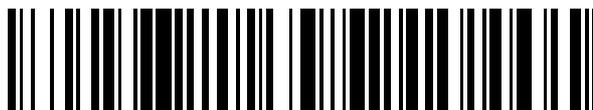


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 863**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2014 PCT/EP2014/051860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14118305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2014 E 14704537 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2950819**

54 Título: **Administración intradérmica de composiciones inmunológicas que comprenden agonistas del receptor de tipo Toll**

30 Prioridad:

01.02.2013 US 201361759751 P
28.05.2013 EP 13169596

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GALLORINI, SIMONA;
BAUDNER, BARBARA y
O'HAGAN, DEREK

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 670 863 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

Administración intradérmica de composiciones inmunológicas que comprenden agonistas del receptor de tipo Toll

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de la administración de vacunas.

5 **Técnica antecedente**

Las composiciones de vacuna que comprenden agonistas de receptor de tipo Toll (TLR) están disponibles en la actualidad y estas vacunas se administran mediante inyección intramuscular. Aunque efectiva, la administración intramuscular puede causar dolor y daño tisular local, y el miedo a una inyección intramuscular es común. Las inyecciones intramusculares deben ser administradas por personal médicamente capacitado, lo que impide la administración rápida y la venta sin receta médica. La administración intramuscular requiere el uso de formulaciones líquidas que pueden carecer de estabilidad durante largos períodos de tiempo.

Weldon et al., 2012 (Effect of adjuvants on responses to skin immunization by microneedles coated with influenza subunit vaccine. PloS one, 7(7), e41501) encontraron que la administración con micro-agujas de imiquimod, un ligando de TLR7, con la vacuna de la subunidad de gripe induce respuestas inmunitarias mejoradas en comparación con la vacuna sola.

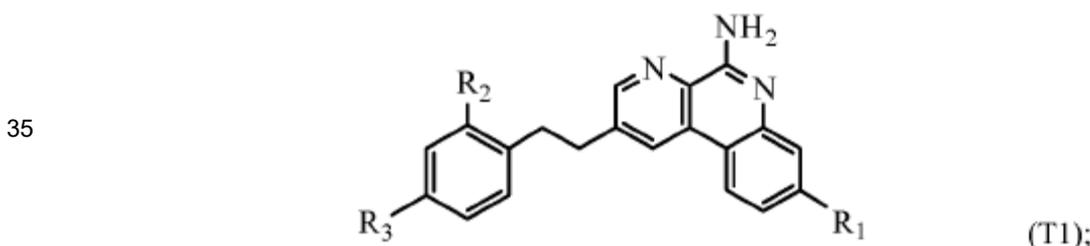
Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento diferente de administración de vacunas que comprenden agonistas de TLR y, en particular, una manera más conveniente que no adolezca de los inconvenientes indicados anteriormente.

Divulgación de la invención

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las composiciones inmunogénicas que comprenden un agonista de receptor de tipo Toll (TLR) pueden proporcionar una mejor respuesta inmunológica si se administran por vía intradérmica en lugar de por vía intramuscular. Puede encontrarse un mayor número de células que expresan TLR en la dermis y la epidermis en comparación con los músculos, lo que puede explicar la respuesta mejorada proporcionada. Además, la administración intradérmica puede causar considerablemente menos dolor que la administración intramuscular y puede permitir más fácilmente la auto-administración de la composición, particularmente cuando la administración intradérmica se consigue mediante el uso de múltiples micro-agujas en forma de un dispositivo de micro-agujas, como un parche para la piel.

La invención proporciona un sistema de administración intradérmica que comprende una micro-aguja biodegradable sólida, en la que la micro-aguja comprende un agonista de TLR7 de benzonaftridina y un inmunógeno, en el que el inmunógeno es un antígeno bacteriano, por ejemplo, un antígeno de *Neisseria meningitidis*.

En una realización, el agonista de TLR7 tiene la fórmula T1:



La invención proporciona también un procedimiento de preparación de un sistema de administración intradérmica de la invención que comprende una micro-aguja biodegradable sólida, en el que la micro-aguja comprende un agonista de TLR7 de benzonaftridina y un inmunógeno bacteriano, en el que el procedimiento comprende las etapas de a) mezclar el inmunógeno y el agonista de TLR7 de benzonaftridina para formar una composición inmunogénica en la que el inmunógeno tiene una concentración de 10 mg/ml-50 mg/ml y el agonista de TLR7 benzonaftridina tiene una concentración de 0,1 mg/ml-10 mg/ml y b) secar la composición inmunogénica para formar una micro-aguja biodegradable sólida.

La concentración del inmunógeno puede ser de 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml o 50 mg/ml y la concentración del agonista de TLR puede ser de 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml.

La relación de antígeno a agonista de TLR que se usa puede ser de aproximadamente 10:1.

Una manera preferente de conseguir la administración intradérmica es mediante un parche cutáneo (por ejemplo, mediante una micro-aguja biodegradable o una micro-aguja revestida) y, de esta manera, la invención se refiere también a un parche cutáneo para la administración intradérmica de un inmunógeno que tiene una pluralidad de micro-agujas biodegradables, en el que las micro-agujas comprenden un agonista de TLR7 de benzonafitridina y el inmunógeno bacteriano.

La composición inmunogénica que se administra por vía intradérmica es preferentemente sólida, en contraste con las composiciones líquidas que se administran mediante agujas intradérmicas huecas convencionales. Las composiciones inmunogénicas sólidas pueden estar en forma de una micro-aguja sólida que puede penetrar en la piel y administrar composiciones inmunogénicas por vía intradérmica. La propia micro-aguja puede formarse a partir de la composición inmunogénica sólida (véase las micro-agujas biodegradables sólidas más adelante).

Administración intradérmica

La administración intradérmica de una composición puede conseguirse usando cualquier modo de administración en el que la composición es suministrada a la dermis, pero no pasa a través de la dermis al músculo, incluidos aquellos en los que la composición es administrada directamente a la dermis (por ejemplo, mediante una aguja que pasa completamente a través de la epidermis a la dermis) y aquellos en los que la composición es liberada primero a la epidermis por penetración de la epidermis (por ejemplo, mediante una aguja, donde la composición se mueve a continuación a través de la epidermis a la dermis). La administración intradérmica contrasta con la administración intramuscular de la técnica anterior que requiere que el sistema de administración penetre tanto en la epidermis (típicamente aproximadamente 100 µm de espesor en seres humanos) como en la dermis (típicamente aproximadamente 0,6-3 mm de espesor en seres humanos) y la composición se administra a continuación al músculo.

Los sistemas de administración intradérmica adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos basados en micro-agujas. Las micro-agujas son sólidas, a diferencia de las huecas, que retienen su integridad estructural durante el almacenamiento y la inserción, y están conformadas de manera que puedan penetrar en la piel de un sujeto cuando se aplican a la misma. Las características mecánicas que se requieren para la penetración en la piel dependen del organismo objetivo, pero preferentemente tienen suficiente resistencia para penetrar en la piel humana mientras permanecen sustancialmente intactas. Los materiales para formar agujas adecuadas están fácilmente disponibles (véase más adelante) y estos pueden ensayarse para determinar las características apropiadas para cualquier necesidad particular. La administración de vacunas con micro-agujas se analizó en las referencias 1 y 2.

Las micro-agujas sólidas difieren de las agujas huecas estándar en que no comprenden una cavidad a través de la cual la composición inmunogénica pasa como un líquido, sino que la forma de la micro-aguja es tal que una composición inmunogénica sólida está presente en el exterior de la aguja, o ella misma forma la aguja.

Las micro-agujas pueden penetrar en la piel. Son lo suficientemente largas como para penetrar a través de la epidermis y administrar material a la dermis y conseguir de esta manera la administración intradérmica, pero idealmente no son tan largas como para que puedan penetrar en la hipodermis o más allá de la misma. La longitud de la aguja depende del organismo objetivo, y la longitud requerida para alcanzar la dermis del organismo objetivo particular. Por lo tanto, para su uso en humanos, serán típicamente de 100-2.500 µm de largo por ejemplo aproximadamente 500 µm, aproximadamente 1.000 µm o aproximadamente 1.500 µm. En el momento de la administración, la punta de una micro-aguja puede penetrar en la dermis, mientras su base permanece en la epidermis.

Las micro-agujas pueden tener diversas formas y geometrías, por ejemplo, véase la Figura 2 de la referencia 3. Típicamente, serán ahusadas con un punto orientado hacia la piel, por ejemplo, con forma de pirámides o conos. Una micro-aguja ahusada con un diámetro más amplio de <500 µm es típica. Se han estudiado en detalle los parámetros estructurales (incluyendo la forma, el radio de la punta, el radio de la base, el paso, la altura, la densidad y el volumen total de los poros) (por ejemplo, véanse las referencias 3-6) y pueden modificarse según las necesidades o deseos particulares en cualquier situación elegida.

Preferentemente, las micro-agujas no se usan individualmente, sino que por el contrario se aplican múltiples agujas simultáneamente usando un dispositivo de micro-agujas, por ejemplo, como un parche cutáneo que comprende una pluralidad de micro-agujas. Un único parche incluirá típicamente una pluralidad de micro-agujas, por ejemplo, ≥10, ≥20, ≥30, ≥40, ≥50, ≥60, ≥70, ≥80, ≥90, ≥100, ≥200, ≥300, ≥400, ≥500, ≥750, ≥1.000 o más por cada parche. Cuando un parche incluye una pluralidad de micro-agujas, puede comprender una capa de refuerzo a la que están unidas todas las micro-agujas. Una capa de refuerzo unitaria con ≥20 micro-agujas sobresalientes es

típica, por ejemplo, 50-600 micro-agujas por cada parche. Cuando un parche incluye una pluralidad de micro-agujas, éstas pueden disponerse en un patrón o conjunto repetitivo regular, o pueden disponerse irregularmente. La separación de las micro-agujas puede ser un parámetro importante para controlar la permeabilidad [3,4] y puede ajustarse según las situaciones particulares.

5 Un parche tendrá típicamente un área de 3 cm² o menos, por ejemplo <2 cm² o <1 cm². Un parche circular con un diámetro de entre 0,5 cm y 1,5 cm es útil.

La densidad de las micro-agujas en un parche puede variar, pero puede ser ≥10 cm⁻², ≥20 cm⁻², ≥30 cm⁻², ≥40 cm⁻², ≥50 cm⁻², ≥60 cm⁻², ≥70 cm⁻², ≥80 cm⁻² o más.

10 Un parche de la invención tiene una cara interior orientada hacia la piel y una cara exterior orientada hacia el entorno. La cara interior puede incluir un adhesivo para facilitar la adherencia a la piel de un sujeto. Cuando está presente, preferentemente no está presente en las propias micro-agujas, es decir, las micro-agujas no tienen adhesivo. De esta manera, la cara interior tendrá típicamente un margen o anillo exterior adhesivo para adherir el parche a la piel, por ejemplo, como se ve en yesos pegados o parches de nicotina. La región adhesiva y las micro-agujas se pueden proporcionar como una unidad integral, o la región adhesiva se puede preparar añadiendo un refuerzo que se extiende hacia afuera más allá de las micro-agujas para proporcionar el margen adhesivo externo o el anillo para adherir el parche a la piel por ejemplo como se ve en las tiritas o en los parches de nicotina.

15 Los parches pueden empaquetarse en bolsas individuales, por ejemplo, selladas bajo nitrógeno, a continuación, selladas térmicamente. Deberían almacenarse cuidadosamente para evitar daños a las micro-agujas. Los parches de la invención pueden comprender adhesivos que comprenden agentes de pegajosidad. Los agentes de pegajosidad son sustancias que aumentan la adhesividad del parche, evitando por lo tanto que el parche se desprenda de la piel del sujeto. Si la composición inmunogénica sobre la cara interior del parche se cristaliza, el parche puede desprenderse de la piel del sujeto. Por lo tanto, pueden añadirse inhibidores de cristalización a la composición inmunogénica para evitar que la composición se cristalice.

20 Las micro-agujas pueden ser huecas, de manera que una composición inmunogénica pueda pasar a través de las mismas y llegar de esta manera a la dermis. Sin embargo, una opción preferente usa micro-agujas sólidas no huecas. Las agujas sólidas útiles incluyen agujas biodegradables y no biodegradables. Las agujas biodegradables pueden (si así se desea) dejarse en la piel después de ser aplicadas, y el inmunógeno puede incorporarse a las propias agujas durante la fabricación, de manera que el inmunógeno sea liberado a medida que las agujas se degradan o se disuelven en el sitio. Las agujas sólidas no biodegradables deben retirarse cierto tiempo después de ser aplicadas y el inmunógeno está presente típicamente como un revestimiento seco sobre la cara exterior de las agujas sólidas.

Micro-agujas biodegradables sólidas

35 Un formato de micro-aguja sólida útil para su uso en la invención es una micro-aguja biodegradable sólida. El inmunógeno se incorpora en el interior de la micro-aguja, de manera que la aguja está compuesta estructuralmente tanto por el inmunógeno como por excipientes sólidos adecuados. Los excipientes sólidos proporcionan resistencia mecánica para permitir que las micro-agujas sean insertadas en la piel de un sujeto, donde el inmunógeno puede ser liberado.

40 Las micro-agujas son biosolubles y biodegradables. De esta manera, la aguja puede disolverse en la piel después de la aplicación de la micro-aguja, en contraste con las micro-agujas revestidas usadas en las referencias 7 y 8 (véase más adelante). Una vez disuelto, el material de la aguja se metabolizará a continuación para dar productos finales inofensivos. La escala de tiempo para la disolución después de la aplicación del parche puede variar, pero la disolución comenzará generalmente inmediatamente después de la aplicación del parche (por ejemplo, dentro de 10 segundos) y puede continuar, por ejemplo, hasta 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 5 horas, 10 horas o 24 horas, hasta que la micro-aguja se haya disuelto completamente (aunque las agujas podrían retirarse antes de que se complete la disolución). Los materiales con cinéticas de disolución *in vivo* adecuadas están fácilmente disponibles (tal como se describe más adelante) y estos pueden variarse y ensayarse para determinar las concentraciones apropiadas, etc., para cualquier perfil de disolución deseado.

50 Los materiales adecuados para formar las micro-agujas serán típicamente polímeros biosolubles y biodegradables, y estos pueden comprender uno o más carbohidratos. Pueden usarse también carbohidratos de cadena corta. Por ejemplo, el material puede comprender una celulosa, una dextrina, un dextrano, un disacárido, un quitosano, una quitina, etc., o mezclas de los mismos. Pueden usarse también hialuronatos [9], así como ácidos polilácticos [10]. Como una alternativa a los materiales de carbohidratos, pueden usarse polímeros como polivinilpirrolidona (PVP) o copolímeros de metilviniléter y ácido maleico o anhídrido maleico (PMVE/MA), como Gantrez™ AN-139 [6,11]. Pueden usarse también otros materiales de GRAS.

