



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 692 068**

⑮ Int. Cl.:

A61K 9/48 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013** **PCT/US2013/031483**
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13148258**
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013** **E 13769010 (3)**
⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2830599**

⑮ Título: **Formulaciones para vacunación oral específica a sitio gastrointestinal activas sobre el íleo y el apéndice**

⑩ Prioridad:

29.03.2012 US 201261617367 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2018

⑦ Titular/es:

THERABIOME, LLC (100.0%)
6 Jack Lane
Marlboro NJ 07746, US

⑦ Inventor/es:

SCENTAG, JEROME, J. y
KABADI, MOHAN

⑦ Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 692 068 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

Formulaciones para vacunación oral específica a sitio gastrointestinal activas sobre el íleo y el apéndice

5 **Campo de la invención**

La invención proporciona formulaciones de vacuna oral que administra un antígeno en la proximidad del íleo distal (en ciertas realizaciones, en el colón, en la proximidad del apéndice) y el área del freno ileal. Estas vacunas son útiles en el tratamiento y/o prevención de diversidad de trastornos, incluyendo infecciones víricas y bacterianas y 10 cánceres.

También se proporcionan métodos de tratamiento relacionados que usan las formulaciones de vacuna oral de la invención.

15 **Antecedentes de la invención**

El tracto gastrointestinal (GI) tiene varias regiones claramente demarcadas por el pH local que oscila de 5,5 a 8,2. El íleo distal además contiene excepcionalmente una región en la que el pH habitual está entre 7,3 y 8,2. Particularmente, este área está relativamente desprovisto de rutas de degradación para antígenos tales como 20 construcciones de vacuna, incluso mucho más sensible a su presencia.

Muchos antígenos se degradan por las condiciones ácidas y proteolíticas del estómago y el tracto GI anterior, las condiciones que hacen a la vacunación oral poco factible a casi imposible desde un punto de vista técnico. Por tanto, el íleo distal y el área del freno ileal, que es óptimo para un sensor de control para el equilibrio nutricional, también 25 contiene excepcionalmente tanto las condiciones de pH óptimas para la vacunación (estabilidad de la sustancia antigénica) como contiene numerosas células sensoriales (tales como placas de Peyer), que ayudan a definir la respuesta del sistema inmune a los patógenos invasores extraños y en algunos casos, tumores.

30 El apéndice, a modo de ejemplo en la técnica, es un sensor especializado localizado distal al íleo en el colon derecho. Contiene tejido linfoide y se ha creído durante mucho tiempo que está implicado en la activación de la respuesta del linfocito B a antígenos de todos los tipos. Debido a la inaccesibilidad relativa a formulaciones, ni el íleo distal ni el apéndice se han usado como sitio objetivo para la vacunación oral, y aunque el uso de estas áreas del tejido linfoide son objetivos lógicos para la administración de vacuna, se ha creído imposible de alcanzar.

35 Por consiguiente, existe la necesidad de vacunas orales que sean capaces de administración eficaz de una amplia diversidad de antígenos en la región del íleo distal y el freno ileal, evitando de ese modo la degradación del antígeno encontrada con vacunas de dosificadas oralmente conocidas.

Compendio de la invención

40 En una realización, la invención proporciona una formulación de vacuna oral que administra un antígeno en la proximidad del íleo distal, comprendiendo la formulación:

45 (a) una pluralidad de núcleos, cada uno de los cuales comprende:

(1) un antígeno;
 (2) un primer revestimiento entérico que encapsula el antígeno, el cual es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,6, y el cual preferiblemente está comprendido por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en poli(dl-láctido-co-glicólido, 50 quitosano (Chi) estabilizado con APV (alcohol poli-vinílico), un lípido, un alginato, carboximetiletilcelulosa (CMEC), celulosa acetato trimelitato (CAT), hidroxipropilmelcelulosa ftalato (HPMCP), hidroxipropilmelcelulosa, etil celulosa, colorcon, glaseado alimenticio y mezclas de hidroxipropilmelcelulosa y etil celulosa, polivinil acetato ftalato (PVAP), celulosa acetato ftalato (CAP), shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo a los cuales se ha añadido un monómero de acrilato de etilo durante la polimerización; y opcionalmente
 (3) un segundo revestimiento entérico que es composicionalmente igual o diferente del primer revestimiento, el cual es básicamente insoluble en un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0, el cual está contenido dentro del revestimiento de encapsulación de la primera formulación, y el cual preferiblemente está comprendido por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en polivinil acetato ftalato (PVAP), celulosa acetato ftalato (CAP), shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo al cual se ha añadido un monómero de acrilato de etilo durante la polimerización; y opcionalmente

65 (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un virus inactivado o fragmento adecuado antígeno del mismo (por ejemplo, un fragmento peptídico que tiene un epítopo que provoca una respuesta inmunogénica en un paciente) seleccionado del grupo que consiste en *Adenoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Herpadnaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papovaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, adenovirus, herpes simplex, 5 varicella zóster, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la gripe de tipo H 1-7 y tipo N 1-9, virus del papiloma humano, virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, poliovirus, virus Coxsackie, rinovirus, vacuna, viruela, rotavirus, virus-1 linfotrópico T humano, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la rabia, virus de la rubeola, arbovirus, enterovirus tales como polio, cocksackie, virus de Ebstein-Barr, citomegalovirus (CMV), mononucleosis, rotavirus, virus de Norwalk, y virus de la Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C; 10 o

(b) patógenos intracelulares inactivados o fragmentos adecuados antígenos parásitos de los mismos (por ejemplo, un fragmento peptídico como se describió anteriormente) seleccionados del grupo que consiste en *Afipia spp*, *Brucella spp*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia*, *Coxiella burnetti*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rickettsiae*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*, *Plasmodium spp*, *Theileria parva*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y *Cryptococcus neoformans*, *Giardia*, *Cryptosporidia*; o

(c) inactivados o fragmentos adecuados antígenos de un antígeno transmitido por vector que incluye *Plasmodium* o *borrelia*; o

(d) bacterias inactivadas o fragmentos adecuados antígenos de las mismas que incluyen cólera, salmonela, *Shigella*, *Campylobacter*, *Leptospirosis*, *Helicobacter pylori* y *E. coli* enterotoxigénica incluyendo *E. coli* 0157, y *Listeria spp*, o bacterias patógenas humanas o fragmentos adecuados antígenos de bacterias que incluyen *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*; o

(e) un antígeno relacionado con cáncer o derivado de célula cancerosa, que incluye, pero no se limita a, antígenos relacionados con cáncer seleccionados del grupo que consiste en el antígeno NY-ESO-1 para tumores de vejiga, 25 cerebro, mama, esofágicos, gastrointestinales, hepatocelulares, de riñón, pulmón, melanoma, de ovario, próstata, sarcoma, cervical y uterino, gangliósido GD2, mimotopo 47-LDA de GD2, proteínas de choque térmico, antígenos de testículos cancerosos (TC), antígeno de cáncer de ovario epitelial (COE); la vacuna terapéutica de Oncothyreon ONT-10, dirigida a MUC1, y otras vacunas terapéuticas dirigidas de Oncothyreon con o sin el lípido A PET 30 adyuvante acompañante; y otros antígenos relacionados con cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario, cervical, pancreático, hepatocelular, de colon, mama, pulmón, y cerebro) específicamente descritos o si no revelados en referencias citadas en el presente documento.

En una realización preferida, el antígeno es un virus o bacteria viva atenuada.

35 En una realización preferida, el antígeno está acompañado en la formulación oral por un adyuvante específico que se propone aumentar la respuesta inmune resultante del antígeno, y liberado en el íleo del sujeto mediante la formulación como se ilustra en las figuras 2 a 3.

40 En otra realización más: (1) el antígeno se combina con (por ejemplo, se mezcla con) un adyuvante no específico que puede servir como una sustancia liberadora de hormona de freno ileal que es una sustancia seleccionada del grupo que consiste en azúcares, ácidos grasos libres, polipéptidos, aminoácidos, y composiciones que producen azúcares, ácidos grasos libres, polipéptidos, o aminoácidos tras la digestión; y (2) el antígeno combinado y la sustancia liberadora de hormona de freno ileal están encapsulados por el primer revestimiento entérico.

45 En otra realización más, la invención proporciona una formulación de vacuna oral que administra un antígeno en la proximidad del íleo distal, comprendiendo la formulación:

(a) una primera población núcleo que comprende una pluralidad de núcleos, cada uno de los cuales comprende:

50 (1) un antígeno y opcionalmente, un adyuvante;

(2) un primer revestimiento entérico que encapsula el antígeno y el adyuvante opcional, el cual es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,6, y el cual está preferiblemente comprendido por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en polí(diláctido-co-glicólido), quitosano (Chi) estabilizado con APV (alcohol polivinílico), un lípido, un alginato, carboximetiletilcelulosa (CMEC), celulosa acetato trimelitato (CAT), hidroxipropilmetilcelulosa ftalato (HPMCP), hidroxipropilmetilcelulosa, etil celulosa, colorcon, glaseado alimenticio y mezclas de hidroxipropilmetilcelulosa y etil celulosa, polivinil acetato ftalato (PVAP), celulosa acetato ftalato (CAP), shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo a los cuales se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización; y opcionalmente (véase las figuras 4 a 6)

(3) una dosificación dirigida a apéndice adicional del antígeno y el adyuvante opcional, en la que un segundo revestimiento entérico que es composicionalmente igual o diferente del primer revestimiento, el cual es básicamente insoluble en un pH de menos de un intervalo de aproximadamente 5,5, y el cual preferiblemente está comprendido por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo a los cuales se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización para asegurar la liberación de los contenidos a pH 5,5 a 6,0;

(b) una segunda población núcleo que comprende una pluralidad de núcleos, cada uno de los cuales comprende:

- (1) el antígeno y un adyuvante opcional; y
 5 (2) un revestimiento entérico que encapsula el antígeno, el cual es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5, y el cual preferiblemente está comprendido por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo a los cuales se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización; y opcionalmente

10 (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización más, la invención proporciona una formulación de vacuna oral que administra un antígeno en la proximidad del apéndice y/o el colon derecho de una manera ilustrada en las figuras 4 a 6, por ejemplo, comprendiendo la formulación:

15 (a) una pluralidad de núcleos, cada uno de los cuales comprende:

- (1) un antígeno y opcionalmente un adyuvante;
 20 (2) una primera capa revestimiento o interior que (i) es entérica (ii) encapsula el antígeno y el adyuvante opcional (iii) es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0, y (iv) la cual está preferiblemente comprendida por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo a los cuales se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización;
 25 (3) opcionalmente, una segunda capa de revestimiento que encapsula la primera capa de revestimiento entérica y que comprende una sustancia nutricional seleccionada del grupo que consiste en azúcares, ácidos grasos libres, polipéptidos, aminoácidos y composiciones que producen azúcares, ácidos grasos libres, polipéptidos, o aminoácidos tras la digestión que puede funcionar como adyuvante; y
 30 (4) una segunda/tercera capa de revestimiento que (i) es entérica (ii) encapsula la primera o segunda capa de revestimiento (iii) es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,6, y (iv) la cual está preferiblemente comprendida por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en poli(dl-láctido-co-glicólido), quitosano (Chi) estabilizado con APV (alcohol poli-vinílico), un lípido, un alginato, carboximetiletilcelulosa (CMEC), celulosa acetato trimelitato (CAT), hidroxipropilmelcelulosa ftalato (HPMCP), hidroxipropilmelcelulosa, etil celulosa, colorcon, glaseado alimenticio y mezclas de hidroxipropilmelcelulosa y etil celulosa, polivinil acetato ftalato (PVAP), celulosa acetato ftalato (CAP), shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo a los cuales se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización; y opcionalmente

40 (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización de una formulación de vacuna oral como se describe en el presente documento, los núcleos están preparados en forma de micropartículas que tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 1 nanómetro a aproximadamente 100 micras de diámetro (como se expone en la figura 5, por ejemplo).

45 En una realización de una formulación de vacuna comprende una primera y segunda población núcleo como se describe en el presente documento y como se ilustra en la figura 5, por ejemplo, los núcleos de la primera población núcleo y la segunda población núcleo son micropartículas, el diámetro promedio de los núcleos de la primera población núcleo es mayor que el diámetro promedio de los núcleos de la segunda población núcleo, los núcleos de la segunda población núcleo tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 1 nanómetro a aproximadamente 99 micras de diámetro, y los núcleos de la primera población núcleo tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 2 nanómetros a aproximadamente 100 micras.

55 Los núcleos descritos en el presente documento pueden comprender un componente inerte, por ejemplo, perlas de nonpareil o un polímero biocompatible como se describe más adelante en el presente documento.

55 En otra realización, los núcleos son nanopartículas y el diámetro medio de los núcleos está entre 0,5 y 100 nm, más preferiblemente entre 1 y 50 nm, y aún más preferiblemente entre 1 y 20 nm. El diámetro medio se puede medir usando técnicas bien conocidas en la técnica tales como la microscopía electrónica de transmisión.

60 En otra realización más, la invención proporciona métodos de tratamiento y/o prevención de trastornos víricos, patógenos, parasitarios, bacterianos, asociados a transmisión por vector, o relacionados con el cáncer mediante la administración a un sujeto en necesidad de los mismos de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una formulación de vacuna oral comprendida por un antígeno apropiado y de otra manera como se describe en el presente documento.

65 Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un método de provocación de una respuesta inmune a un

antígeno vírico, bacteriano, parasitario, microbiano o asociado a cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una formulación de vacuna oral comprendida por un antígeno apropiado y de otra manera como se describe en el presente documento.

- 5 En otra realización, la invención proporciona un método de provocación de una respuesta inmune a un antígeno asociado a cáncer en un sujeto, comprendiendo el método coadministrar al sujeto una formulación de vacuna oral comprendida por un antígeno anticanceroso apropiado como se describe en el presente documento y una o más proteínas de choque térmico.
- 10 Estos y otros aspectos de la invención se describen más en la Descripción detallada de la invención.

Breve descripción de las figuras

- 15 La Figura 1 es un esquema de liberación entérica convencional - objetivo duodenal, que es proximal al nuevo objetivo para la vacunación oral según la presente invención.
- La Figura 2 representa la administración al freno ileal de vacunas: pH objetivo para la liberación es de aproximadamente 7,2 a 7,5. Los aspectos de la localización del tracto GI y los pH objetivos en el íleo están proporcionados en el diagrama.
- 20 La Figura 3 ilustra el detalle de formulación aplicado para asegurar la liberación al íleo de los antígenos vacuna reivindicados y algunos adyuvantes y/o sustancias liberadoras de hormona de freno ileal que comprende la vacuna. La propia formulación puede ser mezclas de microgránulos, gránulos o polvos, cada uno de los cuales se pueden combinar dentro de la formulación y proteger por el revestimiento hasta que alcance el valor de pH por encima de 7,3 y el objetivo de la liberación GI al menos inicialmente en el íleo.
- 25 La Figura 4 ilustra que debido a la liberación del revestimiento entérico a pH 5,5 solo se dirige al duodeno y el antígeno liberado en el duodeno no sobreviviría al tránsito para alcanzar el colon, la administración en colon derecho y apéndice requiere una píldora exterior y una interior. La estrategia de la píldora interior es requerida para evitar el duodeno con el revestimiento exterior que se disuelve solamente a pH de aproximadamente 7,3 a 7,6, el cual puede liberar sus contenidos activos, si es necesario, en el íleo. De ese modo, la píldora interior se libera intacta en el íleo, pero no se disuelve allí; pasa dentro del colon donde el pH es 5,5 a 6,0 y en el que libera sus contenidos.
- 30 La Figura 5 ilustra el concepto de "píldora de vacuna dentro de una píldora de vacuna": liberación dirigida en freno ileal (pH 7,3 a 7,5) y liberación en colon/apéndice de la píldora de vacuna interior, la cual contiene la formulación de vacuna para la liberación dirigida en apéndice a pH de aproximadamente 5,5 a 6,2.
- 35 La Figura 6 ilustra los dos nuevos sitios de disolución gastrointestinal de la píldora de vacuna dentro de una píldora de vacuna.

Descripción detallada de la invención

- 40 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "una" y "el", "la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un compuesto" u otro elemento de la presente invención incluye una pluralidad (por ejemplo, dos o más elementos) de tales elementos, y demás. En ninguna circunstancia se ha de interpretar que la patente está limitada a los ejemplos o realizaciones específicas o métodos específicamente descritos en el presente documento.

- 45 El término "compuesto", como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a cualquier compuesto químico específico, incluyendo un antígeno descrito en el presente documento e incluye tautómeros, regioisómeros, isómeros geométricos, y cuando sea aplicable, sus isómeros ópticos, así como sus sales farmacéuticamente aceptables. Dentro de su uso en el contexto, el término compuesto generalmente se refiere a un compuesto sencillo, incluyendo un antígeno, pero también puede incluir otros compuestos como estereoisómeros, regioisómeros y/o isómeros ópticos (incluyendo mezclas racémicas) así como enantiómeros específicos o mezclas enantioméricamente enriquecidas de compuestos descritos.

- 55 El término "antígeno" o "inmunógeno" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto (por ejemplo, péptido, carbohidrato, fragmento de una célula, un microbio o un virus (con frecuencia atenuado o inactivo), o fragmento de ADN o ARN que se puede usar para provocar una respuesta inmunogénica en el apéndice o el íleo de un paciente al que se administran las presentes composiciones. Hay que indicar que los fragmentos de ADN o ARN se consideran antígenos en ciertas estrategias de vacuna o se pueden administrar para expresar un antígeno, cada uno de los cuales se define por lo demás como un compuesto en el presente documento. El término "composición antigénica" se refiere a una composición que contiene uno o más antígenos. Las composiciones 60 antigenicas se usan para generar una respuesta inmunogénica en un paciente o sujeto tras la administración o introducción.

- 65 Hay que indicar que la presente invención contempla la administración de composiciones antigenicas que comprenden microbios atenuados (especialmente incluyendo bacterias) o virus que están diseñados para provocar una respuesta inmunogénica sin causar enfermedad. La cepas de vacuna de microbios o virus atenuados son especies intrínsecamente invasivas, en muchos casos altamente virulentas y pueden causar enfermedades graves

- con incluso un pequeño inóculo tan pequeño como 10^3 . Por consiguiente, las cepas de microbios vacuna, en particular, bacterias, nunca se dan en grandes cantidades, preferiblemente entre aproximadamente 10^2 a aproximadamente 5×10^4 , o aproximadamente 10^2 a aproximadamente 5×10^3 microbios por dosis, incluso a superficies no estériles tales como el tracto gastrointestinal humano, debido a la probabilidad de que grandes números causasen enfermedad invasiva y/o daño tisular. Además, las cepas bacterianas que se usan en la presente invención son o bien inactivas o atenuadas. El uso de microbios atenuados, incluyendo bacterias atenuadas, para provocar una respuesta inmunogénica en un paciente o sujeto se encuentra en contraste con el uso de una bacteria viva, por ejemplo, una población bacteriana probiótica que se administra a un sujeto para un fin completamente diferente y que tiene características básicamente diferentes de la presente invención. En el caso de la administración de organismos probióticos, los organismos están vivos y animados y se administran en grandes cantidades (hasta aproximadamente 10^2 organismos o más) para reposar el tracto gastrointestinal de un paciente o sujeto con los organismos. Por tanto, la naturaleza del organismo y el número de organismos a administrar en una estrategia de reposición tal como se usa con probióticos se colocan en completo contraste al uso de microbios, incluyendo microbios atenuados, para provocar una respuesta inmunogénica conforme a la presente invención.
- Un antígeno preferido puede o no puede contener una sustancia adyuvante, pero en cualquier caso de la aplicación por los expertos en la técnica debe demostrar una respuesta protectora suficiente en el paciente al cual se da.
- El término "paciente" o "sujeto" se usa a lo largo de la memoria dentro del contexto para describir un animal, generalmente un mamífero, incluyendo con frecuencia un animal domesticado (incluyendo animales de granja), pero o un animal de ensayo de laboratorio y preferiblemente un ser humano, al cual se proporciona tratamiento, incluyendo tratamiento profiláctico, con las composiciones y/o métodos según la presente invención. Para el tratamiento de una afección particular o patología que es específica para un animal específico tal como un paciente humano, el término paciente se refiere al animal específico.
- El término "eficaz" se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, para describir una cantidad de un compuesto, composición o componente y durante un periodo apropiado de tiempo de exposición que, en el contexto, se usa para producir o efectuar un resultado deseado, si ese resultado se relaciona con la provocación de una respuesta inmunogénica, provocando una respuesta inmune específica al antígeno administrado, o si ese resultado se relaciona con el tratamiento o prevención/profilaxis de un trastorno o afección asociada con la presente invención o alternativamente, se usa para producir otro compuesto, agente o composición. Este término subsume todos los otros términos de cantidad eficaz o de concentración eficaz que son por lo demás descritos en la presente solicitud.
- Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en el intervalo indicado es abarcado dentro de la invención. También se abarca dentro de la invención los límites superiores e inferiores de estos intervalos menores que se pueden incluir independientemente en los intervalos menores, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera de ambos de aquellos límites incluidos también son incluidos en la invención.
- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por el experto en la técnica a la cual pertenece esta invención.
- Aunque algunos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento también se usan en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen más adelante.
- El término "sustancia nutricional" se usa de manera sinónima a "composición farmacéutica" y "sustancia liberadora de hormona de freno ileal" en ciertos contextos en el presente documento y se refiere a la sustancia que produce el efecto deseado en el íleo de un paciente o sujeto conforme a la presente invención.
- Una "sustancia nutricional" incluye, pero no se limita a, proteínas y aminoácidos asociados, grasas que incluyen grasas saturadas, grasas monosaturadas, grasas poliinsaturadas, ácidos grasas básicos, ácidos grasos Omega-3 y Omega-6, ácidos grasos trans, colesterol, sustitutos de grasa, carbohidratos tales como fibra dietética (fibra tanto soluble como insoluble), almidón, azúcares (incluyendo monosacáridos, fructosa, galactosa, glucosa, dextrosa, disacáridos, lactosa, maltosa, sacarosa, y alcohol), azúcares poliméricos que incluyen inulina y polidextrosa, sustitutos naturales del azúcar (incluyendo brazzeína, curculina, eritritol, fructosa, glicirrizina, glicirrizina, glicerol, hidrosilatos de almidón hidrogenados, maltosa, isomaltosa, lactitol, mabinlina, maltitol, manitol, miraculina, monelina, pentadina, sorbitol, estevia, tagatosa, taumatina y xilitol), sahlep, y extracto de raíz de halwa. La D-glucosa (dextrosa) es una sustancia nutricional preferida. Las sustancias nutricionales incluyen todas las composiciones que proporcionan los nutrientes anteriormente mencionados tras la digestión o que contienen tales nutrientes, incluyendo las formas poliméricas de estos nutrientes.
- Componentes nutricionales adicionales que se pueden incluir en las composiciones según la presente invención incluyen, cebada, conocida por ser un fuente rica de vitaminas altamente metabolizables y minerales tales como

vitaminas A, B1, B2, B6 y C, potasio, magnesio y zinc. Además, la cebada también tiene una alta concentración de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual se ha mostrado que tiene altos niveles de actividad antioxidante. La cebada y derivados se clasifican como "Generally Regarded Safe" (Generalmente Considerados como Seguros) (GRAS) por la FDA. La cebada se cree que es un nutriente importante en la regulación del proceso digestivo debido a que se cree que los micronutrientes, enzimas (por ejemplo, SOD), y fibra contenidos en la cebada mejoran las funciones inmunes intestinales y de reparación.

