramente en ADN de mamífero. Por lo tanto, secuencias de CpG no metilado distinguen ADN microbiano de ADN de mamífero. Un agonista del TLR9 puede ser una preparación de ADN microbiano incluyendo, a modo no taxativo, ADN de *E. coli*, ADN de *E. coli* libre de endotoxinas o ADN bacteriano libre de endotoxinas de *E. coli* K12. Un agonista del TLR9 puede ser un oligonucleótido sintético que contiene motivos de CpG no metilados, también denominados en la presente "oligodesoxinucleótido de CpG", "CpGODN", "ODN" o "CpG". Los ODN de CpG son moléculas de ADN cortas de una sola hebra que contienen una citoquina (nucleótido "C") seguida por una guanina (nucleótido "G"). La "p" típicamente se refiere a la estructura principal del fosfodiéster de ADN. Un agonista del TLR9 tal como se describe en la presente puede incluir cualquiera de los tres tipos de ODN estimulador descritos, tipo A, tipo B y tipo C. Los oligodesoxinucleótidos de CpG pueden producirse mediante métodos estándar para síntesis química de polinucleótidos o adquirirse comercialmente. Por ejemplo, los ODN de CPG pueden adquirirse a través de InvitroGen (San Diego, CA).

Las composiciones como se describen en la presente pueden incluir una o más citoquinas. Las citoquinas pueden incluir, a modo no taxativo, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-19, IL-20, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF), factor de transformación de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y/o ligando Flt-3. En algunas aplicaciones, una o más citoquinas pueden servir como un adyuvante.

También se describen en la presente métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto mediante la administración de una composición tal como se describe en la presente al sujeto. La respuesta inmune puede o no conferir inmunidad protectora. Una respuesta inmune puede incluir, por ejemplo, una respuesta humoral y/o una respuesta inmune mediada por una célula. Una respuesta inmune humoral puede incluir una respuesta de IgG (incluyendo IgG1, IgG2 (incluyendo IgG2a y/o IgG2b), IgG3 y/o IgG4), IgM, IgA, IgD, IgE y/o IgY. Una respuesta inmune celular puede incluir activación de células T y/o producción de citoquinas. La determinación de una

respuesta inmune celular o humoral puede determinarse mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en las técnicas inmunológicas, incluyendo, a modo no taxativo, cualquiera de las descritas en la presente.

La inducción de una respuesta inmune puede incluir el cebado y/o la estimulación del sistema inmune a un desafío futuro con un agente infeccioso, proporcionando inmunidad a las infecciones futuras. La introducción de dicha respuesta inmune puede servir como una respuesta protectora, generalmente resultando en una reducción de los síntomas. La respuesta inmune puede mejorar una respuesta inmune adaptativa y/o innata. La respuesta inmune puede demostrar concentraciones más altas de anticuerpos con una única inmunización primaria. La respuesta inmune puede mostrar relaciones de inmunoglobulina alteradas y/o inducción alterada de citoquinas inflamatorias, interferones de tipo I y/o quimiocinas, en comparación con la inmunización con la matriz de suspensión. Dicha alteración puede ser un aumento o un descenso. Por ejemplo, puede obtenerse una relación mayor de un isotipo de inmunoglobulina en comparación con otro isotipo de inmunoglobulina (por ejemplo, cualquiera de IgM, IgA, IgD, IgG o IgE en comparación con cualquiera de IgM, IgA, IgD, IgG o IgE) o una relación mayor de una subclase de IgG en comparación con otra subclase de IgG (por ejemplo, cualquiera de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgG4 en comparación con cualquiera de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgG4).

También se describen en la presente métodos para vacunar a un sujeto mediante la administración de una composición tal como se describe en la presente al sujeto. Dicha vacunación puede resultar en una reducción o mitigación de los síntomas de infección futura y puede prevenir una infección futura. Las composiciones descritas en la presente pueden tener aplicaciones profilácticas y/o terapéuticas como composiciones inmunogénicas para prevenir y/o mejorar una infección, de forma tal que se mejorará la resistencia a una nueva infección y/o se reducirá la gravedad clínica de la enfermedad. Dicha protección puede demostrarse ya sea mediante una reducción o falta de los síntomas asociados con RSS, incluyendo, a modo no taxativo, cualquiera de los descritos en la presente. Puede utilizarse cualquiera de una amplia variedad de ensayos disponibles para determinar la eficacia del método de vacunación tal como se describe en la presente, incluyendo, a modo no taxativo, cualquiera de los descritos en la presente.

Una cantidad inmunológicamente efectiva de al menos un inmunógeno se puede emplear en una cantidad tal como para provocar una reducción sustancial en el curso de la infección normal. La inmunogenicidad y eficacia pueden ensayarse en cualquiera de una variedad de sistemas experimentales conocidos, incluyendo, a modo no taxativo, cualquiera de los descritos en la presente.

Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden administrarse a un sujeto para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades virales, enfermedades infecciosas, incluyendo, a modo no taxativo, infecciones parasitarias, fúngicas y bacterianas, cáncer y otras enfermedades en las cuales la administración de uno o más inmunógenos es terapéuticamente deseada. Con los métodos tal como se describen en la presente, la eficacia de la administración de uno o más agentes puede evaluarse mediante cualquiera de una variedad de parámetros conocidos en la técnica, incluyendo, a modo no taxativo, cualquiera de los descritos en la presente. Estos incluyen, por ejemplo, determinaciones de un aumento en la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado a un antígeno de tumor, determinaciones de un atraso en el tiempo de recaída de la malignidad después del tratamiento, determinaciones de un aumento en el tiempo de supervivencia libre de recaída, determinaciones de un aumento en la supervivencia después del tratamiento, determinación del tamaño del tumor, determinación del número de células T reactivas que se activan tras la exposición a los antígenos de vacunación mediante varios métodos, incluyendo ELISPOT, análisis FACS, liberación de citoquinas o ensayos de proliferación de células T.

Por ejemplo, las composiciones y métodos descritos en la presente pueden administrarse a un paciente para el tratamiento de cáncer. Las vacunas anti-tumor incluyen, a modo no taxativo, vacunas de péptidos, vacunas de células completas, vacunas de células completas genéticamente modificadas, vacunas de proteínas recombinantes o vacunas en base a la expresión de antígenos asociados a tumor por vectores virales recombinantes. Los cánceres a tratar incluyen, a modo no taxativo, melanoma, carcinoma de célula basal, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de células pequeñas), leucemia, linfoma, sarcoma, cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, insulinooma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones de la piel pre-malignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer esofágico, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello de útero, cáncer endometrial, glioblastoma y cáncer corticosuprarrenal. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer primario. En algunos aspectos, el cáncer es metastásico. Tal como se utiliza en la presente, "tumor" se refiere a todos los tipos de cánceres, neoplasmas o tumores malignos encontrados en mamíferos.

La eficacia del tratamiento de un cáncer puede evaluarse mediante cualquiera de los varios parámetros bien conocidos en la técnica. Estos incluyen, a modo no taxativo, determinaciones de una reducción en el tamaño del tumor, determinaciones de la inhibición del crecimiento, propagación, invasividad, vascularización, angiogénesis y/o metástasis de un tumor, determinaciones de la inhibición del crecimiento, propagación, invasividad y/o vascularización de cualquier lesión metastásica, determinaciones de infiltraciones tumorales mediante células del sistema inmune y/o determinaciones de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado aumentada al antígeno

del tumor. La eficacia del tratamiento también puede evaluarse mediante la determinación de un retraso en la recaída o un retraso en el avance del tumor en el sujeto o mediante una determinación de la tasa de supervivencia del sujeto, por ejemplo, una tasa de supervivencia aumentada uno o cinco años después del tratamiento. Tal como se utiliza en la presente, una recaída es el regreso de un tumor o neoplasma después de su cese aparente.

5 Tal como se utiliza en la presente, a menos que el contexto deje en claro lo contrario, "tratamiento" y una palabra similar tal como "tratado", "que trata", etc., es un abordaje para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo y preferiblemente resultados clínicos. Un tratamiento puede incluir tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Los efectos deseados del tratamiento incluyen prevenir la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad, alivio de síntomas, disminución de una o más consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, disminuir la tasa de avance de la enfermedad, la mejora y paliación del estado de la enfermedad y la remisión o prognosis mejorada. En algunas aplicaciones, una composición tal como se describe puede demostrar una mejora en uno o más resultados deseados de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20% o al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95%.

20 Tal como se utiliza en la presente, una "cantidad efectiva" o una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una sustancia es esa cantidad suficiente para afectar un efecto biológico deseado, tal como resultados beneficiosos, incluyendo resultados clínicos. Las concentraciones y cantidades terapéuticamente pueden determinarse para cada aplicación en la presente empíricamente evaluando los compuestos en sistemas in vitro e in vivo conocidos, incluyendo cualquiera de los descritos en la presente. Las dosificaciones para humanos u otros animales pueden extrapolarse entonces de los mismos. Con los métodos tal como se describen en la presente, la eficacia de la administración de una o más intervenciones puede evaluarse mediante cualquiera de una variedad de parámetros bien conocidos en la técnica.

Una "cantidad efectiva" puede ser una cantidad que resulta en una reducción de al menos un parámetro patológico.

30 Por lo tanto, por ejemplo, una cantidad que es efectiva para alcanzar una reducción de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20% o al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95%, en comparación con la reducción esperada en el parámetro en un individuo que no recibe tratamiento.

40 También se describen en la presente métodos para preparar y utilizar las composiciones de vacuna descritas en la presente. Las composiciones tal como se describen en la presente pueden formularse en preparaciones farmacéuticas en una variedad de formas adaptadas a la vía elegida de administración. Puede utilizarse cualquiera de una variedad de modos de administración. Por ejemplo, la administración puede ser intravenosa, tópica, oral, intranasal, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o intratumoral.

45 Una composición de vacuna tal como se describe en la presente puede tomar la forma de un implante. Dicho implante puede implantarse dentro del tumor. La administración puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de tecnologías disponibles, incluyendo, por ejemplo, inyección, infusión, instilación, aplicación tópica, administración mediante una aguja y/o administración mediante un catéter. La administración puede hacerse mediante el uso de un dispositivo o herramienta de administración, tal como una aguja o catéter. Dichos dispositivos de administración también se describen en la presente.

50 Una composición tal como se describe en la presente puede administrarse con una o más intervenciones terapéuticas adicionales. Tratamientos terapéuticos adicionales incluyen, a modo no taxativo, resección quirúrgica, terapia de radiación, quimioterapia, terapia hormonal, vacunas anti-tumor, terapias en base a anticuerpos, irradiación de cuerpo completo, trasplante de médula ósea, trasplante de células madre de sangre periférica, la administración de citoquinas, antibióticos, agentes antimicrobianos, agentes antivirales, tales como AZT, ddI o ddC, la administración de agentes quimioterapéuticos, tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, doxorubicina, vincristina, ifosfamida, cisplatina, gemcitabina, busulfán, ara-C, adriamicina, mitomicina, citoxano, metotrexato y combinaciones de los mismos. Dicha administración puede ocurrir antes, durante y/o después de la administración de una composición de vacuna como se describió.

Tal como se utiliza en la presente, el término "sujeto" incluye, a modo no taxativo, vertebrados humanos y no humanos. Un sujeto puede ser un mamífero, particularmente un humano. Un sujeto puede ser un "individuo", "paciente" o "huésped". Un sujeto puede incluir, por ejemplo, un humano, un primate superior, un primate no humano, animales de cría y mascotas domésticas (tales como perros, gatos, vacas, caballos, cerdos, oveja, cabras, mulas,

monos, visón y aves de corral), animales de laboratorio (tales como por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, conejillos de Indias y conejos) y vida salvaje. Una composición de vacuna, como se describe en la presente, se puede administrar a un bovino, incluyendo, a modo no taxativo, vacas domésticas, búfalo de agua, búfalo africano, bisonte y yak.

5 Las composiciones de vacuna descritas en la presente pueden administrarse a aves de corral, incluyendo, por ejemplo, pollos, pavos, gallina de Guinea, perdices y aves acuáticas, tales como, por ejemplo, patos y gansos. Los pollos incluyen, a modo no taxativo, gallinas, gallos, aves de engorde, pollos grandes, gallinas reproductoras, la descendencia de gallinas reproductoras y ponedoras. La vacuna tal como se describe en la presente puede administrarse a aves de corral antes o después de que salgan del cascarón. Las aves de corral pueden recibir una  
10 vacuna en una variedad de edades. Por ejemplo, las aves de engorde pueden vacunarse in ovo, al día de vida, in ovo o a las 2-3 semanas de edad. Los animales de crianza ponedores o de reproducción pueden vacunarse, por ejemplo a las aproximadamente 6-12 semanas de edad y reforzarse a las aproximadamente 16-20 semanas de edad. Dichos animales de crianza ponedores o de reproducción pueden vacunarse a las aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11 o  
15 aproximadamente 12 semanas de vida. Dichos animales de crianza ponedores o de reproducción pueden reforzarse a las aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 semanas de vida. La descendencia de dichos animales de crianza ponedores o de reproducción puede demostrar una titulación de anticuerpo al inmunógeno administrado que puede prevenir o mitigar los síntomas de una infección en la descendencia.

20 Las composiciones tal como se describen en la presente pueden formularse de acuerdo con los métodos conocidos y utilizados en la técnica. Una composición de vacuna tal como se describe en la presente puede incluir sales, soluciones salinas, conservantes u otras sustancias designadas para mejorar o estabilizar la composición. Una composición de vacuna puede incluir un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia adecuada para la  
25 administración a un humano u otro animal vertebrado. Para la administración, una composición tal como se describe en la presente puede amortiguarse adecuadamente si es necesario y la composición se vuelve isotónica con suficiente solución salina o glucosa. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica. Más aun, para la administración humana, las preparaciones deberían cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza general requeridos por la FDA. Dicha  
30 preparación puede estar libre de pirógenos, puede ser estéril y/o estar libre de endotoxinas.

Una composición tal como se describe en la presente también puede contener uno o más estabilizadores. Puede utilizarse cualquier estabilizador, incluyendo carbohidratos tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrina o glucosa; proteínas tales como albúmina o caseína y soluciones amortiguadoras tales como fosfato de metal alcalino y similares. Un estabilizador es particularmente ventajoso cuando una preparación de vacuna seca se prepara  
35 mediante liofilización. Dicha composición puede incluir portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los portadores incluyen, por ejemplo, estabilizadores, conservantes y soluciones amortiguadoras. Los estabilizadores adecuados incluyen, por ejemplo, SPGA, carbohidratos (tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano, glutamato o glucosa), proteínas (tales como suero de leche en polvo, albúmina o caseína) o productos de degradación de los mismos. Soluciones adecuadas incluyen, por ejemplo, fosfatos de metal alcalino. Conservantes adecuados incluyen, por ejemplo, timerosal, mertiolato y gentamicina. Los diluyentes, incluyen, a modo no taxativo,  
40 agua, solución amortiguadora acuosa (tal como solución salina tamponada), alcoholes y polioles (tales como glicerol).

Cualquiera de una amplia variedad de agentes moduladores puede incluirse en los métodos y composiciones descritos en la presente. Tal como se utiliza en la presente, un "agente de modulación" es un agente que tiene un efecto terapéutico en tejido vivo. Agentes moduladores incluyen, por ejemplo agentes terapéuticos que son efectivos  
45 para prevenir y/o superar la enfermedad y/o promover la recuperación.

La vacuna tal como se describe en la presente puede administrarse a un sujeto mediante cualquiera de muchas vías diferentes. Por ejemplo, la vacuna puede administrarse intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intranasalmente, oralmente, transdérmicamente y/o intramuscularmente. Los regímenes de dosificación adecuados pueden determinarse tomando en cuenta factores bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la edad,  
50 peso, sexo y afección médica del sujeto; la vía de administración; el efecto deseado y el conjugado y formulación particulares empleados. La vacuna puede administrarse como una dosis única o múltiples dosis. Cuando se administra en un formato de vacunación de multi-dosis, la frecuencia de las dosis puede seguir los esquemas conocidos en la técnica. Por ejemplo, después de una administración inicial, una o más dosis de refuerzo pueden administrarse posteriormente para mantener titulaciones de anticuerpo y/o memoria inmunológica.

55 Los métodos tal como se describen en la presente pueden incluir métodos in vitro, ex vivo o in vivo. Tal como se utiliza en la presente "in vitro" es en el cultivo celular e "in vivo" es dentro del cuerpo de un sujeto. Tal como se describe en la presente, puede administrarse un inmunógeno o agente aislado. Tal como se utiliza en la presente, "aislado" se refiere a un material que se ha retirado de su ambiente natural, se ha producido utilizando técnicas recombinantes o sintetizado químicamente o enzimáticamente y, por lo tanto, está alterado "por la mano del hombre"  
60 con respecto a su estado natural.

También se describen en la presente kits que emplean una o más de las composiciones descritas en la presente.

Dichos kits pueden proporcionar la administración de un inmunógeno a un sujeto para provocar una respuesta inmune. Los kits tal como se describen en la presente pueden incluir reactivos tales como soluciones amortiguadoras y también se incluyen soluciones necesarias para poner en práctica la presente divulgación.