Las celulosas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, celulosa, carboximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosas, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Las dextrinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, maltodextrina, ciclodextrina, amilodextrina, icodextrina, dextrina amarilla y dextrinas blancas. Los disacáridos adecuados incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, turanosa y celobiosa. Un material adecuado para formar micro-agujas biosolubles y biodegradables es una mezcla de dextrina/trehalosa. Otros carbohidratos adecuados son las amilopectinas [12]. Pueden añadirse fácilmente excipientes de formulación a las composiciones inmunogénicas de las micro-agujas biodegradables sólidas para mejorar la estabilidad de la composición y proporcionar un procedimiento de fabricación que sea tanto robusto como escalable. Los polímeros de micro-agujas biodegradables sólidas pueden proporcionar la ventaja de estabilizar los antígenos. Dicha ventaja puede ser proporcionada por los polímeros de las micro-agujas o copolímeros que tienen grupos carbohidrato que tienen un efecto estabilizador sobre los antígenos. Por lo tanto, puede extenderse la vida útil del sistema de administración intradérmica.

La capacidad antigénica de las micro-agujas biodegradables sólidas puede ser más alta que otras micro-agujas, lo que proporciona la ventaja de permitir la usabilidad en combinación con antígenos que requieren altos niveles de inmunógeno en cada aguja, como la gripe o gripe tetravalente,

Estas agujas pueden fabricarse de diversas maneras, por ejemplo, siguiendo las técnicas y la guía en las referencias 12 a 19. Por ejemplo, puede prepararse un molde con cavidades de micro-aguja. Un material de matriz (por ejemplo, una mezcla de dextrina y trehalosa) puede combinarse con un inmunógeno y a continuación este material acuoso se moldea por centrifugación en el molde para formar una matriz de micro-agujas sólidas. A continuación, puede aplicarse un gel de celulosa sobre la mezcla matriz/inmunógeno (por ejemplo, cuya mezcla ha formado una película) para formar una capa de refuerzo en el parche. Cuando esta capa de refuerzo se ha secado, puede ser retirada para proporcionar un parche desde el cual se proyectan las micro-agujas sólidas. Un procedimiento alternativo implica la polimerización *in situ* en un molde adecuado, por ejemplo, un inmunógeno puede mezclarse con un monómero líquido (como vinilpirrolidona) dentro de un molde de parche y esta mezcla puede fotopolimerizarse. En dicho procedimiento, el inmunógeno está presente idealmente en forma seca (por ejemplo, liofilizada) que quede encapsulado durante la polimerización. Puede usarse también moldeo de hidrogeles [12] o partículas [20]. Los moldes para estos procedimientos pueden fabricarse de diversas maneras, por ejemplo, mediante micromoldeo basado en láser [6], mediante grabado, etc.

De esta manera, un procedimiento de fabricación puede comprender: (a) mezclar un material de matriz biosoluble y biodegradable con un inmunógeno, normalmente reconstituyendo un inmunógeno liofilizado; (b) añadir la mezcla de la etapa (a) a un molde que contiene cavidades para formar micro-agujas; (c) dejar que la mezcla se endurezca en el molde, para formar micro-agujas sólidas; (d) opcionalmente, aplicar material a las micro-agujas endurecidas para proporcionar una capa de refuerzo; y (e) retirar las micro-agujas (y la capa de refuerzo opcional) desde el molde. Un procedimiento de fabricación alternativo puede comprender: (a) mezclar un monómero polimerizable con un inmunógeno, normalmente un inmunógeno liofilizado; (b) añadir la mezcla de la etapa (a) a un molde que contiene cavidades para formar micro-agujas; (c) polimerizar el monómero dentro de la mezcla en el molde, para formar micro-agujas sólidas; (d) opcionalmente, aplicar material a las micro-agujas sólidas para proporcionar una capa de refuerzo; y (e) retirar las micro-agujas (y la capa de refuerzo opcional) desde el molde.

Las micro-agujas biodegradables sólidas se proporcionan idealmente como una matriz en un parche. Como se ha indicado anteriormente, el parche puede tener dos partes, que pueden adoptar adecuadamente la forma de un disco interno y un anillo externo. Las micro-agujas pueden proporcionarse en una primera parte interior del parche, y una segunda parte exterior puede incluir un adhesivo. Este parche puede colocarse sobre la piel y puede presionarse hacia abajo para que la parte exterior se adhiera a la piel, mientras que las micro-agujas de la parte interior penetran en la epidermis. Dichas matrices pueden producirse mediante litografía suave o fotolitografía.

En la referencia 21, la disolución de las matrices de micro-agujas se mostró adecuada para obtener protección contra tétanos, difteria, malaria y gripe (véase también la referencia 16). Las micro-agujas biodegradables sólidas son ventajosas con respecto a otras formas de agujas debido a la ausencia de superficies afiladas en la aguja. Por lo tanto, las agujas biodegradables sólidas proporcionan mayores niveles de seguridad y pueden permitir la venta sin receta y la auto-administración.

Además, la formulación de composiciones inmunogénicas como micro-agujas biodegradables sólidas puede conseguirse más fácilmente que las composiciones inmunogénicas usadas con las micro-agujas revestidas sólidas analizadas a continuación. Muchas composiciones inmunogénicas comprenden detergentes, particularmente aquellas basadas en antígenos de superficie de virus. Estos detergentes pueden causar dificultades cuando se preparan micro-agujas revestidas, de manera que las micro-agujas biodegradables proporcionan una ventaja para dichas composiciones.

Micro-agujas revestidas sólidas

Otro formato de micro-aguja sólida útil es una micro-aguja sólida, no hueca, no biodegradable. La micro-aguja está realizada en un material que tiene resistencia mecánica para permitir la inserción en la piel de un sujeto. El inmunógeno se reviste sobre las agujas y, después de que se han inyectado, el inmunógeno se libera desde el revestimiento. Las tecnologías MACROFLUX™ (Zosano), MTS™ (3M) e IMMUNPATCH™ son ejemplos de dichos sistemas de administración.

Las micro-agujas son sólidas y permanecen intactas después de la inserción en la piel de un paciente (en contraste con las micro-agujas biodegradables discutidas anteriormente). Los materiales para formar agujas sólidas adecuadas están fácilmente disponibles y estos pueden ser ensayados y seleccionados para cualquier necesidad particular, por ejemplo, metales (como acero inoxidable), polímeros (como policarbonato, idealmente de grado médico) o silicio. Las agujas de metal pueden fabricarse usando corte por láser y electro pulido [24] o grabado [22]. Las agujas de polímero pueden fabricarse mediante microreplicación y/o micromoldeo (incluido moldeo por inyección). Las agujas de silicio pueden fabricarse mediante grabado [4,23]. Las micro-agujas adecuadas se divulgan en las referencias 7, 8 y 24-28.

El inmunógeno se reviste sobre las micro-agujas. El revestimiento puede conseguirse bien aplicando un revestimiento líquido que a continuación forma un revestimiento sólido (por ejemplo, mediante secado), o bien aplicando un revestimiento sólido directamente. El revestimiento puede conseguirse mediante un procedimiento simple, como el revestimiento por inmersión, por ejemplo, que implica una etapa de inmersión y a continuación una etapa de secado (por ejemplo, mediante evaporación), con repetición según sea necesario. Otras técnicas de revestimiento útiles se divulgan en la referencia 26. Puede usarse también revestimiento por pulverización, con formulaciones basadas en azúcar para proporcionar un revestimiento seco [29]. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender: aplicar un inmunógeno a la superficie de una o más micro-agujas sólidas para proporcionar un dispositivo de micro-aguja revestido para la inyección de la vacuna.

Una solución de revestimiento para su aplicación a las agujas puede incluir uno o más materiales de matriz biosolubles y biodegradables, tales como los analizados anteriormente para la formación de agujas biodegradables, y en particular incorporando hidratos de carbono. De esta manera, un procedimiento de la invención puede comprender: (a) mezclar un material de matriz biosoluble y biodegradable con un inmunógeno; y (b) aplicar la mezcla de la etapa (a) a la superficie de una o más micro-agujas sólidas para proporcionar un dispositivo de micro-aguja revestida para la inyección del inmunógeno. El revestimiento puede mejorarse usando uno o más "componentes potenciadores de deposición", como se describe en la referencia 26.

Las etapas de aplicación descritas anteriormente pueden comprender una sub-etapa de aplicación seguida de un sub-etapa de secado, y este par de sub-etapas pueden realizarse una vez o más de una vez, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces

En la referencia 22 se usaron matrices de micro-agujas sólidas revestidas con inmunógenos del virus de gripe y se demostró que activaban los brazos humorales y celulares de la respuesta inmunológica y conferían una protección a largo plazo mejorada.

Agonistas de receptor de tipo Toll

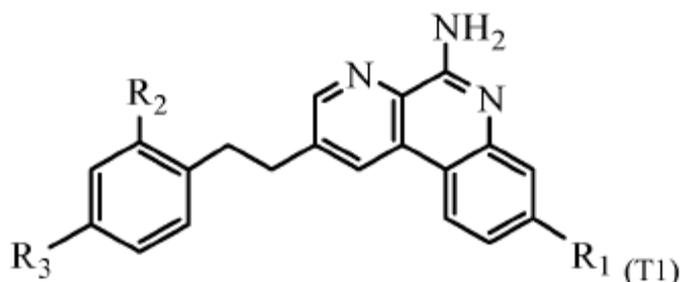
Las composiciones de la invención incluyen un agonista de TLR7 de benzonaftiridina, es decir, un compuesto que puede mostrar actividad agonista con un receptor 7 de tipo Toll. Más preferentemente, un agonista de TLR7 de benzonaftiridina es un agonista de un TLR7 humano.

Una composición de la invención puede incluir más de un agonista de TLR. Estos dos agonistas son diferentes entre sí y pueden tener como objetivo el mismo TLR o TLR diferentes.

La actividad agonista de un compuesto contra cualquier receptor de tipo Toll particular puede determinarse mediante ensayos estándar. Empresas como Imgenex e Invivogen suministran líneas celulares que se co-transfectan de manera estable con genes TLR humanos y NFκB, más genes informadores adecuados, para medir las vías de activación de TLR. Están diseñados para obtener sensibilidad, amplia dinámica de rango de trabajo y pueden usarse para la detección de alto rendimiento. La expresión constitutiva de uno o dos TLRs específicos es típica en dichas líneas celulares. Véase también la referencia 30. Muchos agonistas de TLR son conocidos en la técnica, por ejemplo, la referencia 31 describe ciertas moléculas de lipopéptido que son agonistas de TLR2, cada una de las referencias 32 a 35 describe clases de agonistas de molécula pequeña de TLR7, y las referencias 36 y 37 describen agonistas de TLR7 y TLR8 para el tratamiento de enfermedades.

Los agonistas de TLR7 que pueden usarse con la invención son benzonaftiridinas, tales como las que tienen la fórmula T1:

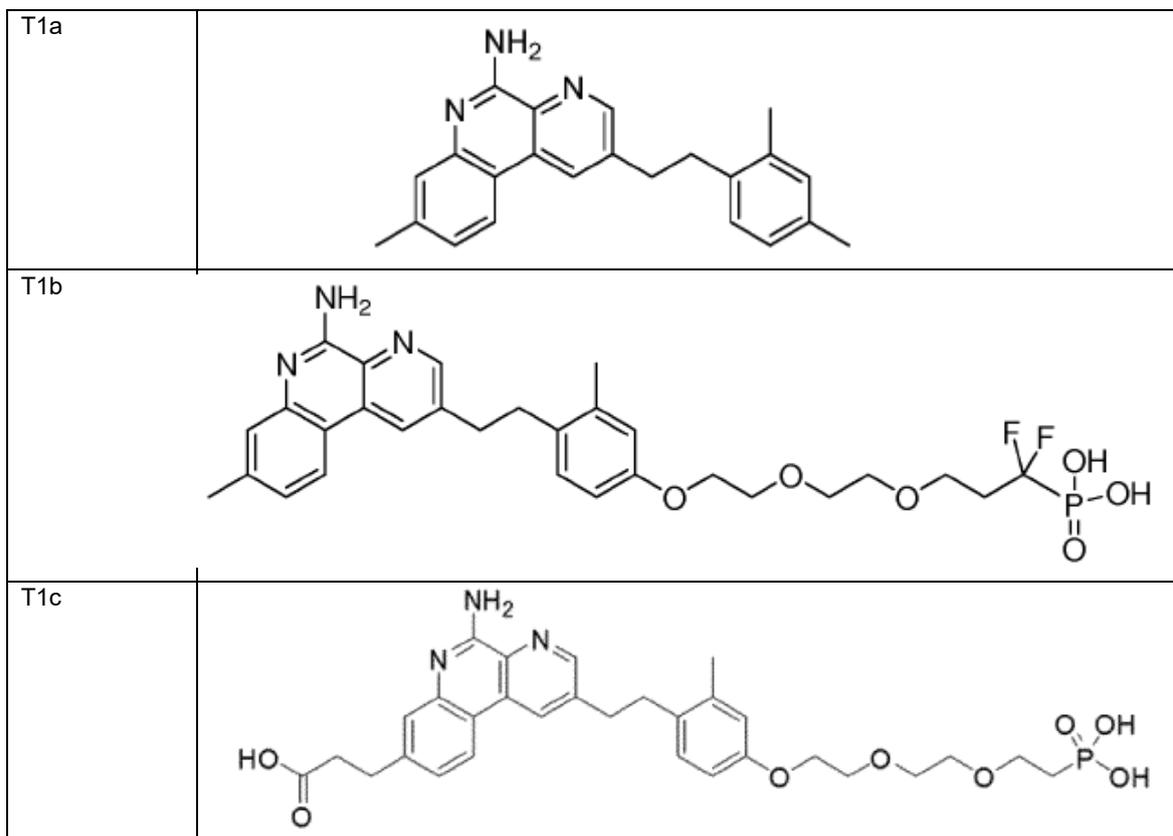
5



en la que

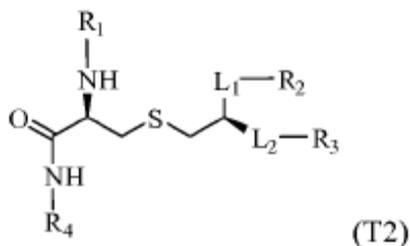
- 10 R^1 es H, alquilo C₁-C₆, -C(R⁵)₂OH, -L¹R⁵, -L¹R⁶, -L²R⁵, -L²R⁶, -OL²R⁵ o -OL²R⁶;
 L^1 es -C(O)- u -O-;
- L^2 es alquileno C₁-C₆, alquenileno C₂-C₆, arileno, heteroarileno o -((CR⁴R⁴)_pO)_q(CH₂)_p-, en el que el alquileno C₁-C₆ y el alquenileno C₂-C₆ de L^2 están opcionalmente sustituidos con 1 a 4 grupos fluoro;
- 15 cada L^3 se selecciona independientemente de entre alquileno C₁-C₆ y -((CR⁴R⁴)_pO)_q(CH₂)_p-, en el que el alquileno C₁-C₆ de L^3 está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos fluoro;
- L^4 es arileno o heteroarileno;
- R^2 es H o alquilo C₁-C₆;
- R^3 se selecciona de entre alquilo C₁-C₄, -L³R⁵, -L¹R⁵, -L³R⁷, -L³L⁴L³R⁷, -L³L⁴R⁵, -L³L⁴L³R⁵, -OL³R⁵, -OL³R⁷, -OL³L⁴R⁷, -OL³L⁴L³R⁷, -OR⁸, -OL³L⁴R⁵, -OL³L⁴L³R⁵ y -C(R⁵)₂OH;
- 20 cada R^4 se selecciona independientemente de entre H y fluoro;
- R^5 es -P(O)(OR⁹)₂;
- R^6 es -CF₂P(O)(OR⁹)₂ o -C(O)OR¹⁰;
- R^7 es -CF₂P(O)(OR⁹)₂ o -C(O)OR¹⁰;
- R^8 es H o alquilo C₁-C₄;
- 25 cada R^9 se selecciona independientemente de entre H y alquilo C₁-C₆;
- R^{10} es H o alquilo C₁-C₄;
- cada p se selecciona independientemente de entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y
- q es 1, 2, 3 o 4.