5 El té de hoja de alfalfa fresca o seca también es utilizable en la invención, para estimular el apetito, y como buena fuente de clorofila y fibra. La Alfalfa contiene biotina, calcio, colina, inositol, hierro, magnesio, PABA, fosforo, potasio,

10 proteína, sodio, azufre, triptófano (aminoácido), y vitaminas A, complejo B, C, D, E, K, P y U. Los suplementos de alfalfa se recomiendan para tratar la mala digestión, y se muestran que bajan los niveles de colesterol en estudios con animales. La alfalfa se clasifica como "Generally Regarded Safe" (Generalmente Considerada como Segura) (GRAS) por la FDA. Las dosis pueden oscilar desde 25 a 1.500 mg, preferiblemente 500 a 1.000 mg de hoja secada por día.

15 15 La Chlorella es otra sustancia más utilizable en la invención en combinación con la sustancia nutricional (preferiblemente D-glucosa o dextrosa), que es un género de alga verde unicelular, crecida y cultivada en tanques, purificada, procesada y secada para formar un polvo. La Chlorella es rica en clorofila, carotenos y contiene el complejo de vitamina B completo, vitaminas E y C, y tiene un amplio rango de minerales, incluyendo magnesio, 20 potasio, hierro y calcio. La Chlorella también proporciona fibra dietética, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas, CGF (Factor de Crecimiento de la Chlorella) y otras sustancias. Las dosis pueden oscilar de 300 a 1.500 mg/día.

25 La Clorofilina es otra sustancia nutricional más, que es un aditivo alimenticio conocido y se ha usado como una medicina alternativa. La Clorofilina es un derivado de sodio/cobre semisintético, soluble en agua de la clorofila, y el principio activo en un número de preparaciones internamente tomadas previstas para reducir olores asociados con procedimientos de incontinencia, colostomías y similares, así como olor corporal en general. También está disponible como una preparación tópica, supuestamente útil para el tratamiento y el control del olor de heridas, 30 lesiones y otras afecciones de la piel, tales como para quemaduras por radiación.

30 30 El alginato de sodio también se puede usar como una sustancia nutricional, preferiblemente en combinación con D-glucosa o dextrosa.

35 El término "íleo" se usa para describir la tercera (de tres) parte del intestino delgado justo antes de que el intestino delgado llegue a ser el intestino grueso en el tracto gastrointestinal. El íleo es la sección final del intestino delgado en la mayoría de los vertebrados superiores, incluyendo mamíferos. El íleo sigue al duodeno y yeyuno en el intestino delgado, y está separado del "Ciego" por la válvula ileocecal (VIC). En seres humanos, el íleo es de aproximadamente 2 a 4 metros de longitud, y el pH normalmente oscila entre 7 y 8 (neutro o ligeramente alcalino). La función del íleo es principalmente absorber la vitamina B12, sales biliares y cualquier producto de la digestión que no fue absorbido por el yeyuno. La propia pared está compuesta por pliegues, cada uno de los cuales tiene muchas 40 proyecciones similares a pequeños dedos conocidos como "vellosidades" sobre su superficie. Sucesivamente, las células epiteliales que cubren estas vellosidades poseen incluso mayores números de microvellosidades. Las áreas dentro de estas vellosidades contienen los componentes importantes del sistema inmune denominados placas de Peyer. Las células del SNED (sistema neuroendocrino difuso) que recubren el íleo contienen cantidades menores de las enzimas proteasa y carbohidrata (gastrina, secretina, colecistoquinina) responsables de las fases finales de la 45 digestión de proteína y carbohidrato. Estas enzimas están presentes en el citoplasma de las células epiteliales.

50 Retrasar la liberación *in vivo* de la mayoría de la sustancia nutricional y/o antígeno hasta que la forma farmacéutica alcance el íleo del sujeto o el apéndice y el colon derecho significa: (1) que no menos de alrededor el 50 % en peso, no menos de alrededor del 70 % en peso, más preferiblemente no menos de alrededor del 80 % en peso, y más preferiblemente no menos de alrededor del 90 %, de la sustancia nutricional y/o antígeno permanece sin liberarse *in vivo* antes de la llegada de la forma farmacéutica al íleo o apéndice y colon derecho de un sujeto; y (2) que no menos de alrededor del 50 %, no menos de alrededor del 70 % en peso, más preferiblemente no menos de alrededor del 80 % en peso, y más preferiblemente no menos de alrededor del 90 %, de la sustancia nutricional permanece sin liberarse *in vivo* para cuando la forma farmacéutica entra en el íleo o apéndice y colon derecho del sujeto.

55 En aspectos preferidos de la invención esta cantidad de sustancia nutricional es al menos aproximadamente 1 gramo, al menos aproximadamente 2,5 gramos, al menos aproximadamente 3 gramos, al menos aproximadamente 5 gramos, al menos aproximadamente 7,5 gramos, preferiblemente aproximadamente 10 gramos a aproximadamente 12 a 12,5 gramos o más (aproximadamente 12,5 a aproximadamente 20 gramos, especialmente de materiales poliméricos tales como polidextrosa u otros compuestos de mayor peso molecular) de la sustancia nutricional y en particular, glucosa, se libera dentro del intestino delgado en el íleo para estimular las hormonas del íleo y hormonas relacionadas y lograr un resultado secundario asociado con la inducción de la saciedad y/o la influencia de una o más de resistencia a insulina (disminuir la resistencia), azúcar en sangre (disminuir /estabilizar los niveles de glucosa), leptina (incrementar), secreción de glucagón (disminuir), liberación de insulina (disminuir y/o estabilizar la liberación y/o niveles), liberación de hormona de íleo (incrementar) u otra liberación de hormona, en

particular, una o más de GLP-1, glicentina, GLP-1 extendida a glicina C-terminalmente (7 37), (PG (78 108); C-peptido, péptido-2 intermedio (PG (111 122) amida); GLP-2 (PG (126 158), GRPP (PG (1 30), oxintomodulina (PG (33 69), y otras fracciones peptídicas para ser aisladas, PYY (1-36), PYY (3-36), colecistoquinina (CCK), gastrina, enteroglucagón, secretina, así como leptina, IGF-1 y IGF-2, y preferiblemente, una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, o todas de GLP1, GLP2, C-peptido, PYY (1-36 y/o 3-36), glucagón, leptina, IGF-1 y IGF-2.

En la presente invención todos los antígenos, adyuvantes y principios activos coadministrados se usan en cantidades eficaces para proporcionar actividad relevante al uso del compuesto. Por ejemplo, en terapia de combinación, un antígeno canceroso, un adyuvante opcional y agente de liberación de hormona de freno ileal opcional se usan todos en cantidades eficaces. La cantidad de tales composiciones usadas en la presente invención puede variar según la naturaleza de la composición, la edad y el peso del paciente y otros numerosos factores que pueden influir en la biodisponibilidad y las farmacocinéticas de la composición, la cantidad de la composición que se administra a un paciente generalmente oscila de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg o más, aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg/kg por día y de otra manera descrito en el presente documento. El experto puede reconocer fácilmente las variaciones en los calendarios de dosificación o las cantidades a realizar durante el trascurso de la terapia.

El término "hormonas del íleo" incluye todas las hormonas que están asociadas con sustancias alimenticias intraluminales que estimulan la liberación de dichas hormonas, podrían estar asociadas con la retroalimentación de saciedad a partir del íleo o estimulación relacionada con el íleo de la secreción de insulina o inhibición de la secreción de glucagón. Por lo tanto, las "hormonas del íleo" incluyen, pero no se limitan a, GLP-1, glicentina, GLP-1 extendida a glicina C-terminalmente (7 37), (PG (78 108); péptido-2 intermedio (PG (111 122) amida); GLP-2 (PG (126 158), GRPP (PG (1 30)), oxintomodulina (PG (33 69), y otras fracciones peptídicas a aislar, PYY (PYY 1-36) y (PYY 3-36), colecistoquinina (CCK), gastrina, enteroglucagón y secretina.

El término "cantidad estimulante de la hormona de íleo de una sustancia nutricional" o "sustancia liberadora de hormona de freno ileal" significa cualquier cantidad de una sustancia nutricional que es eficaz para inducir la liberación de la hormona medible en el íleo, particularmente en ciertos aspectos de la presente invención la producción de interferón (IFN) y la reducción de la liberación de endotoxina. Muchas de las hormonas del freno ileal inducen saciedad en el paciente mediante retroalimentación a partir del íleo o estimulación relacionada con el íleo de la secreción de insulina o inhibición de la secreción de glucagón, u otros efectos tales como parada o disminución de la resistencia a insulina e incrementación de la tolerancia a glucosa. Por consiguiente, una "cantidad estimulante de la hormona del íleo de una sustancia nutricional" puede variar mucho en dosis dependiendo de los factores tales como el nutriente específico en cuestión, el efecto deseado de administración, el objetivo deseado de minimizar la ingesta calórica, y las características del sujeto al que se administra la sustancia nutricional. Por ejemplo, se usa al menos aproximadamente 500 mg de D-glucosa, y una cantidad estimulante de hormona del íleo particularmente preferida de D-glucosa incluye entre aproximadamente 7,5 a 8 g a aproximadamente 12 a 12,5 g (preferiblemente alrededor de 10 g).

Las formas farmacéuticas usadas en los métodos de la invención pueden estar en forma adecuada para el uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, grajeas, suspensiones, microsuspensiones, polvos dispersables o gránulos, emulsiones, microemulsiones, cápsulas duras o blandas. Las formas farmacéuticas útiles incluyen sistemas de administración osmótica como se describe en los documentos de Patente americana N.º 4.256.108; 5.650.170 y 5.681.584, sistemas multiparticulados como se describe en el documento de Patente americana N.º 4.193.985; sistemas en los que la sustancia nutricional se reviste con una película mezclada de un compuesto orgánico hidrófobo-polímero entérico como se describe en el documento de Patente americana N.º 6.638.534; sistemas tales como los descritos en los documentos de Patente americana N.º 7.081.239; 5.900.252; 5.603.953; y 5.573.779; formulaciones de emulsión seca revestidas entéricas (por ejemplo, *Journal of Controlled Release*, vol. 107, artículo 1 20 de Septiembre, páginas 91-96), y emulsiones tales como el sistema de emulsión de Olibra® y las descritas en el documento de Patente americana N.º 5.885.590. Los expertos en la técnica anterior saben cómo formular estas diversas formas farmacéuticas y modificar estas formas de modo que liberen la mayoría de su sustancia nutricional en el íleo o duodeno de un sujeto como por lo demás se describe en el presente documento ajustando las características de solubilidad y pH de liberación de las formas farmacéuticas una vez que la presente invención llegue a ser conocida para ellos.

Formas farmacéuticas como ejemplo que liberarán la mayoría de la sustancia nutricional *in vivo* tras alcanzar el íleo incluyen formas farmacéuticas orales tales como comprimidos, trociscos, grajeas, polvos o gránulos dispersables, o cápsulas duras o blandas que están formadas revistiendo la sustancia nutricional con un revestimiento entérico (por ejemplo, un derivado de la celulosa entérico, un copolímero acrílico entérico, un copolímero maleico entérico, un derivado de polivinilo entérico, o shellac). Los revestimientos entéricos preferidos tienen un perfil de disolución de pH que retrasa la liberación *in vivo* de la mayoría de la sustancia nutricional hasta que la forma farmacéutica alcanza el íleo. Los revestimientos entéricos pueden consistir en una composición única, o pueden comprender dos o más composiciones, por ejemplo, dos o más polímeros o composiciones de compuesto orgánico hidrófobo-polímero entérico como se describe en el documento de Patente americana N.º 6.638.534).

Un material que tiene un perfil de disolución de pH que retrasa la liberación *in vivo* de la mayoría de la sustancia nutricional y/o antígeno hasta que la forma farmacéutica alcanza el íleo, íleo distal o colon en la proximidad del apéndice incluye pero no se limita a celulosa acetato trimelitato (CAT), hidroxipropilmelcelulosa ftalato (HPMCP), polivinil acetato ftalato (PVAP), celulosa acetato ftalato (CAP), shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo al cual se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización, una mezcla del complejo de amilosa-butan-1-ol (amilosa vítreo) con dispersión acuosa de Ethocel® (Milojevic y col., *Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* 20, 288, 1993), una formulación de revestimiento que comprende un revestimiento interior de amilosa vítreo y un revestimiento exterior de celulosa o material de polímero acrílico (Allwood y col. GB 9025373.3), pectinato de calcio (Rubenstein y col., *Pharm. Res.*, 10, 258, 1993) pectina, sulfato de condroitina (Rubenstein y col. *Pharm. Res.* 9, 276, 1992), almidones resistentes (PCT WO 89/11269), hidrogeles de dextrano (Hovgaard, y col., *3rd Eur. Symp. Control. Drug Del.*, Abstract Book, 1994, 87) goma guar modificada tal como goma guar modificada con bórax, (Rubenstein y Gliko-kabir, S.T.P. *Pharma Sciences* 5, 41-46, 1995), beta-ciclodextrina (Sidke y col., *Eu. J. Pharm. Biopharm.* 40 (supl), 335, 1994), polímeros que contienen sacárido, por ejemplo, una construcción polimérica que comprende un biopolímero que contiene oligosacárido sintético incluyendo polímeros metacrílicos covalentemente acoplados a oligosacáridos tales como celobiosa, lactulosa, rafinosa y estaquiosa, o que contienen sacárido, polímeros naturales incluyendo mucopolisacáridos modificados tales como pectato reticulado (Sintov y Rubenstein PCT/US 91/03014); metacrilato-galactomanano (Lehmann y Dreher, *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 18, 331, 1991) e hidrogeles sensibles a pH (Kopecek y col., *J. Control. Rel.* 19, 121, 1992), y almidones resistentes, por ejemplo, amilosa vítreo.

Los metacrilatos de metilo o copolímeros de ácido metacrílico y metacrilato de metilo son materiales preferidos que tienen un perfil de disolución de pH que retrasa la liberación *in vivo* de la mayoría del antígeno hasta que la forma farmacéutica alcanza el apéndice y/o el colon derecho. Tales materiales están disponibles como polímeros Eudragit® (Rohm Pharma, Darmstadt, Alemania). Por ejemplo, se pueden usar Eudragit® L100 y Eudragit® S100, o bien solos o en combinación. Eudragit® L100 se disuelve a pH 6 para arriba y comprende 48,3 % de unidades de ácido metacrílico por g de sustancia seca; Eudragit® S100 se disuelve a pH 7 para arriba y comprende 29,2 % de unidades de ácido metacrílico por g de sustancia seca. Generalmente, el polímero de encapsulamiento tiene una cadena principal polimérica y ácido u otros grupos funcionales solubilizador. Los polímeros que se han encontrado adecuados con el fin de la presente invención incluyen poliacrilatos, polímero de acrilato cíclico, ácidos poliacrílicos y poliacrilamidas. Otro grupo preferido de polímeros de encapsulamiento son los ácidos poliacrílicos Eudragit® L y Eudragit® S que se pueden combinar opcionalmente con Eudragit® RL o RS. Estos ácidos acrílicos modificados son útiles puesto que se pueden hacer solubles a un pH de 6 o 7,5, dependiendo del Eudragit particular elegido, y en la proporción de Eudragit® S y Eudragit® L, RS y RL usados en la formulación. Combinando uno o ambos de Eudragit® L y Eudragit® S con Eudragit® RL y RS (5 a 25 %), es posible obtener una pared de cápsula más fuerte y aún conserva la solubilidad dependiente de pH de la cápsula. En aspectos preferidos adicionales de la invención, se puede usar un revestimiento de shellac (que también incluye uno o más emulsionantes tales como hipromelosa y/o triacetina) que es elegido para tener un perfil de disolución dependiente de pH adecuado para liberar los contenidos de una forma farmacéutica tal como un comprimido dentro del íleo de un paciente o sujeto. Este tipo de revestimiento proporciona un planteamiento nutraterapéutico para liberación retrasada y/o controlada usando componentes de origen natural no sintéticos.

En algunas realizaciones, el perfil de revestimiento que retrasa la liberación *in vivo* de la mayoría del antígeno hasta que la forma farmacéutica alcance el apéndice y/o colon derecho comprende Eudragit® L100 y shellac o glaseado alimenticio/farmacéutico, Eudragit® S100 en el intervalo de 100 partes L100:0 partes S100 a 20 partes L100:80 partes S100, más preferiblemente 70 partes L100:30 partes S100 a 80 partes L100:20 partes S100. Cuando el pH al cual el revestimiento comienza a disolverse incrementa, el espesor necesario para alcanzar la administración específica a íleo disminuye. Para formulaciones en las que la relación de Eudragit® L100:S100 es alta, se puede usar un espesor de revestimiento del orden de 150 a 200 µm. Para revestimientos en los que la relación de Eudragit® L100:S100 es baja, se puede usar un espesor de revestimiento del orden de 80 a 120 µm. Las formas farmacéuticas usadas en los métodos de la invención pueden incluir uno o más vehículos, aditivos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo, aditivo o excipiente que no es inaceptablemente tóxico al sujeto al cual se administra. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen en detalle por E.W. Martin, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", entre otros bien conocidos en la técnica. vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o prolongadores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silílico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) tensioactivos, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y sus mezclas; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tampones. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina

rellenadas blandas y duras que usan tales excipientes como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

5 Las emulsiones y microemulsiones pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agente solubilizadores y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y sus mezclas. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como tensioactivos, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, de aromatización y agentes conservantes.

10 15 Las suspensiones, además de la sustancia nutricional, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isostearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol, y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

20 Las técnicas para formular las formas farmacéuticas útiles anteriormente mencionadas o bien están descritas en las referencias anteriormente citadas o son bien conocidas por los expertos en la técnica. La píldora de vacuna en una forma farmacéutica de píldora de vacuna como se ilustra en las figuras 5 a 6 o como se modifica es una forma farmacéutica particularmente preferida que es útil en los métodos de tratamiento de la invención.