- 5 Opcionalmente asociado con dichos recipientes puede haber un aviso o instrucciones impresas. Tal como se utiliza en la presente, la frase "material de envasado" se refiere a una o más estructuras físicas utilizadas para alojar los contenidos del kit. El material de envasado se construye mediante métodos conocidos, preferiblemente para proporcionar un ambiente estéril y libre de contaminantes. Tal como se utiliza en la presente, el término "envase" se refiere a una matriz o material sólido tal como vidrio, plástico, papel, aluminio y similares, capaz de mantener dentro de límites fijos un polipéptido. Los kits tal como se describen en la presente también pueden incluir también instrucciones para su uso. Las instrucciones para su uso típicamente incluyen una expresión tangible que describe la concentración de reactivo o al menos un parámetro del método de ensayo, tal como las cantidades relativas de reactivo y muestra para mezclar, periodos de tiempo de mantenimiento para mezclas de reactivo/muestra, temperatura, condiciones de solución de amortiguación y similares.
- 10
- 15 La lista representa solamente un grupo ilustrativo y no se debería interpretar como una lista exclusiva.

La presente invención es ilustrada por los siguientes ejemplos.

### EJEMPLOS

#### Ejemplo 1

Nuevo régimen de administración de vacunas genera respuestas inmunes específicas de vacunas mejoradas

- 20 Para mejorar la administración de vacunas con respecto a la administración vista cuando se utilizan los métodos de administración convencionales, este ejemplo se centra en proporcionar un antígeno, más menos un adyuvante de CpG, junto con un componente que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente, pero que forma un depósito de gel en condiciones fisiológicas, después de la inyección a 35°C. Esto permite que el antígeno y el adyuvante se administren en una forma concentrada, mejorando la actividad celular que presenta antígenos y conduciendo a respuestas específicas de vacunas pro-inflamatorias. Se utilizó un antígeno de hepatitis B recombinante (rHepBag) como el antígeno para la vacunación y el método de administración se evaluó junto con siete esquemas de administración de vacunas diferentes para la capacidad de inducir anticuerpos y citoquinas específicos de hepatitis B. Los ratones se vacunaron con rHepBag en dos tipos diferentes de suspensiones de gel (PURAMATRIX, también denominado en la presente "P1" y MATRIGEL también denominado en la presente "P2") o con rHepBag en ALHYDROGEL (sal de aluminio) o rHepBAG mezclado con adyuvante completo de Freund (CFA).
- 25
- 30

Las suspensiones de gel y ALHYDROGEL se mezclaron +/- con el ODN de CpG 1826 murino.

- Los resultados mostraron que los ratones vacunados con la suspensión de gel más ODN tuvieron una producción de TNF significativamente más alta 24 a 48 horas después de la inoculación primaria, mientras que P1 fue significativamente superior a ALHYDROGEL a las 24 horas. El adyuvante P2 presentó una inhibición de Th2 prometedor después de 48 horas con la reducción de los niveles de IL-4, IL-5 e IL-10 con una producción de IgG2a específica de antígenos en suero.
- 35

- El análisis de los anticuerpos específicos de vacunas mostró que P1 generó titulaciones altas de IgA, IgM e IgG específicas de vacunas 14 días después de la administración principal utilizando o no ODN y las titulaciones altas de IgA e IgG se mantuvieron durante 35 días. Dado que ambos sistemas de suspensión de gel evaluados en este estudio fueron superiores a los adyuvantes convencionales, este nuevo sistema de administración de vacunas de suspensión de gel tendrá una amplia utilidad para mejorar las respuestas a numerosas vacunas actuales que son poco funcionales actualmente. El uso de este nuevo sistema de administración de vacunas se investigará en más detalle en el desarrollo de vacunas para cualquiera de una amplia variedad de enfermedades infecciosas, desde una infección parasitaria a viral.
- 40

#### 45 Material y métodos

- Vacunas y vía de administración. La vacuna experimental utilizada en este estudio se produjo a partir de un antígeno de hepatitis B, principalmente, rHepBag (Fitzgerald Industries, Inc. Massachusetts, EE.UU.). 90 ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de edad se dividieron uniformemente en 9 grupos y recibieron respectivamente una inyección subcutánea (sc) principal en el lomo y un refuerzo 4 semanas después de 0.1 ml de solución que contenía 5 µg de rHepBag, 0.1 ml de 50 µg de ODN 1826 (InvivoGen, Inc. California, EE.UU.) con 5 µg de rHepBag, 0.4 ml de solución de PURAMATRIX (P1) y 5 µg de rHepBag con o sin ODN 1826, 0.4 ml de MATRIGEL (P2) y 5 µg de rHepBag con o sin ODN 1826, 0.1 ml de solución de 250 µg de alumbre (Thermo Fisher Scientific, Inc. Pensilvania, EE.UU.) y 5 µg de rHepBag con o sin ODN 1826 y 0.1 ml de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Co. Missouri, EE.UU.) con 5 µg de rHepBag (1:2). Para preparar una dosis de la suspensión, 5 µg de antígeno de rHBsAg, con o sin mezclado previo con 50 µg de CpG, se llevaron a un volumen final de 400 µl con MATRIGEL o
- 50
- 55

PURAMATRIX y se mezcló completamente antes de la inyección subcutánea. Las cantidades se aumentaron dependiendo del número de dosis necesarias. MATRIGEL y PURAMATRIX se adquirieron de BD (Franklin Lakes, NJ).

5 Evaluación de citoquinas y anticuerpos. Se aislaron esplenocitos una semana después del refuerzo para la evaluación de las citoquinas. Se prepararon suspensiones de una única célula ( $1.5 \times 10^6$ /ml) y se suspendieron en un medio 1640 (RPMI 1640 Thermo Scientific Hyclone, Utah, EE.UU.) con penicilina-estreptomina (concentraciones finales de 100 U/ml y 100  $\mu$ g/ml respectivamente) (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, EE.UU.). Se agregaron 0.5 ml de la suspensión de una única célula a placas de 48 pocillos (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, EE.UU.) con 0.5 ml de medio, 0.5 ml de 1  $\mu$ g/ml de concanavalina A (ConA) o 0.5 ml de 5  $\mu$ g/ml de rHepBag y se cultivaron a 10 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Los niveles de TNF se cuantificaron después de 24 y 48 horas de cultivo, los de IL-4 e IL-5 después de 48 horas y los de IL-4 e IL-10 después de 72 horas, cada uno por triplicado. Los porcentajes de ratones positivos para citoquinas fueron transformados adicionalmente utilizando una plataforma de dos etapas que consistió en (1) calcular una mediana global para cada citoquina considerando el rango completo de valores obtenidos para cada grupo y (2) establecer para cada grupo el concepto de productores de citoquina "bajos" y "altos" utilizando el porcentaje de mediana global de células positivas para citoquinas como el límite de corte para segregar los individuos en dos categorías denominadas productores de citoquina "bajos" y "altos". Es importante destacar que el perfil de citoquina total para cada grupo se construyó proporcionando el mismo peso a todas las citoquinas y produciendo poblaciones celulares.

20 También se realizó un IFN gamma ELISpot con  $3 \times 10^5$  y  $1.5 \times 10^5$  esplenocitos después de 24 horas de cultivo, tal como lo describe el fabricante (BD Biosciences (San Francisco, CA, EE.UU.) utilizando 1  $\mu$ g/ml de ConA como testigo positivo. El valor de la unidad formadora de manchas (SFU) se expresó como la media de los cultivos por triplicado menos el valor medio de sus niveles basales individuales.

25 Se recolectaron muestras de sangre de los ratones semanalmente de 1 a 6 semanas, incluyendo el día anterior a la inmunización primaria. Se utilizaron sueros recogidos de estas muestras de sangre en ensayos ULISA para la detección y cuantificación de anticuerpos.

Péptidos sintéticos para análisis de células T para citometría de flujo. Péptidos sintéticos fueron sintetizados por Biosynthesis, Inc y se seleccionaron en base a literatura relevante. El péptido S 228-39 (IPQSLDSWWTSL) está restringido por H2-L<sup>d</sup> y es el epítipo dominante en ratones Balb/c. Los esplenocitos de cinco ratones por grupo se estimularon individualmente con 5  $\mu$ M de péptido y 40 U/ml de IL-2 para citometría de flujo.

30 Análisis estadísticos. Para la evaluación de anticuerpos se analizaron comparaciones por la prueba de Mann-Whitney o *t*-Student utilizando el software GraphPad PRISM, versión 4.0 (GraphPad Software, California, EE.UU.), después de la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Una diferencia fue considerada como estadísticamente significativa cuando un valor P fue  $\leq 0.05$ . La prueba de chi cuadrado se utilizó para comparaciones de frecuencias de productores de citoquina "bajos" y "altos" entre grupos y la significación se consideró en  $P \leq 0.05$ . La comparación de los ejes de gráficas de radar y áreas del polígono se consideraron significativa para relaciones dos veces más bajas en magnitud. El análisis de datos para los resultados presentados en el formato de diagrama de radar se realizó mediante la comparación de las áreas del polígono central intra e inter grupos de categorías productoras de citoquina. Se consideraron diferencias significativas para relaciones que indican ejes y áreas de polígonos dos veces menores o mayores en tamaño.

#### 40 Resultados

Los resultados iniciales mostraron que los ratones vacunados con cualquier solución de gel más CpG tenían IgG2a específica de vacunas significativamente más alta 14 días después de la vacunación principal e IgA, IgM a los 28 días después de la inoculación que ratones vacunados con alumbre o CFA. Una administración de suspensión de gel produjo titulaciones de IgG específicas de vacunas 14 días después de la vacunación principal mayores que otros métodos de administración después del refuerzo, lo que sugiere que el refuerzo fue innecesario. Los ensayos de respuesta mostraron IL-10 e IL-4 reguladas hacia arriba de esplenocitos de ratones vacunados con ALHYDROGEL o CFA en comparación con células de ratones vacunados con suspensión de gel + CpG. El uso de CpG redujo los niveles de IL-5 a niveles basales en todos los grupos comparados con niveles elevados en CFA. No se observaron diferencias en los niveles de IFN o TNF.

50 La Figura 1 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgA. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

La Figura 2 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgM. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

55 La Figura 3 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgG. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

La Figura 4 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgG<sub>2a</sub>. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

La Figura 5 muestra la cinética de titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg de IgG<sub>22</sub>. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10.

5 La Figura 6 muestra titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg más altas después de una única vacunación (21 días). Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

10 La Figura 7 muestra titulaciones de anticuerpos anti-HBsAg más altas después de una única vacunación (35 días). Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10; \*p<0.05 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

La Figura 8 muestra el perfil de citoquina veinticuatro horas después de una re-estimulación con HBsAg de esplenocitos. Los datos que se muestran son representativos de un experimento, n=5; \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

15 La Figura 9 muestra el perfil de citoquina cuarenta y ocho horas después de una re-estimulación con HBsAg de esplenocitos. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10 (n=5 sólo para adyuvantes); no se observó ninguna diferencia estadística (p<0.05) en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

20 La Figura 10 muestra el perfil de citoquina setenta y dos horas después de una re-estimulación con HBsAg de esplenocitos. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10 (n=5 sólo para adyuvantes); \*\*p<0.01 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

25 La Figura 11 muestra una inmunidad mediada por células específicas de HBsAg mediante ELISpot en respuestas de células T específicas de HbsAg. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10; \*p<0.05 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

La Figura 12 muestra una inmunidad mediada por células T específicas de HBsAg mediante citometría de flujo. Los datos que se muestran se reunieron de dos experimentos independientes para un total de n=10; \*\*p<0.01 en comparación con el antígeno solo utilizando ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni.

30 Aumento de la secreción de citoquinas por parte de esplenocitos con estimulación de rHepBag. Para medir la respuesta inmune celular inducida por las vacunas se sacrificaron ratones una semana después del refuerzo y los esplenocitos se cultivaron con o sin 5 µg/ml de concentración final de rHepBag. Los niveles de citoquinas se midieron mediante ELISA. El concepto de productores bajos y altos se aplicó para investigar un rango más amplio de citoquinas y evaluar los perfiles de citoquina ex vivo de leucocitos circulantes. A estos efectos, se calculó la mediana global para cada subconjunto de células positivas para citoquinas, tomando el rango completo de valores obtenidos para cada grupo, como se describió anteriormente (Vitelli-Avelar et al., 2008, *Scand J Immunol*; 68(5):516-25). El porcentaje de mediana global de cada población celular positiva para citoquinas se utilizó como el límite de corte para segregar los individuos en dos categorías denominadas productores de citoquina "bajos" y "altos", como se muestra en la Tabla 1.

40 Los datos demostraron que ninguno de los ratones inoculados con ODN 1826 mostró producción de TNF en 24 horas, pero cuando ODN 1826 se asoció con los adyuvantes P1 o P2, una proporción importante de ratones mostró valores de TNF por encima del límite de corte, como se muestra en la Fig. 13 (P < 0.011). Aunque el ALHYDROGEL, cuando se asoció o no con ODN 1826, indujo una cantidad importante de productores de TNF altos, todos los ratones que se inocularon con el adyuvante P1 sin CpG mostraron valores por encima del corte, y este valor fue significativamente mayor que todos los grupos de ALHYDROGEL (P < 0.001). Este mismo resultado no se observó después de 48 horas cuando los adyuvantes P1, P2, ALHYDROGEL y Freund mostraron un número comparable de productores de TNF "altos" (Fig. 14A y 14B) (P < 0.001).

50 Más aun, se encontraron datos interesantes para la producción de IL-4 e IL-5 después de 48 horas cuando la mayoría de los ratones inmunizados con el adyuvante P2 cayeron en la región de productores de IL-4 e IL-5 "bajos" (P < 0.05). Por el contrario, la mayoría de los ratones inoculados con el adyuvante P1 presentaron una producción alta de ambas citoquinas (P < 0.002). Tal como se muestra en la Fig. 15, el adyuvante P1 continuó presentando productores de IL-4 "altos" después de 72 horas, en asociación o no con ODN 1826, y este mismo resultado se encontró después de la inmunización con ALHYDROGEL o Freund (P < 0.001). Asimismo, los datos demostraron que la mayoría de los ratones previamente inmunizados con el adyuvante P2 o adyuvante P2 más ODN 1826 mostraron valores de IL-10 por debajo del límite de corte, significativamente más bajos que los ratones inmunizados con rHepBag, asociados o no con ODN 1826 (P < 0.05).

Tabla 1 Frecuencia de sujetos con alta producción de citoquina en base al corte de citoquina medio global detectado en cultivos de esplenocitos estimulados con rHepBag\*.

Cito-quina	Corte medio global	Productores de citoquinas altos (%)									
		rHepBag	rHepBag + ODN	rHepBag en P2	rHepBag en P2 + ODN	rHepBag en P1	rHepBag en P1 + ODN	rHepBag en Alhy-drogel	rHepBag en drogel + ODN	rHepBag en Freund	
24h											
TNF	0.009 (0.00-1.26)	40	0	40	25 <sup>b</sup>	100 <sup>a,c,d</sup>	40 <sup>b</sup>	75 <sup>a</sup>	80 <sup>b</sup>	40	
48h											
TNF	12.96 (0.73-16.41)	20	40	50 <sup>a</sup>	56 <sup>b</sup>	50 <sup>a</sup>	30	67 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>	80 <sup>a</sup>	
IFN gamma	0.00 (0.00-3.89)	50	50	50	56	40	60	33	30	20	
IL-4	0.00 (0.00-0.00)	20	0	10 <sup>a</sup>	0	40 <sup>a</sup>	0	33 <sup>a</sup>	0	50 <sup>a</sup>	
IL-5	0.00 (0.00-5.98)	40	10	20 <sup>a</sup>	0	80 <sup>a</sup>	0	67 <sup>a</sup>	0	80 <sup>a</sup>	
72h											
IL-4	0.00 (0.00-7.23)	40	10	30	0	90 <sup>a,e</sup>	30 <sup>b</sup>	89 <sup>a</sup>	0	80 <sup>a</sup>	
IL-10	41.57 (0.00-179.00)	70	40	50 <sup>a</sup>	11 <sup>b</sup>	80	30	56	30	80	

\*Los datos están expresados como porcentaje de ratones que muestran un porcentaje de células positivas para citoquina mayor o igual al corte medio global calculado para cada población celular dentro de las células de inmunidad adaptativa. La significación estadística en  $P \leq 0.05$  ( $\chi^2$ ) se representó mediante letras superíndices 'a', 'b', 'c', 'd' y 'e' para comparaciones con rHepBag, rHepBag + ODN, rHepBag en Alhydrogel, rHepBag en Alhydrogel + ODN y HepBag en Freund, respectivamente. PURAMATRIX (P1) y MATRIGEL (P2).

La respuesta humoral sostenida en ratones vacunados con rHepBag y adyuvantes P1 y P2. Se recogieron sueros semanalmente antes y después de la inmunización para evaluar la titulación de anticuerpos de isotipos específicos mediante ELISA. Los ratones vacunados con ambos adyuvantes P1 y P2 desarrollaron un anticuerpo de IgG anti-rHepBag en 2 semanas después de la inoculación principal ( $P < 0.002$ ). Las titulaciones de anticuerpos anti-rHepBag más altas se alcanzaron en ratones vacunados con P1 asociado o no a ODN y estas respuestas fueron significativamente mayores que la inmunización con los adyuvantes ODN, Alumbre o de Freund ( $P < 0.001$ ). La relación IgG1:IgG2a provocada in vivo representa diferentes patrones para ambos adyuvantes. El adyuvante P1 provoca una respuesta de Th2 con altos niveles de IgG1 en 14 a 35 días después de la inoculación principal. Por otro lado, la respuesta provocada por P2 más ODN es un sistema mezclado más que una respuesta de Th1 o Th2 pura, en donde los niveles de IgG1 e IgG2a se regularon hacia arriba durante toda la línea de tiempo. Ver las Figs. 17A-17D.