30 Detalles adicionales de estos compuestos se divulgan en la referencia 38, y la invención puede usar cualquiera de los compuestos 1 a 28 de la referencia 38. Los ejemplos preferentes de compuestos de fórmula T1 incluyen:



Otros agonistas de TLR7 útiles incluyen, pero no se limitan a, o cualquiera de los compuestos 1 a 247 divulgados en la referencia 34, o cualquiera de los compuestos 1 a 102 de la referencia 39.

5 Los agonistas de TLR2 incluyen lipopéptidos que tienen la fórmula T2:



10

en la que:

R¹ es H, -C(O)-alquilo C₇-C₁₈ o -C(O)-alquilo C₁-C₆;

R² es alquilo C₇-C₁₈;

15 R³ es alquilo C₇-C₁₈;

L₁ es -CH₂OC(O)-, -CH₂O-, -CH₂NR⁷C(O)- o -CH₂OC(O)NR⁷-;

L₂ es -OC(O)-, -O-, -NR⁷C(O)- o -OC(O)NR⁷-;

R⁴ es -L₃R⁵ o -L₄R⁵;

20 R⁵ es -N(R⁷)₂, -OR⁷, -P(O)(OR⁷)₂, -C(O)OR⁷, -NR⁷C(O)L₃R⁸, -NR⁷C(O)L₄R⁸, -OL₃R⁶, -C(O)NR⁷L₃R⁸, -C(O)NR⁷L₄R⁸, -S(O)₂OR⁷, -OS(O)₂OR⁷, alquilo C₁-C₆, un arilo C₆, un arilo C₁₀, un arilo C₁₄, heteroarilo de 5 a

14 anillos miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, cicloalquilo C₃-C₈ o un heterocicloalquilo de 5 a 6 anillos miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, S y N, en el que el arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo de R⁵ están cada uno sin sustituir o el arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo de R⁵ está cada uno sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de entre -OR⁹, -OL₃R⁶, -OL₄R⁶, -OR⁷ y -C(O)O⁷;

L₃ es un alquileo C₁-C₁₀, en el que el alquileo C₁-C₁₀ de L₃ no está sustituido, o el alquileo C₁-C₁₀ de L₃ es sustituido con 1 a 4 grupos R⁶, o el alquileo C₁-C₁₀ de L₃ está sustituido con 2 grupos alquilo C₁-C₆ en el mismo átomo de carbono que, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un cicloalquilo C₃-C₈;

L₄ es -((CR⁷R⁷)_pO)_q(CR¹⁰R¹⁰)_p- o -(CR¹¹R¹¹)((CR⁷R⁷)_pO)_q(CR¹⁰R¹⁰)_p-, en el que cada R¹¹ es un grupo alquilo C₁-C₆ que conjuntamente, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un cicloalquilo C₃-C₈;

cada R⁶ se selecciona independientemente de entre halo, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido con 1-2 grupos hidroxilo, -OR⁷, -N(R⁷)₂, -C(O)OH, -C(O)N(R⁷)₂, -P(O)(OR⁷)₂, un arilo C₆, un arilo C₁₀ y un arilo C₁₄;

cada R⁷ se selecciona independientemente de entre H y alquilo C₁-C₆;

R⁸ se selecciona de entre -SR⁷, -C(O)OH, -P(O)(OR⁷)₂, y un heterocicloalquilo de 5 a 6 anillos miembros que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O y N;

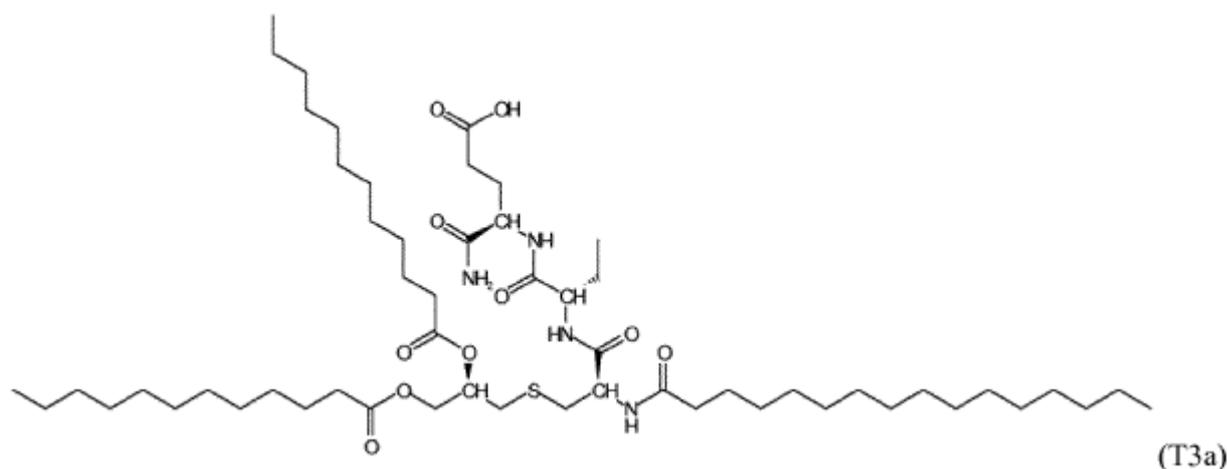
R⁹ es fenilo;

cada R¹⁰ se selecciona independientemente de entre H y halo;

cada p se selecciona independientemente de entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y

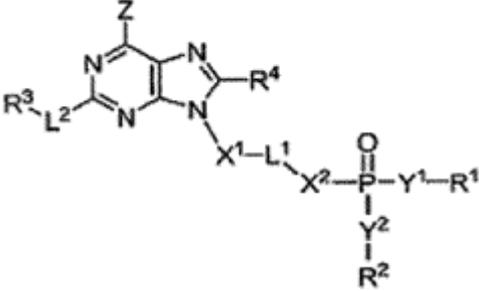
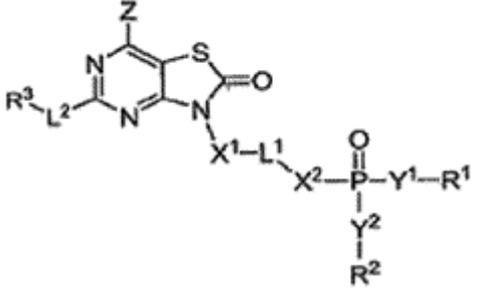
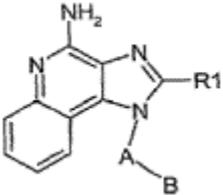
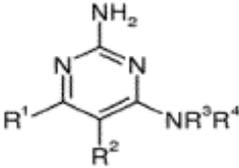
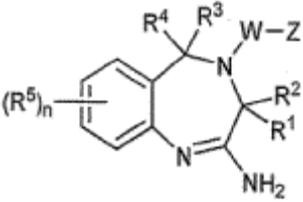
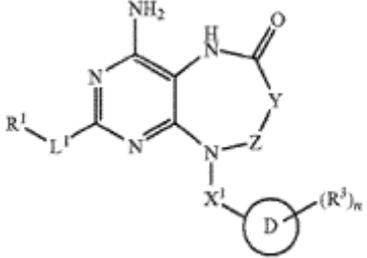
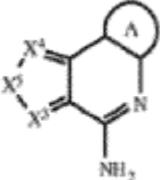
q es 1, 2, 3 o 4.

Detalles adicionales de estos compuestos se divulgan en la referencia 40, y la invención puede usar cualquiera de los compuestos descritos en la misma, por ejemplo, los ejemplos 1-92 de la misma, y los compuestos enumerados en la reivindicación 17 de la misma. Otro agonista de TLR2 útil es palmitoil-Cys (2[R],3-dilauroiloxi-propil)-Abu-D-Glu-NH₂, donde: Cys es un residuo de cisteína, Abu es un residuo de ácido aminobutírico y Glu es un residuo de ácido glutámico. Este compuesto se divulga en el ejemplo 16 de la referencia 31, y tiene la fórmula T3a:



El agonista de fórmula T1 o T2 o T3a puede estar presente como una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, hidrato), como un derivado de N-óxido, como un isómero (incluyendo un tautómero o un enantiómero) o una mezcla de isómeros, etc. Una sal particularmente útil es la sal de arginina del compuesto T1c, que puede usarse como monohidrato de sal de arginina.

Otros agonistas de TLR útiles son los compuestos siguientes:

 <p>como se define en las páginas 2-7 de la referencia 33;</p>	 <p>como se define en las páginas 2-5 y 7-8 de la ref. 33;</p>
 <p>como se define en las páginas 6 y 7 de la referencia 32;</p>	 <p>como se define en las páginas 2 a 5 de la referencia 35;</p>
 <p>como se define en las páginas 5 a 6 de la referencia 36;</p>	 <p>como se define en las páginas 2 a 3 de la referencia 41;</p>
 <p>como se define en las páginas 2-4 de la referencia 34</p>	

En la técnica se conocen diversos agonistas de TLR4 útiles, muchos de los cuales son análogos de endotoxina o lipopolisacárido (LPS), o de monofosforil lípido A ('MPLA'). Por ejemplo, un agonista de TLR4 usado con la invención puede ser:

5

(i) 3d-MPL (es decir, monofosforil lípido A 3-O-desacilado; conocido también como monofosforil lípido A 3-de-O-acilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A). Este derivado de la porción monofosforil lípido A de la endotoxina tiene una posición 3 desacilada del extremo reductor de la glucosamina. Se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil a los ácidos y un grupo acilo lábil a las bases. La preparación de 3d-MPL se describió

10

originalmente en la ref. 42, y el producto ha sido fabricado y comercializado por Corixa Corporation. Está presente en el adyuvante 'AS04' de GSK. Pueden encontrarse más detalles en las referencias 43 a 46.

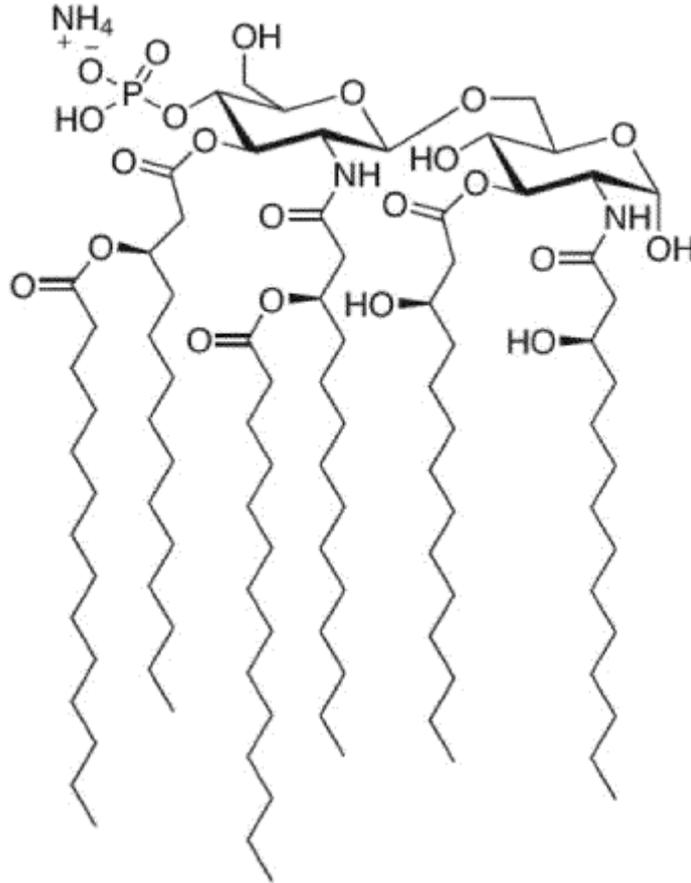
(ii) glucopiranosil lípido A (GLA) [47] o su sal de amonio, por ejemplo

5

10

15

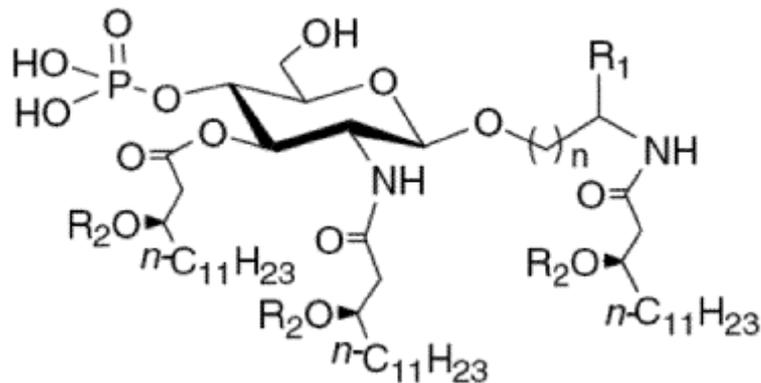
20



(iii) un fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como RC-529 o CRX-524 [48-50]. RC-529 y CRX-524 tienen la siguiente estructura, que se diferencia por sus grupos R_2 :