25 "Polímero biocompatible" como se usa en el presente documento se pretende que describa polímeros que no son tóxicos a células. Los compuestos son "biocompatibles" si su adición a células *in vitro* da como resultado menos de o igual al 20 % de muerte celular y no inducen inflamación significativa u otros efectos adversos significativos *in vivo*.

30 35 40 Los polímeros biocompatibles se pueden clasificar como biodegradables y no biodegradables. Los polímeros biodegradables se degradan *in vivo* en función de la composición química, método de fabricación, y estructura implante. Se pueden usar polímeros sintéticos y naturales aunque los polímeros sintéticos son preferidos debido a la degradación más uniforme y reproducible y otras propiedades físicas. Ejemplos de polímeros sintéticos incluyen polianhídridos, polihidroxíacidos tales como ácido poliláctico, ácidos poliglicólicos y sus copolímeros, poliésteres, poliamidas, poliorthoésteres y algunos polifosfacenos. Ejemplos de polímeros de origen natural incluyen proteínas y polisacáridos tales como colágeno, ácido hialurónico, albúmina y gelatina. El antígeno y/o fármaco puede estar encapsulado dentro, por toda y/o sobre la superficie del implante. El antígeno y/o fármaco se libera por difusión, degradación del polímero, o una combinación de los mismos. Hay dos clases generales de polímeros biodegradables: aquellos que se degradan por erosión en masa y los que se degradan por erosión superficial. Las patentes americanas que describen el uso de polianhídridos para la administración controlada de sustancias incluyen el documento de Patente americana N.º 4.857.311 de Domb y Langer, documento de Patente americana N.º 4.888.176 de Langer, y col., y documento de Patente americana N.º 4.789.724 de Domb y Langer.

45 Los polímeros tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y sus copolímeros han estado comercialmente disponibles como materiales de sutura durante un número de años y fácilmente se pueden formar en dispositivos para la administración de fármaco.

50 55 Los polímeros no biodegradables permanecen intactos *in vivo* durante períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, al menos aproximadamente uno o más años). El antígeno y/o fármaco cargados dentro de la matriz de polímero no biodegradable se libera por difusión a través del entramado microporo del polímero de un modo constante y predecible, el cual se puede confeccionar para proporcionar una tasa de liberación rápida o una más lenta alterando el porcentaje de carga de fármaco, porosidad de la matriz, y estructura de implante. El copolímero etilen-vinil acetato (EVAc) es un ejemplo de un polímero no biodegradable que se ha usado como un sistema de administración local para proteínas y otras micromoléculas, como se publicó por Langer, R., y J. Folkman, *Nature* (London) 263:797-799 (1976). Otros incluyen poliuretanos, poliacrilonitrilos, y algunos polifosfacenos.

60 65 Los polímeros catiónicos se han usado mucho como vectores de transfección debido a la facilidad con la que pueden condensar y proteger las cadenas de ADN negativamente cargadas. Los polímeros que contienen amina tales como poli(lisina) (Zauner y col., *Adv. Drug Del. Rev.*, 30:97-113, 1998; Kabanov y col., *Bioconjugate Chem.*, 6:7-20, 1995, las enseñanzas enteras de cada una de las anteriores referencias se incorporan en el presente documento como referencia), poli(etilenimina) (PEI) (Boussif y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7.297-7.301, 1995, las enseñanzas enteras de las que se incorporan en el presente documento como referencia), y poli(amidoamina) dendrímeros (Kukowska-Latallo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4.897-4.902, 1996; Tang y col., *Bioconjugate Chem.* 7:703-714, 1996; Haensler y col., *Bioconjugate Chem.*, 4:372-379, 1993; las enseñanzas enteras de cada una de las referencias anteriores están incorporadas en el presente documento como referencia) están positivamente cargadas a pH fisiológico, forman pares de iones con los ácidos nucleicos, y median la transfección en una diversidad de líneas celulares.

70 También se han desarrollado poliésteres degradables que portan cadenas laterales catiónicas (Putnam y col., *Macromolecules*, 32:3.658-3.662, 1999; Barrera y col., *J. Am. Chem. Soc.* 115:11.010-11.011, 1993; Know y col.,

Macromolecules, 22:3.250-3.255, 1989; Lim y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5.633-5.639, 1999; Zhou y col., *Macromolecules*, 23:3.399-3.406, 1990, las enseñanzas enteras de cada una de las referencias anteriores están incorporadas en el presente documento como referencia). Ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-láctido-co-L-lisina) (Barrera y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11.010-11.011, 1993; las enseñanzas enteras de las que están

5 incorporadas en el presente documento como referencia), poli(serina éster) (Zhou y col., *Macromolecules*, 23:3.399-3.406, 1990, la enseñanza entera de cada una de las referencias anteriores están incorporadas en el presente documento como referencia), poli(4-hidroxi-L-prolina éster) (Putnam y col., *Macromolecules*, 32:3.658-3.662, 1999; Lim y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5.633-5.639, 1999, las enseñanzas enteras de cada una de las referencias anteriores están incorporadas en el presente documento como referencia). Recientemente se demostró que el 10 poli(4-hidroxi-L-prolina éster) condensa ADN plásmido a través de interacciones electroestáticas, y media la transferencia génica (Putnam y col., *Macromolecules*, 32:3.658-3.662, 1999; Lim y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5.633-5.639, 1999, las enseñanzas enteras de cada una de las referencias anteriores están incorporadas en el presente documento como referencia). Importantemente, estos nuevos polímeros son significativamente menos 15 tóxicos que la poli(lisina) y PEI, y se degradan en metabolitos no tóxicos.

15 Los revestimientos entéricos se pueden aplicar mediante técnicas de revestimiento convencionales, tales como revestimiento en bombo o revestimiento en lecho fluidizado, usando soluciones de polímeros en agua o disolventes orgánicos adecuados o usando dispersiones de polímero acuosas. Como realización alternativa, el revestimiento entérico de control de liberación puede separar las capas de antígeno y/o fármaco adicionales sobre el núcleo; por ejemplo, después del revestimiento con la sustancia controladora de la liberación, se puede aplicar otra capa de antígeno y/o fármaco, que es seguida por otra capa controladora de la liberación, etc. Por ejemplo, materiales adecuados para la capa controladora de la liberación incluyen EUDRAGIT® (copolímeros de ésteres de ácido acrílico y metacrílico), Eudragit®RS (copolímeros de ésteres de ácido acrílico y metacrílico), derivados de celulosa tales como dispersiones acuosas de etilcelulosa (AQUACOAT®, SURELEASE®), hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, polivinilpirrolidona, copolímero de polivinilpirrolidona/ acetato de vinilo, OPADRY®, y similares.

30 El espesor del revestimiento afecta al perfil de liberación en el yeyuno e íleo, y así se puede usar este parámetro para personalizar el perfil. Los niveles de revestimiento sugeridos son de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 %, preferiblemente aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 % (p/p), y aproximadamente 6 % o 35 aproximadamente 8 % como las realizaciones más preferidas. Un revestimiento al 8 % p/p debería liberar aproximadamente el 80 % del antígeno y/o fármaco en 3 a 3,5 horas después de la ingestión, y un revestimiento al 6 % p/p debería dar como resultado la liberación de aproximadamente 80 % del antígeno y/o fármaco en 2,8 a 3,2 horas después de la ingestión. Con frecuencia, en muchos aspectos de la invención, el espesor del revestimiento objetivo entre 6 a 10 % en peso, y el tiempo objetivo de absorción es tan largo como 3,5 horas.

40 Los métodos descritos en el presente documento también pueden comprender la administración de uno u otros más agentes terapéuticos o fármacos, incluyendo sin limitación agentes antivíricos, antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes anticancerosos y antimicrobianos. Con el fin de la presente invención, los términos agentes terapéuticos o fármacos se pretende que abarquen organismos vivos tales como bacterias probióticas y tal interpretación está 45 específicamente excluida en el presente documento.

Ejemplos de agentes antivíricos incluyen, sin limitación, inhibidores de la transcriptasa inversa tales como, por 50 ejemplo, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, nevirapina, delavirdina, y efavirenz; inhibidores de la proteasa tales como, por ejemplo, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, indinavir, amprenavir y lopinavir; agentes para tratar el virus del herpes tales como, por ejemplo, aciclovir, valaciclovir, valaciclovir, famciclovir, ganciclovir, foscarnet y cidolovir; y, agentes para tratar la gripe tales como, por ejemplo, oseltamivir, amantadina, rimatadina, y zanamivir. Ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, sin limitación, penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos. Ejemplos de agentes antifúngicos incluyen, sin limitación, anfotericina B, fluconazol, voriconazol y similares.

55 El término "cáncer" se usa por toda la memoria para referirse al proceso patológico que da como resultado la formación y el crecimiento de un neoplasma canceroso o maligno, es decir, tejido anormal que crece mediante proliferación celular, con frecuencia más rápidamente de lo normal y continúa creciendo después de que cese los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los neoplasmas malignos muestran carencia parcial o completa de la organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal y la mayoría invaden los tejidos de alrededor, sufren metástasis en varios sitios, y es probable que se repitan después de intentar la eliminación y causen la muerte del paciente a menos que se trate adecuadamente. Como se usa en el presente documento, el término neoplasia se usa para describir todas las patologías cancerosas y abarca o incluye el proceso patológico asociado 60 con tumores hematógenos, ascéticos y sólidos malignos.

65 Un planteamiento prometedor para utilizar la presente invención es incorporar antígenos cancerosos ya caracterizados (1-10) y administrarlos al íleo y apéndice para aumentar la respuesta inmune resultante. Los antígenos específicos se describen en los ejemplos, los cuales se presentan en la presente memoria, pero no significa que sean limitantes, ya que la formulación descrita en el presente documento se puede adaptar fácilmente a cualquier antígeno de tumor existente o nuevamente descubierto por un experto en la técnica.

Los antígenos tumorales reconocidos por linfocitos T CD8+ autólogos y/o anticuerpos se han clasificado dentro de una o más de las siguientes categorías a) antígenos de diferenciación, por ejemplo, tirosinasa, Melan-A/MART-1, gp100; b) antígenos mutacionales, por ejemplo, CDK4, beta-catenina, caspasa-8 y P53;c) antígenos de amplificación, por ejemplo, Her2/neu y P53, d) antígenos de variante de corte y empalme, por ejemplo, NY-CO-37/PDZ-45 y ING1; e) antígenos víricos, por ejemplo, virus del papiloma humano y VEB; y f) antígenos de TC, por ejemplo, MAGE, NY-ESO-1 y LAGE-1.(7) Los antígenos de TC son una clase distinta y única de antígenos de diferenciación. Las características que definen estos antígenos son los altos niveles de expresión en células germinales de macho adulto, pero generalmente no en otros tejidos adultos normales, y la expresión aberrante en una proporción variable de un amplio rango de diferentes tipos de cáncer.

10 Las formulaciones y métodos de la invención, además de la inmunogenicidad por instilación y/o inmunidad frente a infección, también se puede usar para "inmunoterapia" para tratar una patología cancerosa, en particular, un cáncer resistente a fármaco, un cáncer resistente a fármaco múltiple, una leucemia o cáncer hematopoyético relacionado, incluyendo LLA-T y leucemias relacionadas, especialmente leucemias resistentes a fármaco (múltiple), tal como LLA-T, y numerosos tumores cancerosos como se describe por lo demás en el presente documento. Estas enfermedades pueden incluir un cualquiera o más de neoplasmas hematopoyéticos y metástasis de tales neoplasmas, incluyendo enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemias, incluyendo leucemias no agudas y agudas, tales como leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia linfoblástica de linfocito T aguda, leucemia linfoblástica aguda de linaje T (LLA-T), leucemia de linfocito T adulta, leucemia basófila, leucemia eosinófila, leucemia granulocítica, leucemia de célula pilosa, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblastica, leucemia monocítica, leucemia neutrófila y leucemia de célula madre. Otros cánceres, incluyendo tumores cancerosos, que se pueden tratar usando la presente invención incluyen, por ejemplo, cáncer de estómago (especialmente incluyendo células estromales gástricas), colon, rectal, de hígado, pancreático, de pulmón, mama, cuello del útero, cuerpo del útero, ovario, próstata, testículos, vejiga, renal, de cerebro/SNC, cabeza y cuello, garganta, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, cáncer de piel, incluyendo melanoma y no melanoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, sarcoma de Ewing, cáncer de pulmón de célula pequeña, coriocarcinoma, rabdomiosarcoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, leucemia de célula pilosa, cáncer de boca/faringe, esófago, laringe, de riñón y linfoma, entre otros. Cánceres adicionales que pueden ser particularmente responsables para métodos terapéuticos según la presente invención incluyen, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda de linaje T (LLA-T), linfoma linfoblástico de linaje T (LL-T), linfoma de linfocito T periférico, leucemia de linfocito T adulta, Pre-B LLA, Pre-linfomas B, linfoma de linfocito B grande, linfoma de Burkitts, LLA de linfocito B, LLA positivo de cromosoma de Philadelphia y LMC positiva de cromosoma de Philadelphia, cáncer de mama, sarcoma de Ewing, osteosarcoma y sarcomas de alto grado no diferenciados, entre otros.

40 El término "neoplasia" o "neoplasma" se usa por toda la memoria para referirse al proceso patológico que da como resultado la formación y el crecimiento de un neoplasma canceroso o maligno, es decir, tejido anormal que crece mediante proliferación celular, con frecuencia más rápidamente de lo normal y continua creciendo después de que cesen los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los neoplasmas malignos muestran carencia parcial o completa de la organización estructural y la coordinación funcional con el tejido normal y pueden invadir tejidos de alrededor. Como se usa en el presente documento, el término neoplasia/neoplasma se usa para describir todas las patologías cancerosas y abarca o incluye el proceso patológico asociado con el cáncer, incluyendo cánceres hematopoyéticos, numerosos tumores cancerosos y su metástasis.

45 Un "neoplasma hematopoyético" o "cáncer hematopoyético" es un neoplasma o cáncer de células hematopoyéticas del sistema sanguíneo o linfático e incluye patologías tales como enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemias, incluyendo leucemias no agudas y agudas, tales como leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia de linfocito T adulto, leucemia linfoblástica aguda de linaje T (LLA-T), leucemia basófila, leucemia eosinófila, leucemia granulocítica, leucemia de célula pilosa, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblastica, leucemia monocítica, leucemia neutrófila y leucemia de célula madre entre otros.

55 El término "profiláctico" se usa en el contexto de esta descripción con un significado similar como "proporcionar una respuesta inmunogénica" o alternativamente, "vacunación" se usa para describir el uso de un compuesto descrito en el presente documento que reduce la probabilidad de una ocurrencia de una afección o enfermedad en un paciente o sujeto. El término "reducir la probabilidad" se refiere al hecho de que en una población dada de pacientes, se puede usar la presente invención para reducir la probabilidad de una ocurrencia, recurrencia o metástasis de enfermedad en uno o más pacientes dentro de la población de todos los pacientes, más que prevenir, en todos los pacientes, la ocurrencia, recurrencia o metástasis de una enfermedad.

60 En ciertos aspectos según la presente invención, en los que diversos cánceres son a tratar, las formulaciones se pueden co-administrar con al menos otro agente anticanceroso tal como antimetabolitos, Ara C, etopósido, doxorubicina, taxol, hidroxiurea, vincristina, cytoxan (ciclofosfamida) o mitomicina C, entre numerosos otros, incluyendo inhibidores de la topoisomerasa I y topoisomerasa II, tales como adriamicina, topotecán, camptotecina e irinotecán, otro agente tal como gemcitabina y agentes basados en campotecina y cisplatina. Por "coadministrador"

se quiere decir que los presentes compuestos se administran a un paciente de modo que los presentes compuestos así como el compuesto coadministrado se puede encontrar en la corriente sanguínea al mismo tiempo, sin reparar en cuándo los compuestos se administran realmente, incluyendo simultáneamente. En muchos casos, la coadministración de los presentes compuestos con agentes anticancerosos tradicionales produce un resultado sinérgico (es decir, más que aditivo) el cual es inesperado.

5 Compuestos adicionales que se pueden usar en combinación con las formulaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo: adriamicina, anastrozol, trióxido arsénico, asparaginasa, azacitidina, BCG vivo, bevacizumab, cápsulas de bexaroteno, gel de bexaroteno, bleomicina, bortezombi, busulfán intravenoso, busulfán oral,

10 calusterona, campotecina, capecitabina, carboplatina, carmustina, carmustina con implante de polifeprosan 20, celecoxib, cetuximab, clorambucilo, cisplatina, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, cytoxan, citarabina liposomal, dacarbazina, dactinomicina, actinomicina D, dalteparina sódica, darbepoetina alfa, dasatinib, dauronorubicina liposomal, dauronobicina, daunomicina, decitabina, denileuquina, denileuquina diftitox, dexamoxano, dexamoxano, docetaxel, doxorubicina, doxorubicina liposomal, propionato de dromostanolona,

15 eculizumab, solución B de Elliott, epirubicina, hidrocloruro de epirubicina, epoetina alfa, erlotinib, estramustina, etopósido fosfato, etopósido VP-16, exemestano, citrato de fentanilo, filgrastim, floxuridina (intraarterial), fludarabina, fluorouracilo 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, hidrocloruro de gemcitabina, gemcitabina, gentuzumab ozogamicina, gleevac, acetato de goserelina, acetato de goserelina, acetato de histrelina, hidroxiurea, ibritumomab tiuxetán, idarubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón alfa 2a, interferón alfa-2b, irinotecán, irinotecán-PEG, ditosilato de lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, acetato de leuprolida, levamisol, lomustina CNU, mecloretamina, mostaza de nitrógeno, acetato de megestrol, melfalán L-PAM, mercaptopurina 6-MP, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, fenpropionato de nandrolona, nelarabina, nefetumomab, oprelvekina, oxaliplatina, paclitaxel, partículas unidas a proteína de paclitaxel, palifermina, pamidronato, panitumumab, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, peginterferón alfa-2b, disodio pemetrexado,

20 pentostanina, pipobromán, plicamicina, mitramicina, porfímero sódico, procarbazina, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargramostim, sorafenib, estreptozocina, sunitinib, maleato de sunitinib, talco, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido VM-26, testolactona, talidomida, tioguanina 6-TG, tiotepa, topotecán, topotecán hcl, toremifeno, tosimumomab, tosimumomab/I-131 tosimumomab, trastuzumab, tretinoína ATRA, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vorinostat, zoledronato, ácido zoledrónico y sus mezclas.

30 Como se describe en el presente documento, otras enfermedades que se pueden tratar o frente a las que se puede vacunar usando formulaciones de la invención incluyen, sin limitación, cualquier infección y las enfermedades causadas por las infecciones. En una realización, la infección es una infección grave. En una realización, la infección es una infección bacteriana. En otra realización, la infección es una infección vírica. En otra realización, la infección es una infección fungica. En una realización, la enfermedad es sepsis. En otra realización, la enfermedad es una

35 infección que conduce a una enfermedad respiratoria (o una enfermedad respiratoria resultante de una infección), que incluye sin limitación, infecciones y enfermedades causadas por bacterias gram positivas y gram negativas, micobacterias (tales como *Mycobacterium tuberculosis*), infecciones fungicas (por ejemplo, infecciones de *Pneumocystis*, *Candida* e *Histoplasma*) e infecciones virales (por ejemplo, infecciones de la gripe, varicela y corona virus tales como coronavirus asociados a SARS). En otra realización, la enfermedad es meningitis. En otra realización, la enfermedad es gripe. En una realización, la enfermedad es neumonía (sin reparar en si está causada por una infección bacteriana, vírica o fungica). En una realización específica, la neumonía es Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC). En una realización, la infección vírica es una infección retrovírica. En una realización, la infección retrovírica es infección por VIH. En otra realización, la infección es Hepatitis de cualquier variedad, incluyendo A, B, C u otra. En otra realización, la enfermedad asociada está asociada con baja expresión de MIF y es infección por un virus u otro patógeno que usa el receptor de CCR5 para la infección, incluyendo, sin limitación, VIH-1, VHC, CMV, virus de Epstein-Barr y *Yersinia pestis*.

50 Las formulaciones de la invención también se pueden administrar en combinación con un antagonista del factor- α de necrosis tumoral (TNF α) o un antagonista del interferón (IFN) (por ejemplo, un antagonista de IFNy) a un sujeto. Ejemplos de antagonistas de TNF α y IFNy incluyen, sin limitación, anti-TNF, receptor de TNF soluble, anti-IFNy, receptor de IFNy soluble, inhibidores de p38 MAPK, e inhibidores de JAK-STAT.