La combinación del adyuvante P1 +/- ODN indujo la regulación hacia arriba de las titulaciones de IgA e IgM tan pronto como 14 días después de la inoculación principal y esta respuesta humoral se mantuvo hasta los 35 y 21 días, respectivamente ( $P < 0.04$ ). Este adyuvante fue superior al de Freund durante 14 y 35 días y al ALHYDROGEL durante las primeras 3 semanas para la producción de IgA, IgM e IgG ( $P < 0.02$ ). Adicionalmente, los adyuvantes P1 y P2 demostraron ser superiores al adyuvante de Freund para la producción de toda la Ig después del refuerzo ( $P < 0.02$ ). Ver las Figs. 16A-16D.

#### Análisis

Este ejemplo mostró que los ratones vacunados con la suspensión de gel P1 o P2 más ODN tuvieron una producción de TNF significativamente más alta 24 a 48 horas después de la inoculación primaria, mientras que P1 fue significativamente superior a ALHYDROGEL a las 24 horas. El adyuvante P2 presentó una inhibición de Th2 prometedora después de 48 horas con la reducción de los niveles de IL-4, IL-5 e IL-10 con una producción de IgG2a específica de antígenos en suero.

El análisis de los anticuerpos específicos de vacunas mostró que P1 generó titulaciones altas de IgA, IgM e IgG específicas de vacunas 14 días después de la vacunación principal utilizando o no ODN y las titulaciones altas de IgA e IgG se mantuvieron durante 35 días. Dado que ambos sistemas de suspensión de gel evaluados en este estudio fueron superiores a los adyuvantes convencionales, este nuevo sistema de administración de vacunas de suspensión de gel tendrá una amplia utilidad para mejorar las respuestas a numerosas vacunas actuales que son poco funcionales actualmente. El uso de este nuevo sistema de administración de vacunas se investigará en más detalle en el desarrollo de vacunas para cualquier tipo de enfermedades infecciosas, desde una infección parasitaria a una viral.

#### Ejemplo 2

##### Vacunación contra la influenza

Siguiendo los métodos descritos en más detalle en los ejemplos previos, ratones C57/BL y Balb/c fueron inmunizados con el antígeno del virus de influenza de nucleoproteínas recombinantes (rNP) administrado con alumbre, CpG o una suspensión de PURAMATRIX y CpG. Para preparar una dosis de la suspensión, 10 ug de antígeno de rNP, con o sin mezclado previo con 50  $\mu$ g de CpG, se llevaron a un volumen final de 200  $\mu$ l con PURAMATRIX y se mezcló completamente antes de la inyección subcutánea. Las cantidades se aumentaron dependiendo del número de dosis necesarias. Tal como se muestra en la Fig. 18B, las titulaciones de IgG anti-influenza se aumentaron en ratones Balb/c vacunados con rNP administrada como una suspensión con PURAMATRIX y CpG, en comparación con ratones vacunados con rNP administrada con el adyuvante alumbre o CpG. La Fig. 18A muestra titulaciones de IgG anti-influenza en ratones C57BL/6. Las titulaciones de IgG anti-influenza se determinaron cuatro semanas después de la última vacunación (wplv).

Nuevamente, siguiendo los métodos descritos en más detalle en los ejemplos previos, ratones C57BI/6 se inmunizaron con una cepa PR8 del virus de la influenza A (H1N1) inactivado completo administrado con alumbre, como una suspensión PURAMATRIX o como una suspensión de PURAMATRIX y CpG. Como testigo, los ratones adicionales fueron inmunizados sólo con el virus inactivado completo PR8 (WIV). Para preparar una dosis de la suspensión, 15 ug de antígeno de PR8, con o sin mezclado previo con 50  $\mu$ g de CpG, se llevó a un volumen final de 200  $\mu$ l con PURAMATRIX y se mezcló completamente antes de la inyección subcutánea. Las cantidades se aumentaron dependiendo del número de dosis necesarias. PR8 (WIV) es influenza A/PR/8/34 (H1N1) inactivada con formalina de Charles River rNP es proteína nuclear NP de Influenza A (A/PR/8/34/Mount Sinai (H1N1) segmento 5) humana recombinante de Imgenex.

Tal como se muestra en la Fig. 19, las titulaciones de IgG anti-influenza en suero se aumentaron en ratones C57BI/6 vacunados con WIV PR8 administrado con una suspensión de PURAMATRIX y CpG, en comparación con ratones vacunados con WIV PR8 administrado con el adyuvante alumbre o como una suspensión con PURAMATRIX solo, sin CpG. Las titulaciones de IgG anti-influenza se determinaron cuatro semanas después de la última vacunación (wplv). La Fig. 19 muestra los resultados de dos experimentos independientes.

Tal como se muestra en la Fig. 20, la protección mejorada de desafío letal se observó en ratones C57Bl/6 vacunados con WIV PR8. La Fig. 20A muestra resultados de un experimento independiente con desafío letal a 30 LD<sub>50</sub> y la Fig. 20B muestra resultados de un experimento independiente con desafío letal a 1000 LD<sub>50</sub>.

#### Ejemplo 3

##### 5 Vacunación contra Burkholderia

Siguiendo los métodos descritos en más detalle en el ejemplo previo, los ratones fueron inmunizados con un cóctel de tres proteínas recombinantes de burkholderia diferentes (proteína de burkholderia 4-9, proteína de burkholderia 22-11 y la proteína de burkholderia 42) administradas con una o más preparaciones de adyuvantes diferentes, alumbre, adyuvante completo de Freund (CFA) o suspensión de PURAMATRIX y CpG. Para preparar una dosis de la suspensión de PURAMATRIX + CpG, 75 ug de antígeno de proteínas de Burkholderia, con o sin mezclado previo con 50 µg de CpG, se llevaron a un volumen final de 200 µl con PURAMATRIX y se mezcló completamente antes de la inyección subcutánea. Las cantidades se aumentaron dependiendo del número de dosis necesarias. Como testigos, ratones adicionales fueron inmunizados sólo con alumbre, sólo con CFA o suspensión de PURAMATRIX + CpG, sin antígeno.

15 El nombre del género *Burkholderia* (previamente parte de *Pseudomonas*) se refiere a un grupo de bacterias en forma de bastoncillos aeróbicas obligadas, motiles, gram negativas virtualmente ubicuas que incluyen patógenos de animales/humanos y plantas, así como algunas especies ambientalmente importantes. *Burkholderia* es mejor conocida por sus miembros patogénicos. *Burkholderia mallei* es responsable por el muermo, una enfermedad que ocurre mayormente en caballos y animales relacionados. *Burkholderia pseudomallei* es el agente causante de melioidosis (también denominada enfermedad de Whitmore), una enfermedad infecciosa predominantemente de climas tropicales que puede infectar humanos o animales, especialmente en el sudeste de Asia y norte de Australia. *Burkholderia cepacia* es un patógeno importante de infecciones pulmonares en personas con fibrosis quística.

Debido a su resistencia a antibióticos y la alta tasa de mortalidad de sus enfermedades asociadas *Burkholderia mallei* y *Burkholderia pseudomallei* son consideradas posibles agentes biológicos de uso bélico dirigidos a animales de cría y humanos.

La Fig. 21 muestra titulaciones de IgG anti-burkholderia en ratones inmunizados con un cóctel de tres proteínas recombinantes de burkholderia (proteína de burkholderia 4-9, la proteína de burkholderia 22-11 y la proteína de burkholderia 42). La Fig. 21B muestra titulaciones de IgG de la proteína anti-burkholderia 4-9 en ratones inmunizados. La Fig. 21A muestra titulaciones de IgG de la proteína anti-burkholderia 22-11 en ratones inmunizados. La Fig. 21C muestra titulaciones de IgG de la proteína anti-burkholderia 42 en ratones inmunizados. Se muestran las titulaciones de anticuerpo después de la inmunización con sólo alumbre, cóctel de alumbre + proteína, sólo adyuvante completo de Freund (CFA), cóctel de CFA + proteína, sólo suspensión de PURAMATRIX + CpG y cóctel de gel PURAMATRIX + proteína. Una respuesta inmune aumentada medida por niveles de anticuerpo en suero específicos se observó contra dos de las tres proteínas administradas como una composición de vacuna en gel con puramatrix en comparación con vacunación con alumbre o CFA. Específicamente, se observaron las titulaciones de IgG anti-burkholderia contra la proteína de burkholderia 4-9 (Fig. 21B) y la proteína de burkholderia 22-11 (Fig. 21AB) cuando se administraron como una vacuna en gel con PURAMATRIX, en comparación con la vacunación con alumbre o CFA. Se están analizando los datos del desafío.

#### Ejemplo 4

##### 40 Vacunas veterinarias

Siguiendo los procedimientos descritos en más detalle en los ejemplos previos, la presente invención puede utilizarse con cualquiera de una variedad de vacunas veterinarias. Las composiciones de vacuna, métodos de administración y sistema de administración descritos en la presente, proporcionarán muchas ventajas y un valor superior para la industria comercial de animales de cría, incluyendo, a modo no taxativo, eficacia mejorada, administración temprana en el ciclo de producción y eficacia con la administración de sólo una única dosis para proporcionar protección en todo el ciclo de producción.

Las composiciones, métodos de administración y sistemas de administración descritos en la presente pueden utilizarse en la inmunización de cerdos. Las vacunas que pueden administrarse a los cerdos utilizando las composiciones, métodos y sistemas descritos en la presente incluyen, a modo no taxativo, vacuna contra el circovirus porcino tipo 2 (PCV2), síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), vacuna contra microplasma respiratorio, vacuna contra *Streptococcus suis*, vacuna contra coronavirus porcino, vacuna contra rotavirus, vacuna contra *Escherichia coli* enterotoxigénica (K88), vacuna contra *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP) y vacuna contra influenza porcina. Ver, por ejemplo, en Internet en [merck-animal-health.com/species/pigs/vaccines.aspx](http://merck-animal-health.com/species/pigs/vaccines.aspx), "Vaccinations for the Swine Herd," Alabama Cooperative Extension System Publication ANR-902, Alabama A&M and Auburn Universities (disponible en Internet en [aces.edu/pubs/docs/A/ANR-0902/](http://aces.edu/pubs/docs/A/ANR-0902/) ANR-0902.pdf) y "Pig vaccination programs," PRIME FACT publicación 944, setiembre de 2009 (disponible en Internet en [dpi.nsw.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0009/301500/Pig-vaccination-programs.pdf](http://dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0009/301500/Pig-vaccination-programs.pdf)) información más detallada sobre vacunas disponibles y la administración de dichas vacunas a porcinos.

Las composiciones, métodos de administración y sistemas de administración descritos en la presente pueden utilizarse en la inmunización de bovinos, incluyendo, a modo no taxativo ganado doméstico, búfalo de agua, búfalo africano, bisonte y yak. Las vacunas que pueden administrarse a bovinos, utilizando las composiciones, métodos y sistemas descritos en la presente incluyen, a modo no taxativo, vacuna contra la enfermedad respiratoria bovina (BRD), incluyendo, a modo no taxativo, BVDV tipos I y II, vacuna contra el virus del herpes bovino 1 (BHV-1), incluyendo, a modo no taxativo, vacunas de subunidades que no resultarían en virus latente, vacuna contra *Haemophilus somnus*, vacuna contra *Mannheimia haemolytica*, vacuna contra *Mycoplasma bovis*, vacuna contra el rotavirus bovino, vacuna contra *Escherichia coli* K99, vacuna contra coronavirus bovino (BCV), vacuna contra *Clostridium chauvoei* (pierna negra), vacuna contra *Clostridium septicum*, vacuna contra *Clostridium sordelli* (edema maligno), vacuna contra *Clostridium novyi* (enfermedad negra), vacuna contra *Clostridium perfringens* (enterotoxemia), vacuna contra queratoconjuntivitis bovina infecciosa (conjuntivitis), incluyendo, a modo no taxativo, *Moraxella bovis*, clamidia, micoplasma, acoleplasma o vacunas contra el virus de rinotraqueítis bovina infecciosa (IBR), vacunas contra la mastitis, incluyendo, a modo no taxativo, vacuna contra *Escherichia coli* J5.

En algunas aplicaciones, las composiciones, los métodos de administración y los sistemas de administración descritos en la presente pueden utilizarse para la administración de uno o más antígenos de esquistosomiasis a un bovino. Dicho antígeno de esquistosoma puede derivar de, por ejemplo, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma monsoni* o *Schistosoma haematobium*. Un antígeno de esquistosoma puede ser una proteína de triosa fosfato isomerasa (CTPI) de esquistosoma o un fragmento o derivado antigénico de la misma, incluyendo, a modo no taxativo, una proteína CTPI de *S. japonicum*, *S. monsoni* o *S. haematobium* o un fragmento o derivado antigénico de la misma. Un antígeno de esquistosoma puede ser una proteína de membrana integral de 23 kDa de tetraspina esquistosoma (C23) o un fragmento o derivado antigénico de la misma, incluyendo, a modo no taxativo, una proteína C23 de *S. japonicum*, *S. monsoni* o *S. haematobium* o un fragmento o derivado antigénico de la misma. Dicho antígeno de esquistosoma puede ser un polipéptido quimérico, fusionado a uno o más determinantes antigénicos adicionales, tales como por ejemplo, una proteína de choque de calor o un fragmento o derivado antigénico de la misma, incluyendo, a modo no taxativo, la proteína 70 de choque de calor de bovino (Hsp70).

Ver, por ejemplo, "Beef Cattle Herd Health Vaccination Schedule" Powell et al., Universidad de Arkansas, División de Agricultura, Publicación de Agricultura y Recursos Naturales FSA3009 (disponible en Internet en [uaex.edu/Other\\_Areas/publications/PDF/FSA-3009.pdf](http://uaex.edu/Other_Areas/publications/PDF/FSA-3009.pdf)), "How to Vaccinate", Servicio de Extensión Cooperativa de Oklahoma, División de Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales, Publicación No. 350 (disponible en Internet en [ansci.colostate.edu/pdf\\_files/YLE/Dairy7\\_vaccinate.pdf](http://ansci.colostate.edu/pdf_files/YLE/Dairy7_vaccinate.pdf)) y "Cattle Vaccines and Their Use", Beef Cattle Handbook, publicación BCH-3015 (disponible en Internet en [iowabeefcenter.org/Beef%20Cattle%20Handbook/Vaccines\\_Cattle.pdf](http://iowabeefcenter.org/Beef%20Cattle%20Handbook/Vaccines_Cattle.pdf)) para obtener información más detallada sobre vacunas disponibles y la administración de dichas vacunas a ganado.

Las composiciones de vacuna, métodos de administración y sistema de administración descritos en la presente también pueden utilizarse en la vacunación de animales de compañía, incluyendo, a modo no taxativo, gatos y perros, tales como, por ejemplo, para la inmunización de perros con la vacuna del parvovirus para la transferencia de inmunidad maternal.

Las vías de administración incluyen, a modo no taxativo, inyección subcutánea (sc) o intramuscular (im). La vacunación con la composición, métodos y sistemas de administración descritos en la presente proporcionará una protección más duradera y rápida después de la administración de una única dosis.

#### Ejemplo 5

##### Vacunas para aves de corral

Siguiendo los procedimientos descritos en más detalle en los ejemplos previos, la presente invención puede utilizarse como un sistema de administración para cualquiera de una variedad de vacunas para aves de corral, incluyendo, a modo no taxativo, vacunas contra virus de bronquitis infecciosa (IB), virus de enfermedad de Newcastle (ND), enfermedad de Marek (MDV), virus de enfermedad bursal infecciosa (IBD), laringotraqueítis infecciosa (ILT), reovirus aviar, cólera, viruela aviar, micoplasmosis, Coriza de pollos y pavos, influenza aviar, encefalomiелitis aviar (AE), rinotraqueítis aviar (ART), hepatitis viral del pato, enteritis hemorrágica, parvovirus de ganso, Paramixovirus 3, virus de anemia en pollos (CAV), *E. coli*, *Erysipelas*, *Reimerella*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y coccidiosis.

Las vías de administración incluyen, a modo no taxativo, inyección subcutánea (sc) o intramuscular (im). Con inyección subcutánea, la vacuna se inyecta en el espacio entre la piel y los tejidos subyacentes. Típicamente el sitio de aplicación utilizado en aves de corral en la piel flácida en la parte posterior del cuello. Con inyección intramuscular, la preparación de vacuna se deposita dentro de una masa de músculo. Típicamente, el músculo de la pechuga o el músculo del muslo se utiliza a estos efectos. La vacunación puede incluir la vacunación de crías de un día, pollas, ponedoras, reproductoras, aves de engorde y/o aves de exhibición. Típicamente las ponedoras y reproductoras se vacunan antes del periodo de puesta y luego cada 6 a 8 semanas con vacunas inactivadas durante el periodo de puesta. Esto no sólo las protege de enfermedades, sino que transmite anticuerpos maternos a la progenie. Las

aves de corral que pueden vacunarse incluyen, a modo no taxativo, gallinas, pavos y aves acuáticas, tales como, por ejemplo, patos y gansos.