25

30



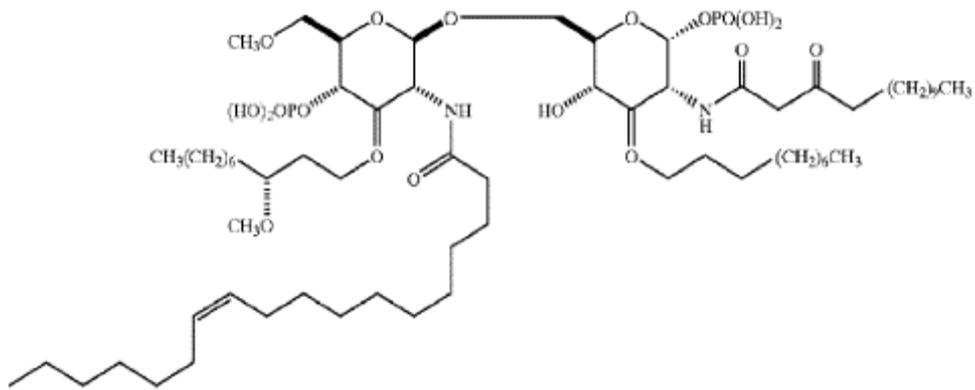
$R_1 = H$, $R_2 = n-C_{13}H_{27}CO$, $n = 1$ (RC-529)

$R_1 = H$, $R_2 = n-C_9H_{19}CO$, $n = 1$ (CRX-524)

35

(iv) compuestos que contienen lípidos unidos a un esqueleto acíclico que contiene fosfato, como E5564 [51,52]:

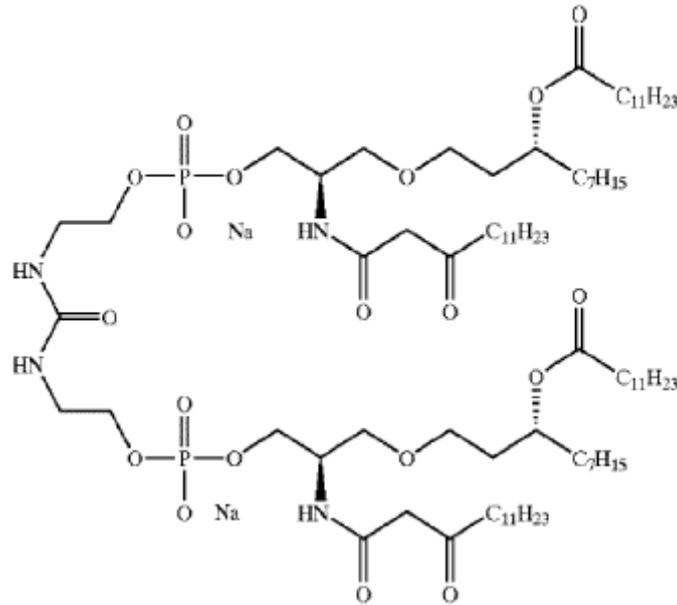
5



10

(v) Un compuesto de fórmula I, II o III como se define en la referencia 53, o una sal del mismo, tal como los compuestos 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 803022', 'ER 804764' o 'ER 804057'. ER 804057 se conoce también como E6020 y tiene la siguiente estructura:

15

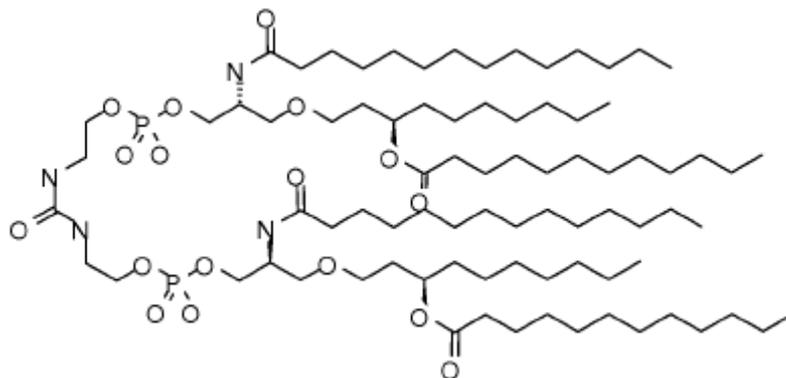


20

25

mientras que ER 803022 tiene la siguiente estructura:

30



35

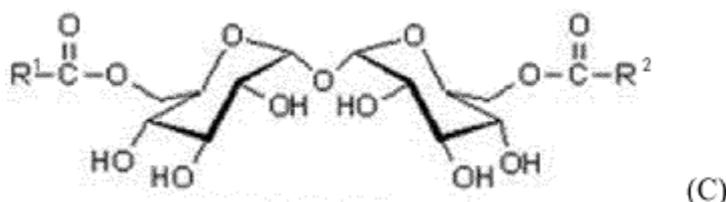
(vi) Uno de los ligandos polipeptídicos divulgados en la referencia 54.

Los agonistas de TLR4 preferentes son análogos de monofosforil lípido A (MPL)

Otros receptores biológicos

La presente divulgación se ha definido anteriormente y se define a continuación con referencia a agonistas de TLR, pero puede aplicarse más ampliamente a otros inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIPs) que no actúan a través de TLRs. En particular, los SMIPs que pueden usarse con la invención pueden mostrar actividad agonista con los receptores de lectina de tipo C (CLR) o CD1d en lugar de (o además de) un TLR. De esta manera, la presente divulgación incluye la divulgación según se ha descrito anteriormente con referencia al agonismo de TLR, pero en la que las referencias a un agonista de TLR (o similar) se reemplazan con referencia a un agonista de CLR o a un agonista de CD1d.

Los agonistas de CLR incluyen, pero no se limitan a, trehalosa-6,6'-dimicolato (TDM), su análogo sintético D-(+)-trehalosa-6,6'-dibehenato (TDB) y otros 6,6'-diésteres de trehalosa y ácidos grasos. De esta manera, la invención puede aplicarse a ésteres de trehalosa y diacil trehalosas que son agonistas de CLR. Estos agonistas pueden tener la fórmula (C):



en la que R¹C(O)- y R²C(O)- son iguales o diferentes y son grupos acilo. Los grupos acilo adecuados pueden ser saturados o insaturados. Pueden seleccionarse de entre los residuos acilo de un ácido micólico, un ácido corinomicólico, un ácido 2-tetradecil-3-hidroxiocetadecanoico, un ácido 2-eicosil-3-hidroxitetracosanoico, un ácido bourgeánico, un ácido behénico, un ácido palmítico, etc. Los ácidos micólicos útiles incluyen ácidos alfa-, metoxi- y cetomícólicos, en formas cis y/o trans.

Los agonistas de CD1d incluyen, pero no se limitan a, α -glucosilceramidas [55-64] tales como α -galactosilceramidas. De esta manera, la invención puede aplicarse a glucosilceramidas que son agonistas de CD1d, incluyendo α -galactosilceramida (α -GalCer), α -glucosilceramidas que contienen fitoesfingosina, [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosilo)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], OCH, KRN7000 CRONY-101, 3"-O-sulfo-galactosilceramida, etc.

Toxina mutante termolábil de E.coli

La presente divulgación se ha definido anteriormente y se define a continuación con referencia a agonistas de TLR, pero puede aplicarse también a adyuvantes proteináceos que no actúan a través de TLRs, tales como toxinas termolábiles de *E. coli* mutante. De esta manera, la presente divulgación incluye la descripción descrita anteriormente con referencia al agonismo de TLR, pero en la que las referencias a un agonista de TLR (o similar) se reemplazan por referencias a una toxina termolábil de *E. coli* mutante que muestra una actividad enzimática reducida en comparación con la toxina de tipo salvaje [65,66,67]. Se conocen varios de dichos mutantes, por ejemplo, referencia 68.

Las toxinas termolábiles de *E. coli* mutante adecuadas incluyen, pero no se limitan a, un mutante K63 (en el que la Ser-63 de tipo salvaje en la subunidad A enzimáticamente activa está mutada a Lys [68,69]) y un mutante R72 (en el que la Ala-72 de tipo salvaje está mutada a Arg [69,70]), o un doble mutante K63/R72 [71]. También puede usarse el mutante G192, en el que la Arg de tipo salvaje está mutada a Gly.

Inmunógenos

La invención puede usarse para administrar una amplia gama de inmunógenos bacterianos, para tratar o proteger contra una amplia gama de enfermedades. El inmunógeno bacteriano provoca una respuesta inmunológica que protege contra una enfermedad bacteriana (por ejemplo, debida a una bacteria Gram negativa o Gram positiva)

El inmunógeno bacteriano puede adoptar diversas formas, por ejemplo, un organismo completo, una vesícula de membrana exterior, un polipéptido, un sacárido, un liposacárido, un conjugado (por ejemplo, de un vehículo y un hapteno, o de un vehículo y un sacárido), etc. Cuando el inmunógeno es un polipéptido, será típicamente un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glicoproteína de envoltura, una glicoproteína con púas o espinas, etc.

El inmunógeno bacteriano puede producirse mediante expresión en un organismo que difiere del organismo que causa la enfermedad contra la que el inmunógeno proporciona una respuesta inmunológica. Un inmunógeno que provoca una respuesta inmunológica contra una enfermedad bacteriana es un inmunógeno bacteriano, independientemente de cómo se produzca el inmunógeno.

5 Antígenos bacterianos

Los antígenos bacterianos adecuados para su uso en composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos, polinucleótidos y vesículas de membrana exterior que aislados, purificados o derivados de una bacteria. En ciertas realizaciones, los antígenos bacterianos incluyen lisados bacterianos y formulaciones bacterianas inactivadas. En ciertas realizaciones, los antígenos bacterianos se producen mediante expresión recombinante. En ciertas realizaciones, los antígenos bacterianos incluyen epítomos que están expuestos sobre la superficie de las bacterias durante al menos una etapa de su ciclo de vida. Los antígenos bacterianos se conservan preferentemente en serotipos múltiples. En ciertas realizaciones, los antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de una o más de las bacterias expuestas a continuación, así como los ejemplos de antígenos específicos identificados a continuación:

15 *Neisseria meningitidis*: Los antígenos de *Meningitidis* incluyen, pero no se limitan a, proteínas, sacáridos (incluyendo un polisacárido o lipooligosacárido) o vesículas de membrana exterior purificadas o derivadas del serogrupo *N. meningitidis* tales como A, C, W135, Y, X o B. Una combinación útil de antígenos proteicos de *N. meningitidis* incluye incluir uno, dos o tres de un inmunógeno de NHBA, fHbp y/o NadA, por ejemplo, la mezcla divulgada en la referencia 72.

20 *Streptococcus pneumoniae*: Los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* incluyen, pero no se limitan a, un sacárido (incluyendo un polisacárido o un oligosacárido) y/o proteína de *Streptococcus pneumoniae*. El sacárido puede ser un polisacárido que tiene el tamaño resultante durante la purificación del sacárido a partir de la bacteria, o puede ser un oligosacárido obtenido mediante la fragmentación de dicho polisacárido. En el producto 7-valente PREVNAR™, por ejemplo, 6 de los sacáridos se presentan como polisacáridos intactos, mientras que uno (el serotipo 18C) se presenta como un oligosacárido. En ciertas realizaciones, los antígenos de sacáridos se seleccionan de entre uno o más de los siguientes serotipos neumocócicos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y/o 33F. Una composición inmunogénica puede incluir serotipos múltiples, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más serotipos. Las combinaciones de conjugados 7-valente, 9-valente, 10-valente, 11-valente y 13-valente son ya conocidas en la técnica, así como una combinación no conjugada 23-valente. Por ejemplo, una combinación 10 valente puede incluir sacárido de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una combinación 11 valente puede incluir además sacárido del serotipo 3. Una combinación 12-valente puede añadirse a la mezcla 10-valente: los serotipos 6A y 19A; 6A y 22F; 19A y 22F; 6A y 15B; 19A y 15B; r 22F y 15B; Una combinación 13-valente puede añadirse a la mezcla 11-valente: serotipos 19A y 22F; 8 y 12F; 8 y 15B; 8 y 19A; 8 y 22F; 12F y 15B; 12F y 19A; 12F y 22F; 15B y 19A; 15B y 22F. etc. En ciertas realizaciones, los antígenos proteicos pueden seleccionarse de entre una proteína identificada en los documentos WO98/18931, WO98/18930, la patente US 6.699.703, la patente US 6.800.744, los documentos WO97/43303, WO97/37026, WO 02/079241, WO 02/34773, WO 00/06737, WO 00/06738, WO 00/58475, WO 2003/082183, WO 00/37105, WO 02/22167, WO 02/22168, WO 2003/104272, WO 02/08426, WO 01/12219, WO 99/53940, WO 01/81380, WO 2004/092209, WO 00/76540, WO 2007/116322, LeMieux et al., Infect. Imm. (2006) 74:2453-2456, Hoskins et al., J. Bacteriol. (2001) 183:5709-5717, Adamou et al., Infect. Immun. (2001) 69(2):949-958, Briles et al., J. Infect. Dis. (2000) 182:1694-1701, Talkington et al., Microb. Pathog. (1996) 21(1):17-22, Bethe et al., FEMS Microbiol. Lett. (2001) 205(1):99-104, Brown et al., Infect. Immun. (2001) 69:6702-6706, Whalen et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol. (2005) 43:73-80, Jomaa et al., Vaccine (2006) 24(24):5133-5139. En otras realizaciones, las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* pueden seleccionarse de entre la familia de tríada de poli histidina (PhtX), la familia de proteínas de unión a colina (CbpX), truncados de CbpX, familia LytX, truncados de LytX, proteínas quiméricas truncado de CbpX – truncado de LytX, pneumolisina (Ply), PspA, PsaA, Spl28, SplOI, Spl30, Spl25, Spl33, subunidades de pneumococcal pilus.

50 *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del Grupo A): Los antígenos de *Streptococcus* del grupo A incluyen, pero no se limitan a, una proteína identificada en el documento WO 02/34771 o el documento WO 2005/032582 (incluyendo GAS 40), fusiones de fragmentos de proteínas GAS M (incluyendo las descritas en el documento WO 02/094851, y Dale, Vaccine (1999) 17:193-200 y Dale, Vaccine 14(10):944-948), proteína de unión a fibronectina (Sfb1), proteína asociada a Streptococcal heme (Shp) y estreptolisina S (SagA).

55 *Moraxella catarrhalis*: Los antígenos de *Moraxella* incluyen, pero no se limitan a, antígenos identificados en los documentos WO 02/18595 y WO 99/58562, antígenos proteicos de la membrana exterior (HMW-OMP), antígeno C y/o LPS.