55 Por tanto, las formulaciones de la invención pueden tratar y/o prevenir, por ejemplo, infecciones víricas (incluyendo infecciones retrovíricas), infecciones bacterianas, infecciones fungicas, infecciones que conducen a enfermedad respiratoria, infecciones con VIH, infecciones con CMV, infecciones con el virus de la Hepatitis (especialmente A, B o C), neumonía, Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC), meningitis y gripe. En ciertas realizaciones, una formulación de la invención se usa para tratar y/o prevenir infecciones patógenas durante las fases agudas de la infección, incluyendo durante un rebrote de la infección, durante un cambio de terapia, cuando se manifiestan señales de resistencia a terapia en el sujeto, o como una intervención temprana.

60 En una realización, la invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una infección que conduce a una enfermedad respiratoria que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la invención. Las infecciones que conducen o pueden conducir a enfermedad respiratoria incluyen, sin limitación, infecciones por bacterias gram positivas y gram negativas, micobacterias (tales como *Mycobacterium tuberculosis*), infecciones fungicas (por ejemplo, infecciones de *Pneumocystis*, *Candida* e *Histoplasma*) e infecciones

víricas (por ejemplo, infecciones de la gripe, varicela y corona virus tales como coronavirus asociados a SARS).

La invención también proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad respiratoria resultante de una infección que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la invención.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de neumonía en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la invención. Las infecciones microbianas que conducen a neumonía incluyen, sin limitación, infecciones bacterianas (por ejemplo, infecciones de bacterias gram positivas, bacterias gram negativas y micobacterias tales como *Mycobacterium tuberculosis*), infecciones fúngicas (por ejemplo, infecciones de *Pneumocystis*, *Candida* e *Histoplasma*) e infecciones víricas (por ejemplo, infecciones de la gripe, varicela y corona virus tales como coronavirus asociados a SARS).

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de una infección retrovírica que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la invención.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de infección por VIH que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la invención.

La invención también comprende el uso de una formulación de la invención como un inmunoadyuvante, también simplemente denominado un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes que se han empleado en vacunas disponibles incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: Alumbre, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, polisorbato 80, virosomas en particular para aumentar la respuesta a las vacunas de la gripe y hepatitis, escualeno, adyuvante de Freund, el sistema adyuvante AS03, el cual es una emulsión de aceite en agua que contiene Vitamina E, escualeno y polisorbato 80. Esto con frecuencia se usa para las vacunas de la gripe. La endotoxina o el lipopolisacárido bacteriano o sus derivados con frecuencia se usa como adyuvante para las vacunas cancerosas; las vacunas de ADN con vectores adenovíricos son hasta ahora altamente inmunogénicas frente a los virus de la Hepatitis C en ensayo.

De nuevo, los métodos descritos en el presente documento también comprenden la administración de uno u otros más agentes terapéuticos, que incluyen sin limitación agentes antibacterianos, agentes antifúngicos y agentes antimicrobianos. Ejemplos adicionales de agentes antivíricos incluyen, sin limitación, inhibidores de la transcriptasa inversa tales como, por ejemplo, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, nevirapina, delavirdina, y efavirenz; inhibidores de la proteasa tales como, por ejemplo, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, indinavir, amprenavir y lopinavir; agentes para tratar virus del herpes tales como, por ejemplo, aciclovir, valaciclovir, valaciclovir, famciclovir, ganciclovir, foscarnet y cidolovir; y, agentes para tratar la gripe tales como, por ejemplo, oseltamivir, amantadina, rimatadina, y zanamivir. Ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, sin limitación, penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos. Ejemplos de agentes antifúngicos incluyen, sin limitación, anfotericina, fluconazol.

En otra realización, la invención proporciona un método de inhibición del ciclo de vida de un virus en un sujeto infectado con dicho virus o en riesgo de estar infectado con dicho virus que comprende administrar al sujeto una formulación de la invención. En una realización, el patógeno es VIH-1.

Como se usa en el presente documento la "inhibición del ciclo de vida de un virus" incluye, inhibir la replicación vírica, inhibir la infección vírica, latencia y oncogénesis.

En una realización específica, la invención proporciona un método para tratar o prevenir la infección de VIH (VIH 1 o 2) en un sujeto infectado o en riesgo de estar infectado con VIH, que comprende administrar al sujeto una formulación de la invención. En ciertas realizaciones, el antígeno es gp120 o gp41 o la estructura trimérica entera del virus VIH, o partículas similares a virus (PSV). Una pequeña proporción de individuos infectados por VIH generan una respuesta de anticuerpo neutralizante (AcN) de magnitud y amplitud excepcional. Un análisis detallado de los epítopos críticos dirigidos por anticuerpos en líneas generales neutralizantes deberían ayudar a definir los objetivos óptimos para el diseño de vacuna. Los sujetos infectados por VIH-1 con anticuerpos neutralizantes de suero de reacción cruzada potentes se identificaron analizando sueros de 308 sujetos frente al panel multiclado de 12 virus "tier 2" (4 de cada uno de los subtipos A, B y C). Diversas especificidades de epítopo neutralizante se determinaron para los 9 neutralizadores superiores, incluyendo los donantes infectados por el clado A, clado B, clado C, y clado A/C, usando un conjunto completo de ensayos. En algunos sujetos, la amplitud de neutralización se midió por dos o más especificidades de anticuerpo. Aunque se identificaron los anticuerpos a la región externa proximal de la membrana (RPEM) de gp41 en algunos sujetos, los sujetos con la mayor amplitud de neutralización dirigida a epítopos gp120, incluyendo el sitio de unión de CD4, un epítopo cuaternario que contiene glicano formado por los bucles V2 y V3, o un epítopo de dominio exterior que contiene un glicano en el residuo N332. La neutralización de VIH-1 en líneas generales reactiva observada en algunos sujetos se mide por anticuerpos que se dirigen a varias regiones conservadas sobre la glicoproteína de la cubierta del VIH-1.(11, 12). El virus VIH tiene muchas estrategias

para evitar la respuesta mediada por linfocito T e incluso la respuesta del linfocito B humoral a su invasión,(13-19) y sus rutas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Se incorporan en el presente documento como referencia.

- 5 En ciertas realizaciones, se administra una formulación de la invención a un sujeto durante infección por VIH aguda o durante un rebrote. Estos métodos también pueden comprender la administración de uno u otros más agentes terapéuticos. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de una formulación de la invención en combinación con agentes antivíricos. Ejemplos de agentes antivíricos incluyen, sin limitación, inhibidores de la transcriptasa inversa tales como, por ejemplo, zidovudina, didanosina, zalcitabina, 10 estavudina, lamivudina, abacavir, nevirapina, delavirdina, y efavirenz; inhibidores de la proteasa tales como, por ejemplo, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, indinavir, amprenavir y lopinavir; agentes para tratar los virus del herpes tales como, por ejemplo, aciclovir, valaciclovir, valaciclovir, famciclovir, ganciclovir, foscarnet y cidofovir; y, agentes para tratar la gripe tales como, por ejemplo, oseltamivir, amantadina, rimatadina, y zanamivir.
- 15 En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento o prevención de infección por VIH en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de la invención. En una realización, la infección por VIH está en una fase aguda. En una realización, el método comprende además administrar al sujeto otro agente antivírico.
- 20 En una realización específica, la invención proporciona un método de tratamiento y/o prevención de infecciones de la Hepatitis lo más normalmente Hepatitis B o Hepatitis C en un sujeto infectado o en riesgo de estar infectado con Hepatitis B o C, que comprende administrar al sujeto una formulación de la invención que administra el medicamento al íleo y/o apéndice del paciente.
- 25 El término "Virus de la Hepatitis C" o "VHC" se usa para describir diversas cepas del virus de la Hepatitis C. VHC es uno de los varios virus que pueden causar hepatitis. No está relacionado con los otros virus de la hepatitis comunes (por ejemplo, hepatitis A o hepatitis B, entre otros). VHC es un miembro de la familia *Flaviviridae* de virus. Otros miembros de esta familia de virus incluyen aquellos que causan fiebre amarilla y dengue. Los virus que pertenecen a esta familia todos tienen ácido ribonucleico (ARN) como su material genético. Todos los virus de la hepatitis C están 30 compuestos de una capa exterior (cubierta) y contiene enzimas y proteínas que permiten que el virus se reproduzca dentro de las células del cuerpo, en particular, las células del hígado. Aunque esta estructura básica es común a todos los virus de la hepatitis C, hay al menos seis cepas claramente diferentes del virus que tienen perfiles genéticos diferentes (genotipos). El tratamiento de VHC según la presente invención se dirige a todas las cepas de VHC, incluyendo las seis cepas o más distintas anteriormente descritas, así como las cepas relacionadas que son 35 cepas resistentes a fármaco y resistentes a fármaco múltiple. En los EE.UU, el genotipo 1 es la forma más común de VHC. Incluso dentro de un genotipo único puede haber algunas variaciones (genotipo 1a y 1b, por ejemplo). La genotipificación es vista como importante para guiar el tratamiento debido a que algunos genotipos víricos responden mejor a terapia que otros. La diversidad genética de VHC es una razón por la que ha sido difícil desarrollar una vacuna eficaz puesto que la vacuna debe proteger frente a todos los genotipos.
- 40 Una "infección por virus de la Hepatitis C" o "infección de la Hepatitis C" es una infección del hígado causada por el virus de la hepatitis C (VHC).
- 45 En ciertas realizaciones, una formulación de la invención se administra a un sujeto durante la infección de la hepatitis C aguda (semanas 12 a semana 42) o durante un rebrote.(20) Raghuraman y col. examinaron el curso temporal de la hepatitis C y su interacción con las células del sistema inmune hospedador. Indicaron que el virus de la Hepatitis C establece fácilmente infección crónica con agotamiento de los linfocitos T específicos a VHC y escapa de los anticuerpos neutralizantes. La recuperación espontánea a partir de la infección crónica es rara y se ha estudiado de manera incompleta en el pasado. Estudiaron prospectivamente, desde antes de a >2 años de seguimiento, las citoquinas, los linfocitos T específicos a VHC y anticuerpos, así como la evolución de la secuencia vírica en un hombre blanco que aclaró espontáneamente el genotipo VHC 1a después de 65 semanas. La elevación significativa de la alanina aminotransferasa y la citoquina en plasma y las amplias respuestas del linfocito T específico a VHC de los linfocitos T CD4 y CD8 no dieron como resultado el aclaramiento del VHC en la fase aguda. La frecuencia y la función efectora de los linfocitos T específicos a VHC disminuyeron más adelante, y los títulos de VHC se estabilizaron como es normal para la fase crónica. El aclaramiento de VHC después de 65 semanas siguió la aparición de anticuerpos neutralizantes en la semana 48 y se asoció con la inversión del agotamiento de linfocito T específico a VHC, como se evidencia por la expresión reducida de la muerte programada-1 (MP-1) y la función mejorada de linfocito T. El aclaramiento se dio sin inflamación o superinfección con el virus de la hepatitis B, virus de citomegalovirus humano, gripe, y virus de Epstein-Barr. Concluyeron que el agotamiento de linfocito T es reversible 50 al menos en los 2 primeros años de infección por VHC crónica, y esta inversión junto con los anticuerpos neutralizantes puede aclarar VHC(20). Indicaron que la Hepatitis C generalmente no aclara de manera espontánea, y se atribuyeron los defectos de linfocito T a deficiencia de reconocimiento y a agotamiento de linfocito T, entre otros. El hecho de que una proporción significativa de las personas infectadas controla espontáneamente la infección por VHC en el marco de una respuesta inmune apropiada sugiere que una vacuna para VHC es un objetivo realista.(21)
- 55 60 Un análisis comparativo de las personas infectadas con distintos resultados clínicos ha permitido la caracterización de muchos procesos inmunes innatos y adaptivos importantes asociados con el control vírico. Está claro que una

vacuna de VHC exitosa necesitará explotar y aumentar estos mecanismos de defensa inmune naturales. Nuevos planteamientos de vacuna de VHC, incluyendo péptido, proteína recombinante, vacunas basadas en vector y ADN, han alcanzado recientemente ensayos clínicos humanos en Fase I/II. Algunas de estas tecnologías han generado inmunidad antivírica fuerte en voluntarios sanos y pacientes infectados.

5 El papel del interferón IFN está aún bajo estudio intenso; claramente, esta citoquina, un producto de linfocitos T CD8⁺ activados (ausentes durante el agotamiento de linfocito T) tiene propiedades antivíricas así como inhibe fácilmente la replicación de la Hepatitis C en células de hepatoma.(21). Claramente estos descubrimientos justifican el uso continuado de productos de IFN como parte de las estrategias de tratamiento con fármaco totales para la
 10 Hepatitis C. También está claro que muchos regímenes orales están siendo usados sin IFN adicional son incapaces de aclarar completamente el virus de la Hepatitis C(22). Se ha postulado por Grafmueller que IL-17 tiene un papel similar al de IFN en la Hepatitis C así como en VIH. Encontró que un subconjunto de linfocitos T CD8(+) pueden secretar interleuquina 17 (IL-17). Para dirigir los asuntos de la especificidad de antígeno, distribución de tejido y relevancia biológica, analizó exhaustivamente las respuestas del linfocito T CD8(+) periférico e intrahepático en una cohorte de pacientes con infección por virus de la hepatitis C (VHC) crónica para la producción específica a antígeno de IL-17 e interferón (IFN) gama. Los linfocitos T CD8(+) que producen IL-17 específico a VHC y que expresan receptor gama huérfano relacionado con el receptor del ácido retinoico eran detectables en sangre e hígado y se dirigen a epítopos diferentes, en comparación con los linfocitos T CD8(+) que producen IFN gamma. Se encontró su mayor frecuencia en pacientes con baja actividad inflamatoria, sugiriendo un papel protector para IL-17 en infección
 15 por VHC crónica.(23)

20 Es un objetivo de la presente invención aumentar la acción de IFN y posiblemente IL-17 mediante el uso de sustancias liberadoras de hormona de freno ileal como reguladores del linfocito T CD4 y CD8, combinados con vacunas de la Hepatitis C activas para estimular los linfocitos T CD8⁺ para aumentar la producción endógena de IFN, combinados con antivirales altamente activos frente al virus de la Hepatitis C.

25 Estos descubrimientos son relevantes para la vacunación de la Hepatitis C, la elección del momento de vacunación, y también siguen la inmunoterapia de las infecciones de Hepatitis C crónicas. La elección del momento de vacunación a la fase de la infección de la Hepatitis C es claramente una parte importante de la realización preferida de la invención. Estos métodos también pueden comprender la administración de uno u otros más agentes terapéuticos durante o después del uso de una vacuna con o sin dosis de inmunoterapia. La lógica de combinar una vacuna o inmunoterapia con un fármaco para reducir la carga vírica de la Hepatitis C es conocida por el experto en la técnica, pero de hecho no ha sido el caso cuando el tratamiento antivírico solo ha conferido larga duración de la inmunidad a Hepatitis C. A modo de ejemplo, Rahman y col. examinaron la recuperación en pacientes seleccionados con hepatitis C aguda.(24) En la mayoría de los casos la recuperación espontánea se asoció con respuestas inmunes celulares vigorosas y de larga duración. La recuperación inducida por tratamiento con fármaco se puede alcanzar en la mayoría de los pacientes que se tratan en la fase aguda, particularmente con regímenes que contienen interferón, pero las cinéticas y los mecanismos de aclaramiento vírico y capacidad de reacción inmune no son bien entendidos. Se han propuesto tanto los efectos antiviricos directos como los efectos inmuno-mediados
 30 indirectos, tales como la modulación inmune de respuestas de Th2 a Th1 y la prevención de agotamiento de respuestas celulares mediante rápida reducción de título vírico. Para investigar cómo afecta la terapia antivírica temprana a las respuestas del linfocito T específicas al virus de la Hepatitis C (VHC), Rahman realizó estudios clínicos, virológicos e inmunológicos prospectivos detallados sobre 7 pacientes con hepatitis C aguda quienes
 35 recibieron terapia antivírica y se siguieron a intervalos de 2 a 4 semanas durante 1 a 2 años. Se analizó la respuesta de célula CD4(+) y CD8(+) total con 600 péptidos de VHC de superposición y 6 proteínas por inmunoadsorción ligada a enzima (ELISpot) ex vivo, tinción de citoquina intracelular, y ensayos de proliferación. Al contrario que los estudios anteriores con epítopos de VHC seleccionados, este análisis prolongado detectó respuestas multiespecíficas de interferón gamma (+) (IFN-gamma (+)) en cada paciente, incluso en ausencia de proliferación de linfocito T. Despues de la iniciación de la terapia antivírica (a una media de 20 semanas después de la infección),
 40 todas los pacientes que responden confirmados demostraron gradualmente disminución, después respuestas de linfocito T específico a VHC casi ausentes, mientras que el paciente único que desarrolló avance vírico después del control inicial de VHC mantuvo las respuestas inmunes celulares. Su trabajo apunta al problema fundamental de los fármacos antiviricos solos en hepatitis C, es decir, la carencia de asociación entre la reducción de la carga vírica con los medicamentos y la ausencia de un aumento de la duración de la capacidad de respuesta del linfocito T
 45 específicos a VHC en sangre(24).

50 Tales observaciones provocan la combinación de un íleo o apéndice derivado de la vacuna de la hepatitis C con terapia de fármaco oral convencional o nueva, una estrategia reivindicada en el presente documento en realizaciones específicas de la invención. Tales combinaciones descritas son necesarias para superar la respuesta del linfocito T débil total del hospedador al virus de la hepatitis C durante la infección, la inmunidad añadida insignificante que está conferida por agentes antiviricos, y la necesidad de exponer tejidos linfoideos alternativos a Hepatitis C para producir una respuesta de linfocito T duradera que, a continuación, se pueda amplificar y transferir a linfocitos B de memoria de larga vida en el bazo, timo y médula ósea.

55 Recientemente se han revisado vacunas candidatas por Strickland y col., y el listado entero contenido en el mismo se reivindica como antígenos/adyuvantes candidatos para la administración oral al íleo y/o apéndice(25). Esta lista

no significa que sea limitante puesto que la formulación se podría emplear para cualquier antígeno disponible.

5 Recientemente se ha desarrollado una vacuna oral por Rajkannan y col. para la Hepatitis B.(26) La formulación de vacuna de la Hepatitis B oral se preparó mediante encapsulación exitosa de residuos que representaban péptido inmunogénico 127-145 del epítopo de linfocito B inmuno-dominante de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en micropartículas de poli(D,L-láctido-co-glicólico) (PLG). Las micropartículas de PLG esféricas, lisas con un diámetro de alrededor de 10 micras se prepararon usando el método de evaporación de disolvente de emulsión doble Agua/Aceite/Agua. La eficacia de atrapamiento del péptido de epítopo de linfocito B (PELB) dentro de las micropartículas de PLG era del 64 %. Estudios *in vitro* mostraron que las micropartículas de PLG cargadas con epítopo del linfocito B (MELB) liberaban el péptido en perfil constante y alcanzaban la eficacia del 64,9 % en el Día 10 25. La inmunización oral sencilla de ratones con MELB conducía a la inducción significativa de IgG en suero específico y anticuerpos anti-HB IgM. Después de la finalización de la inducción de anticuerpo, los ratones oralmente inmunizados se infectaban con HBsAg, lo cual daba como resultado la producción rápida de anticuerpos frente a HBsAg como resultado de la respuesta inmune secundaria. El planteamiento de la formulación de micropartículas de 15 PLG puede tener potencial en el incremento de la eficacia de los sistemas microparticulados para la administración oral de vacuna de la hepatitis B(26). Este planteamiento es destacado debido a que es un producto de liberación duodenal pero producía buena inmunidad. No está claro si la estrategia crearía la misma cantidad de inmunidad a la Hepatitis C.

20 En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de una formulación de la invención antes de o en combinación con agentes antivíricos. Ejemplos de agentes antivíricos usados para la Hepatitis B o C incluyen, sin limitación, agentes antivíricos que incluyen agentes antihepatitis B y agentes antihepatitis C están por lo demás descritos en el presente documento e incluyen, por ejemplo, Hepsera (adefovir dipivoxil), lamivudina, entecavir, telbivudina, tenofovir, emtricitabina, clevudina, valtoricitabina, amdoxovir, 25 pradefovir, racivir, BAM 205, nitazoxanida, UT 231-B, Bay 41-4109, EHT899, zadaxin (timosina alfa-1) y sus mezclas para las infecciones de la hepatitis B y ribavirina, interferón pegilado, boceprevir, daclatasvir, asunapavir, INX-189, FV-100, NM 283, VX-950 (telaprevir), SCH 50304, TMC435, VX-500, BX-813, SCH503034, R1626, ITMN-191 (R7227), R7128, PF-868554, TT033, CGH-759, GI 5005, MK-7009, SIRNA-034, MK-0608, A-837093, GS 9190, GS 9256, GS 9451, GS 5885, GS 6620, GS 9620, GS9669, ACH-1095, ACH-2928, GSK625433, TG4040 (MVA-VHC), 30 A-831, F351, NS5A, NS4B, ANA598, A-689, GNI-104, IDX102, ADX184, ALS-2200, ALS-2158, BI 201335, BI 207127, BIT-225, BIT-8020, GL59728, GL60667, PSI-938, PSI-7977, PSI-7851, SCY-635, agonista de TLR9, PHX1766, SP-30 y sus mezclas para las infecciones de la hepatitis C.