Ejemplo 6

Inmunización de esquistosomiasis

5 Se inmunizaron ratones con el antígeno de la proteína de esquistosoma CCA en el adyuvante completo de Freund o en MATRIGEL más CpG. Las titulaciones de anticuerpo IgG anti-CCA se determinaron mediante ELISA. Los datos se muestran en la Fig. 22A (CCA en el adyuvante completo de Freund) y la Fig. 22B (CCA en MATRIGEL más CpG). Dos ratones se inmunizaron para cada preparación de antígenos. Las muestras de suero se recogieron a los días 0, 8, 16 y 19 después de la inmunización para ratones inmunizados con CCA en adyuvante completo de Freund y a los  
10 días 0, 8, 16, 24, 32 y 40 después de la inmunización para ratones inmunizados con CCA en MATRIGEL más CpG. Los datos de ELISA muestran claramente las titulaciones superiores de anticuerpos específicos de CCA en ratones inmunizados con MATRIGEL más CpG.

Ejemplo 7

Vacunación para la esquistosomiasis del búfalo de agua

15 La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria que afecta más de 200 millones de personas en todo el mundo. La reevaluación de la discapacidad relacionada con la esquistosomiasis, combinada con información reciente en la prevalencia global de infección por esquistosoma, indica que la verdadera carga de la esquistosomiasis es sustancialmente mayor que la apreciada previamente. En Asia, particularmente China, el agente causante es *Schistosoma japonicum*. A diferencia de las especies africanas, *S. mansoni* y *S. haematobium*, *S. japonicum* es un  
20 parásito zoonótico, siendo los bovinos, particularmente los búfalos de agua, responsables de aproximadamente el 75% de la transmisión de esquistosoma a humanos en China. Las intervenciones que reducen la infección por esquistosoma en búfalos de agua mejorarán su salud y a la vez reducirá la transmisión de la enfermedad a humanos.

Los programas de control en muchas áreas de China incluyen un tratamiento con praziquantel (PZQ) simultáneo de  
25 humanos y búfalos de agua que, si bien han mostrado una reducción en la prevalencia general, requieren tratamientos en masa continuos que insumen mucho tiempo y son costosos. Una opción más sostenible sería el desarrollo de una vacuna que reduzca la transmisión de *S. japonicum* de bovinos para reemplazar la quimioterapia bovina. En efecto, el modelo matemático (Williams et al., 2002, *Acta Trop*; 82(2):253-262) ha demostrado que reduciendo la infección de *S. japonicum* en reservas bovinas utilizando vacunas profilácticas con 45% de eficacia solas o en combinación con PZQ debería, con el transcurso del tiempo, reducir la prevalencia del equilibrio y  
30 potencialmente conducir a un control sostenible a largo plazo de la esquistosomiasis. Esta intervención de acción doble reduciría significativamente la transmisión de esquistosomiasis para la salud bovina a largo plazo, aumentaría la salud y el crecimiento de los bovinos y probablemente reduciría la morbilidad total en poblaciones de aldeas. Ver Da'Dara et al., 2008, *Vaccine*; 26(29-30):3617-3625.

35 Las composiciones de antígeno-PURAMATRIX tal como se describen en la presente se utilizarán para inmunizar animales de cría con antígenos de *S. japonicum*. Para estas pruebas, a todos los animales se les proporcionará una vacunación primaria con una vacuna de ADN plasmídico de SjCTPI-Hsp70 (como se describe en más detalle en Da'Dara et al., 2008, *Vaccine*; 26(29-30):3617-3625). El búfalo de agua se reforzará con una composición de la proteína SjCTPI recombinante, PURAMATRIX y CpG bovino. Específicamente, 100 ug de SjCTPI recombinante más CpG bovino se mezclarán con PURAMATRIX para un volumen de inyección total de aproximadamente 0.50  
40 ml/animal. Esto se inyectará en el hombro del búfalo/y ganado. Sólo una única vacunación de refuerzo se administrará a un animal.

Se determinará la obtención de respuestas inmunes celulares y humorales, incluyendo respuesta de anticuerpo de IgG anti-SjCTPI. Después de la vacunación de refuerzo, los animales serán desafiados con cercarias y se  
45 determinará la eficacia de la vacuna mediante la medición de la reducción en el número de huevos por gramo de heces, reducción en huevos en tejidos del hígado, reducción en eclosión miracidial y reducción en la cantidad de gusanos. Los métodos para estas determinaciones se describen en más detalle en Da'Dara et al., 2008, *Vaccine*; 26(29-30):3617-3625.

Una primera prueba en las Filipinas se encuentra ya en el Año 2 con 400 búfalos de agua o ganado que han sido reforzados como se describió anteriormente. Una segunda prueba en Samar, Filipinas, incluirá 1500 búfalos de agua o ganado. Una tercera prueba en China incluirá 600 búfalos de agua o ganado.  
50

La inmunización del búfalo de agua y ganado con composiciones de polipéptidos de esquistosoma, tales como por ejemplo, los polipéptidos SjCTPI, SjCTPI-Hsp70, SjC23 o SjC23-Hsp70 en una composición de puramatrix, con o sin adyuvantes, tales como por ejemplo, CpG o IL-12 pueden servir como la base para nuevos programas de control para esquistosomiasis en Asia. Dicho programa, además del tratamiento con praziquantel (PZQ), incluiría la  
55 vacunación de búfalos de agua con vacunas parcialmente protectoras tales como SjC23-Hsp70 y SjCTPI-Hsp70 como un medio para reducir la cantidad de parásitos ponedores de huevo en animales de cría, conduciendo a reducciones mensurables de la prevalencia, intensidad y transmisión de *S. japonicum*.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de vacuna que comprende:
  - (i) un hidrogel peptídico con la estructura principal de péptido RADARADARADARADA, donde el hidrogel peptídico con la estructura principal de péptido RADARADARADARADA es un líquido a temperatura ambiente y un gel en concentraciones salinas fisiológicas y/o temperaturas fisiológicas;
  - (ii) uno o más antígenos; y
  - (iii) uno o más adyuvantes.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde uno o más adyuvantes comprenden un agonista del receptor tipo Toll (TLR).
3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en donde el agonista del TLR comprende un agonista del TLR4 y/o TLR9.
4. La composición de vacuna de la reivindicación 3, en donde el agonista del TLR9 comprende un oligodesoxinucleótido (ODN) de CpG.
5. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el antígeno comprende un antígeno de hepatitis, un antígeno de influenza, un antígeno de esquistosomiasis y/o un antígeno de burkholderia o un fragmento antigénico de los mismos.
6. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la inmunización de un sujeto en donde la composición es para ser administrada al sujeto.
7. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el sujeto es
  - (i) un animal de cría o animal de compañía doméstico,
  - (ii) ave de corral, o
  - (iii) ser humano.
8. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en donde la composición se formula para la inyección subcutánea (sc) y/o inyección intramuscular (im).
9. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde
  - (i) la respuesta inmune producida en un sujeto es una respuesta inmune anti-esquistosoma en un bovino o
  - (ii) en donde la inmunización a un sujeto es la vacunación contra la esquistosomiasis en un bovino, y en donde dicho uno o más antígenos comprenden un antígeno de esquistosoma.
10. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el antígeno de esquistosoma comprende
  - (i) un antígeno de Schistosoma japonicum o un fragmento antigénico del mismo, o
  - (ii) un polipéptido SjCTPI, un polipéptido SjCTPI-Hsp70, un polipéptido SjC23 y/o un polipéptido SjC23-Hsp70 o un fragmento antigénico de los mismos.
11. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde la composición es para ser administrada como una vacunación primaria y/o de refuerzo.
12. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde la composición es para ser administrada como un refuerzo administrado después de una vacunación primaria con una vacuna de ADN plasmídico de SjCTPI-Hsp70.
13. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde además se administran uno o más agentes quimioterapéuticos anti-esquistosoma.

Figura 1

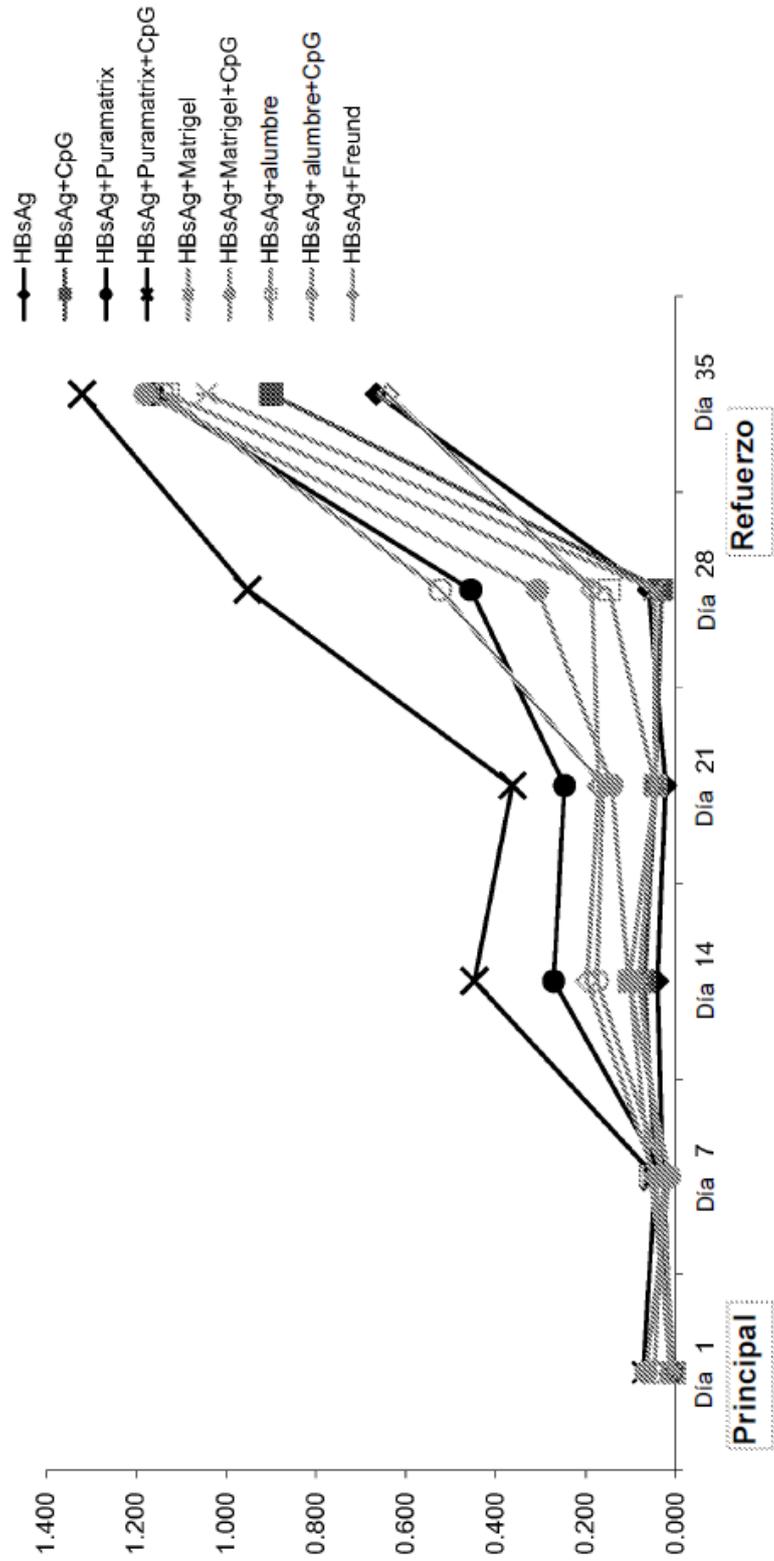
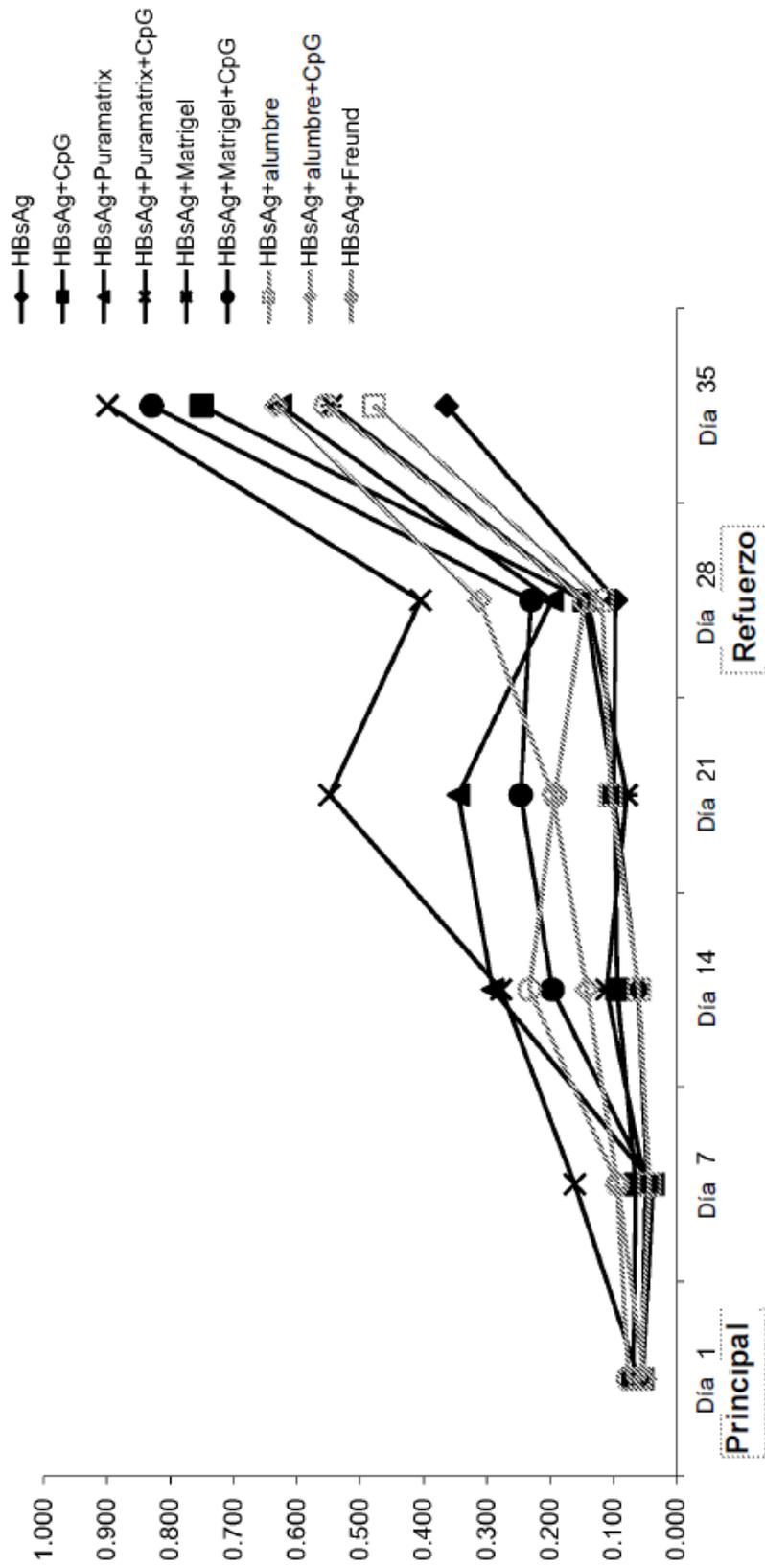