Bordetella pertussis: Los antígenos de Pertussis incluyen, pero no se limitan a, toxoide de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3.

5 *Burkholderia*: Los antígenos de Burkholderia incluyen, pero no se limitan a Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei y Burkholderia cepacia.

10 *Staphylococcus aureus*: Los antígenos de Staph aureus incluyen, pero no se limitan a, un polisacárido y/o proteína de *S. Aureus*. Los polisacáridos de *S. aureus* incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 (CP5 y CP8) conjugados opcionalmente con exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante no tóxica, tal como StaphVAX™, polisacáridos tipo 336 (336PS), polisacáridos de adhesión intercelular (PIA, conocidos también como PNAG). Las proteínas *S. aureus* incluyen, pero no se limitan a, antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, quinasas, hialuronidasa), factores de superficie que inhiben la absorción fagocítica (cápsula, proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa, factor de coagulación, y/o toxinas que dañan la membrana (opcionalmente detoxificadas) que lisan las membranas de las células eucariotas (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina). En ciertas realizaciones, los antígenos de *S. Aureus* pueden seleccionarse a partir de una proteína identificada en los documentos WO 02/094868, WO 2008/019162, WO 02/059148, WO 02/102829, WO 03/011899, WO 2005/079315, WO 02/077183, WO 99/27109, WO 01/70955, WO 00/12689, WO 00/12131, WO 2006/032475, WO 2006/032472, WO 2006/032500, WO 2007/113222, WO 2007/113223, WO 2007/113224. En otras realizaciones, los antígenos de *S. Aureus* pueden seleccionarse de entre lsdA, lsdB, lsdC, SdrC, SdrD, SdrE, ClfA, ClfB, SasF, SasD, SasH (AdsA), Spa, EsaC, EsxB, Emp, H1aH35L, CP5, CP8, PNAG, 336PS.

20 *Staphylococcus epidermidis*: Los antígenos de *S. epidermidis* incluyen, pero no se limitan a, antígeno asociado a limo (SAA).

25 *Clostridium tetani* (Tétanos): Los antígenos del tétanos incluyen, pero no se limitan a, toxoide tetánico (TT). En ciertas realizaciones, dichos antígenos se usan como una proteína portadora en conjunción/conjugada con las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria.

Clostridium perfringens: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, toxina Epsilon de *Clostridium perfringens*.

Clostridium botulinums (Botulismo): Los antígenos de botulismo incluyen, pero no se limitan a, los derivados de *C. botulinum*.

30 *Cornynebacterium diphtheriae* (Difteria): Los antígenos de difteria incluyen, pero no se limitan a, toxina diftérica, preferentemente detoxificada, como CRM197. Además, se contemplan antígenos capaces de modular, inhibir, o asociados con, la ribosilación de ADP para la combinación/co-administración/conjugación con las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los toxoides de difteria se usan como proteínas portadoras.

35 *Haemophilus influenzae B* (Hib): Los antígenos Hib incluyen, pero no se limitan a, un antígeno sacárido Hib. Los antígenos Hib pueden estar conjugados.

Pseudomonas aeruginosa: Los antígenos de Pseudomonas incluyen, pero no se limitan a, endotoxina A, proteína Wzz, *P. aeruginosa* LPS, LPS aislado de PAO1 (serotipo O5) y/o proteínas de membrana exterior, incluyendo proteínas de membrana exterior F (OprF).

40 Brucella. Los antígenos bacterianos derivados de Brucella, incluyen, pero no se limitan a, B. abortus, B. canis, B. melitensis, B. neotomae, B. ovis, B. suis y B. pinnipediae.

Francisella. Los antígenos bacterianos derivados de Francisella, incluyen, pero no se limitan, *F. novicida*, *F. philomiragia* y *F. tularensis*.

45 *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del Grupo B): Los antígenos de Streptococcus del grupo B incluyen, pero no se limitan a, un antígeno de proteína o de sacárido identificado en los documentos WO 02/34771, WO 03/093306, WO 04/041157 o WO 2005/002619 (incluyendo las proteínas GBS 80, GBS 104, GBS 276 y GBS 322, e incluyendo antígenos sacáridos derivados de los serotipos Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII).

50 *Neisseria gonorrhoeae*: Los antígenos de Gonorrhoeae incluyen, pero no se limitan a, proteínas Por (o porinas), tales como PorB (véase Zhu et al., Vaccine (2004) 22:660 - 669), una proteína de unión de transferencia, tal como TbpA y TbpB (véase Price et al., Infection and Immunity (2004) 71(1):277 - 283), una proteína de opacidad (como Opa), una proteína de reducción modificable (Rmp) y vesícula de membrana exterior (OMV)

(véase Plante et al, J Infectious Disease (2000) 182:848 - 855), véase también, por ejemplo, los documentos WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280, WO02/079243).

5 *Chlamydia trachomatis*: Los antígenos de *Chlamydia trachomatis* incluyen, pero no se limitan a, antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C (agentes de tracoma, una causa de ceguera), los serotipos L1, L2 y L3 (asociados con el linfogranuloma venéreo) y los serotipos, D-K. En ciertas realizaciones, los antígenos de *Chlamydia trachomatis* incluyen, pero no se limitan a, un antígeno identificado en los documentos WO 00/37494, WO 03/049762, WO 03/068811 o WO 05/002619, incluyendo PepA (CT045), LcrE (CT089), ArtJ (CT381), DnaK (CT396), CT398, similar a OmpH (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823) y MurG (CT761).

10 *Treponema pallidum* (Sífilis): Los antígenos de sífilis incluyen, pero no se limitan a, antígeno TmpA.

Haemophilus ducreyi (causante de chancroide): Los antígenos de *Ducreyi* incluyen, pero no se limitan a, proteína de membrana exterior (DsrA).

Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, una repetición trisacárida u otros antígenos derivados de *Enterococcus*.

15 *Helicobacter pylori*: Los antígenos de *H pylori* incluyen, pero no se limitan a, CagA, VacA, NAP, HopX, HopY y/o antígeno de ureasa.

Staphylococcus saprophyticus: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, hemaglutinina de 160 kDa de antígeno *S. saprophyticus*.

Yersinia enterocolitica Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, LPS.

20 *E. coli*: Los antígenos de *E. coli* pueden derivarse de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* extraintestinal patógena (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Los antígenos de ExPEC incluyen, pero no se limitan a, factor de colonización accesorio (orf3526), of353, proteína bacteriana de dominio similar a Ig (grupo 1) (orf405), of1364, transportador de eflujo de factor de membrana exterior de la familia NodT (orf1767), gspK (orf3515),
25 gspJ (orf3516), receptor de sideróforo dependiente de tonB (orf3597), proteína fimbrial (orf3613), upec-948, upec-1232, precursor de la cadena A de la proteína fimbrial tipo 1 (upec-1875), homólogo de yap H (upec-2820) y hemolisina A (recp-3768).

30 *Bacillus Anthracis* (ántrax): Los antígenos de *B. anthracis* incluyen, pero no se limitan a, componentes A (factor letal (LF) y factor de edema (EF)), ambos de los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA). En ciertas realizaciones, los antígenos de *B. anthracis* son opcionalmente detoxificados.

Yersinia pestis (peste): Los antígenos de la peste incluyen, pero no se limitan a, antígeno capsular F1, LPS, antígeno V de *Yersinia pestis*.

35 *Mycobacterium tuberculosis*: Los antígenos de tuberculosis incluyen, pero no se limitan a, lipoproteínas, LPS, antígenos de BCG, una proteína de fusión del antígeno 85B (Ag85B), ESAT-6 opcionalmente formulada en vesículas de lípidos catiónicos, antígenos asociados a isocitrato deshidrogenasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y antígenos MPT51.

Rickettsia: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de membrana exterior, incluyendo la proteína de membrana exterior A y/o B (OmpB), LPS y antígeno de proteína de superficie (SPA).

40 *Listeria monocytogenes*: Los antígenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de *Listeria monocytogenes*.

Chlamydia pneumoniae: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, los identificados en el documento WO 02/02606.

45 *Vibrio cholerae*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos de proteinasas, LPS, particularmente lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos O específicos O1 Inaba, *V. cholera* 0139, antígenos de la vacuola IEM108 y toxina de *Zonula occludens* (Zot).

Salmonella typhi (Fiebre tifoidea): Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos capsulares, preferentemente conjugados (Vi, es decir, vax-TyVi).

Borrelia burgdorferi (Enfermedad de Lyme): Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, lipoproteínas (como OspA, OspB, Osp C y Osp D), otras proteínas de superficie como proteínas relacionadas con OspE (Erps), proteínas de unión a decorina (como DbpA), y las proteínas VI antigénicamente variables, tales como los antígenos asociados con P39 y P13 (una proteína de membrana integral, proteína de variación antigénica VlsE).

5 *Porphyromonas gingivalis*: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, proteína de membrana exterior (OMP) de *P. gingivalis*.

Klebsiella: Los antígenos incluyen, pero no se limitan a, una OMP, incluyendo OMP A, o un polisacárido opcionalmente conjugado con toxoide tetánico.

10 Otros antígenos bacterianos usados en las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, antígenos capsulares, antígenos polisacáridos, antígenos proteicos o antígenos polinucleotídicos de cualquiera de los anteriores. Otros antígenos bacterianos usados en las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, una preparación de vesícula de membrana exterior (OMV). Además, otros antígenos bacterianos usados en las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, versiones vivas, atenuadas y/o purificadas de cualquiera de las bacterias indicadas anteriormente. En ciertas realizaciones, los antígenos bacterianos usados en las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria se derivan de bacterias gram-negativas, mientras que en otras realizaciones se derivan de bacterias gram-positivas. En ciertas realizaciones, los antígenos bacterianos usados en las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria se derivan de bacterias aeróbicas, mientras que en otras realizaciones se derivan de bacterias anaeróbicas.

20 En ciertas realizaciones, cualquiera de los sacáridos (polisacáridos, LPS, LOS u oligosacáridos) derivados de bacterias anteriores se conjuga con otro agente o antígeno, tal como una proteína portadora (por ejemplo, CRM₁₉₇). En ciertas realizaciones, dichas conjugaciones son conjugaciones directas efectuadas mediante aminación reductiva de restos carbonilo en el sacárido a grupos amino en la proteína. En otras realizaciones, los sacáridos se conjugan a través de un enlazador, tal como con succinamida u otros enlaces proporcionados en Bioconjugate Techniques, 1996 y CRC, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, 1993.

Antígenos STD

30 En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen uno o más antígenos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (STD). En ciertas realizaciones, dichos antígenos proporcionan profilaxis para STDs tales como clamidia, verrugas genitales, gonorrea, sífilis y/o chancroide. En otras realizaciones, dichos antígenos proporcionan terapia para STDs tales como clamidia, herpes genital, verrugas genitales, gonorrea, sífilis y/o chancroide. Dichos antígenos se derivan de una o más STDs bacterianas. En ciertas realizaciones, los antígenos de STDs bacterianas se derivan de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *E. coli* y *Streptococcus agalactiae*. Los ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

35 Antígenos respiratorios

40 En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen uno o más antígenos bacterianos derivados de un patógeno que causa enfermedad respiratoria. En ciertas realizaciones, los antígenos respiratorios se derivan de una bacteria que causa enfermedad respiratoria, tal como, a modo de ejemplo solamente, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bacillus anthracis* y *Moraxella catarrhalis*. Los ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

Antígenos de vacuna pediátricos

45 En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen uno o más antígenos bacterianos adecuados para su uso en sujetos pediátricos. Los sujetos pediátricos suelen tener menos de aproximadamente 3 años, menos de aproximadamente 2 años o menos de 1 año de edad. Los antígenos pediátricos se administran múltiples veces durante el transcurso de 6 meses, 1, 2 o 3 años. Los antígenos pediátricos se derivan de un virus que puede tener como objetivo poblaciones pediátricas y/o un virus a cuya infección son susceptibles las poblaciones pediátricas. Los antígenos bacterianos pediátricos incluyen antígenos derivados de uno o más de entre *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani* (Tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (Difteria) y *Haemophilus influenzae B* (Hib). Los ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

Antígenos adecuados para su uso en personas ancianas o inmunocomprometidas

En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen uno o más antígenos bacterianos adecuados para su uso en personas ancianas o inmunocomprometidas. Dichos individuos pueden necesitar ser vacunados más frecuentemente, con dosis más altas o con formulaciones con adyuvantes para mejorar su respuesta inmunológica a los antígenos dirigidos. Los antígenos destinados para su uso en personas ancianas o inmunodeprimidas incluyen antígenos derivados de uno o más de entre los siguientes patógenos: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*. (*Streptococcus* del grupo A), *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Clostridium tetani* (Tétanos), *Corynebacterium diphtheriae* (Difteria), *Haemophilus influenzae B* (Hib), *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*. Los ejemplos de antígenos específicos derivados de estos patógenos se han descrito anteriormente.

Antígenos adecuados para su uso en vacunas para adolescentes

En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente memoria incluyen uno o más antígenos bacterianos adecuados para su uso en sujetos adolescentes. Los adolescentes necesitan un refuerzo de un antígeno pediátrico administrado previamente. Los antígenos pediátricos que son adecuados para su uso en adolescentes se han descrito anteriormente. Además, los adolescentes reciben antígenos derivados de un patógeno STD con el fin de garantizar la inmunidad de protección o terapéutica antes del comienzo de la actividad sexual. Los antígenos de STD que son adecuados para su uso en adolescentes se han descrito anteriormente.

Pueden usarse varios otros inmunógenos.

Restos portadores

Los antígenos sacáridos pueden conjugarse con un resto portador.

El resto portador puede ser una proteína. Las proteínas portadoras típicas son toxinas bacterianas, tales como toxinas diftéricas o tetánicas, o toxoides o mutantes o fragmentos de los mismos. El mutante de la toxina diftérica CRM197 [73] es útil. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen el complejo de proteína de membrana exterior de *Meningitidis* [74], péptidos sintéticos [75,76], proteínas de choque térmico [77,78], proteínas de pertussis [79,80], citoquinas [81], linfoquinas [81], hormonas [81], factores de crecimiento [81], proteínas artificiales que comprenden múltiples epítomos de células CD4⁺ T humanas de diversos antígenos derivados de patógenos [82] tal como N19 [83], proteína D de *H.influenzae* [84-86], pneumolisina [87] o sus derivados no tóxicos [88], proteína de superficie neumocócica PspA [89], proteínas de captación de hierro [90], toxina A o B de *C.difficile* [91], exoproteína A recombinante de *P.aeruginosa* (rEPA) [92], etc. En algunas realizaciones, la proteína portadora es una proteína de *S. aureus*, tal como un antígeno seleccionado de entre los grupos de antígenos primero, segundo, tercero o cuarto.