35 Como se usa en el presente documento, el término “respuesta inmune” se refiere a una respuesta inmune humoral y/o respuesta inmune celular que conduce a la activación o proliferación de linfocitos B y/o T y/o células que presentan antígeno. En algunos ejemplos, sin embargo, las respuestas inmunes pueden ser de baja intensidad y llegan a ser detectables solamente cuando se usa al menos una sustancia de acuerdo con la invención. “Inmunogénico” se refiere a un agente usado para estimular el sistema inmune de un organismo vivo, de manera que una o más funciones del sistema inmune se incrementan y dirigen hacia el agente inmunogénico. Un “polipéptido inmunogénico” es un polipéptido que provoca una respuesta inmune celular y/o humoral, tanto solo o ligado a un vehículo en presencia o ausencia de un adyuvante. Preferiblemente, se pueden activar células que 40 presentan antígeno.

45 Para valorar la inmunogenicidad (por ejemplo, si una formulación ha inducido una respuesta de anticuerpo de alto título frente a virus, se puede medir un título medio geométrico (TMG) antivírico, por ejemplo, después de unas pocas semanas de tratamiento (por ejemplo, 3 o 4 semanas) y después de la administración de unas pocas dosis (por ejemplo, 3 o 4). El porcentaje de sujetos que se seroconvierten para virus después de unas pocas semanas de tratamiento (por ejemplo, 3 o 4 semanas) y después de la administración de unas pocas dosis (por ejemplo, 3 o 4) también se puede determinar para valorar la inmunogenicidad.

50 50 Para determinar la eficacia profiláctica, se puede conducir un análisis de inmunogenicidad sobre sujetos que permanecen seronegativo a virus y PCR-negativo a virus (frotis y biopsia) en diversos criterios de valoración después de la exposición.

55 La invención se ilustra más mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Antecedentes

60 La inmunidad de la mucosa derivada del intestino y así la respuesta a vacunas depende de la estimulación del antígeno en estructuras linfoepiteliales especializadas tales como las placas de Peyer (27,28). La diseminación integrada de células de memoria a partir de estos tejidos linfoides activos del GI a todos los tejidos exocrinos es la base funcional para las vacunas orales. Hay buena evidencia de que los determinantes endoteliales con afinidad 65 para células linfoides asociadas a GI se comparten entre las placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos y la lámina propia intestinal (29-39). Las células dendríticas aisladas de estas placas de Peyer regulan el sistema

inmune, y se ha mostrado que estimulan los linfocitos T en una reacción de linfocito mezclado, y soportan el desarrollo de linfocito B con IgA (40-48). Los linfocitos B terminalmente diferenciados de la médula ósea y el timo son responsables de la memoria del sistema inmune a largo plazo, estas células se denominan con frecuencia células plasma en la técnica.

5 El contacto inicial de la formulación dirigida oral del antígeno y el adyuvante administrados, es con las células dendríticas del sistema inmune, generalmente con linfocitos T específicos tales como CD4 y CD8. El procesamiento del antígeno se realiza mediante estas células iniciales y a continuación el mensaje del antígeno se pasa a los linfocitos B de memoria y la diseminación de la memoria entre las células linfoides en el bazo, hígado, timo y médula ósea.

10 Con el conocimiento de estas enseñanzas en mano, es curioso que las estrategias de vacuna oral se han limitado en su dirección a estas placas de Peyer, y que en gran parte solamente ha habido revestimientos entéricos aplicados a antígenos en la técnica anterior. Estas vacunas revestidas entéricas evitan el ácido del estómago y 15 normalmente liberan los contenidos a pH de 5,6 a 6,0, una ruta de formulación que se ilustra en la figura 1. Por otro lado, no hay revestimientos entéricos usados como fármacos o vacunas que tengan pH de liberación sobre 7,0 debido a que la opinión es que estos eviten el duodeno, y el duodeno es el sitio principal de la absorción del fármaco. Tampoco se aprecia generalmente que el intestino delgado distal tenga valores de pH sobre 7,3 y que 20 oscile hasta 8,0 en individuos normales. Además no hay mecanismo o explicación generalmente aceptada para este pH alto en el íleo. En general, de podría indicar que el íleo distal es un objetivo de administración de fármaco específico a sitio novedoso, hasta ahora no estudiado en la técnica, y debido a que las propiedades de administración de fármaco no están exploradas, el íleo y el apéndice también se consideran que son objetivos de administración de vacuna completamente novedosos. Este último concepto surge debido a las acciones reguladoras 25 inmunes conocidas de las placas de Peyer y las acciones recientemente descubiertas de las sustancias liberadoras de hormona de freno ileal que mimetizan RYGB sobre la inmunidad derivada del tracto GI, ambas de las cuales están incorporadas como referencia en esta descripción.

30 Sin embargo, queda un hecho abandonado de que el intestino distal, ya identificado por nuestro trabajo como el sensor principal para la regulación de la nutrición, saciedad, y control del síndrome metabólico es (debido a las células sensores denominadas Placas de Peyer y otro tejido linfoide en el apéndice, el íleo y el apéndice), 35 aparentemente el guarda de la respuesta inmune a la invasión por patógenos a través del tracto GI. Actuando vía células dendríticas en las placas de Peyer y en el apéndice, los antígenos y adyuvantes impactan tanto en las rutas inmunes celulares como humorales, las cuales están controladas de una a una por las células del íleo distal y el apéndice. El apéndice (parte del colon derecho) se ha conocido durante mucho tiempo como un regulador principal 40 de la inmunidad innata, y todavía no hay vacuna propuesta para dirigirse al apéndice directamente. En realidad no se ha creído posible tomar como objetivo el apéndice y sin embargo somos capaces de inventar una estrategia de formulación eficaz y fiable de píldora dentro de píldora para la administración en apéndice y colon derecho basada en las características únicas de pH de estos sitios en el intestino.

40 **Ejemplo 1**

Preparación de material antígeno para la inclusión en formulaciones de vacuna que se dirigen al íleo y el apéndice

45 Los antígenos y su potencial inmunogénico asociado son el componente clave de una respuesta de vacuna óptima en tanto vacunación profiláctica como para tratamiento immunoterapéutico de enfermedad. Hay métodos comúnmente empleados para preparar antígenos para vacuna, todos los cuales se consideran dentro del alcance de esta descripción de nueva formulación. Los antígenos son fragmentos generalmente no invasivos o inactivos de células o ADN/ARN bacteriano o vírico que tiene las propiedades de inmuno reconocimiento de las células completas. Se preparan a partir de células completas mediante fragmentación celular y a continuación la separación 50 del componente, con un foco sobre los componentes de la pared celular. Ya que se define la secuencia precisa del fragmento antigénico, se puede preparar en cantidad en líneas celulares bacterianas, vegetales o linfocíticas. Ejemplos de todas estas preparaciones de antígeno y antígenos seleccionados se reivindican como elementos para la nueva administración a GI específica a sitio al íleo y apéndice.

55 *Preparación de adyuvantes para la inclusión en formulaciones que se dirigen al íleo y apéndice*

60 Cuando la respuesta inmune a un antígeno aplicado es débil, efímera o si no insuficiente, es común en la técnica de desarrollo de vacuna para reforzar la respuesta al antígeno añadiendo un adyuvante al antígeno en la formulación aplicada. El elemento clave de un adyuvante exitoso es una respuesta inmunogénica resultante a un antígeno específico que sea mayor que al antígeno solo. Una respuesta reforzada a un antígeno o bien puede prolongar la duración de la protección de la vacuna o puede incrementar la cantidad de protección, o ambas. El beneficio neto es un mejoramiento en la respuesta de la vacuna total en tanto vacunación profiláctica como para tratamiento immunoterapéutico de la enfermedad. Hay métodos comúnmente empleados para preparar adyuvantes para las vacunas, y la inclusión de todas las combinaciones de antígeno-adyuvante conocidas o nuevamente desarrolladas 65 se consideran dentro del alcance de esta nueva descripción de formulación. Composiciones exactas de antígeno-adyuvante formuladas están en su totalidad dentro del alcance de la formulación descrita, y se eligen materiales

específicos para evitar la inactivación de o bien el antígeno o el adyuvante.

Metodología de formulación general:

- 5 La metodología de formulación general proporcionada en el presente documento administrará antígenos, con o sin adyuvantes, y con o sin sustancias liberadoras de hormona de freno ileal, los cuales optimizan por sí mismos la respuesta inmune de las células dendríticas del íleo y de ese modo la función en el papel de los adyuvantes no específicos. Todas las formulaciones descritas en el presente documento se dirigen a sitio en el tracto GI que es diferente de las formulaciones de revestimiento entérico que se aplican en la técnica de la administración de vacuna oral, las cuales son por definición dirigidas a liberar antígenos en el duodeno (véase la figura 1). Los estudios 10 conducidos que usan la tecnología SmartPill usada para estudiar pacientes establecen las lecturas de pH del tracto de GI entero y revelan un pH objetivo para la disolución en el duodeno de 5,5 a 6,0.(49, 50). Se descubrió que las 15 lecturas de pH del intestino más allá del duodeno podrían permitir una estrategia de formulación avanzada para la administración de vacuna oral específica a sitio descrita en el presente documento. La formulación de la vacuna dentro de una píldora dentro de una píldora tiene algunos elementos comunes así como algunos materiales que son 20 específicos al antígeno a usar. Los elementos comunes se describen en este ejemplo y la estrategia para los antígenos específicos se muestra en los ejemplos posteriores.

La formulación 1, ilustrada por las figuras 2 a 3, demuestra los medios más simples de administración específica a 25 sitio de GI de antígenos con o sin adyuvantes al íleo y freno ileal:

1. Identificar y producir cantidades de vacuna del antígeno a usar en la estimulación de las células diana del íleo distal del sistema inmune.
2. Añadir algunos adyuvantes que pueden aumentar más la capacidad de respuesta de la célula diana.
- 25 3. Incorpora algunos elementos nutricionales para mantener la viabilidad de un antígeno de organismo vivo.
4. Asegurar que la mezcla es estable a valores de pH de 7,3 a 8,0.
5. Encapsular los componentes de la mezcla dentro de los microgránulos, polvos o gránulos.
6. Revestir la superficie de la cápsula para ser insoluble a pH<7,3.
- 30 7. Administrar esta cápsula a los sujetos con el fin de determinar la dosis de vacunación eficaz basada en la respuesta de anticuerpo resultante medida.

Modificaciones del sistema adicionales (evolución de la formulación 2, "píldora dentro de una píldora"), como se ilustra en la figura 4 a 6:

- 35 1. Desarrollar una segunda formulación de antígeno vacuna que sea estable a valores de pH de aproximadamente 5,5 a 6,0.
2. Encapsular dicha mezcla con revestimiento con pH de liberación de aproximadamente 5,5.
3. Añadir esta segunda píldora interior más pequeña a la cápsula que contiene la mezcla antigénica principal y que libera a aproximadamente pH 7,3. La segunda cápsula permanecerá intacta en el íleo distal. Pasará dentro 40 del colon derecho y alcanzará el pH de 5,5, liberando de ese modo los contenidos en el colon derecho y alcanzando directamente el apéndice.
4. El fin de la encapsulación interior del antígeno y adyuvante es presentar los contenidos al colon derecho, exponer tejidos linfoides conocidos del colon derecho y apéndice a los antígenos vacuna.
- 45 5. Administrar esta mezcla de píldora doble a los sujetos con el fin de determinar la dosis de vacunación eficaz basada en la respuesta del anticuerpo resultante medida.

Realización adicional que combina elementos de la formulación 1 y formulación 2:

- 50 1. Crear microgránulos de la mezcla de formulación 1, encapsular para liberar los antígenos contenidos a aproximadamente pH 7,0 a 7,6, propagando de ese modo los microgránulos en el yeyuno e íleo e incrementando de ese modo el contacto de las superficies de GI tales como las placas de Peyer a la mezcla de antígeno.
2. Estos microgránulos se pueden tomar oralmente con cualquier líquido o comida, tal como compota de manzana o yogur, y alcanzarán el sitio de liberación en el íleo y freno ileal.
3. Alternativamente, estos microgránulos se podrían encerrar en una cápsula y liberar a pH 7,0.
- 55 4. Como una realización adicional, esta cápsula también podría contener una segunda cápsula más pequeña como en la formulación 2, que a continuación se liberaría en el colon derecho y cerca del apéndice.
5. O bien la formulación 1 o la formulación 2 podría contener sustancias liberadoras de hormona de freno ileal, ya que estas son estimulantes de la respuesta inmune beneficiosa necesaria para la regulación del reconocimiento de antígeno y respuesta inmune a los mismos.
- 60 6. O bien la formulación 1 o la formulación 2 podría contener sustancias terapéuticamente activas en cantidades activas dirigidas frente a la enfermedad, y de ese modo se usa para la inmunoterapia de combinación y la prevención de infecciones o cánceres.

Compendio – Ventajas de las formulaciones de vacunación oral específicas a sitio GI:

- 65 1. Dosis de antígeno inferior durante la dosis parenteral, especialmente cuando el objetivo de vacunación es íleo

y áreas inmuno sensibles asociadas en las que hay una pluralidad de receptores de antígeno del sistema inmune tales como células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B.

5 2. Las vacunas orales presentan menos problemas de estabilidad que las vacunas inyectables, y facilitan el uso de vacuna en países pobres en recursos. En algunos casos, el uso de vacunas orales y las estrategias pueden incluso evitar cualquier necesidad de refrigeración.

10 3. No agujas o acceso a personal especializado para las inyecciones, cuando todas las vacunaciones se usan como productos orales.

15 4. Las ventajas de seguridad se maximizan debido a que se pueden usar menos cantidades de antígeno para vacunar por el tracto GI, frente a mayores cantidades que circulan en el cuerpo.

5. Las dosis orales de refuerzo son técnicamente más fáciles de administrar en casos en los que más de una dosis es necesaria para maximizar la respuesta inmune.

10 6. Es más fácil dar las dosis orales de refuerzo en los períodos regulares, incluso para casos cuando se inyecta la primera dosis de vacuna, proporcionando un medio de protección fácil y segura de una población en riesgo.

15 7. Se necesitan cantidades menores de antígeno para la aplicación selectiva derecha a las células de inmuno vigilancia en el íleo distal y apéndice.

8. Esta sería la primera vacuna oralmente administrada que realmente podría alcanzar el apéndice y ser activa allí en la estimulación del sistema inmune.

9. Con vacunaciones orales, hay menos preocupaciones o incluso ninguna de componentes extraños añadidos como conservantes o de reacciones inmunes sistémicas a proteínas que se inyectan en el cuerpo.

20 10. Las cápsulas orales facilitan estrategias de vacuna de refuerzo, no necesitan tener una inyección, justo toman una segunda cápsula varias semanas después. De esta manera las cápsulas orales son adecuadas para el uso serial en situaciones en las que la respuesta de antígeno es débil o efímera (VIH, estafilococos, gripe, Hepatitis C y cánceres).

25 Ejemplo 2

Desarrollo de formulaciones que usan la bibliografía de soporte o antígenos descritos

Estafilococos

30 Se ha examinado el potencial de las microesferas biocompatibles y biodegradables como un sistema de administración de vacuna oral de liberación controlada. Las microesferas de 1 a 10 micras oralmente administradas compuestas de poli(DL-láctido-co-glicólido) se absorbían específicamente dentro del tejido linfoide de las placas de Peyer del intestino, en el que aquellas mayores de o igual a 5 micras permanecían durante hasta 35 días. Las

35 microesferas de menos de 5 micras se diseminaban dentro de los macrófagos a los nódulos linfáticos mesentéricos y el bazo. Al contrario del toxoide de enterotoxina B estafilocócica soluble, la inmunización oral con enterotoxoides en microesferas inducía anticuerpos específicos a toxina circulantes y una respuesta de antitoxina IgA secretora simultánea en saliva y fluido intestinal.(51)

40 Theilacker y col. recientemente desarrollaron nuevos antígenos vacuna alrededor de modificaciones estructurales del ácido lipoteicoico, e interesantemente se mostró que estos desarrollaban amplia protección frente a varias especies gram positivas patógenas. El ácido lipoteicoico tipo 1 (ALT) está presente en muchas bacterias gram positivas clínicamente importantes, incluyendo enterococos, estreptococos, y estafilococos, y se ha mostrado que anticuerpos frente a ALT que someten a opsonización cepas de *Enterococcus faecalis* no encapsuladas. En el

45 presente estudio, muestran que los anticuerpos frente a ALT de *E. faecalis* también se unen a ALT tipo 1 de otras especies gram positivas y someten a opsonización cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* así como estreptococos del grupo B. Los estudios de inhibición que usan oligómeros de ácido teicoico indicaron que los anticuerpos opsónicos con reactividad cruzada se unen a la cadena principal del ácido teicoico. La inmunización pasiva con anticuerpos de conejo frente a ALT de *E. faecalis* promovieron el aclaramiento de la bacteriemia por *E. faecalis* y *S. epidermidis* en ratones. Además, la protección pasiva también redujo la mortalidad en un modelo de peritonitis por *S. aureus* murino. La eficacia del anticuerpo de conejo frente a ALT sugiere que esta estructura bacteriana conservada podría funcionar como un antígeno vacuna único que se dirige a patógenos gram positivos múltiples.(52). A modo de ejemplo específico, la aplicación oral de este antígeno en una formulación de tracto GI distal está dentro del alcance de la presente invención, ya que se administra al íleo o apéndice del sujeto a vacunar.

55 Otro ejemplo de una vacuna candidata adecuada para la administración oral al íleo y apéndice es StaphVAX. StaphVAX es una vacuna conjugada con polisacárido y proteína bivalente, dirigida frete a *Staphylococcus aureus* capsular tipos 5 y 8, que están asociados con el 80 a 90 % de las infecciones clínicas por *S. aureus*. La vacuna está siendo desarrollada por Nabi para el tratamiento potencial de infecciones en el riñón de pacientes que están recibiendo diálisis peritoneal y son propensos a infecciones estafilocócicas serias. StaphVAX, en común con otras vacunas frente a *S. aureus*, no es altamente inmunogénica y la protección es más efímera. En febrero de 2001, la compañía patrocinadora Nabi reveló planes para conducir un estudio de refuerzo de StaphVAX en pacientes con enfermedad renal en fase terminal (ERFT). Este estudio se conduciría en pacientes que están inscritos en el primer ensayo de fase III y la compañía esperaba la finalización para principios de 2002[283114]. La compañía también estaba progresando con el aumento a escala de los procesos de fabricación para la producción comercial de la vacuna. El resultado de los posteriores ensayos era una confirmación de la inmunogenicidad débil total y la

respuesta efímera, y en este momento esta vacuna está esperando una estrategia para incrementar su inmunogenicidad y duración(53-57).

- 5 Una cepa de vacuna dirigida frente a ácido lipoteicoico (ALT), un componente principal de la pared celular de las bacterias gram positivas, recientemente ha completado un estudio en Fase II que sugiere eficacia y está siendo desarrollada más para investigación clínica(58).