Figura 2



*Figura 3*

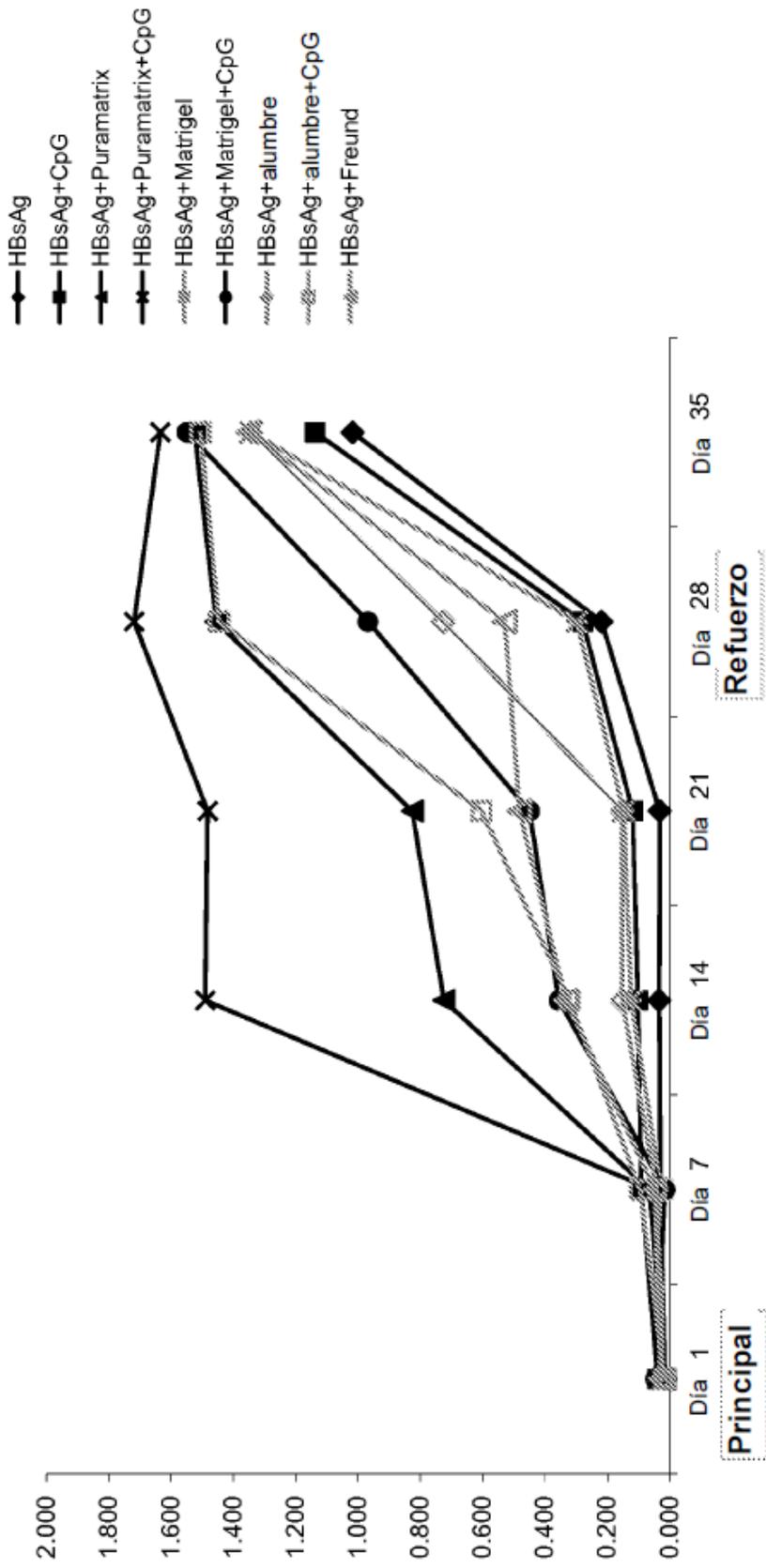


Figura 4

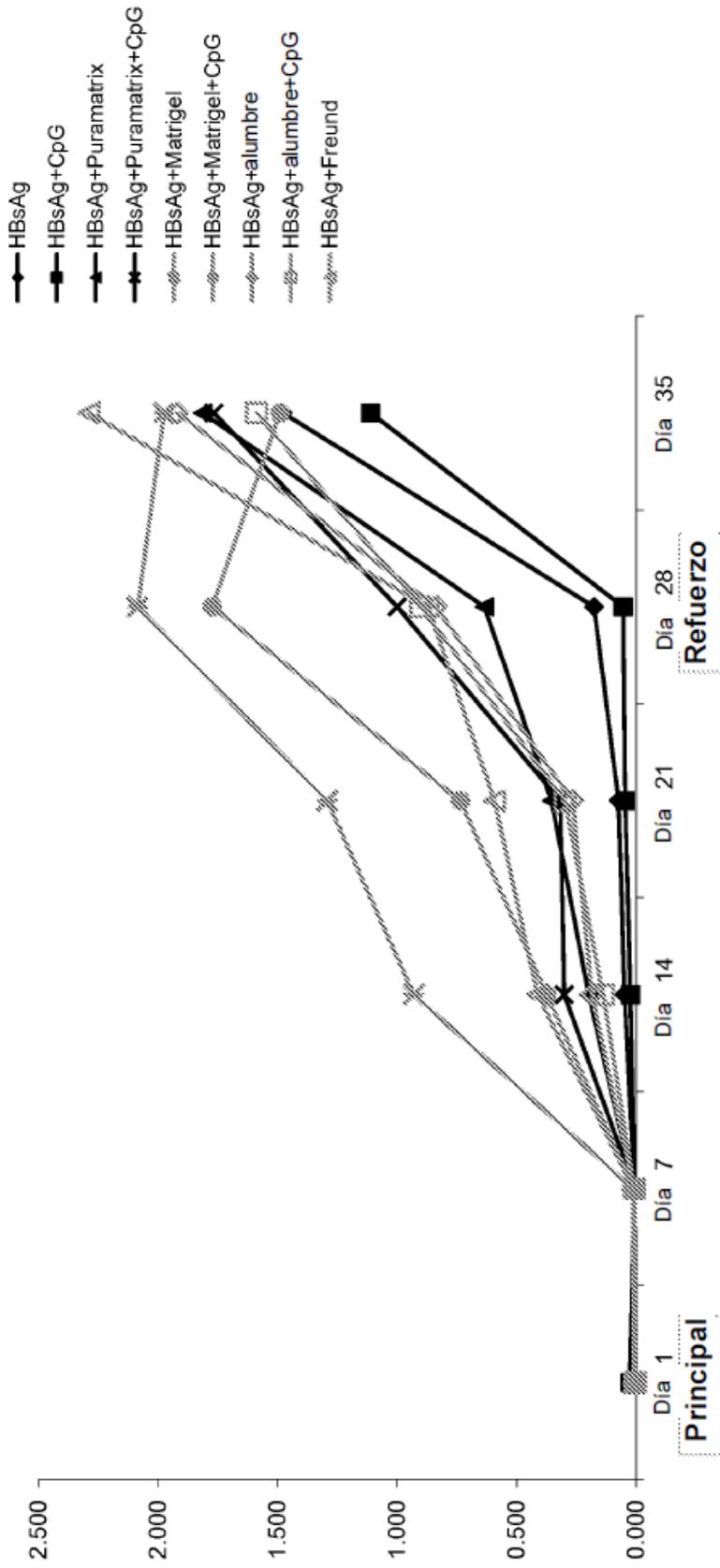


Figura 5

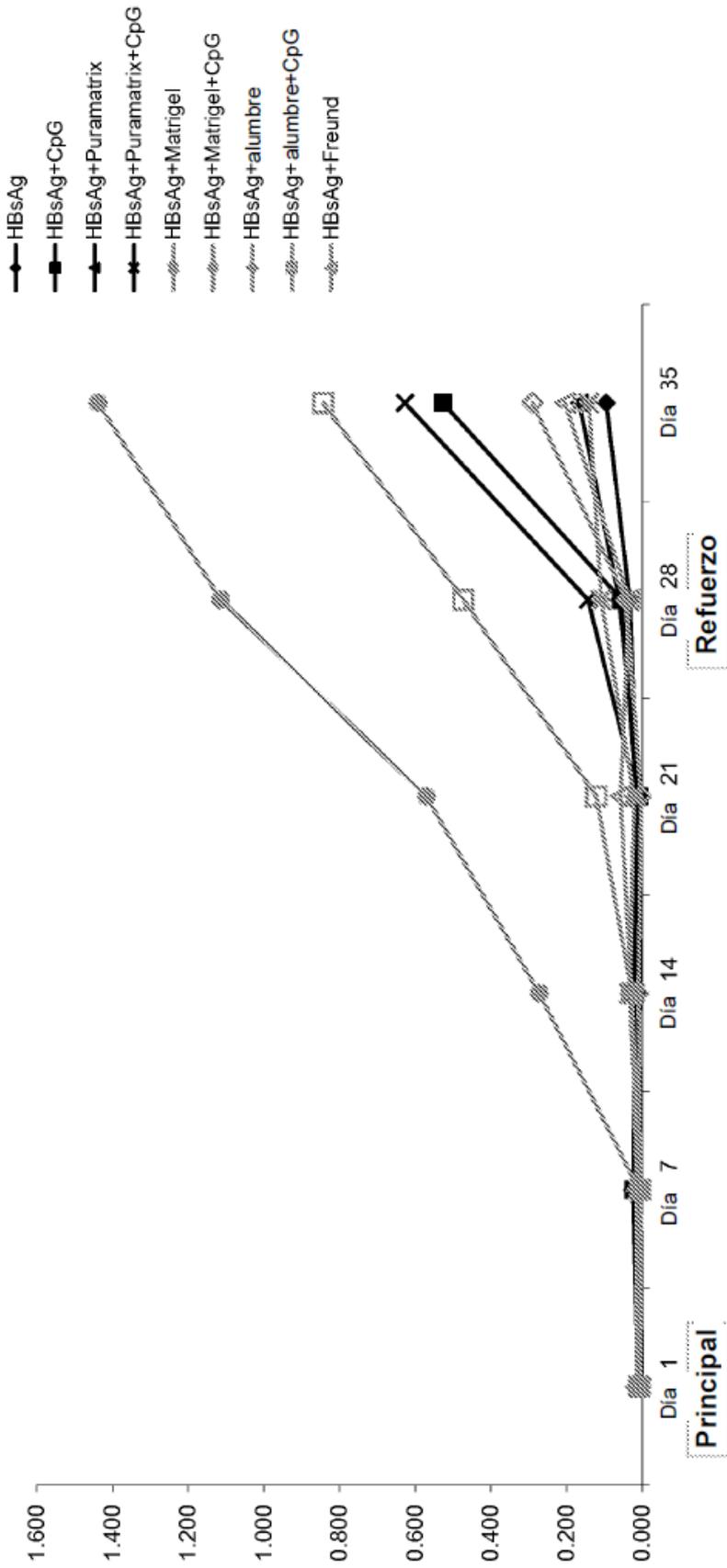
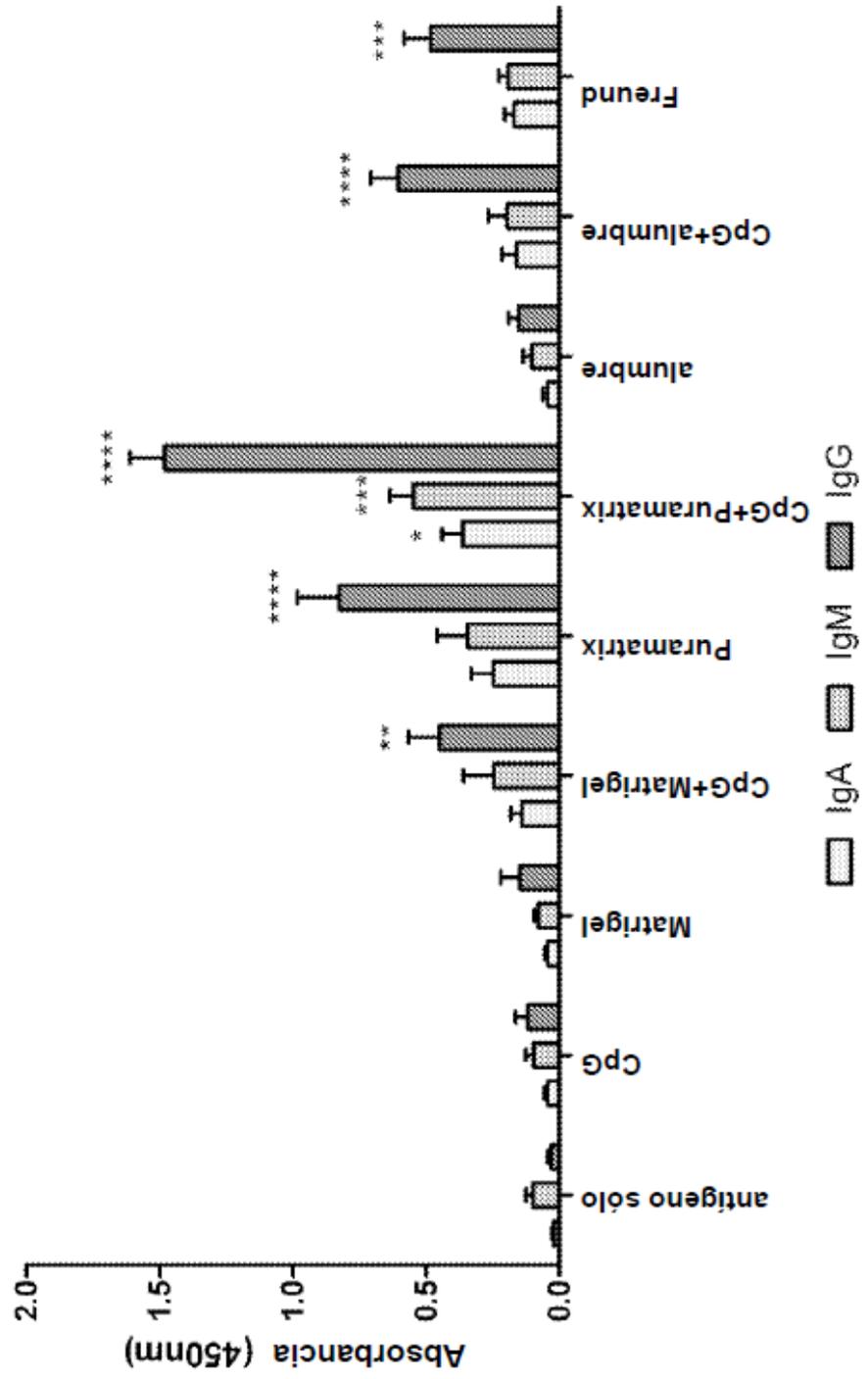