Cuando una composición incluye más de un inmunógeno bacteriano, cada inmunógeno puede usar la misma proteína portadora o una proteína portadora diferente.

Los conjugados pueden tener un exceso de portador (p/p) o un exceso de antígeno (p/p). En algunas realizaciones, un conjugado puede incluir pesos sustancialmente iguales de cada uno.

La molécula portadora puede conjugarse covalentemente al vehículo directamente o a través de un enlazador. Pueden conseguir enlaces directos a la proteína, por ejemplo, mediante aminación reductiva entre el antígeno y el vehículo, como se describe, por ejemplo, en las referencias 93 y 94. El antígeno puede necesitar primero ser activado por ejemplo mediante oxidación. Los enlaces a través de un grupo enlazador pueden realizarse usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 95 y 96. Un tipo de enlace preferente es un enlazador de ácido adípico, que puede formarse mediante el acoplamiento de un grupo -NH₂ libre (por ejemplo introducido en un glucano por aminación) con ácido adípico (usando, por ejemplo, activación con diimida), y a continuación acoplado una proteína al intermedio antígeno-ácido adípico resultante [97,98]. Otro tipo de enlace preferente es un enlazador de carbonilo, que puede formarse mediante reacción de un grupo hidroxilo libre de un CDI de sacárido [99, 100] seguido de reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otros enlazadores incluyen β-propionamido [101], nitrofenil-etilamina [102], haluros de haloacilo [103], enlaces glicosídicos [104], ácido 6-aminocaproico [105], ADH [106], restos C₄ a C₁₂ [107], etc. Puede usarse también condensación de carbodiimida [108].

Componentes no activos adicionales

Las composiciones de la invención pueden incluir componentes además del inmunógeno, agonista de TLR7 de benzonafitridina y material de aguja, por ejemplo, típicamente incluyen uno o más vehículos farmacéuticos y/o

excipientes. Una discusión detallada de dichos componentes está disponible en la referencia 109. Estos componentes pueden añadirse para facilitar la naturaleza sólida de la composición, o pueden ser residuales a partir de la naturaleza acuosa anterior de un componente.

5 Las composiciones pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Las composiciones sin mercurio son preferentes y pueden prepararse vacunas sin conservantes.

10 Las composiciones pueden incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. El cloruro de sodio (NaCl) es típico, que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml, por ejemplo 10 ± 2 mg/ml o 9 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de disodio deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc. Preferentemente, las composiciones usadas para la administración intradérmica no incluyen sales de aluminio tales como fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

15 Las composiciones pueden incluir una o más sales tampón. Pueden añadirse sales tamponadoras para proporcionar tamponamiento cuando la composición se vuelve a disolver. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina o un tampón de citrato. Una sal tampón se incluirá generalmente en el intervalo de 5-20mM. Si se usa un tampón de fosfato, la concentración de iones fosfato debería ser, en algunas realizaciones, <50 mM (véase más arriba), por ejemplo <10mM.

Típicamente, las composiciones tienen un pH entre 5,0 y 9,5, por ejemplo, entre 6,0 y 8,0. El pH de las composiciones sólidas es el pH de la composición cuando se vuelve a disolver en agua.

20 Las composiciones son preferentemente estériles, no pirogénicas (por ejemplo, con un contenido <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por cada dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis), y/o sin gluten.

25 Las composiciones son adecuadas para su administración a pacientes animales (y, en particular, seres humanos) y, de esta manera, incluyen usos tanto humanos como veterinarios. Pueden usarse en un procedimiento para elevar una respuesta inmunológica en un paciente, que comprende la etapa de administrar la composición al paciente. Las composiciones pueden ser administradas antes de que un sujeto sea expuesto a un patógeno y/o después de que un sujeto sea expuesto a un patógeno. Una composición es administrada aplicándola a la piel de un sujeto.

La invención proporciona también un recipiente herméticamente sellado que contiene una composición de la invención. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, una bolsa o sobre.

Dosificación

30 La dosis total de inmunógeno en un parche cutáneo puede ser de 10 µg/parche-100 µg/parche. La dosis total puede ser de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 µg/parche. La dosis particular usada depende del inmunógeno particular y del agonista de TLR particular usado. La administración intradérmica puede permitir el uso de dosis más bajas de inmunógeno y de agonista de TLR en comparación con las requeridas para la administración intramuscular.

35 La dosis total de agonista de TLR proporcionada en un parche cutáneo puede ser de 10 µg/parche-100 µg/parche. La dosis total puede ser de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 µg/parche. La dosis particular usada depende del inmunógeno particular y del agonista de TLR particular usados. La administración intradérmica puede permitir el uso de dosis más bajas de inmunógeno y de agonista de TLR en comparación con las requeridas para la administración intramuscular.

40 La relación de antígeno a agonista de TLR (en masa) puede ser de aproximadamente 10:1.

Concentración de inmunógeno

45 Las composiciones inmunogénicas administradas por vía intradérmica mediante micro-agujas pueden requerir volúmenes mucho menores que las composiciones inmunogénicas típicas administradas por vía intramuscular, pero pueden requerir la misma cantidad de antígeno, que frecuentemente requerirá un antígeno en bruto más concentrado.

Pueden usarse diversas técnicas para esta etapa de concentración que incluyen, pero no se limitan a: filtración centrífuga; ultrafiltración; filtración de flujo tangencial (conocida también como filtración de flujo cruzado).

50 La filtración centrífuga implica la centrifugación de un líquido a través de un filtro. El filtro retiene el antígeno a ser concentrado, pero no retiene disolvente o solutos más pequeños. A medida que el volumen del filtrado aumenta, aumenta también la concentración del antígeno en el producto retenido. Esta técnica típicamente usa un rotor de

ángulo fijo. Diversos dispositivos de filtración centrífuga adecuados están disponibles comercialmente, por ejemplo, los productos comercializados bajo las marcas Centricon™, Vivaspin™ y Spintek™. El corte del filtro se seleccionará de manera que el antígeno de interés permanezca en el producto retenido.

5 La ultrafiltración implica el uso de presión hidrostática para forzar un líquido contra una membrana semipermeable. El filtro retiene el antígeno a concentrar, pero no retiene disolvente o solutos más pequeños. La aplicación
 10 continuada de presión hidrostática causa que el volumen del filtrado aumente y, de esta manera, aumenta también la concentración del antígeno en el producto retenido. Hay muchas membranas de ultrafiltración disponibles comercialmente. El corte de peso molecular (MWCO) de una membrana de ultrafiltración determina qué solutos pueden pasar a través de la membrana (es decir, al producto filtrado) y qué solutos se conservan (es decir, en el producto retenido). El MWCO del filtro usado con la invención se seleccionará de manera que sustancialmente todo el antígeno de interés permanezca en el producto retenido.

15 La filtración de flujo tangencial (TFF) implica pasar un líquido tangencialmente a través de una membrana de filtro. El lado de la muestra se mantiene típicamente a una presión positiva con relación al lado del filtrado. A medida que el líquido fluye sobre el filtro, los componentes en el mismo pueden pasar a través de la membrana al filtrado. El flujo continuado causa que el volumen del filtrado aumente, y de esta manera aumenta la concentración del antígeno en el producto retenido. La TFF contrasta con la filtración en terminación ciega, en la que la muestra se hace pasar a través de una membrana en lugar de tangencialmente a la misma. Muchos sistemas TFF están disponibles comercialmente. El MWCO de una membrana TFF determina qué solutos pueden pasar a través de la membrana (es decir, al producto filtrado) y qué solutos se conservan (es decir, en el producto retenido). El MWCO de un filtro TFF usado con la invención se seleccionará de manera que sustancialmente todo el antígeno de interés permanezca en el producto retenido.

Estas tres técnicas de concentración no son mutuamente excluyentes.

20 Independientemente de la técnica elegida, ésta aumenta preferentemente la concentración del antígeno de interés al menos n veces con relación a la concentración inicial, donde n es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 o más.

Liofilización

Después de la concentración de antígeno, puede usarse una etapa de liofilización.

30 La liofilización implica típicamente tres etapas en el interior de una cámara: (a) congelación; (b) secado principal; y (c) secado secundario. La etapa (a) congela el agua móvil del conjugado. En la etapa (b), la presión de la cámara se reduce (por ejemplo, a $\leq 0,1$ Torr) y se aplica calor al producto para causar la sublimación del agua congelada. En la etapa (c), la temperatura se incrementa para des-absorber cualquier agua unida, tal como agua de cristalización, hasta que el contenido de agua residual cae al nivel deseado.

35 Una etapa inicial en una liofilización típica, antes de que se produzca la congelación, es la adición de un lioprotector. En algunas realizaciones, puede haberse añadido un lioprotector antes de la concentración en la etapa (i), pero, por el contrario, es preferente añadirlo después de que haya ocurrido la concentración, es decir, al final de la etapa (i) o al comienzo de la etapa (ii). Esto hace que sea más fácil controlar la cantidad de lioprotector que está presente al comienzo de la congelación en la liofilización.

40 De esta manera, pueden añadirse uno o más lioprotectores al antígeno concentrado. Los lioprotectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcoholes de azúcar (tales como sorbitol, manitol, maltitol, eritritol, xilitol) y disacáridos (tales como sacarosa, trehalosa, maltosa, lactulosa, lactosa, celobiosa). La sacarosa y el manitol (o una mezcla de los mismos) son lioprotectores preferentes para su uso con la invención.

45 Después de la liofilización, puede reconstituirse un antígeno de vacuna liofilizado. Esta reconstitución puede usar agua (por ejemplo, agua para inyección, wfi) o tampón (por ejemplo, un tampón de fosfato, un tampón Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato, un tampón de histidina o un tampón de citrato). Típicamente, los tampones se incluirán en el intervalo de 5-20mM. Un tampón de fosfato es preferente.

50 La etapa (i) concentró el primer volumen de líquido del antígeno de vacuna, proporcionando una composición con la misma cantidad de antígeno en un segundo volumen de líquido (reducido). La etapa (ii) secó este material concentrado. Este material secado puede reconstituirse en un tercer volumen de líquido. Si el tercer volumen es mayor que el primer volumen, el procedimiento global no ha conseguido concentrar el antígeno. De manera similar, si el tercer volumen es mayor que el segundo volumen, la etapa de reconstitución ha retrocedido en términos de concentración. De esta manera, el tercer volumen es igual o preferentemente menor que el segundo volumen. De esta manera, las etapas de liofilización/reconstitución pueden conseguir una mayor concentración de antígeno.

El agonista de TLR puede añadirse a la composición inmunogénica después de la concentración de antígeno.

Procedimientos de tratamiento y de administración de composiciones inmunogénicas

5 La presente divulgación proporciona un procedimiento para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende la etapa de administrar por vía intradérmica al sujeto un agonista de TLR7 de benzonaftiridina y un inmunógeno bacteriano.

La invención proporciona también una composición que comprende un agonista de TLR7 de benzonaftiridina y un inmunógeno bacteriano, para su uso en un procedimiento para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto mediante administración intradérmica.

10 La invención proporciona también el uso de un agonista de TLR7 de benzonaftiridina y un inmunógeno bacteriano en la fabricación de un medicamento intradérmico para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto. Detalles adicionales del medicamento se han proporcionado anteriormente.

La invención es adecuada para aumentar las respuestas inmunológicas en sujetos humanos o animales no humanos (en particular mamíferos). Las composiciones preparadas según la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos.

15 La respuesta inmunológica estimulada por estos procedimientos y usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectores. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos después de la inmunización son bien conocidos en la técnica.

Grupos químicos

20 A menos que se defina específicamente en otra parte, los grupos químicos descritos en la presente memoria tienen el siguiente significado cuando se usan en la presente especificación:

El término "alquilo" incluye residuos de hidrocarburos saturados que incluyen:

- grupos lineales de hasta 10 átomos (C₁-C₁₀), o de hasta 6 átomos (C₁-C₆), o de hasta 4 átomos (C₁-C₄). Los ejemplos de dichos grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo C₁, etilo C₂, propilo C₃ y n-butilo C₄.
- 25 – grupos ramificados de entre 3 y 10 átomos (C₃-C₁₀), o de hasta 7 átomos (C₃-C₇), o de hasta 4 átomos (C₃-C₄). Los ejemplos de dichos grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, iso-propilo C₃, sec-butilo C₄, iso-butilo C₄, tert-butilo C₄ y neo-pentilo C₅.

El término "alquileo" se refiere al radical de hidrocarburo divalente derivado de un grupo alquilo, y se interpretará según la definición anterior.

30 El término "alquenilo" incluye residuos de hidrocarburos monoinsaturados que incluyen:

- grupos lineales de entre 2 y 6 átomos (C₂-C₆). Los ejemplos de tales grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, vinilo C₂, 1-propenilo C₃, alilo C₃, 2-butenilo C₄
- grupos ramificados de entre 3 y 8 átomos (C₃-C₈). Los ejemplos de dichos grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, 2-metil-2-propenilo C₄ y 2,3-dimetil-2-butenilo C₆.

35 El término alquenileno se refiere al radical de hidrocarburo divalente derivado de un grupo alquenilo, y se interpretará según la definición anterior.

El término "alcoxi" incluye residuos de hidrocarburos unidos a O que incluyen:

- grupos lineales de entre 1 y 6 átomos (C₁-C₆), o de entre 1 y 4 átomos (C₁-C₄). Los ejemplos de dichos grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi C₁, etoxi C₂, n-propoxi C₃ y n-butoxi C₄.
- 40 – grupos ramificados de entre 3 y 6 átomos (C₃-C₆) o de entre 3 y 4 átomos (C₃-C₄). Los ejemplos de dichos grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, iso-propoxi C₃ y sec-butoxi C₄ y tert-butoxi.

Halo se selecciona de entre Cl, F, Br e I. Halo es preferentemente F.

45 El término "arilo" incluye un sistema de anillo aromático único o condensado que contiene 6 o 10 átomos de carbono; en el que, a menos que se indique lo contrario, cada aparición de arilo puede estar opcionalmente sustituido con hasta 5 sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), OH,

halo, CN, COOR¹⁴, CF₃ y NR¹⁴R¹⁵; como se ha definido anteriormente. Típicamente, el arilo estará opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes. Los sustituyentes opcionales se seleccionan entre los indicados anteriormente. Los ejemplos de grupos arilo adecuados incluyen fenilo y naftilo (cada uno opcionalmente sustituido como se ha indicado anteriormente). Arileno se refiere al radical divalente derivado a partir de un grupo arilo, y se interpretará según la definición anterior.