Difteria

- 10 Los liposomas se han usado para encapsular antígenos y adyuvantes desde 1974. Una limitación importante para el uso de liposomas en vacunas orales es la inestabilidad de la estructura lipídica causada por actividades enzimáticas en el duodeno. La reivindicación de los autores era combinar liposomas que pudieran encapsular antígenos (es decir, Dtxd, toxoide de difteria) con quitosano, que protege las partículas y promueve la mucoadhesibilidad. Emplearon técnicas físicas para entender el proceso por el cual los liposomas (SPC: Cho, 3:1) se pueden intercalar 15 con quitosano (Chi) y estabilizar por APV (alcohol polivinílico), que son polímeros biocompatibles biodegradables. Se obtuvieron partículas de superficie lisa redondas de REV-Chi (vesículas de fase inversa intercaladas por Chi) estabilizadas por APV. Las eficacias de encapsulación de las REV (Dtxd se usó como antígeno) eran directamente dependientes de Chi y APV presentes en la formulación. La adsorción de Chi sobre la superficie de las REV se acompañó por un incremento de zeta-potencial. Al contrario, la adsorción de APV sobre la superficie de las REV-Chi 20 estaba acompañada por un descenso del potencial zeta. La presencia de Dtxd incrementó la eficacia de adsorción de superficie de Chi. La afinidad de APV por mucina era 2.000 veces mayor que la observada con Chi solo y no dependía de la molécula que estaba en solución o era adsorbida sobre la superficie liposomal. La liberación de Dtxd encapsulada se retrasó por encapsulación dentro de las REV-Chi-APV. Estos resultados nos conducen a concluir 25 que estas nuevas partículas estabilizadas eran capaces de ser adsorbidas por las superficies intestinales, resistir a la degradación, y de liberación de antígeno controlada. Por lo tanto, las partículas REV-Chi-APV se pueden usar como adyuvantes de la administración oral.(59)

- 30 Se realizó un estudio doblemente ciego en 12 voluntarios sanos para determinar si los inmunocitos circulantes están presentes después de la inmunización oral. Se recogieron muestras secuenciales de sangre periférica en diversos momentos después de la ingestión de una vacuna ribosoma (D53) o placebo. Se identificaron las células que contenían inmunoglobulina en inmunofluorescencia y se detectaron las células formadoras de anticuerpo específico en ELISA-spot en agarosa. Se observaron números superiores de ambos tipos de células en el grupo de individuos que recibieron extractos ribosómicos. Un estudio abierto permitió un mejor acercamiento a las cinéticas de este fenómeno, relacionado con la liberación de linfocitos B activados de placas de Peyer tras la estimulación antigénica. 35 Este acercamiento metodológico se ha descrito en modelos animales pero raramente informado en seres humanos.(60)

- 40 Para elucidar la base fisiológica para la inmunidad de la mucosa de la vacunación oral y presentar el vehículo esencial de micropartículas o nanopartículas usadas para investigar la vacuna de administración oral, se analizaron las características de la presentación de antígeno y la reacción inmune de la mucosa en tejidos linfoides asociados a intestino. Considerada las barreras morfológicas y fisiológicas del tracto gastrointestinal, se discutieron más la absorción y transporte de las partículas, y los estudios sobre las formas farmacéuticas particuladas para la administración de vacuna oral también se resumieron en esta revisión. Las placas de Peyer y las células M, implicadas en la inmuno-regulación son áreas significativas que juegan el papel crítico en las estrategias de 45 administración de vacuna oral. La vesícula aplicada de micropartículas podría superar las barreras y rutas de degradación del tracto gastrointestinal. La vacunación oral se dotó con nueva connotación, especialmente las eficacias de transporte e inmunización aumentadas promovidas por las partículas ancladas a lectina. En conclusión, la vacunación oral mediada por el vehículo particulado por el sistema inmune de la mucosa contribuiría al desencadenamiento específico a sitio y aumento de la señal. Para las vacunas, las perspectivas de la aplicación de 50 estos sistemas vehículo prometedores podrían tener atracción potencial para la investigación científica y el desarrollo comercial.(61). El uso descrito en el presente documento de la formulación 1 y la formulación 2 permite estas vacunas específicas a sitio objetivo de GI y proporcionan una manera específica de reducir estas para practicar. En este ejemplo, reivindicamos una manera oral de administración de cualquier vacuna dirigida a ileo dista o colon derecho a aquellos sitios específicos en el tracto GI, para la respuesta a vacuna del sistema inmune 55 optimizada.

Hepatitis

- 60 Se ha descrito por Pniewski(62) inmunización eficaz frente al virus de la hepatitis B (VHB) y otros patógenos con vacunas orales basadas en planta, y requiere expresantes vegetales apropiados y la optimización de composiciones de vacuna y protocolos de administración. A continuación, estos componentes inmunogénicos requieren formulaciones dirigidas específicas a sitio de GI para la producción de respuesta inmune óptima en el sujeto. Estudios de inmunización previos se basaban principalmente en una combinación de la inyección de un antígeno de superficie pequeño de VHB (S-HBsAg) y el suministro con tejido crudo que contenía el antígeno, complementado 65 con un adyuvante, y que procedía de plantas que conferían resistencia a kanamicina. El objetivo de su estudio era desarrollar una fórmula de vacuna oral prototípica para la inmunización humana. Se produjo por modificación por

ingeniería lechuga resistente a herbicida, expresando establemente a través de microgramos de generación progenie de S-HBsAg por g de peso fresco y formados dentro de partículas similares a virus (PSV). El tejido liofilizado que contenía una dosis de antígeno ensamblado a PSV de 100 ng, relativamente baja, administrado solamente de manera oral a ratones con un largo intervalo de 60 días entre las inmunizaciones principales y de refuerzo y sin adyuvante exógeno, provocó respuestas anti-HB humorales sistémicas y de la mucosa al nivel nominalmente protector. El tejido liofilizado se convirtió en comprimidos, que conservaron el contenido de S-HBsAg durante al menos un año de almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados del estudio proporcionan indicaciones sobre la metodología de inmunización usando una vacuna oral prototípica derivada de planta duradera, eficaz y conveniente frente a la hepatitis B.(62)

10 Programas de inmunización actuales frente al virus de la hepatitis B (VHB) implican con frecuencia cada vez más nuevas vacunas tricomponente que contienen junto con los antígenos de superficie pequeños (S-HBsAg)-también medios y grandes de VHB (M- y L-HBsAg). Las plantas productoras de todas las proteínas HBsAg pueden ser una fuente de componentes para una vacuna anti-VHB "triple" oral potencial. El objetivo de la investigación presentada 15 era estudiar el potencial de expresión de M/L-HBsAg en tejido de hoja y condiciones de su procesamiento para una vacuna oral prototípica. El tabaco y la lechuga que portan genes de M- o L-HBsAg y son resistentes al herbicida glufosinato se modificaron por ingeniería y se verificó la integración de los transgenes por PCR e hibridaciones Southern. Se confirmó la expresión de M- y L-HBsAg por transferencia Western y se analizó por ELISA al nivel de 20 microgramos por g de peso fresco. Los antígenos manifestaron un dominio S común y dominios característicos preS2 y preS1 y se ensamblaron dentro de las partículas similares a virus (PSV). Tejidos de hoja que contenían M- y L-HBsAg se liofilizaron para producir un material de partida de una fórmula de vacuna oralmente administrada. Los antígenos eran claramente sensibles a las condiciones de liofilización y temperatura de almacenamiento, en el aspecto de la estabilidad de los dominios S y preS y la formación de partículas multiméricas. La eficacia de la 25 liofilización y el almacenamiento dependía también del contenido de antígeno inicial en el tejido vegetal, todavía M-HBsAg parecía ser aproximadamente 1,5 a 2 veces más estable que L-HBsAg. Los resultados del estudio proporcionan indicaciones que conciernen a la preparación de otros dos constituyentes, próximos a S-HBsAg, para una vacuna tricomponente oral prototípica derivada de planta frente a la hepatitis B.(63)

30 Se preparó una formulación de vacuna de la hepatitis B mediante la encapsulación exitosa de residuos que representan péptido inmunogénico 127-145 del epítopo de linfocito B inmunodominante del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en micropartículas de poli(D,L-láctido-co-glicólico)(PLG). Las micropartículas de PLG 35 esféricas lisas con un diámetro de alrededor de 10 micras se prepararon usando el método de evaporación de disolvente de emulsión doble (Agua/Aceite/Agua). La eficacia de atrapamiento del péptido de epítopo de linfocito B (PELB) dentro de micropartículas de PLG era del 64 %. Estudios *in vitro* mostraron que las micropartículas de PLG 40 cargadas con epítopo de linfocito B (MELB) liberaban el péptido en perfil constante y alcanzaban 64,9 % de eficacia el Día 25. La inmunización oral sencilla de ratones con BCME condujo a la inducción significativa de anticuerpos anti-HB IgG y IgM de suero específicos. Después de la finalización de la inducción de anticuerpo, los ratones oralmente inmunizados se infectaron con HBsAg, que dieron como resultado la producción rápida de anticuerpos frente a HBsAg como un resultado de la respuesta inmune secundaria. Las formulaciones de micropartícula de PLG 45 pueden tener potencial para incrementar la eficacia de los sistemas microparticulados para la administración oral de la vacuna de la hepatitis B.(26)

50 Una formulación de vacuna oral comprendida por micropartículas de almidón con antígenos conjugados está siendo desarrollada, y los autores han examinado la absorción de tales micropartículas por la mucosa intestinal y 55 examinaron si el antígeno conjugado puede influir en la absorción. Se usaron dos antígenos modelo: subunidad B de la toxina del cólera recombinante (TCBr), que se sabe que se une al receptor GM1 ubicuo, y albúmina de suero humana (HSA) que no se sabe que tenga ninguna propiedad de unión específica. La absorción se estudió en bucles intestinales ligados de ratón dentro de los cuales se inyectaron las micropartículas. Los bucles intestinales se extirparon, fijaron en etanol al 95 % helado. Se montaron especímenes enteros, se expusieron a reactivos marcados con fluorescencia que tiñen el citoesqueleto, las partículas y/o las células M y se examinaron en un microscopio de barrido laser confocal. Se vio una diferencia cualitativa en la absorción de las micropartículas conjugadas con TCBr y HSA. Se encontraron micropartículas conjugadas con TCBr tanto en las vellosidades como en los folículos de las placas de Peyer. Las micropartículas conjugadas con HSA se pudieron detectar solamente en los folículos de las placas de Peyer y no en las vellosidades. La TCBr conjugada a micropartículas no perdió su capacidad de unirse al receptor GM1, como se muestra con un ELISA de GM1, y la absorción de micropartículas conjugadas con TCBr en vellosidades es lo más probablemente facilitado por la unión de TCBr al receptor GM1. La diferencia cualitativa en la absorción podría ser de importancia para el desarrollo de una respuesta inmune ya que el microambiente de citoquina y quimioquina durante la presentación de antígeno decidirá la diferenciación de la respuesta inmune inducida.(64)

60 Gripe

65 La inducción de la inmunidad de la mucosa a través de la inmunización oral es un modo eficaz de controlar la infección de la gripe. El planteamiento es tan exitoso que incluso los pacientes con sistemas inmunes comprometidos como ocurre en VIH y cánceres pueden alcanzar inmunidad a la gripe. En tránsito del ensayo con animales con una realización relacionada con el producto, se encapsuló baculovirus que manifestaba hemaglutinina

de gripe dentro de una estructura micelar inversa de fosfatidilcolina y se administró dentro del tracto intestinal de ratones para estudiar su eficacia como vacuna oral frente a infección de clado cruzado H5N1. Los ratones vacunados con baculovirus encapsulados que manifestaban HA (En-BacHA) mostraron IgG en suero específico a HA significativamente aumentado y anticuerpos IgG y IgA de la mucosa, y títulos de inhibición de hemaglutinación (IH) superiores, cuando se comparaba con su forma no encapsulada (BacHA). La estimación de los anticuerpo neutralizantes en suero también indicó que la formulación de En-BacHA era capaz de inducir fuerte neutralización de clado cruzado frente a cepas de H5N1 heterólogas (clado 1.0, clado 2.1, clado 4.0 y clado 8.0). Además, los ratones vacunados con En-BacHA solo eran capaces de conferir protección al 100 % frente a 5MLD50 de cepa de H5N1 heteróloga HPAI (clado 1). La inclusión de la subunidad B de la toxina del cólera recombinante como adyuvante de la mucosa en la formulación de vacuna no mostró ningún efecto significativo en tanto respuestas inmunes sistémicas como de la mucosa. Los autores concluyeron que la administración oral de HA de H5 recombinante encapsulado expresado sobre la superficie de baculovirus era un modo eficaz para preparar el sistema inmune frente a la infección de H5N1 en ratones y no tendría preocupaciones de bioseguridad asociadas con su producción o administración.(65)

15 Hay productos en necesidad de administración dirigida. Usando la presente invención, estos productos se podrían formular fácilmente para la administración al íleo y apéndice, con el incremento esperado en la respuesta protectora de anticuerpo, un beneficio directo del antígeno que sobrevive más allá del ácido del estómago y las proteasas en el duodeno.

20 Una vacuna experimental eficaz puede fallar en llegar a ser una realidad terapéutica por un número de razones científicas, reguladoras o comerciales. En esta revisión, los autores comparten algo de sus experiencias personales como investigadores de la Universidad y proporcionan un recuento de algunos de los problemas encontrados durante el aumento a mayor escala y la valoración preliminar de una formulación de vacuna oral de la gripe. Muchos de los problemas afrontados han sido no científicos, y han estado relacionados con la identificación de fuentes de financiación del proyecto, el encuentro de compañías de fabricación de contrato adecuado que estén conforme a la GMP, y la protección de la propiedad intelectual de los estudios científicos. La revisión pretende ser una guía práctica que permitirá a otros investigadores adoptar estrategias eficaces para permitir la traducción de una formulación experimental eficaz a un producto comercial viable.(66)

25 30 La gripe parecería un candidato prometedor para la vacunación oral por el íleo y el apéndice, y hay muchas ventajas potenciales y obvias para la adopción de esta vía de vacunación sobre los métodos actualmente disponibles de inyección intramuscular o inhalación nasal. Cada año, la FDA convoca un encuentro con fabricantes para definir las cepas de vacuna a usar en la estación de otoño. En 2012, el comité de la FDA estableció una vacuna de la gripe trivalente que contiene 3 cepas: virus similar a Cepa A/California/7/2009 (H1N1); virus similar a Cepa A/Victoria/361/2011 (H3N2); virus similar a Cepa B/Wisconsin/1/2010 (linaje B/Yamagata). Para producir una vacuna de la gripe oral que se dirige al íleo y apéndice usando la presente invención, cada una de estas cepas seleccionadas por la FDA se encapsularían separadamente dentro de microgránulos. Los microgránulos estarían mezclados en relación 1:1:1 y colocados dentro de la cápsula antes del revestimiento para pH de liberación por encima de 7,3. Para dirigirse al apéndice, la mezcla de microgránulos primero se encapsularía dentro de una píldora interior con disolución a pH entre 5,5 y 6,0. De este modo, los contenidos de la píldora interior alcanzaría el apéndice según las enseñanzas de las figuras 4 a 6 cuando los microgránulos están encapsulados dentro de la Formulación 1 y 2. El uso oral de esta formulación para la vacuna de la gripe 2012 se propondría como una alternativa a una mezcla de estas mismas cepas en una vacuna a inyectar o inhalar. Ensayaríamos esta formulación de la gripe con y sin el adyuvante no específico. Según las enseñanzas de este planteamiento de formulación para gripe, se aplicaría un planteamiento similar para las cepas seleccionadas por el comité de la FDA en cada año se hace una selección.

35 40 45 50 55 60 65 La obesidad es probablemente el factor de riesgo más importante de gravedad incrementada de las infecciones del virus de la gripe y la mortalidad(67), se cree que tiene impacto negativo sobre la eficacia de la vacuna. Recientemente, la mortalidad ha surgido como un resultado del subtipo H1N1 del virus de la gripe A pandémica, necesitando el desarrollo de estrategias de vacuna más eficaces, quizás dirigiendo la respuesta inmune al tracto gastrointestinal.

En ratones obesos, Kim y col. investigaron los efectos de la obesidad inducida por dieta sobre las respuestas inmunes inducidas por vacuna y la eficacia protectora frente a virus de la gripe H1N1 pandémica. Se inmunizaron ratones C57BL/6J obesos y delgados inducidos por dieta con vacuna 2009 H1N1 monovalente comercial, y se observaron las respuestas del anticuerpo específico a antígeno y las actividades neutralizantes. Después de la vacunación, los ratones se expusieron a virus H1N1 homólogo, y se examinaron la patogénesis y la mortalidad. Las respuestas del anticuerpo específico a H1N1 inducidas por vacuna y las actividades neutralizantes se redujeron notablemente en ratones obesos. Coherente con las respuestas del anticuerpo, los títulos de los virus de pulmón fueron significativamente mayores en ratones obesos que en controles delgados después de la exposición. Además, el grupo obeso mostró expresión muy incrementada de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en tejido de pulmón, inflamación de pulmón grave, y tasa de mortalidad final mayor (100 %) en comparación con la de los ratones control delgados (14 %). Los resultados del estudio muestran que las respuestas inmunes profilácticas y la capacidad de protección inducida por la vacuna 2009 H1N1 podían estar extremadamente comprometidas en la obesidad inducida por dieta. Estos resultados sugieren que se requieren nuevas estrategias de vacunación para

grupos en riesgo, incluyendo la población obesa.(68)

Hay que indicar que el pH del íleo es diferente en obesidad del de los normales, y estos resultados ya han conducido al uso mejorado de las sustancias liberadoras de hormona de freno ileal de la manera de imitación de cirugía RYGB,

5 los resultados incorporados por referencia. Claramente, las formulaciones de vacuna oral para la gripe y potencialmente otras vacunas orales dirigidas a íleo se deberían ajustar para el pH de algún modo inferior encontrado en el íleo de sujetos obesos. Por consiguiente, hemos fijado el objetivo para la liberación a pH de 7,3, que debería permitir el uso eficaz de vacunas orales en el paciente obeso así como normal o delgado.

10 Otros han indicado una necesidad de una respuesta inmunogénica mejor a la vacuna de la gripe, y Kim y col. propusieron desarrollar un nuevo método de administración en piel que es sencillo y permite la fácil auto administración. Prepararon parches de microaguja con vacuna de la gripe estabilizada e investigaron sus respuestas inmunes protectoras en ratones. Los ratones vacunados con una dosis de microaguja única de la vacuna de la gripe estabilizada con trehalosa desarrollaron fuertes respuestas a anticuerpo que eran de larga duración. En

15 comparación con la vacunación intramuscular tradicional, la vacunación por microaguja estabilizada era superior en la inducción de inmunidad protectora, como se evidenció por el aclaramiento eficaz del virus del pulmón y las repuestas inmunes de la célula secretora humorales y secretoras de anticuerpo aumentadas después de la supervivencia al 100 % a la exposición letal. La estabilización de la vacuna se encontró que era importante, debido a que los ratones vacunados con una vacuna por microaguja no estabilizada provocó una respuesta de anticuerpo 2a

20 de inmunoglobulina G más débil, en comparación con la vacuna por microaguja estabilizada, y se protegían solamente parcialmente frente a la exposición vírica. Era su hipótesis que el tráfico mejorado de las células dendríticas a los nódulos linfáticos regionales como resultado de la administración con microaguja a la piel podría jugar un papel en la contribución a la inmunidad protectora mejorada. Conclusiones: Estos descubrimientos sugieren que la vacunación de la piel que usa un parche de microaguja puede mejorar la eficacia protectora e inducir la

25 inmunogenicidad constante a largo plazo y también puede proporcionar un método sencillo de administración para mejorar la cobertura de la vacunación de la gripe.(69)

Estos experimentos ofrecen otra ventaja potencial de la administración dirigida de las vacunas al tracto GI por una formulación oral que se dirige a las células dendríticas y los tejidos linfoides del íleo y el apéndice. Específicamente 30 la vacunación será más potente cuando se aplica de esta manera.