Figura 6



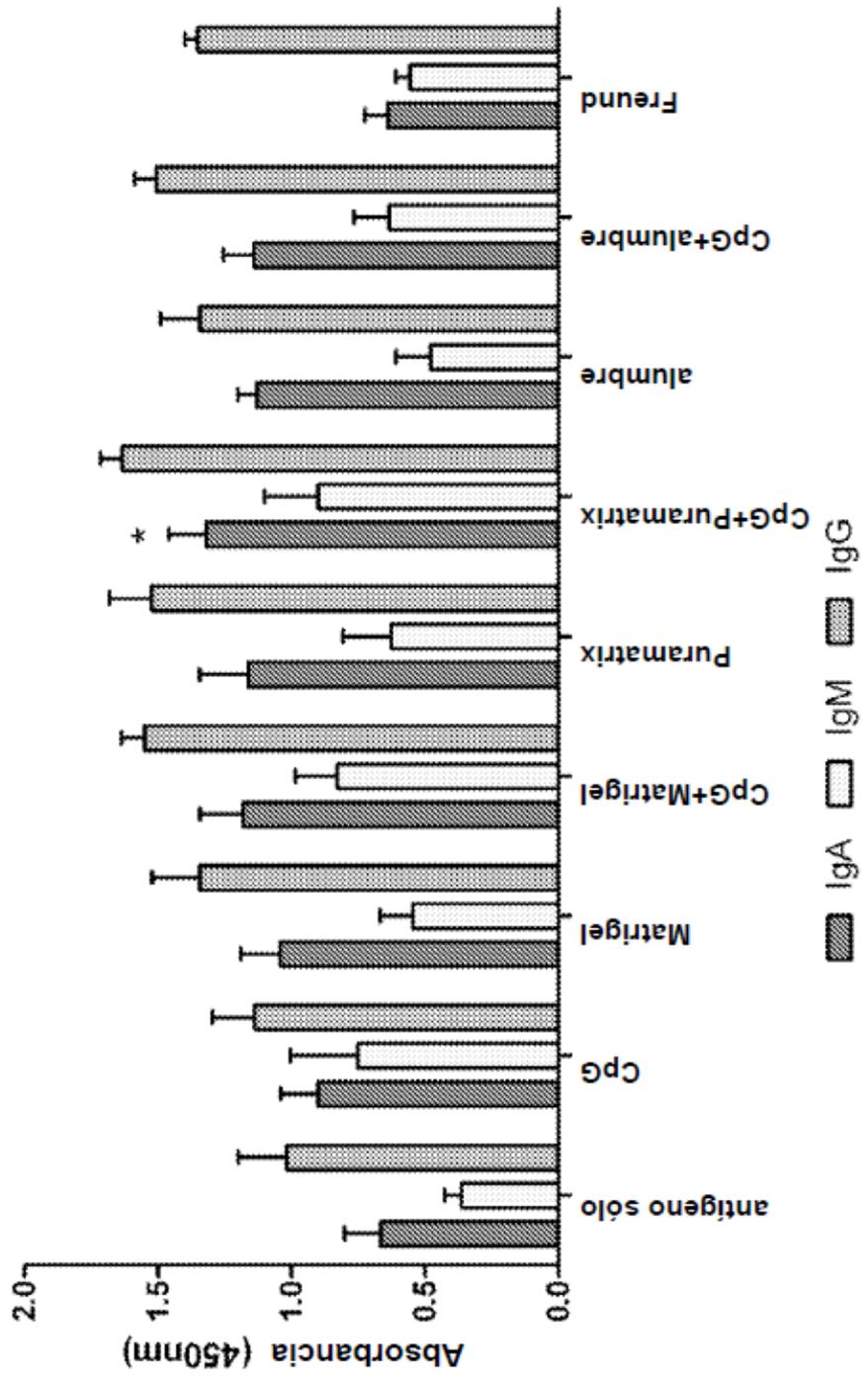


Figura 7

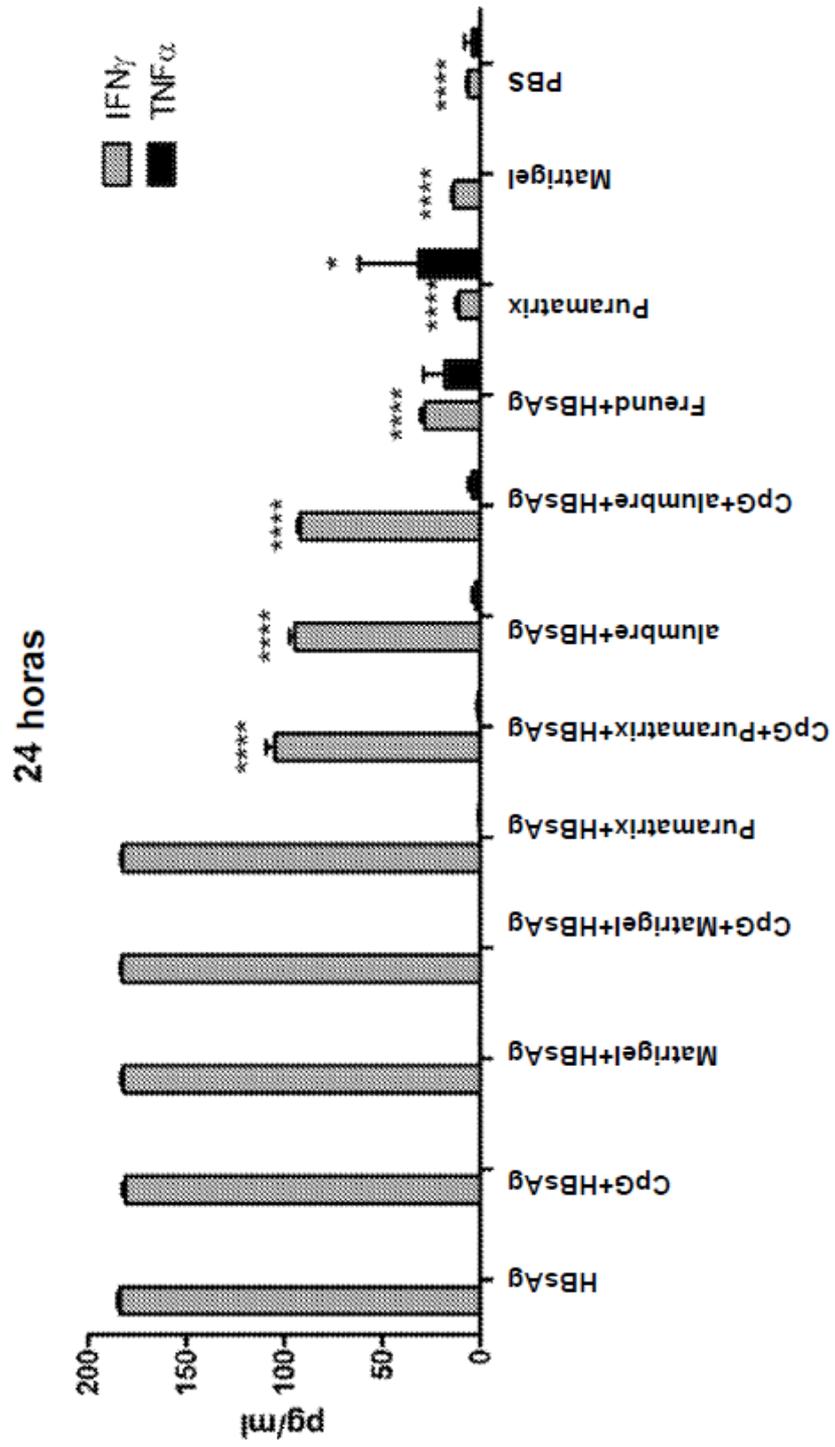


Figura 8

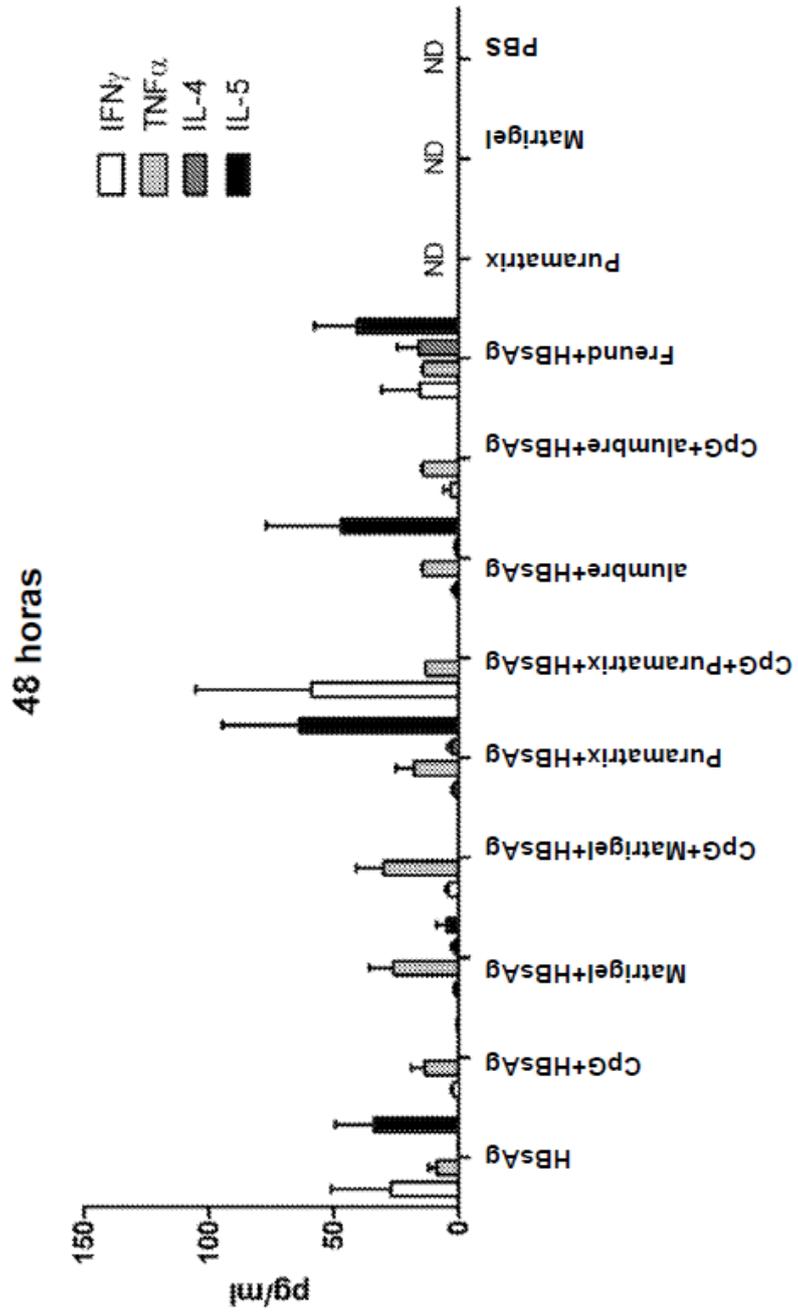


Figura 9

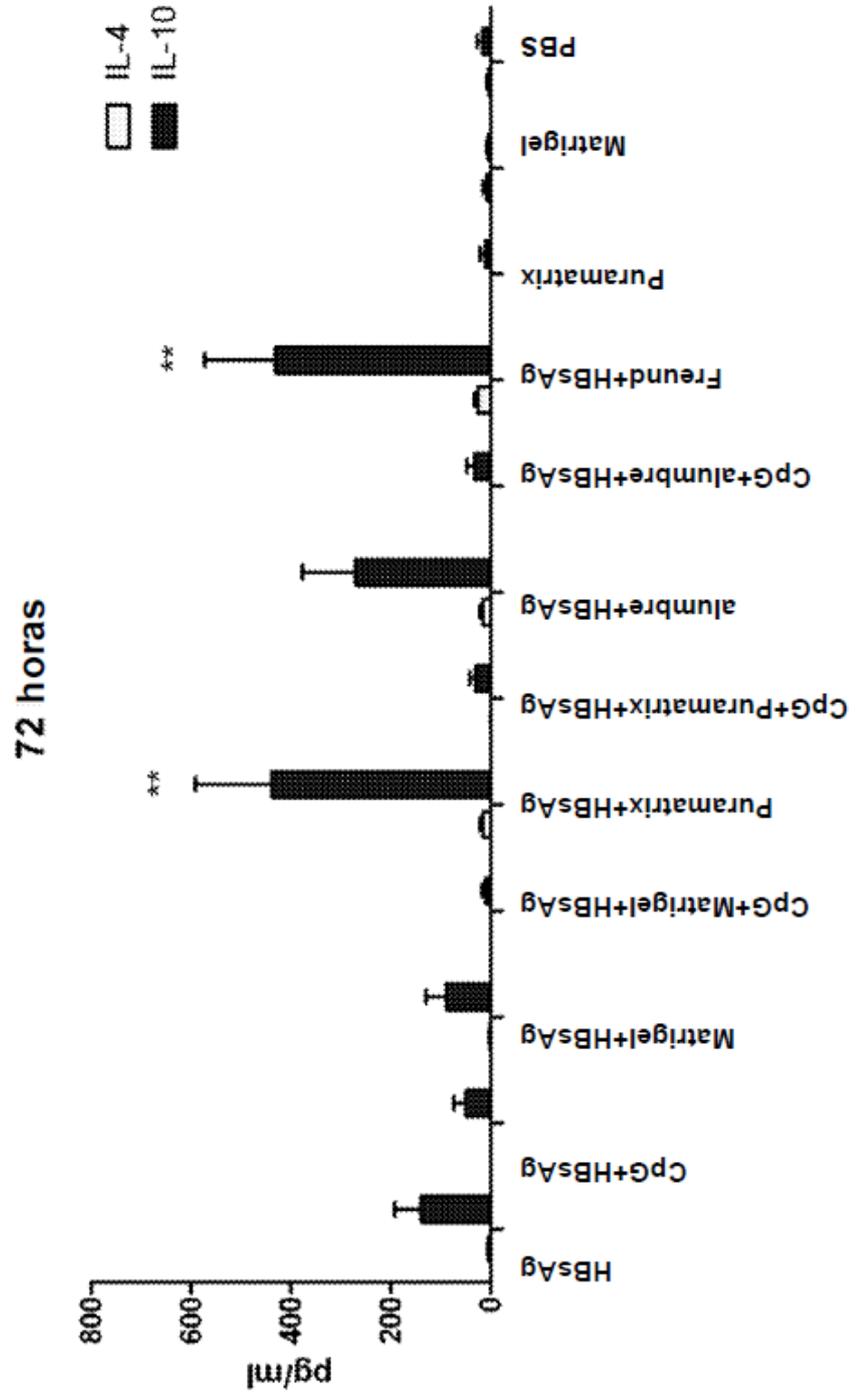
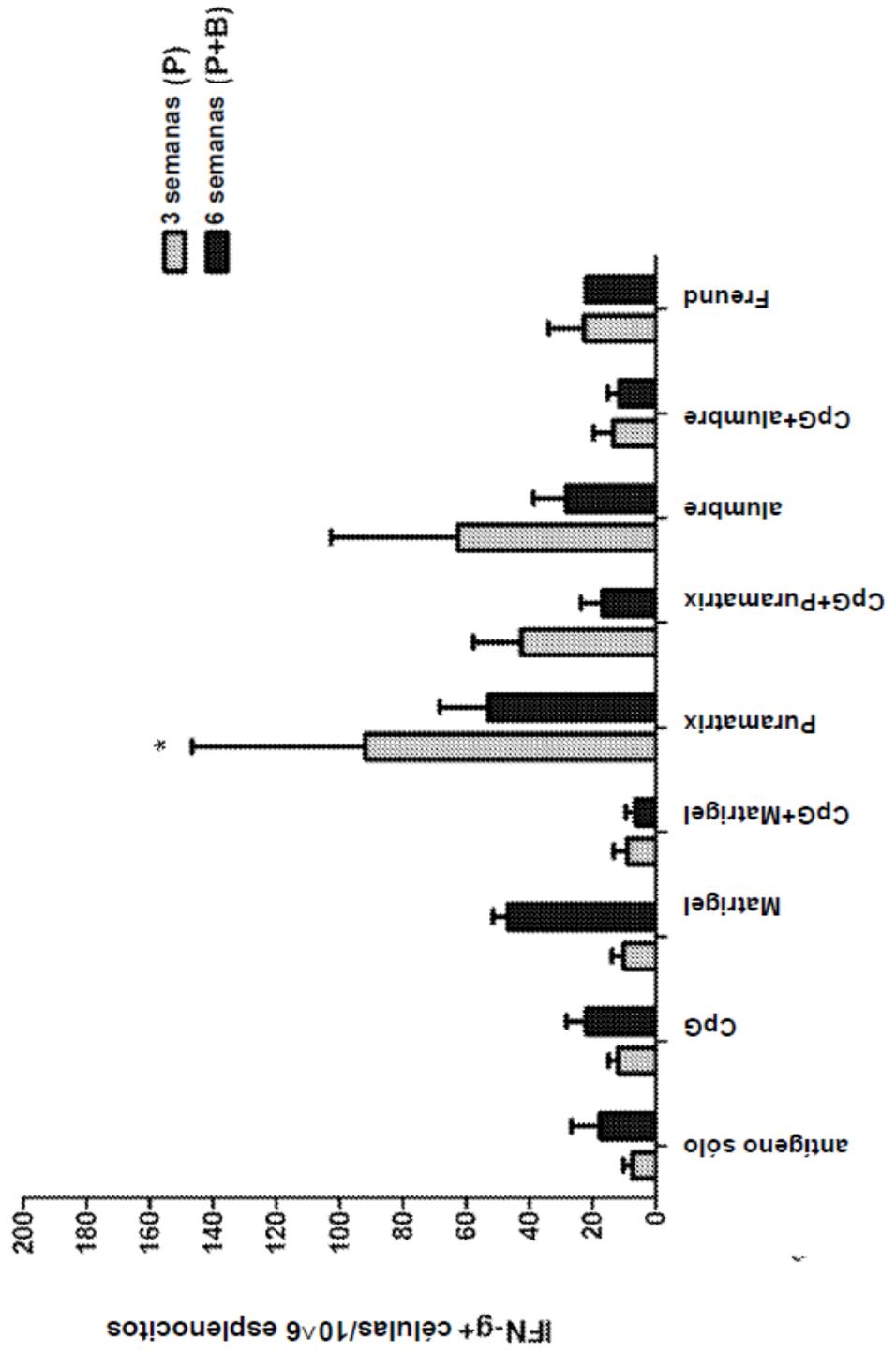