El término "heteroarilo" incluye un anillo aromático mono- o bi- cíclico de 5, 6, 9 o 10 miembros, que contiene 1 o 2 átomos de N y, opcionalmente, un átomo NR¹⁴ o un átomo NR¹⁴ y un átomo S o un átomo O, o un átomo S, o un átomo O; en el que, a menos que se indique lo contrario, dicho heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), OH, halo, CN, COOR¹⁴, CF₃ y NR¹⁴R¹⁵; como se define más adelante. Los ejemplos de grupos heteroarilo adecuados incluyen tienilo, furanilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazoilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzotriazolilo, quinolinilo e isoquinolinilo (opcionalmente sustituido tal como se ha indicado anteriormente). Heteroarileno se refiere al radical divalente derivado a partir de heteroarilo, y se interpretará según la definición anterior.

El término "heterociclilo" es un anillo mono- o bi-cíclico no aromático, de 3 a 10 miembros unido a C o N, en el que dicho anillo heterocicloalquilo contiene, cuando sea posible, 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre N, NR¹⁴, S(O)_q y O; y dicho anillo heterocicloalquilo contiene opcionalmente, cuando sea posible, 1 o 2 enlaces dobles, y está sustituido opcionalmente en el carbono con 1 o 2 sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), OH, CN, CF₃, halo, COOR¹⁴, NR¹⁴R¹⁵ y arilo.

En las definiciones anteriores, R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan independientemente de entre H y alquilo (C₁-C₆).

Cuando una fórmula estructural se define con un sustituyente unido al núcleo de la molécula mediante un enlace no especificado o "flotante", esta definición abarca los casos en que el sustituyente no especificado está unido a cualquiera de los átomos en el anillo en el que está situado el enlace flotante, mientras cumple con la valencia permitida para ese átomo.

En el caso de los compuestos de la invención que pueden existir en formas tautoméricas (es decir, en las formas ceto o enol), la referencia a un compuesto particular incluye opcionalmente la totalidad de dichas formas tautoméricas.

General

El término "que comprende" abarca "que incluye", así como "que consiste" por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" con relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, X±10%.

A menos que se establezca específicamente lo contrario, un procedimiento que comprende una etapa de mezclado de dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezclado. De esta manera, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí y, a continuación, la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deberían obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) y, en particular, libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, es preferente el cultivo de las células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Cuando se administra un compuesto al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede reemplazarse alternativamente por un profármaco adecuado.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Títulos de HI proporcionados por una administración intradérmica e intramuscular de antígeno de gripe y agonistas de TLR después de dos inmunizaciones.

Modos de llevar a cabo la invención

Concentración de inmunógeno

Filtración centrífuga

La filtración centrífuga usó un dispositivo Millipore™ con un corte de 10kDa, accionado a 5.000 rpm.

5 Se ensayaron tres duraciones de centrifugación: 15, 30 y 45 minutos. El material retenido (concentrado) y el filtrado se comprobaron para ver la ubicación de la hemaglutinina de virus de gripe. La Figura 1 muestra que el antígeno todavía está en el producto retenido después de 45 minutos. La concentración de antígeno fue de 3 veces después de 15 minutos, 6 veces después de 30 minutos y 13 veces después de 45 minutos. La recuperación de antígeno fue del 40% después de 15 minutos, del 41% después de 30 minutos y del 55% después de 45 minutos. De esta manera, se eligieron 45 minutos para los trabajos posteriores.

10 En los trabajos posteriores, el antígeno se liofilizó después de la centrifugación, para proporcionar una mayor concentración. Se usó sacarosa como lioprotector, sola (en dos concentraciones diferentes) o con manitol. El material liofilizado fue reconstituido. Las muestras reconstituidas contenían agregados visibles. Con relación al material de partida, el contenido de HA (medido mediante ELISA) se concentró de la siguiente manera:

Tratamiento	Concentración (x)
Material de partida	1,0 x
Adición de sacarosa	2,3 x
Adición de sacarosa (concentración más alta)	1,3 x
Adición de sacarosa + manitol	0,8 x
Sacarosa, liofilización, reconstitución	13,3 x
Sacarosa + manitol, liofilización, reconstitución	8,5 x
Centrífuga, sacarosa, liofilización, reconstitución	25,2 x
Centrífuga, sacarosa (más alta), liofilización, reconstitución	28,4 x

15 De esta manera, la combinación de centrifugación y liofilización puede proporcionar una concentración > 25 veces en el contenido de HA de virus de gripe. Las dos muestras centrifugadas se evaluaron también mediante SRID y mostraron un aumento de 21,1x y 35,1x en el contenido de HA, con el nivel de sacarosa más alto proporcionando una vez más mejores resultados.

Ultrafiltración

20 La ultrafiltración usó un concentrador de células con agitación Amicon™ con una membrana de corte de 10 kDa realizada en celulosa regenerada, accionado bajo nitrógeno presurizado durante 1 hora.

Si se añadió una liofilización, seguida de una reconstitución de nuevo al volumen de pre-liofilización, el material reconstituido tenía una concentración de HA (medida mediante SRID) comparable al material de partida, lo que indicaba ausencia de pérdida de antígeno funcional. El material reconstituido fue estable durante > 2 semanas.

Administración intradérmica de composiciones inmunogénicas

25 Gripe (solo como referencia)

30 La inmunización de ratones Balb/c con 100 µl o 20 µl de composición inmunogénica se llevó a cabo usando tanto administración intramuscular como administración intradérmica. La composición incluía una vacuna trivalente contra la gripe con una dosis de 1 µg de HA de cada uno de entre X180 H1N1 Cal, X187 H3N2 Perth y B/Brisbane y uno de entre un grupo de adyuvantes que incluyen agonistas de TLR. Los ratones fueron anestesiados antes de la inmunización. Para los ratones que recibieron inmunización intradérmica, se afeitó o depiló un área en la parte posterior del ratón para eliminar el pelo en el sitio de la inyección. El sitio se limpió con etanol al 70%. La aguja se insertó, con el bisel hacia arriba, sosteniendo la aguja casi paralela al plano de la piel. Para los ratones que recibieron inmunización tanto intramuscular como intradérmica, se usaron varios agonistas de TLR diferentes y se administraron las dosis, el volumen total de la composición usada y la vía de administración se muestran en la

35 Tabla 1, a continuación. El uso de volúmenes de 50 µl o menos por cada sitio para la administración intradérmica evita traumas en el tejido.

Tabla 1

Grupo	Adyuvante	Dosis	Volumen total	Vía
1	-	-	100 μ l	IM
2	MF59	(1:1)	100 μ l	IM
3	-	-	100 μ l	IM
4	-	-	20 μ l	ID
5	T1a	50 μ g	20 μ l	ID
6	T1b	50 μ g	20 μ l	ID
7	T1b	100 μ g	20 μ l	ID
8	T2	50 μ g	20 μ l	ID
9	LTK63	5 μ g	20 μ l	ID
10	α -GalCer	5 μ g	20 μ l	ID
11	MPLA	25 μ g	20 μ l	ID
12	MF59	(1:1)	20 μ l	ID

El adyuvante T1a se formuló mediante dispersión en carboximetilcelulosa al 0,05% o Tween80 al 0,05% y se sonicó en un baño de agua. El adyuvante T1b se formuló mediante dispersión en 1X y se sonicó en un baño de agua. El adyuvante T2 se formuló mediante dispersión en una solución de amoníaco 10 mM y se sonicó en un baño de agua. El adyuvante LTK63 [110] se formuló en fosfato sódico 0,05 M y L-arginina 0,2M. El adyuvante α -GalCer se formuló en agua y Tween20 al 0,05% y se sonicó en un baño de agua durante 30 minutos a 37°C. El adyuvante MPL se formuló mediante dispersión acuosa usando 0,5% TEoA/WFI.

Se realizaron dos inmunizaciones con 28 días de diferencia, y las muestras individuales se analizaron para determinar los títulos de inhibición de hemaglutinación (HI) anti-H1N1, anti H3N2 y anti-B 14 y 28 días después de la primera inmunización y 14 días después de la segunda inmunización. Las Figuras 1-3 muestran los títulos HI para anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B, respectivamente.

Cuando se administran por vía intradérmica, los antígenos de gripe inducen títulos HI comparables a los inducidos después de la administración intramuscular. Se proporcionó una respuesta inmunológica mejorada después de una segunda inmunización intradérmica en presencia de cada uno de los agonistas de TLR en comparación con la inmunización intradérmica en ausencia de un agonista de TLR. La respuesta inmunológica proporcionada por la inmunización intradérmica con antígeno solo o con antígeno más MF59 es comparable a la respuesta inmunológica proporcionada por la inmunización intramuscular con antígeno solo o con antígeno más MF59.

La inmunización intradérmica con T1b (100 μ g) o LTK63 (5 μ g) proporcionó una respuesta inmunitaria significativamente mejorada en comparación con la inmunización tanto intradérmica como intramuscular usando antígeno solo.

Neisseria meningitidis

La inmunización de ratones CD1 con 100 μ l de composición inmunogénica que comprendía una dosis de 10 μ g de tres antígenos B de *N. meningitidis* [72] y uno de un grupo de coadyuvantes que incluye agonistas de TLR se llevaron a cabo usando tanto administración intramuscular como administración intradérmica. Los ratones se anestesiaron antes de la inmunización. Se afeitó o depiló un área en la parte posterior del ratón para eliminar el pelo en el sitio de la inyección. El sitio se limpió con etanol al 70%. La aguja se insertó, con el bisel hacia arriba, sosteniendo la aguja casi paralela al plano de la piel. Se usaron una serie de agonistas de TLR diferentes y se administraron las dosis, el volumen total de la composición usada y la vía de administración se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Grupo	Adyuvante	Dosis	Volumen total	Vía
1	-	-	100 ul	IM
2	-	-	100 µl	ID
3	T1a	100 µg	100 µl	IM
4	T1a	100 µg	100 µl	ID
5	T1b	100 µg	100 µl	IM
6	T1b	100 µg	100 µl	ID
7	T2	100 µg	100 µl	IM
8	T2	100 µg	100 µl	ID
9	Alum/T1c	100 µg	100 µl	IM
10	Alum/T1c	100 µg	100 µl	ID

5 El adyuvante T1a se formuló mediante dispersión en carboximetilcelulosa al 0,05% o Tween80 al 0,05% y se sonicó en un baño de agua. El adyuvante T1b se formuló mediante dispersión en 1X y se sonicó en un baño de agua. El adyuvante T2 se formuló mediante dispersión en una solución de NH₃ 10 mM y se sonicó en un baño de agua.

10 Se llevaron a cabo inmunizaciones y las muestras individuales se analizaron para determinar la actividad bactericida. La Figura 4 muestra los títulos bactericidas para cada una de las composiciones ensayadas. Cuando se administraron por vía intradérmica, los antígenos MenB indujeron títulos bactericidas más altos que los inducidos después de la administración intramuscular incluso sin la presencia de agonistas de TLR.

15 La inmunización intradérmica con T2 proporciona una respuesta inmunológica mejorada en comparación con la combinación de los antígenos con otros adyuvantes. La respuesta inmunológica proporcionada después de la administración intradérmica de antígenos de meningitis y agonistas de TLR es comparable a la respuesta inmunológica proporcionada después de la administración intramuscular de antígenos de meningitis y agonistas de TLR.

Referencias

- [1] Prausnitz et al. (2009) *Curr Top Microbiol Immunol*. 333:369-93.
- [2] Kang et al. (2012) *Expert Rev Vaccines*. 11(5):547-60.
- [3] Davidson et al. (2008) *Chemical Engineering Research and Design* 86:1196-1206.
- 20 [4] Carey et al. (2011) *PLoS ONE* 6(7): e22442.
- [5] Bal et al. (2010) *J Control Release*. 147:218-24.
- [6] Donnelly et al. (2011) *Pharm Res* 28:41-57.
- [7] Koutsonanos et al. (2009) *PLoS ONE* 4(e): e4773.
- [8] Quan et al. (2009) *PLoS ONE* 4(9):e7152.
- 25 [9] Matsuo et al. (2012) *J Control Release* 161:10-17.
- [10] US-2011/112509.
- [11] WO2009/040548.

- [12] Lee et al. (2008) *Biomaterials* 29(13):2113-24.
- [13] WO2007/030477.
- [14] US-6945952.
- [15] US-7211062.
- 5 [16] Sullivan et al. (2010) *Nature Med* 16:915-920.
- [17] US-2009/0182306
- [18] US-7182747.
- [19] Oh et al. (2006) American Association of Pharmaceutical Scientists, 2006 Annual Meeting and Exposition. The
- 10 AAPS Journal. 8(S2).
- [20] WO2007/127976.
- [21] Matsuo et al. (2012) *J Control Release*. 160(3):495-501.
- [22] Koutsonanos et al. (2012) *Sci Rep*. 2:357.
- [23] EP-A-2289843.
- 15 [24] Gill & Prausnitz (2007) *J Control Release* 117:227-37.
- [25] WO2007/124393.
- [26] WO2007/061964.
- [27] WO2007/059289.
- [28] Jin et al. (2009) *Biomed Microdevices*. 11(6): 1195-203.
- 20 [29] Vrdoljak et al. (2012) *J Control Release* 159:34-42.
- [30] Rosenberg et al. (2010) *J Immunol* 184:136.20.
- [31] US-4.666.886.
- [32] WO2009/118296
- [33] WO2008/005555.
- 25 [34] WO2009/111337
- [35] WO2009/067081
- [36] WO2007/040840.
- [37] WO2010/014913.
- [38] WO2011/049677.
- 30 [39] WO2012/031140
- [40] WO2011/119759
- [41] US2010/0143301.
- [42] GB-A-2220211.
- [43] Myers et al. (1990) páginas 145-156 of Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.
- 35 [44] Ulrich (2000) Chapter 16 (páginas 273-282)

- [45] Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
- [46] Baldrick et al. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
- [47] Coler et al. (2011) *PLoS ONE* 6(1):e16333.
- [48] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- 5 [49] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [50] Bazin et al. (2006) *Tetrahedron Lett* 47:2087-92.
- [51] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [52] US2005/0215517.
- [53] WO03/011223.
- 10 [54] WO2007/053455.
- [55] De Libero et al, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496.
- [56] Patente US 5.936.076.
- [57] Oki et al, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640.
- [58] US2005/0192248.
- 15 [59] Yang et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822.
- [60] WO2008/047174.
- [61] WO2008/047249.
- [62] WO2005/102049.
- [63] Goff et al, *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603.
- 20 [64] WO03/105769.
- [65] Peppoloni et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-93.
- [66] WO95/17211.
- [67] da Hora et al. (2011) *Vaccine* 29:1538-44.
- [68] WO93/13202.
- 25 [69] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-61.
- [70] WO98/18928.
- [71] Feng et al. (2005) *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 37(2):126-32.
- [72] Giuliani et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:10834-9.
- [73] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002).
- 30 [74] EP-A-0372501.
- [75] EP-A-0378881.
- [76] EP-A-0427347.
- [77] WO93/17712.
- [78] WO94/03208.
- 35 [79] WO98/58668.