Cólera

35 La aparición del serogrupo *Vibrio cholerae* O139 de *V. cholera*, capaz de causar cólera deshidratante grave ha conducido durante la década a esfuerzos en la formulación de vacunas para proteger frente a este patógeno. Aunque la prevalencia de la diarrea debido a *V. cholerae* O139 ha registrado un descenso, los esfuerzos sobre el desarrollo de vacuna continua para formular una vacuna oral capaz de estimular el sistema mucoso del intestino. Hemos estudiado la inmunogenicidad mucosa en adultos de Bangladesh a una vacuna del cólera bivalente de célula entera (WC) muerta compuesta de cepas de *V. cholerae* O139 así como *V. cholerae* O1 junto con la subunidad de la

40 toxina B del cólera recombinante (CTB) (WC-O1/O139/CTB) y en comparación con las respuestas inmunes a las obtenidas con la vacuna del cólera monovalente autorizada, Dukoral (WC-O1/CTB). La estimación directa de las respuestas de la mucosa específicas a vacuna WC-O1/O139/CTB se llevaron a cabo usando linfocitos aislados de las biopsias duodenales, fluido de lavado intestinal y heces. Las fuertes respuestas de la célula secretora de anticuerpo inducidas por vacuna en el duodeno específicas a CTB así como el lipopolisacárido (LPS) O1 y O139. La magnitud de la respuesta era mayor en el intestino que en la circulación en todos los tres isotipos de anticuerpo. Las respuestas de anticuerpo de la mucosa específico a CTB y LPS también se vieron en fluido de lavado intestinal y extractos fecales. Las respuestas de anticuerpo de vibrio en plasma se observaron para tanto los serogrupos *V. cholerae* O1 como O139 (tasas de respuesta al 76 % y 57 %, respectivamente). Las respuestas de IgA y IgG en plasma a CTB y las respuestas de IgA a tanto LPS O1 como O139 eran elevadas. Las respuestas inmunes eran

45 comparables a las vistas para los destinatarios de WC-O1/CTB monovalente en todos los componentes estudiados. En general, la vacuna del cólera bivalente induce fuertes respuestas de la mucosa y la adición del componente O139 no interfiere con las respuestas a la vacuna autorizada Dukoral. Esto fija el terreno para ensayar tales vacunas en grandes ensayos de campo en Bangladesh y también demuestra que la adición de otros componentes vibrio a la vacuna del cólera existente no altera las respuestas a los componentes de vacuna O1.(70)

55 La reivindicación de este trabajo era evaluar la microencapsulación mediante secado por pulverización de *Vibrio cholerae* inactivado, usando copolímeros metacrílicos Eudragit(R) L30D-55 y FS30D. Las micropartículas obtenidas presentaron un tamaño de partícula alrededor de 3,0 µm. La temperatura de preparación afectó la morfología y la antigenicidad de las micropartículas, pero no afectó al contenido de *V. cholerae*. Los estudios de liberación *in vitro* 60 mostraron que en medio ácido se liberaron menos del 5 % de las bacterias, y en medio neutro, las micropartículas de Eudragit(R) L30D-55 liberaron 86 % después de 24 h, mientras que FS30D liberó menos del 30 %. Las ratas inoculadas con micropartículas presentaron títulos de anticuerpo de vibrio. La microencapsulación mediante secado por pulverización de *V. cholerae* inactivado se podría proponer como un método para obtener una vacuna oral que proporciona la liberación controlada de las bacterias.(71)

65

BCG para TB

La tuberculosis bovina (bTB) causada por la infección con *Mycobacterium bovis* está causando pérdida económica considerable a los granjeros y el Gobierno en el Reino Unido ya que su incidencia está incrementando. Los esfuerzos para controlar la bTB en el RU está obstruida por la infección en tejones euroasiáticos (*Meles meles*) que representan un reserva y fuente silvestre de la exposición de *M. bovis* recurrente al ganado. La vacunación de los tejones con la vacuna de TB humana., Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) de *M. bovis*, en cebo oral representa una posible herramienta de control de la enfermedad y tiene la mejor perspectiva para alcanzar las poblaciones de tejón sobre un área geográfica amplia. Usando modelos de ratón y cobaya, evaluamos la inmunogenicidad y la eficacia protectora, respectivamente, de vacunas orales de tejón candidatas basadas en la formulación de BCG en matriz lipídica, perlas de alginato, o un nuevo híbrido microcapsular de tanto lípido como alginato. Dos dosis diferentes orales de BCG se evaluaron en cada formulación para su eficacia protectora en cobayas, mientras que unas dosis única se evaluó en ratones. En ratones, las respuestas inmunes significativas (basadas en la proliferación de linfocito y la expresión de IFN-gamma) se vieron solamente con la matriz lipídica y el lípido en formulación microcapsular de alginato, correspondiente al aislamiento de BCG viable a partir de nódulos linfáticos del tracto alimentario. En cobayas, solamente BCG formulado en matriz lipídica confirió protección al bazo y pulmones después de la exposición a la vía por aerosol con *M. bovis*. La protección se ve con dosis de administración en el intervalo de 10(6)-10(7) UFC, aunque esto era más coherente en el bazo a la dosis superior. No se vio protección en términos de UFC de órgano con BCG administrado en perlas de alginato o en lípido en microcápsulas de alginato, aunque 10(7) en la anterior formulación confirió protección en términos de incremento del peso corporal después de la exposición y una relación de pulmón y peso corporal más pequeña en autopsia. Estos resultados resaltan el potencial para las formulaciones de vacuna basadas en lípido, más que en alginato, como vehículos de administración adecuados para una vacuna BCG oral en tejones.(72)

Las nuevas micropartículas de poli(dl-láctido-co-glicólico) para la administración de vacuna oral se formularon usando los polímeros entéricos Eudragit L100-55 y carboximetiletilcelulosa (CMEC) como estabilizadores. Para servir como control, las micropartículas también se produjeron usando el tensioactivo APV convencional. En todos los tres casos el antígeno, las micropartículas cargadas con ovoalbúmina (OVA) producidas eran menos de 5 micras de diámetro y tenían una apariencia redondeada lisa y esférica. La presencia de tensioactivos en la superficie de micropartícula se demostró por las técnicas de análisis de superficie, XPS y SSIMS. La incubación de micropartículas con soluciones de pepsina o tripsina condujeron a la separación de una proporción del antígeno asociado con todos los tres sistemas. Sin embargo, en tres formulaciones de micropartícula estabilizadas con CMEC y una de las tres formulaciones de Eudragit, un alto porcentaje del antígeno asociado se protegió de la separación por una solución de pepsina a pH 1,2 en comparación con las micropartículas estabilizadas con APV. Además, con ciertas formulaciones de CMEC y Eudragit se proporcionó un grado de protección a la OVA asociada frente a la separación por tripsina a pH 7,4. Después de la incubación de las micropartículas en el fluido gástrico simulado se detectó un porcentaje mayor de OVA antigenica intacta en micropartículas estabilizadas usando CMEC que en las formulaciones estabilizadas con APV y Eudragit. La inmunización oral de ratones con micropartículas cargadas con OVA estabilizadas usando cualquiera de los tres surfactantes condujo a la inducción de anticuerpos IgG de suero específico y IgA salivar. Los niveles significativamente mayores de anticuerpo IgA salivar específico a OVA se midieron en ratones inmunizados con micropartículas estabilizadas con CMEC que con las otras dos formulaciones. Este nuevo planteamiento en la formulación de micropartícula de PLG puede tener potencial en el incremento de la eficacia de los sistemas microparticulados para la administración oral de vacunas.(73)

En resumen, las estrategias para la vacunación oral son mucho más comúnmente usadas para inmunizar poblaciones de animales que la inmunización humana. Sin embargo, la nueva estrategia de formulación para los antígenos descritos en el presente documento permitirán la propagación del uso de la vacunación oral para prevenir enfermedad infecciosa seria, así como inmunoterapia oral en soporte del tratamiento para infecciones víricas crónicas o cánceres.

Ejemplo 3

Un estimulante general de las respuestas del linfocito B a partir de antígenos cancerosos y fragmentos que se podrían administrar fácilmente al apéndice.

Un gran acuerdo de trabajo sobre antígenos cancerosos se ha llevado a cabo en el "Roswell Park Cancer Center" en Buffalo NY. Este trabajo ha conducido a un gran número de antígenos a tumores sólidos (1-10). El uso de estos antígenos en una formulación que los administra al íleo y apéndice (formulación 2) se revindica por el presente documento como dentro del alcance de esta tecnología.

Otros ejemplos de antígenos tumorales son conocidos por los expertos. Por ejemplo, Kozbor estudió el gangliósido GD2, manifestado por cinco residuos Neu5Acalfa2-8Neu5Acalfa2-3(GalNAcbeta1-4)Galbeta1-4G1cbeta de carbohidrato unidos a una cadena de ceramida que ancla el gangliósido en la membrana celular, que se expresa sobre tumores derivados de forma neuroectodermal. GD2 se ha usado como un objetivo para la inmunoterapia pasiva y activa en pacientes con melanoma maligno y neuroblastoma. Kozbor generó un mimotopo 47-LDA de GD2 investigando una genoteca peptídica de presentación de fago con AcM anti-GD2 14G2a, y publicó que la vacunación

- con el mimotopo 47-LDA provocaba respuestas de anticuerpo IgG de reacción cruzada GD2 así como linfocitos T CD8(+) restringidos a MHC clase I a células tumorales de neuroblastoma singénico. La actividad citotóxica de LTC inducida por vacuna era independiente de la expresión de GD2, sugiriendo el reconocimiento de un nuevo antígeno asociado a tumor que interacciona con 47-LDA. Los estudios de inmunotransferencia que usan AcM 14G2a 5 demostraron que este anticuerpo interacciona con una glicoproteína de 105 kDa expresada por células de neuroblastoma y melanoma GD2(+) y GD2(-). Los estudios funcionales de células tumorales crecidas en cultivos de colágeno tridimensionales (3D) con AcM 14G2a mostraron disminuciones en la activación de la metaloproteinasa-2 de la matriz, un proceso regulado por moléculas de adhesión de linfocito activado de 105 kDa (ALCAM/CD166). La glicoproteína CD166 se mostró que es reconocida por el anticuerpo 14G2a, y la inhibición de la expresión de CD166 10 por la interferencia de ARN extirpó la sensibilidad celular a lisis por linfocitos T CD8(+) inducidos por 47-LDA *in vitro* e *in vivo*. Estos resultados sugieren que los LTC inducidos por vacuna reconocen un epítopo de interacción 47-LDA expresado por CD166 y revelaron un nuevo mecanismo de inducción de respuestas celulares específicas a tumor expresado por CD166 y revelaron un nuevo mecanismo de inducción de respuestas celulares específicas a tumor. (74)
- 15 Segal y col. estudiaron las proteínas de choque térmico (HSP), las cuales son inductores potentes de inmunidad y se han aprovechado como adyuvantes de vacuna dirigida a cánceres e infecciones. Las HSP son un grupo de moléculas intracelulares ubicuas que funcionan como chaperonas moleculares en numeroso procesos, tales como plegamiento de proteína y transporte, y se inducen bajo condiciones de estrés, tales como fiebre y radiación. Ciertas HSP son inductores potentes de inmunidad innata y específica a antígeno. Activan células dendríticas parcialmente 20 a través de receptores tipo toll, linfocitos citolíticos naturales activos, incrementan la presentación de antígenos a células efectoras y aumentan las respuestas inmunes de linfocito T y humorales frente a sus antígenos asociados. Sus papeles en la preparación de rutas de defensa del hospedador múltiples están siendo explotados en el desarrollo de la vacuna para cáncer y enfermedades infecciosas. (75)
- 25 *Detalles adicionales sobre las proteínas de choque térmico:* Varios estudios han confirmado que ciertas proteínas de estrés pueden funcionar como vacunas potentes frente a un cáncer específico cuando se purifican a partir del mismo tumor. Estudios recientes de dos proteínas de estrés reconocidas durante largo tiempo pero no examinadas, proteína de choque térmico (HSP) 110 y proteína regulada por glucosa (grp) 170, han demostrado que son proteínas de unión a cadena peptídica eficaces. La presente investigación examina el potencial de vacuna de HSP110 y 30 grp170. En primer lugar, se muestra que la vacunación anterior con HSP110 o grp170 purificada de fibrosarcoma inducido por metilcolantreno causó regresión completa del tumor. En un segundo modelo tumoral, HSP110 o grp170 purificada de los tumores de colon 26 condujeron a una inhibición del crecimiento significativa de este tumor. Además, la inmunización de HSP110 o grp170 prolongó significativamente la vida útil de los ratones que portan tumor de colon 26 cuando se aplica después del trasplante tumoral. Una respuesta de linfocito T citotóxico 35 específico a tumor desarrollada en los ratones inmunizados con HSP110 o grp170 derivadas del tumor. Además, los tratamientos de los ratones con células dendríticas derivadas de médula ósea con estas dos proteínas del tumor también provocaron una fuerte respuesta antitumoral. Los estudios mostraron que las condiciones hipertérmicas tipo fiebre suaves aumentan la eficacia de la vacuna de HSP110 así como el cognado de choque térmico 70, pero no grp170. Estos estudios indican que HSP110 y grp170 se pueden usar en inmunoterapia de cáncer basada en 40 HSP, que se pueden usar células dendríticas que presentan Ag para mediar este planteamiento terapéutico, y que la hipertermia de nivel de fiebre puede aumentar significativamente la eficacia de la vacuna de HSP. (76)
- 50 **Cáncer de ovario.** Los antígenos de testículos cancerosos (TC) se expresan en una diversidad de cánceres, pero no en tejidos adultos normales, excepto para células germinales de los testículos, y por lo tanto parecen ser objetivos ideales para la inmunoterapia. En un esfuerzo por examinar el potencial de antígenos de TC NY-ESO-1 y LAGE-1 para la inmunoterapia en el cáncer de ovario epitelial (COE), examinamos la expresión de estos antígenos por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) e inmunohistoquímica (IHC) en un gran panel de tejidos con COE y líneas celulares. Se ensayaron sueros de un subgrupo de los pacientes para el anticuerpo NY-ESO-1/LAGE-1 por ELISA. Los datos indicaron que cuatro líneas celulares de cáncer de ovario eran positivas para uno o ambos antígenos de 55 TC. La expresión de NY-ESO-1 en COE se demostró por RT-PCR y/o IHC en 82 de 190 (43 %) especímenes. La expresión de NY-ESO-1 por IHC osciló de patrón homogéneo a heterogéneo. La expresión de ARNm de LAGE-1 estaba presente en 22 de 107 (21 %) tejidos tumorales. En general, la expresión de ARNm de NY-ESO-1 o LAGE-1 estaba presente en 42 de 107 (40 %) de especímenes con COE y la co-expresión de ambos antígenos se demostró en 11 % de los especímenes. El anticuerpo a NY-ESO-1/LAGE-1 estaba presente en 11 de 37 (30 %) de los pacientes cuyos tumores expresaron o bien NY-ESO-1 o LAGE-1. Los anticuerpos detectables se presentaron durante hasta 3 años después del diagnóstico inicial. Aunque no había relación estadísticamente significativa entre la expresión de antígeno NY-ESO-1/LAGE-1 y supervivencia, los datos mostraron expresión aberrante de NY-ESO-1 y LAGE-1 por IHC/RT-PCR en una proporción significativa de pacientes con COE. Estos descubrimientos indican que NY-ESO-1 y LAGE-1 eran objetivos atractivos para la inmunoterapia específica a antígeno en COE. (77)
- 60 60 Los adyuvantes no tienen que ser proteínas, especialmente si las placas de Peyer asociados a íleo se dirigen por medio de la invención reivindicada en este momento.

Ejemplo 4*Formulación de la vacuna oral*

- 5 Se desarrolló una formulación de vacuna oral comprendida por micropartículas de almidón con antígenos conjugados.

La absorción de tales micropartículas mediante la mucosa intestinal se midió y los autores examinaron si el antígeno conjugado puede influir en la absorción.

10 Se usaron dos antígenos modelo en la preparación de esta vacuna: subunidad de toxina B del cólera recombinante (TCBr), la cual se sabe que se une al receptor GM-1 ubicuo, y la albúmina de suero humana (HSA) que no se conoce que tenga ninguna propiedades de unión específica. La absorción se estudió en bucles intestinales ligados de ratón dentro de los cuales se inyectaron las micropartículas. Los bucles intestinales se extirparon, fijaron en etanol al 95 % helado. Los especímenes enteros se montaron, expusieron a reactivos marcados por fluorescencia que tiñen el citoesqueleto, las partículas y/o las células M y se examinaron en un microscopio de barrido por láser confocal. Se vio una diferencia cualitativa en la absorción de las micropartículas conjugadas con TCBr y HSA. Las micropartículas conjugadas con TCBr se encontraron tanto en vellosidades como en los folículos de las placas de Peyer. Las micropartículas conjugadas con HSA solamente podrían detectarse en los folículos de las placas de Peyer y no en vellosidades. La TCBr conjugada a las micropartículas no perdieron su capacidad de unirse al receptor GM1, como se muestra con un ELISA de GM1, y la absorción de micropartículas conjugadas con TCBr en vellosidades es lo más probablemente facilitada por la unión de TCBr al receptor GM1. La diferencia cualitativa en la absorción podría ser de importancia para el desarrollo de una respuesta inmune ya que el microambiente de citoquina y quimioquina durante la presentación de antígeno decidirá la diferenciación de la respuesta inmune inducida.(64) Los descubrimientos experimentales de este trabajo permite el uso de la formulación 1 en vacunas dirigidas específicas a sitio de GI orales, ya que los sitios en el intestino alcanzados en la preparación experimental son los mismos que los permitidos en el uso humano de la vacunación oral por dicha metodología de liberación específica a sitio.

30 **El ejemplo 5 está dirigido a la realización y ensayo de una formulación oral de vacuna para la administración específica a sitio de GI de antígenos con o sin adyuvantes inicialmente al íleo y después más tarde al apéndice para estimular el objetivo del íleo distal y/o células del sistema inmune del apéndice.**

35 Administración dirigida: vacuna (bacterias atenuadas vivas "*Listeria monocytogenes*" con/o sin proteínas de fusión peptídicas como antígenos con "L-leucina" como un ayudante farmacéutico) para la administración en íleo a pH 7,3 a 7,6 y apéndice a pH 5,5 a 6,2.

Ingrediente farmacéutico activo (IFA):

40 Bacterias altamente atenuadas vivas: *Listeria monocytogenes* son proporcionadas por Denisco, CHR Hansen, Instituto Risell-Lallemand y/u otros proveedores globales de alta calidad.

45 L-leucina (ayudante de dispersabilidad) - suministrada por Ajinomoto y Tyloxapol, USP (ayudante de anti-acumulación) suministrado por Sigam Aldrich.

50 Proceso de formulación intermedia/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

"Formulación intermedia en polvo (10 a 100 micras) de vacuna seca"

Ingredientes	Cantidad (%)
Bacterias vivas y altamente atenuadas, liofilizadas (especie de <i>Listeria monocytogenes</i>)	5 %
L-leucina	95 %
Agua como sea requerida	0 %

55 Preparada mezclando L-leucina, bacterias (especie de *Listeria monocytogenes*) vivas y altamente atenuadas, liofilizadas, con agua y liofilizada/secada por pulverización más en liofilizador/secador por pulverización para separar el agua.

60 Producto final ejemplo – cápsula en cápsula (gelatina dura) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	10 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	58 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	9 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Agua/disolventes como sean requeridos	0 %

La anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca, y una parte de los excipientes se mezclan en un mezclador de tipo V o similar. Los polvos mezclados se rellena en cápsulas de HPMC pequeñas (aproximadamente 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulación. Las anteriores cápsulas se revisten (revestimiento barrera)

- 5 con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con
- 10 solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o polímeros equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento
- 15 acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 pequeñas junto con una parte de los excipientes se llenan en unas cápsulas de gelatina duras mayores usando un equipo de encapsulamiento. Estas cápsulas grandes se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho
- 20 fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando
- 25 condiciones optimizadas.

Producto final ejemplo – cápsula en cápsula (rellenadas con líquido/polvo) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	5 %
Aceite vegetal	55 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	5 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Agua/disolventes como sean requeridos	0 %

- 30 La formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla en porciones deseadas con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras pequeñas usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Las anteriores cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a

7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 son revestidas por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 llenadas

- 5 con líquido pequeñas junto con una parte de los excipientes se rellenan en unas cápsulas de gelatina duras mayores usando equipo de encapsulamiento. Estas cápsulas grandes se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

10

15 Producto final ejemplo – cápsula/cápsula (co-paquete) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso).

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	10 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	58 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	9 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Aqua/disolventes como sean requeridos	0 %

Una parte de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca, y una parte de los excipientes se mezclan en un mezclador tipo V o similar. Los polvos mezclados se rellenan en cápsulas de HPMC usando equipo de encapsulamiento. Las anteriores cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 5.5 a 6.2) en un bombo de

- 25 solución de revestimiento acuosa o disolvente de polímeros (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

30 Finalmente, las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

La parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca, y los excipientes se mezclan en un mezclador tipo V o similar. Los polvos mezclados se rellenan en cápsulas de gelatina/HPMC duras usando el equipo de encapsulamiento. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con

- 40 solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Los dos productos cápsula se co-empaquetan en un blíster (véase empaquetado de producto final)

45

Co-paquete cápsula/cápsula producto final ejemplo (rellenadas con líquido/polvo) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	5 %
Aceite vegetal	55 %

Ingredientes	Cantidad (%)
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	5 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Aqua/disolventes como sean requeridos	0 %

Una parte de la formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

- 5 Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 o 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.
- 10 La parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca, y los excipientes se mezclan en un mezclador tipo V o similar. Los polvos mezclados se llenan en cápsulas de gelatina/HPMC duras usando equipo de encapsulamiento. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Los dos productos cápsula se co-empaquetan en un blíster (véase empaquetado de producto final).
- 15

- 20 30 Co-paquete cápsula/cápsula producto final ejemplo (ambas llenadas con líquido) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Aceite vegetal	60 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	5 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Aqua/disolventes como sean requeridos	0 %

- 35 Una parte de la formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.
- 40
- 45

Finalmente, las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

- 5 La parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla en aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más
- 10 con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Los dos productos cápsula se co-empaquetan en un blíster (véase empaquetado
- 15 producto final)

Cápsula en cápsula producto final ejemplo (rellenadas con líquido) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	5 %
Aceite vegetal	55 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras (pequeñas y grandes)	5 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Agua/disolventes como sean requeridos	0 %

- 20 Una parte de la formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Esta cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.
- 25
- 30
- 35

- 40 Una parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Los dos productos cápsula de gelatina/HPMC blanda o dura pequeños se llenan junto con los excipientes en una cápsula de gelatina/HPMC más grande o dura usando un equipo de encapsulamiento.
- 45

- 50 Cápsula en cápsula producto final ejemplo (rellenadas con líquido) - proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	5 %
Aceite vegetal	55 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras (pequeñas y grandes)	5 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Agua/disolventes como sean requeridos	0 %

Una parte de la formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Esta cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

- 5 Una parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Los dos productos cápsula de gelatina/HPMC blanda o dura pequeños se llenan junto con los excipientes en una cápsula de gelatina/HPMC mayor o dura que usa un aparato de encapsulamiento blando o duro. Las cápsulas mayores se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.
- 10 15 20 25 30

La parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Los dos productos cápsula de gelatina/HPMC blanda o dura pequeños se llenan junto con los excipientes en una cápsula de gelatina/HPMC mayor o dura que usa un aparato de encapsulamiento blando o duro. Las cápsulas mayores se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

El empaquetado de producto final (en CMO local, condiciones secas de baja humedad y bajo oxígeno (purgación de N2) a lo largo del proceso):

Las anteriores cápsulas revestidas se empaquetan en botellas con inducción de sellado o en blísteres a condiciones de temperatura ambiente controladas (a 20 a 25 grados C) y baja humedad (a o por debajo de 40 % de HR). También pueden empaquetarse en blísteres en la máquina de empaquetado de blíster.