Figura 10

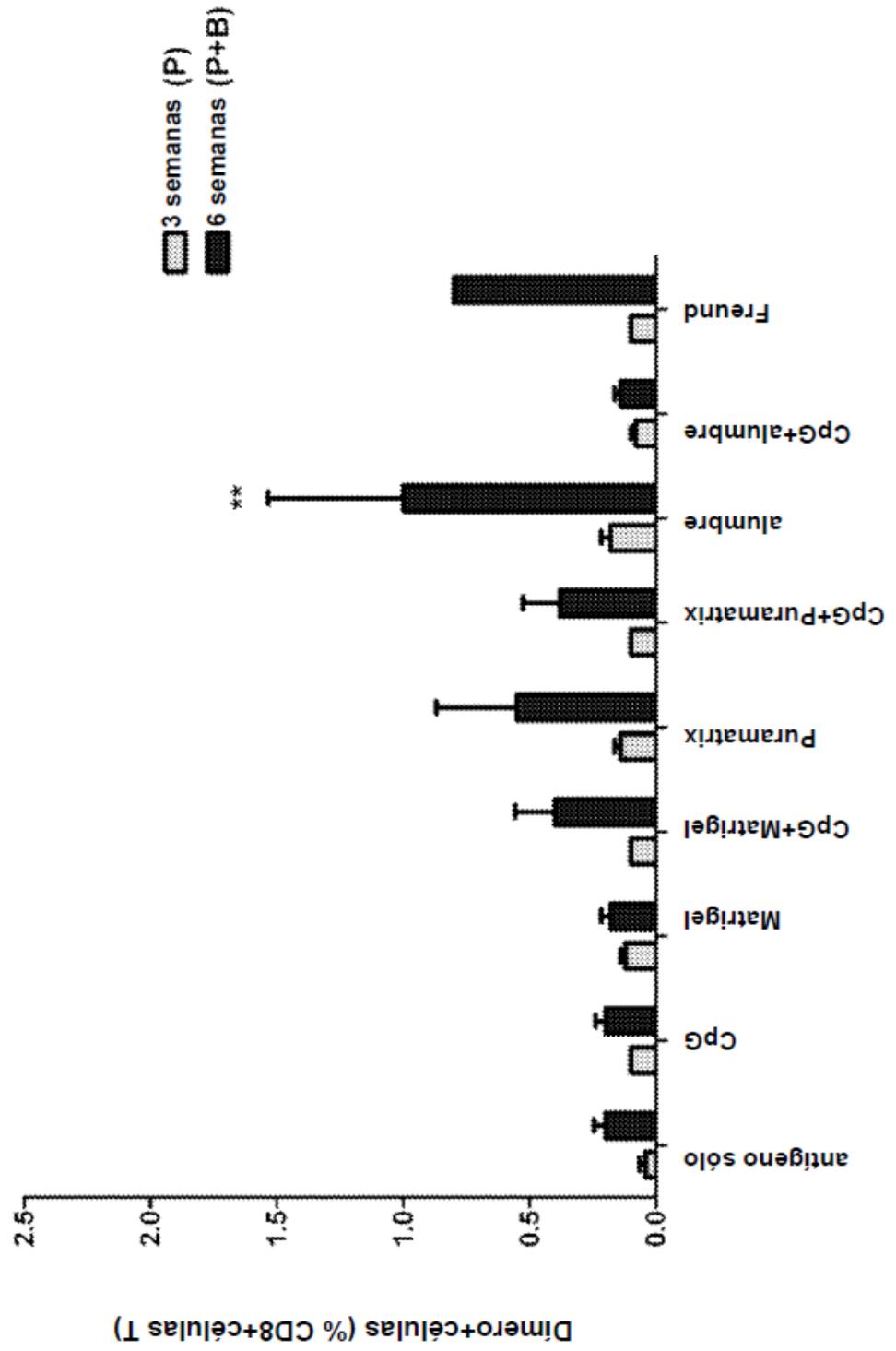
*Figura 11*

Respuestas de células T específicas de HBsAg



*Figura 12*

Respuestas de células T específicas de HBsAg mediante citometría de flujo



*Figura 13*

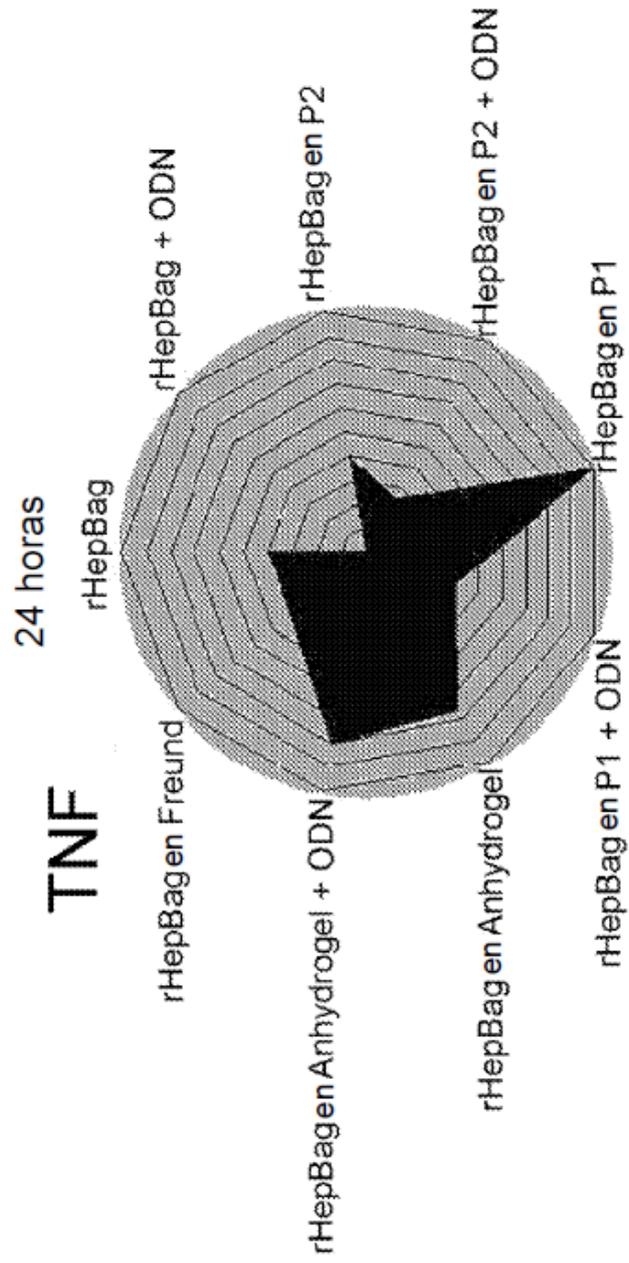


Figura 14A

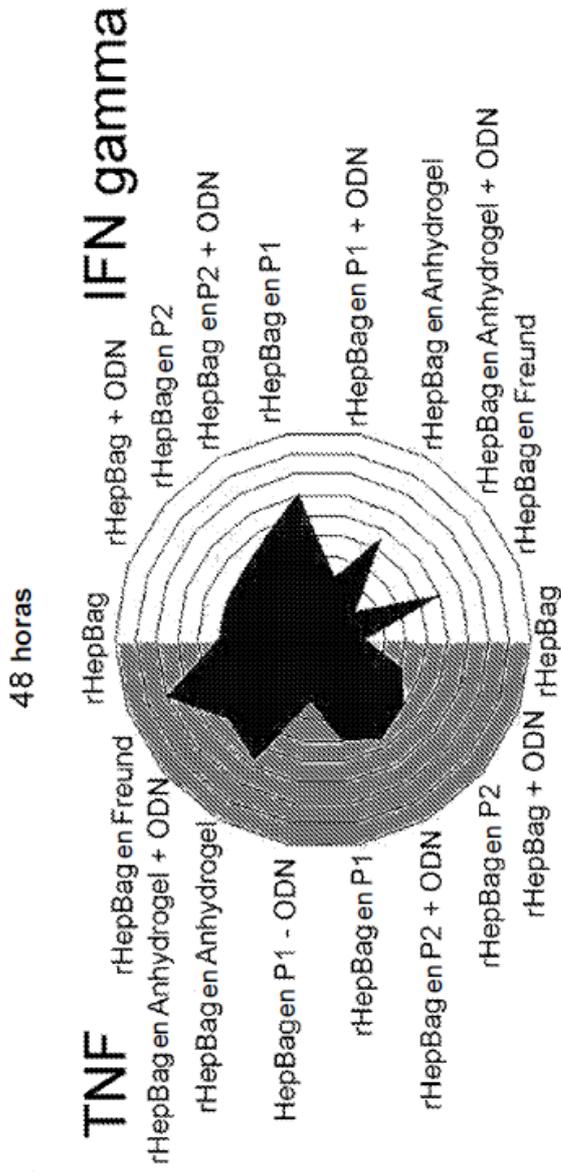
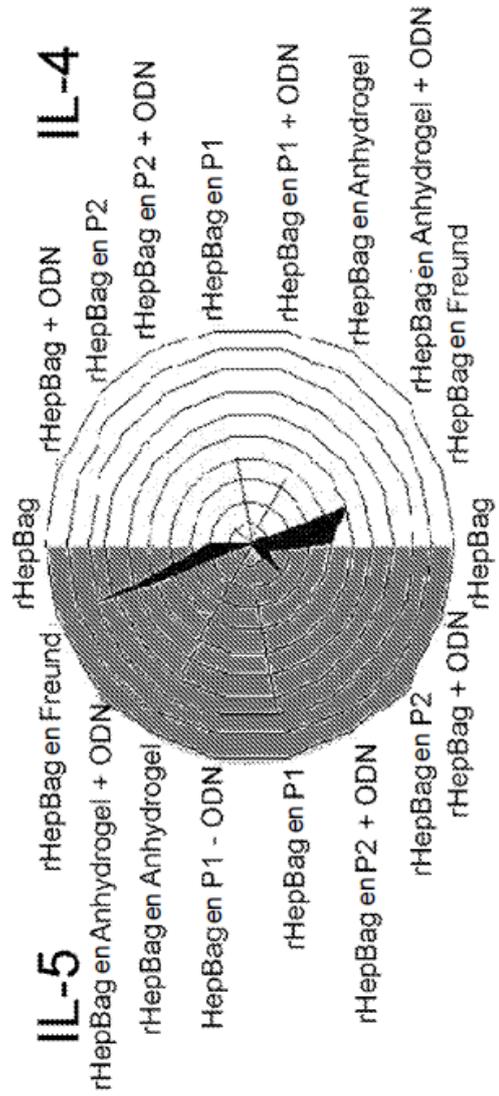


Figura 14B



*Figura 15*

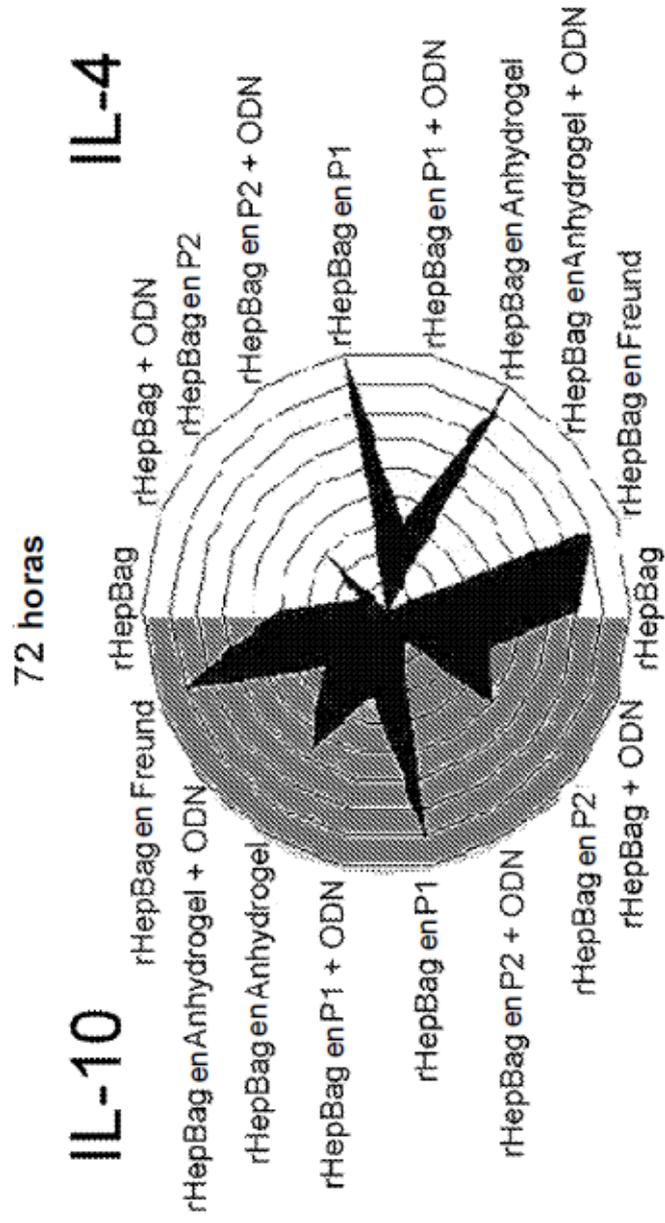


Figure 16A

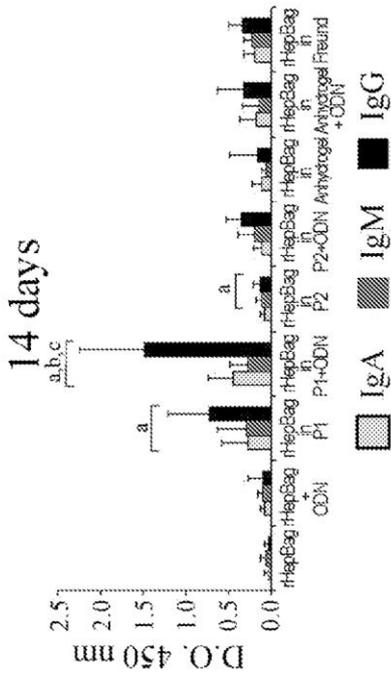


Figure 16B

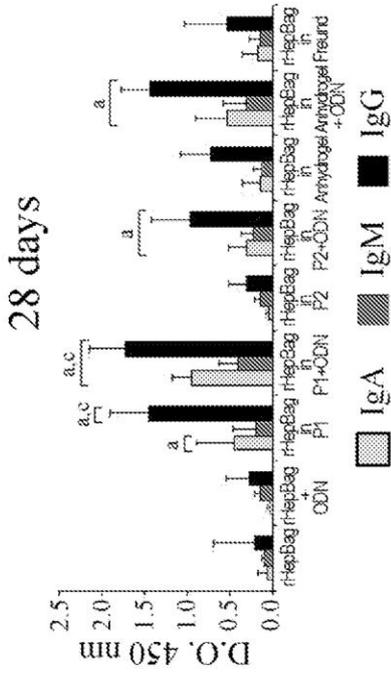


Figure 16C

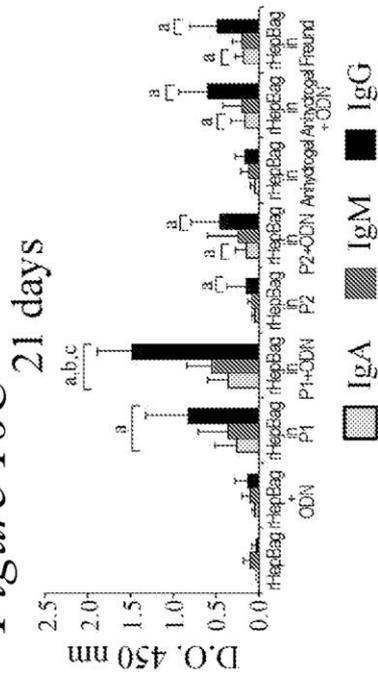


Figure 16D

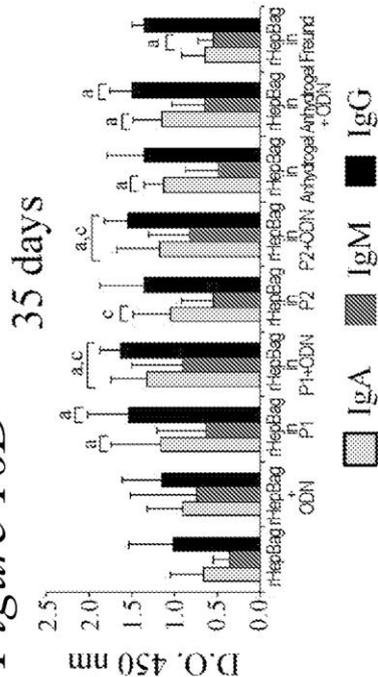


Figura 17B

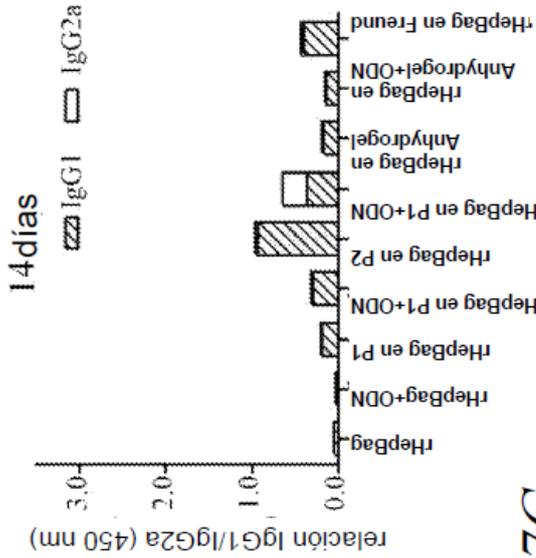
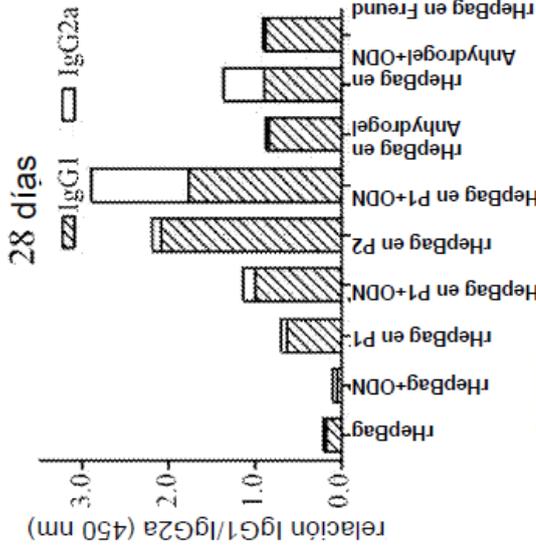