- [80] EP-A-0471177.
- [81] WO91/01146
- [82] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824.
- [83] Baraldo et al. (2004) Infect Immun 72(8):4884-7.
- 5 [84] EP-A-0594610.
- [85] Ruan et al. (1990) J Immunol 145:3379-3384.
- [86] WO00/56360.
- [87] Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [88] Michon et al. (1998) Vaccine. 16:1732-41.
- 10 [89] WO02/091998.
- [90] WO01/72337.
- [91] WO00/61761.
- [92] WO00/33882
- [93] Patente US 4.761.283.
- 15 [94] Patente US 4.356.170.
- [95] Patente US 4.882.317.
- [96] Patente US 4.695.624.
- [97] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- [98] EP-A-0208375.
- 20 [99] Bethell G.S. et al., J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4
- [100] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
- [101] WO00/10599.
- [102] Gever et al., Med. Microbiol. Immunol, 165: 171-288 (1979).
- [103] Patente US 4.057.685.
- 25 [104] Patentes US 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
- [105] Patente US 4.459.286.
- [106] Patente US 4.965.338.
- [107] Patente US 4.663.160.
- [108] WO2007/000343.
- 30 [109] Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 2000; 20th edition, ISBN: 0683306472)
- [110] Tritto et al. (2007) J. Immunol. 179:5346-5357.

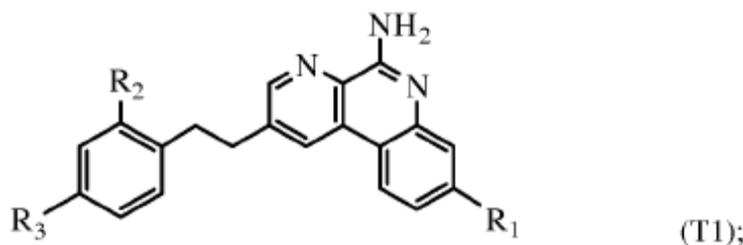
REIVINDICACIONES

1. Un sistema de administración intradérmica que comprende una micro-aguja biodegradable sólida, en el que la micro-aguja comprende un agonista de TLR7 de benzonaftiridina y un inmunógeno, en el que el inmunógeno es un antígeno bacteriano.

5 2. El sistema de administración intradérmica según la reivindicación 1, en el que el antígeno bacteriano es un antígeno de *Neisseria meningitidis*.

3. El sistema de administración intradérmica según la reivindicación 1 o 2, en el que el agonista de TLR7 de benzonaftiridina tiene la fórmula T1:

10



15 en la que

R^1 es H, alquilo C_1-C_6 , $-C(R^5)_2OH$, $-L^1R^5$, $-L^1R^6$, $-L^2R^5$, $-L^2R^6$, $-OL^2R^5$ o $-OL^2R^6$;

L^1 es $-C(O)-$ u $-O-$;

L^2 es alquileno C_1-C_6 , alquenileno C_2-C_6 , arileno, heteroarileno o $-((CR^4R^4)_pO)_q(CH_2)_p-$, en el que el alquileno C_1-C_6 y el alquenileno C_2-C_6 de L^2 están opcionalmente sustituidos con 1 a 4 grupos fluoro;

20 cada L^3 se selecciona independientemente de entre alquileno C_1-C_6 y $-((CR^4R^4)_pO)_q(CH_2)_p-$, en el que el alquileno C_1-C_6 de L^3 está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos fluoro;

L^4 es arileno o heteroarileno;

R^2 es H o alquilo C_1-C_6 ;

25 R^3 se selecciona de entre alquilo C_1-C_4 , $-L^3R^5$, $-L^3R^7$, $-L^3L^4L^3R^7$, $-L^3L^4R^5$, $-L^3L^4L^3R^5$, $-OL^3R^5$, $-OL^3R^7$, $-OL^3L^4R^7$, $-OL^3OL^3R^7$, $-OR^8$, $-OL^3L^4R^5$, $-OL^3L^4L^3R^5$ y $-C(R^5)_2OH$;

cada R^4 se selecciona independientemente de entre H y fluoro;

R^5 es $-P(O)(OR^9)_2$,

R^6 es $-CF_2P(O)(OR^9)_2$ o $-C(O)OR^{10}$;

R^7 es $-CF_2P(O)(OR^9)_2$ o $-C(O)OR^{10}$;

30 R^8 es H o alquilo C_1-C_4 ;

cada R^9 se selecciona independientemente de entre H y alquilo C_1-C_6 ;

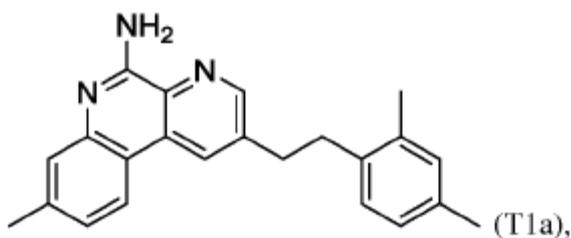
R^{10} es H o alquilo C_1-C_4 ;

cada p se selecciona independientemente de entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y

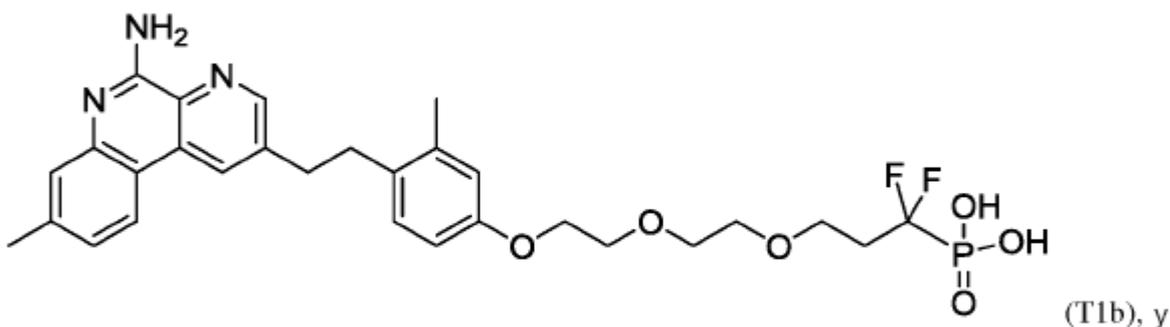
q es 1, 2, 3 o 4.

35 4. El sistema de administración intradérmica según la reivindicación 3, en el que el agonista de TLR7 de benzonaftiridina se selecciona de entre

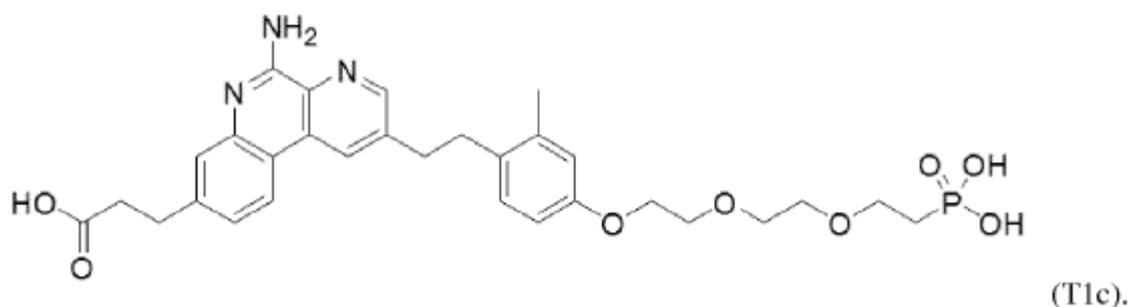
5



10



15



20

5. El sistema de administración intradérmica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un agonista de TLR que es:

- a) un agonista de TLR4;
- 25 b) un agonista de TLR5;
- c) un agonista de TLR1;
- d) un agonista de TLR6; o
- e) un agonista de TLR9.

6. El sistema de administración intradérmica según la reivindicación 5, en el que el agonista de TLR4 es MPL.

30 7. Un procedimiento de preparación de un sistema de administración intradérmica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento comprende las etapas de a) mezclar el inmunógeno y el agonista de TLR7 de benzonaftiridina para formar una composición inmunogénica en la que el inmunógeno tiene una concentración de 10 mg/ml-50 mg/ml y el agonista de TLR7 de benzonaftiridina tiene una concentración de 0,1 mg/ml-10 mg/ml y b) secar la composición inmunogénica para formar una micro-aguja biodegradable sólida.

35

FIG. 1

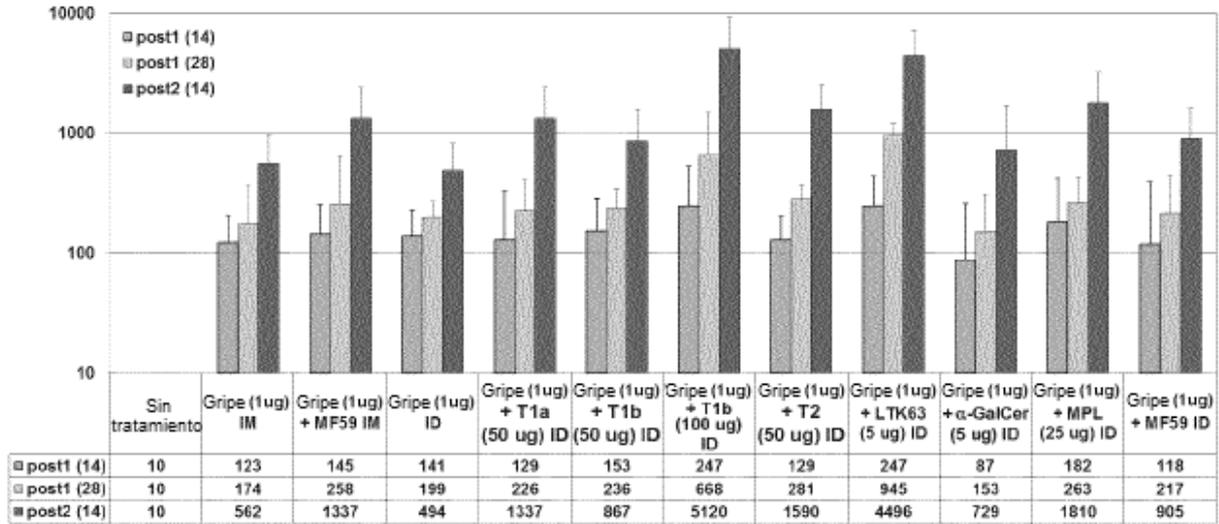


FIG. 2

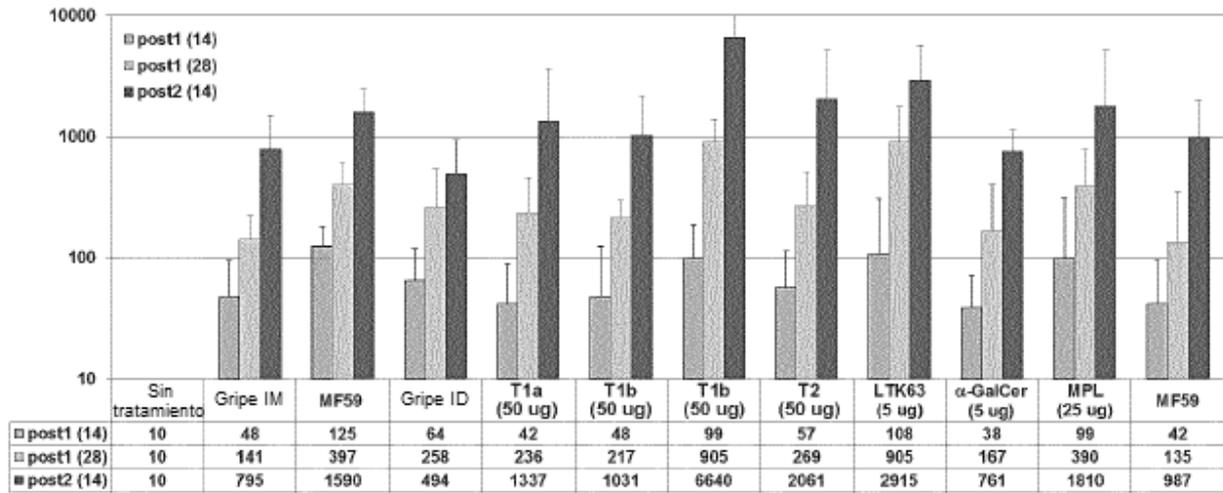


FIG. 3

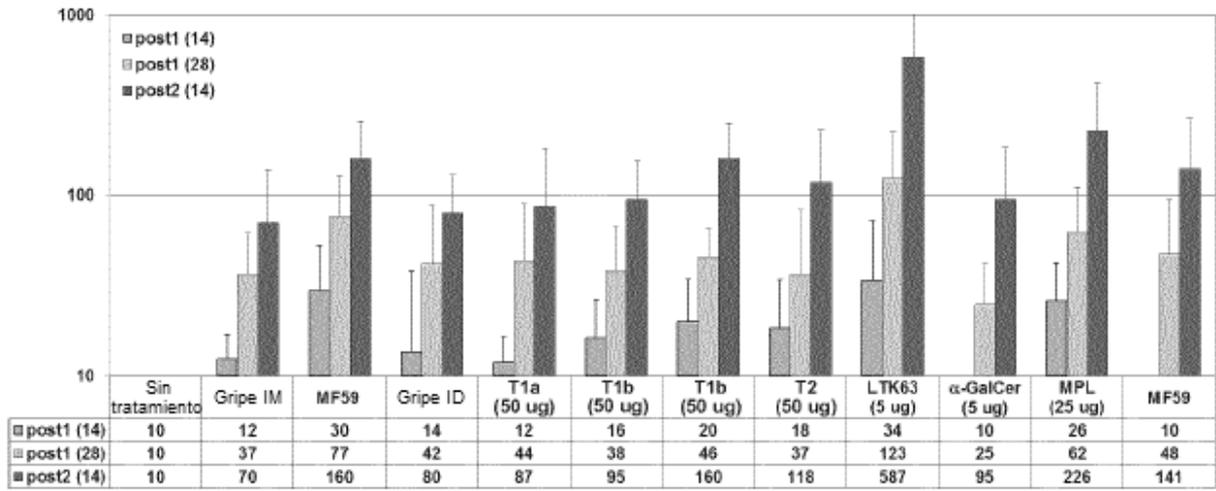


FIG. 4