Figura 17A

Figura 17D

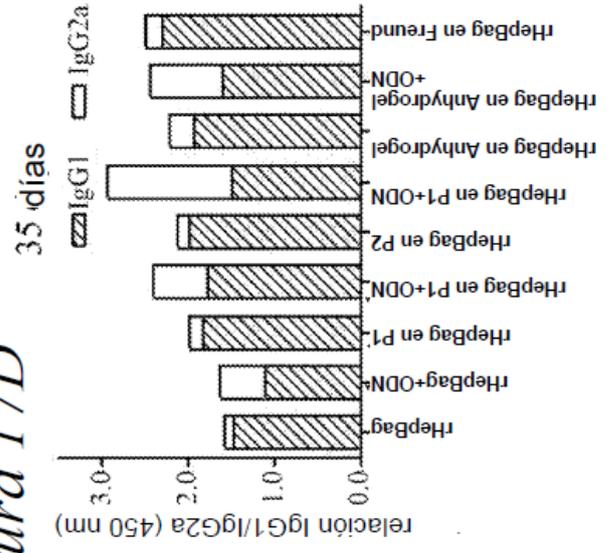


Figura 17C

Figura 18A

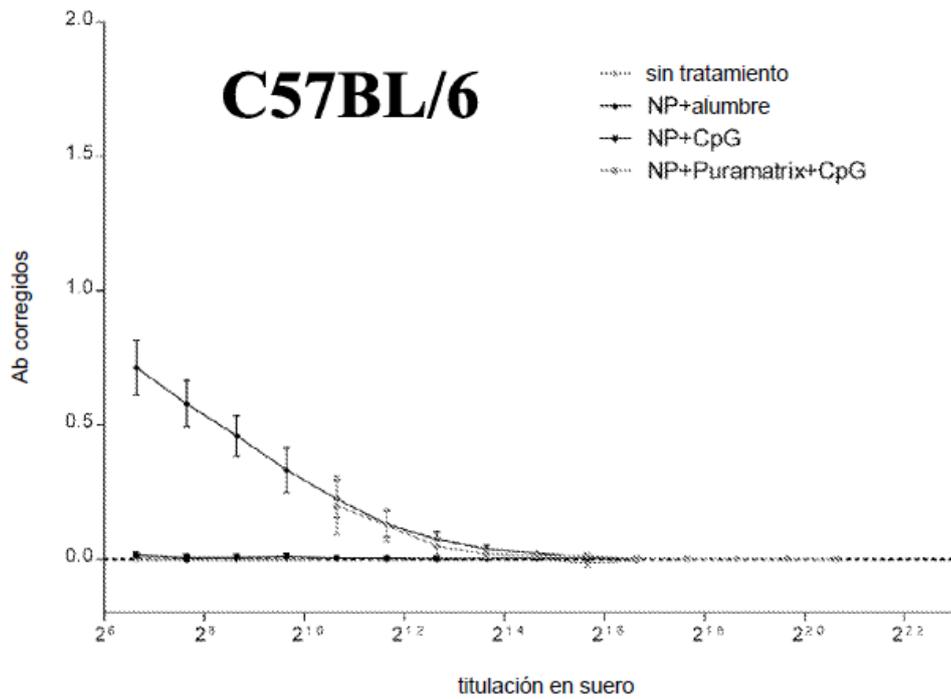
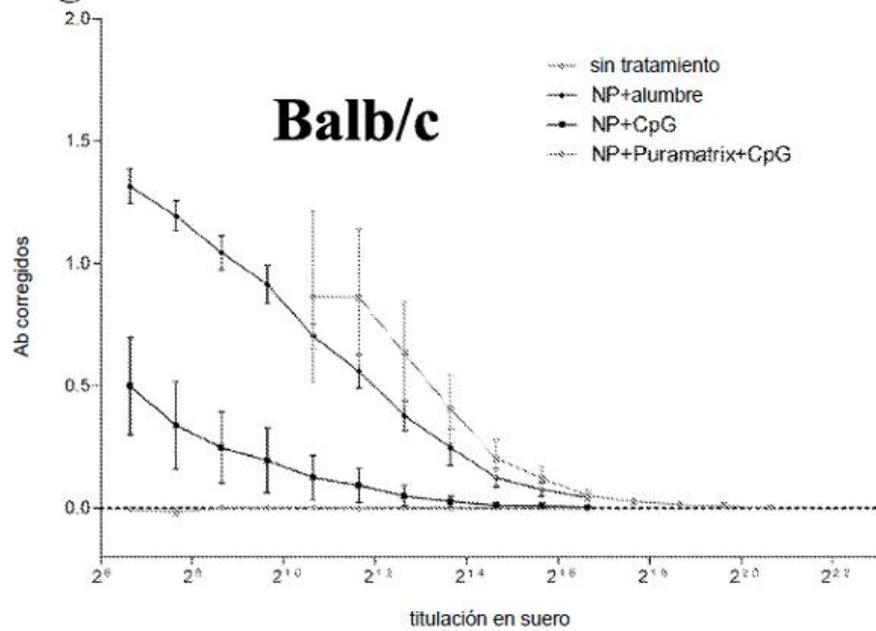
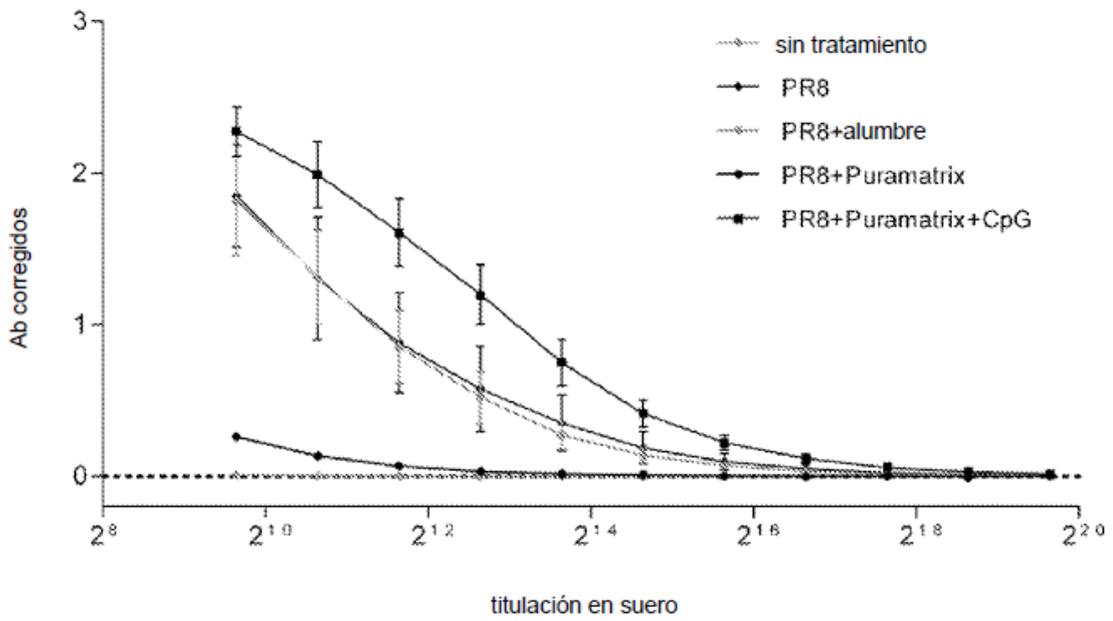


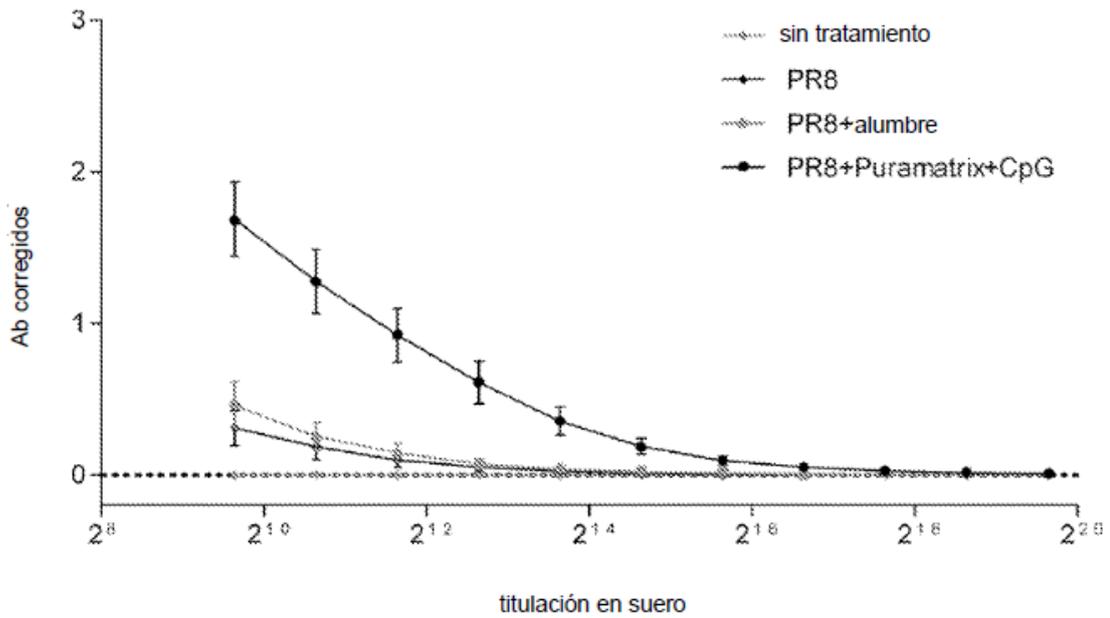
Figura 18B



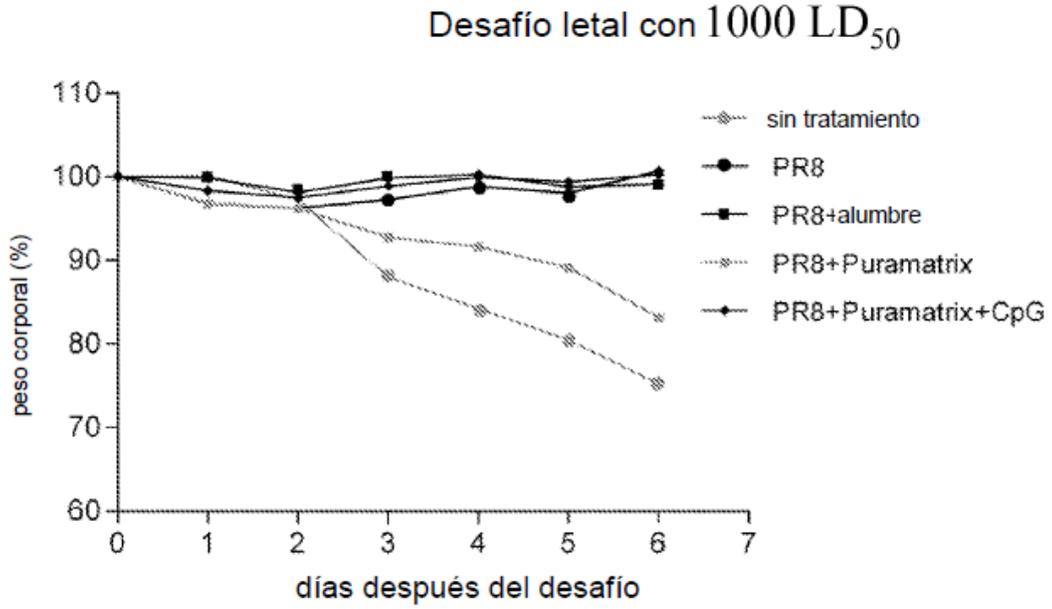
*Figura 19A*



*Figura 19B*



*Figura 20A*



*Figura 20B*

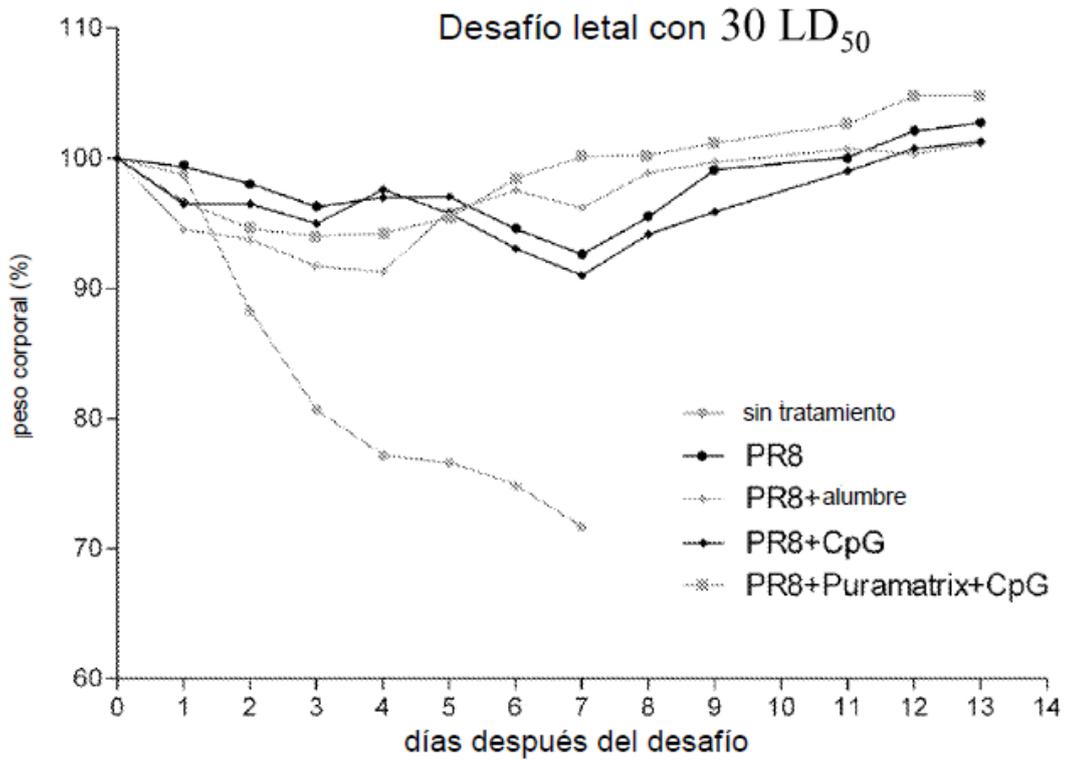


Figura 21A

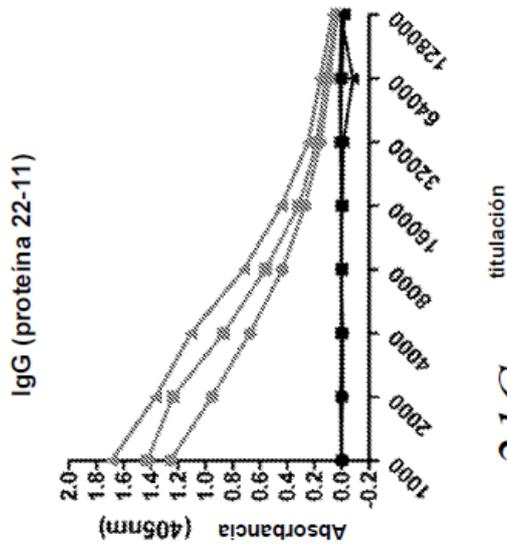


Figura 21B

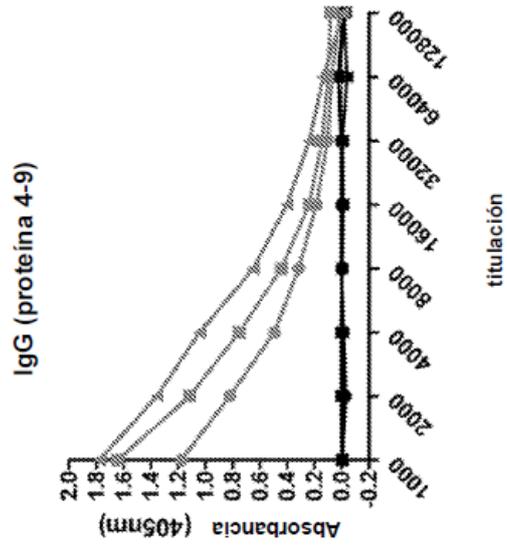
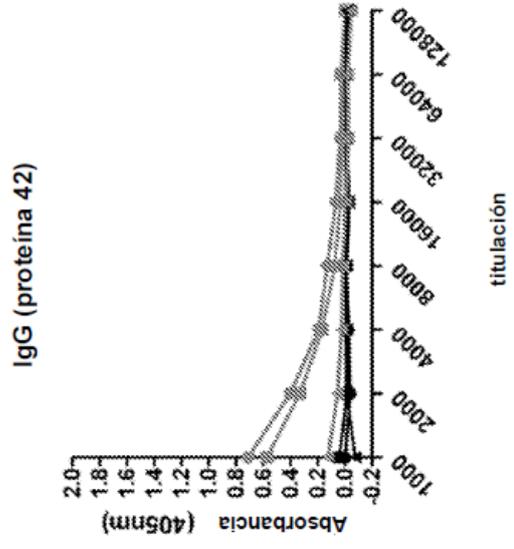
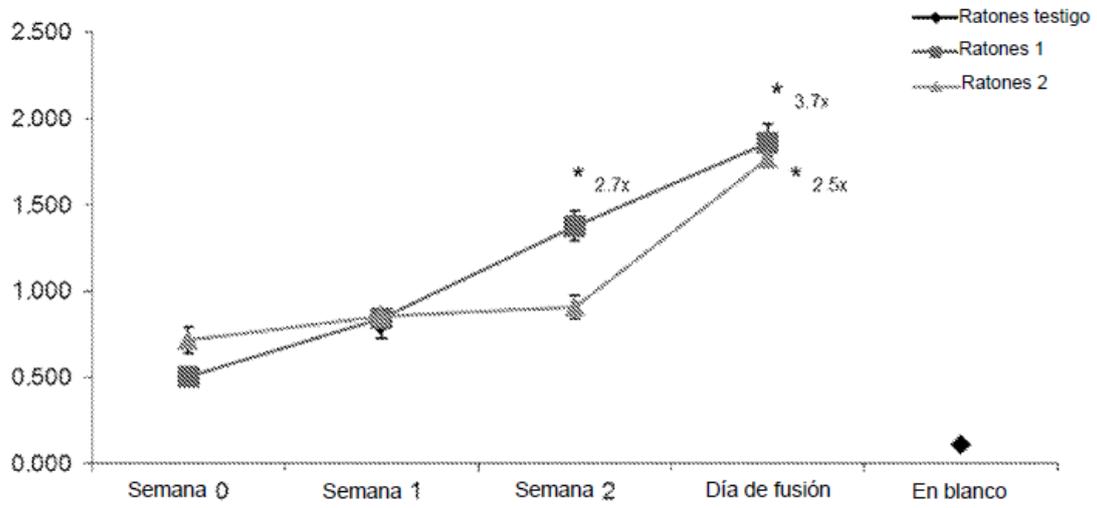


Figura 21C



- sólo alumbre
- ◆ alumbre+proteína
- sólo CFA
- ▨ CFA+proteína
- ▲ sólo Puramatrix+CpG
- ▧ Puramatrix+CpG+proteína

*Figura 22A*



*Figura 22B*