- 30
- Ensayo de liberación control de calidad (ingredientes farmacéuticos activos (IFA) y medicamento final)

Vacuna

Ensayos	Métodos y valoración
Descripción	Gránulos, comprimidos, cápsulas en blísteres o botellas, etc.
Apariencia	Inspección visual del color, forma, etc.
Identificación	Genes, especies, cepas. Apariencia morfológica mediante evaluación microscópica y/o PCR múltiple así como otros ensayos que incluyen métodos bioquímicos tales como perfil de fermentación o métodos genotípicos. Además, desarrollar un análisis de identidad específica para la actividad biológica crítica. Otros ensayos pueden incluir: hibridación de ADN-ADN para especificar cepas en especie; secuencia de ADN codificada por who; tipificación de la cepa incluye electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), etc.
Potencia – organismos viables	Ensayo microscópico, u opacidad para medir células viables por unidad o dosis, es decir, unidades formadoras de colonia (ufc)
Ensayo de potencia	Valoración de ufc (por ejemplo, sobre medio sólido) y ensayos de correlación con la actividad. Métodos de revestimiento de viabilidad M u otros de ensayo <i>in vitro</i> .
Pureza	Contenido de endotoxina, anticuerpos residuales, y/o la cuantificación de componentes tóxicos residuales o contaminantes introducidos durante la fabricación por ELISA o perfil de aminoácidos.

Biocarga microbiana contaminantes límites o y	Materiales extraños que incluyen patógenos usando ELISA o perfil de aminoácidos o SDS PAGE o cromatografía de intercambio iónico, etc. Límites microbianos mediante la farmacopea americana (USP31 <61>.
Porcentaje de células viables	Microensayo después de la regeneración en medios apropiados y ensayos, por ejemplo, análisis vivo/muerte por ATP. También la determinación de unidades no viables por g, es decir, por recuento de electrozona de células no fluorescentes (SDS PAGE)
Material particulado	USP31 <788>
Pirógenos	Ensayo de pirogenicidad en conejo (USP31 <151>)
Ensayo de pH	Medidor de pH
Humedad residual	Contenido en agua, USP31 <921>
Uniformidad de contenido	Atp u otra metodología de análisis
Integridad del empaquetado	Ensayo de fuga en vacío
Estabilidad	Potencia, determinación celular viable, contaminación microbiana, pH y humedad residual
Ensayo de liberación <i>in vitro</i> (por equipo de ensayo de disolución): pala o cestillo de USP	Medio: tampón pH 1 (gástrico simulado), tampón pH 6, tampón pH 7,2 a 7,6 (fluído intestinal simulado), seguido de tampón a pH 5,5 a 6,2 (fluído colónico simulado). Tiempos de muestra: Tampón pH 1 – 1 hora Tampón pH 6 – 1 hora pH 7,2 a 7,6 – 1,2,3 y 4 horas pH 5,5 a 6,2 – 1,2,4 y 8 horas Ensayo de vacuna: Ensayo de microbiología para recuento (ufc/gramo) y otra tecnología especial
Ensayo de estabilidad (0, 6, 12, 18 y 24 meses)	Vacuna: Identificación, potencia, determinación celular viable, contaminación microbiana, pH y humedad residual, etc.

Ejemplo 6

- 5 Formulación de vacuna para cáncer de ovario oral que se dirige a íleo y apéndice
- Vacuna de cáncer de ovario con administración a íleo y apéndice, fuente de material de vacuna:
 - antígenos tumorales de ovario quirúrgicamente separados se capturan del paciente de origen y se procesan para volver a usarse en el paciente de origen
 - aseguramiento de que los antígenos usados no son en sí mismos oncogénicos
 - mezclas de antígenos quirúrgicamente separados y procesados de varios pacientes dadas a nuevos pacientes que portan tumor pero no vacunados anteriormente
 - antígenos circulantes capturados y/o células metastásicas de la sangre de uno o más pacientes, procesados para la vacunación oral del paciente índice o mezclados para el uso en pacientes que portan nuevo tumor pero no vacunados anteriormente
 - Antígeno de cáncer de ovario para el uso humano: rCNP-NY-ESO-1/TRICOM para dirigirse al íleo y colon derecho/apéndice.
 - Los adyuvantes se pueden añadir a la formulación tal como Proteínas de Choque Térmico.
 - Algunas o todas las estrategias de píldora interior anteriores combinadas con el uso de sustancias de píldora exterior en formulaciones que aumentan las funciones del sistema inmune en el eje GI-pancreático-hepático.
 - La píldora exterior puede ser vacuna en combinación con adyuvantes; la píldora interior que se dirige al apéndice puede ser una vacuna con o sin un adyuvante.

Administración dirigida: vacuna (antígeno de cáncer de ovario para uso humano: rCNP-NY-ESO-1/TRICOM para dirigirse a íleo y colon derecho/apéndice con/o sin adyuvantes con “l-leucina” como ayudante farmacéutico) para la administración en el íleo a pH 7,3 a 7,6 y el apéndice a pH 5,5 a 6,2.

Materiales y métodos:

Ingrediente farmacéutico activo (IFA):

5 Antígeno de cáncer de ovario para uso humano: rCNP-NY-ESO-1/TRICOM es proporcionado por proveedores globales de alta calidad.

L-leucina (ayudante de dispersabilidad) – suministrada por Ajinomoto y Tyloxapol, USP (ayudante a anti-acumulación) suministrado por Sigma Aldrich

10 Principios inactivos (excipientes) – celulosa microcristalina, lactosa, almidón pregelatinizado, dióxido de silicio, HPMC o “polímeros” equivalentes, cápsulas de gelatina o HPMC duras, gelatina, aceite vegetal y otras cargas, etc. – comprados de nuestro proveedor local tal como FMC, Capsugel, Colorcon, Evonik, etc.

15 Proceso de formulación intermedia/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Formulación intermedia en polvo (10 a 100 micras) de vacuna seca”

Ingredientes	Cantidad (%)
rCNP-NY-ESO-1/TRICOM	5 %
L-leucina	95 %
Agua como sea requerida	0 %

20 Preparada mezclando L-leucina, y rCNP-NY-ESO-1/TRICOM con agua y liofilizado/secado por pulverización en liofilizador/secador por pulverización para separar el agua.

25 Producto final ejemplo - cápsula/cápsula (gelatina dura) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	10 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	58 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	9 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Agua/disolventes como sean requeridos	0 %

30 La anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca, y una parte de los excipientes se mezclan en un mezclador tipo V o similar. Los polvos mezclados se llenan en cápsulas de HPMC pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento. Las cápsulas anteriores se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

35 Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 pequeñas junto con una parte de los excipientes se llenan en unas cápsulas de gelatina duras mayores usando equipo de encapsulamiento. Estas cápsulas grandes se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

40 Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando

45

50

condiciones optimizadas.

Producto final ejemplo - cápsula en cápsula (rellenadas con líquido/polvo) - proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

5

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	5 %
Aceite vegetal	55 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	5 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Aqua/disolventes como sean requeridos	0 %

La formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla en partes deseadas con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de HPMC/gelatina blandas o duras pequeñas usando equipo de encapsulamiento de gelatina blanda o dura. Las cápsulas anteriores se revisten (revestimiento barrera)

- 10 con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 llenadas con líquido pequeñas junto con una parte de los excipientes se llenan en unas cápsulas de gelatina duras mayores usando equipo de encapsulamiento. Estas cápsulas grandes se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.
- 15
- 20
- 25
- 30

Producto final ejemplo – cápsula/cápsula (co-paquete) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	10 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	58 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	9 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Aqua/disolventes como sean requeridos	0 %

35

- Una parte de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca, y una parte de los excipientes se mezclan en un mezclador tipo V o similar. Los polvos mezclados se llenan en cápsulas de HPMC usando equipo de encapsulamiento. Las cápsulas anteriores se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento
- 40

revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten

5 con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

10 La parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca, y los excipientes se mezclan en un mezclador tipo V o similar. Los polvos mezclados se rellenan en cápsulas de gelatina/HPMC duras usando equipo de encapsulamiento. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con

15 solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible a pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento

20 usando condiciones optimizadas. Los dos productos cápsula se co-empaquetan en un blíster (véase empaquetado de producto final)

Co-paquete cápsula/cápsula producto final ejemplo (rellenadas con líquido/polvo) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

25

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	5 %
Aceite vegetal	55 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	5 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Agua/disolventes como sean requeridos	0 %

Una parte de la formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras usando equipo de encapsulamiento con gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con

30 solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

35 Finalmente, las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con

40 solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

45 La porción restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca, y los excipientes se mezclan en un mezclador tipo V o similar. Los polvos mezclados se rellenan en cápsulas de HPMC/gelatina duras usando

equipo de encapsulamiento. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con

50 solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, las cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Los dos productos cápsula se co-empaquetan en un blíster (véase empaquetado de

producto final).

Co-paquete cápsula/cápsula producto final ejemplo (ambas rellenas con líquido) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

5

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Aceite vegetal	60 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras	5 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Agua/disolventes como sean requeridos	0 %

Una parte de la formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras usando equipo de encapsulamiento con gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

La parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC blandas o duras usando equipo de encapsulamiento con gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con solución de revestimiento acuosa o disolvente de "polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o "polímeros" equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Los dos productos cápsula se co-empaquetan en un blíster (véase empaquetado de producto final).

35 Cápsula en cápsula producto final ejemplo (rellenadas con líquido) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	5 %
Aceite vegetal	55 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras (pequeñas y grandes)	5 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
"Polímeros" (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o "polímeros" equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Aqua/disolventes como sean requeridos	0 %

Una parte de la formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC duras o blandas pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento con gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten

(revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.

- 5 Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas EC de pH 5,5 a 6,2 se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.
- 10

- 15 La parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC duras o blandas pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando un equipo de encapsulamiento con gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten más con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Los dos productos cápsula de gelatina/HPMC blanda o dura pequeña se llenan junto con excipientes en un cápsula de gelatina/HPMC mayor o dura usando un equipo de encapsulamiento duro.
- 20
- 25

Cápsula en cápsula producto final ejemplo (rellenadas con líquido) – proceso de formulación/fabricación (en CMO local, condiciones ambiente y humedad controladas a lo largo del proceso):

Ingredientes	Cantidad (%)
Formulación intermedia en polvo de vacuna seca	7 %
Excipientes (celulosa microcristalina – carga, dióxido de silicio - sustancia de deslizamiento/ayudante al flujo)	5 %
Aceite vegetal	55 %
Gelatina como polvo (gelatina blanda)	5 %
Cápsulas de gelatina o HPMC duras (pequeñas y grandes)	5 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento barrera)	1 %
“Polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6)	10 %
HPMC o “polímeros” equivalentes (revestimiento de sellado)	1 %
Agua/disolventes como sean requeridos	0 %

- 30 Una parte de la formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC duras o blandas pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento con gelatina blanda o dura. Estas cápsulas se revisten (revestimiento barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 5,5 a 6,2) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Las cápsulas revestidas entéricas (EC) de pH 5,5 a 6,2 se revisten (barrera) con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.
- 35
- 40

- 45 La parte restante de la anterior formulación intermedia en polvo de vacuna seca se mezcla con aceite vegetal (líquido inmiscible) en un mezclador. El líquido se rellena en cápsulas de gelatina/HPMC duras o blandas pequeñas (alrededor de 22 microlitros de capacidad) usando equipo de encapsulamiento con gelatina blanda o dura. Los dos productos cápsula de gelatina/HPMC blanda o dura pequeños se llenan junto con excipientes en una cápsula de gelatina/HPMC mayor o dura usando un equipo de encapsulamiento blando o duro. Las cápsulas mayores se revisten con solución de revestimiento acuosa o disolvente de “polímeros” (revestimiento sensible pH 7,2 a 7,6) en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas. Finalmente, la cápsulas EC de pH 7,2 a 7,6 se revisten por sellado con solución de revestimiento acuosa o disolvente de HPMC o “polímeros” equivalentes en un bombo de revestimiento o secador de lecho fluidizado/máquina de revestimiento usando condiciones optimizadas.
- 50

Empaquetado producto final (en CMO local, condiciones secas de baja humedad y bajo oxígeno (purgando N2) a lo largo del proceso):

- 5 Las anteriores cápsulas revestidas se empaquetan en botellas con sellado por inducción o en blísteres a baja humedad (a o por debajo de HR al 40 %) y condiciones de temperatura ambiente controladas (a 20 a 25 grados C). También se pueden empaquetar en blísteres en la máquina de empaquetado de blíster.

Ensayo de liberación control de calidad (ingrediente farmacéutico activo (IFA) y medicamento final)

10 Vacuna

Ensayos	Métodos y valoración
Descripción	Gránulos en blísteres o botellas, etc.
Apariencia	Inspección visual del color, forma, etc.
Identificación	Antígeno por ADN
Análisis	Metodología de análisis específico a antígeno
Pureza	Electroforesis en gel SDS
Material particulado	USP31 <788>
Humedad residual	Contenido de agua, USP31 <921>
Uniformidad de contenido	Metodología de análisis específico a antígeno
Integridad del empaquetado	Ensayo con fuga en vacío
Estabilidad	Ánalysis, pureza, contaminación microbiana, pH y humedad residual
Ensayo de liberación <i>in vitro</i> (por equipo de ensayo de disolución): pala o cesta USP	Medio: tampón pH 1 (gástrico simulado), tampón pH 6, tampón pH 7,2 a 7,6 (fluido intestinal simulado), seguido de tampón pH 5,5 a 6,2 (fluido colónico simulado). Tiempos de muestra: Tampón pH 1 – 1 hora Tampón pH 6 – 1 hora pH 7,2 a 7,6 – 1, 2, 3 y 4 horas pH 5,5 a 6,2 – 1, 2, 4 y 8 horas Ánalysis de vacuna: Metodología de análisis específico a antígeno y/o otra tecnología especial
Ensayo de estabilidad (0, 6, 12, 18 y 24 meses)	Vacuna: Identificación, potencia, determinación de célula viable, contaminación microbiana, pH y humedad residual, etc.

Ejemplo 7

15 Vacuna de cáncer hepatocelular oral

- Vacuna de cáncer hepatocelular con administración a íleo y apéndice:
 - antígenos tumorales quirúrgicamente separados del paciente de origen y procesados para volver a usarse en el paciente de origen
 - mezclas de antígenos quirúrgicamente separados y procesados de varios pacientes dadas a pacientes que portan nuevo tumor pero no anteriormente vacunados
 - antígenos circulantes capturados y/o células metastásicas de la sangre de uno o más pacientes, procesados para la vacunación oral del paciente índice o mezclados para el uso en nuevos pacientes que portan tumor pero no vacunados anteriormente
 - se pueden añadir adyuvantes a la formulación tales como Proteínas de Choque Térmico
- Algunas o todas las anteriores estrategias de píldora interior combinadas con el uso de formulaciones adyuvantes de píldora exterior que aumentan las funciones del sistema inmune en el eje GI-pancreático-hepático.
 - La píldora exterior puede ser material de vacuna combinado con adyuvantes; la píldora interior puede ser material de vacuna combinado con adyuvantes pero no contendría ninguna de las sustancias liberadoras de hormona de freno ileal, puesto que no son necesarias para la amplificación de material de vacuna mediante el apéndice.

Ejemplo 8

40 Vacuna de cáncer de colon oral

- Vacuna de cáncer de colon con administración a íleo y apéndice:

- antígenos tumorales quirúrgicamente separados del paciente de origen y procesados para volver a usarse en el paciente de origen
- mezclas de antígenos quirúrgicamente separados y procesados de varios pacientes dadas a nuevos pacientes que portan tumor pero no vacunados anteriormente
- 5 - antígenos circulantes capturados y/o células metastásicas de la sangre de uno o más pacientes, procesados para la vacunación oral del paciente índice o mezclados para su uso en nuevos pacientes que portan tumor pero no vacunados anteriormente
- se pueden añadir adyuvantes a la formulación tales como Proteínas de Choque Térmico
- 10 • Algunas o todas las anteriores estrategias de píldora interior combinadas con el uso de formulaciones de liberación ileal de píldora exterior que aumentan las funciones del sistema inmune en el eje GI-pancreático-hepático.
- 15 - La píldora exterior puede ser construcciones de vacuna de liberación ileal con o sin adyuvantes, la píldora interior es un vacuna dirigida a apéndice.

Ejemplo 9

- Vacuna de cáncer pancreático oral
- 20 • Vacuna de cáncer pancreático con administración a íleo y apéndice:
 - antígenos tumorales quirúrgicamente separados del paciente de origen y procesados para volver a usarse en el paciente de origen
 - mezclas de antígenos quirúrgicamente separados y procesados de varios pacientes dadas a nuevos pacientes que portan tumor pero no vacunados anteriormente
 - antígenos circulantes capturados y/o células metastásicas de la sangre de uno o más pacientes, procesados para la vacunación oral del paciente índice o mezclados para su uso en nuevos pacientes que portan tumor pero no vacunados anteriormente
 - 30 - se pueden añadir adyuvantes a la formulación tales como Proteínas de Choque Térmico
 - Algunas o todas las estrategias de píldora interior anteriores combinadas con el uso de formulaciones de liberación ileal en píldora exterior que aumentan las funciones del sistema inmune en el eje GI-pancreático-hepático.
 - 35 - La píldora exterior puede ser de liberación ileal con adyuvantes, la píldora interior puede ser una vacuna dirigida al apéndice.

Referencias

- 40 1. Akers SN, Odunsin K., Karpf AR. "Regulation of cancer germline antigen gene expression: implications for cancer immunotherapy". *Future Oncol.* 2010;6(5):717-32.
- 45 2. Chen YT, Hsu M., Lee P., Shin SJ, Mhawech-Fauceglia P., Odunsi K., y col. "Cancer/testis antigen CT45: analysis of mRNA and protein expression in human cancer". *Int. J. Cancer.* 2009;124(12):2.893-8.
- 50 3. Li Q., Eppolito C., Odunsi K., Shrikant PA. "Antigen-induced Erk1/2 activation regulates Ets-1-mediated sensitization of CD8+T cells for IL-12 responses". *J. Leukoc. Biol.* 2010;87(2):257-63.
- 55 4. Mhawech-Fauceglia P., Smiraglia DJ., Bshara W., Andrews C., Schwaller J., South S., y col. "Prostate-specific membrane antigen expression is a potential prognostic marker in endometrial adenocarcinoma". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(3):571-7.
- 5. Qian F., Odunsi K., Blatt LM, Scanlan MJ, Mannan M., Shah N., y col. "Tumor associated antigen recognition by autologous serum in patients with breast cancer". *Int. J. Mol. Med.* 2005;15(1):137-44.
- 60 6. Tammela J., Jungbluth AA, Qian F., Santiago D., Scanlan MJ, Keitz B., y col. "SCP-1 cancer/testis antigen is a prognostic indicator and a candidate target for immunotherapy in epithelial ovarian cancer". *Cancer Immun.* 2004;4:10.
- 7. Tsuji T., Matsuzaki J., Kelly MP, Ramakrishna V., Vitale L., He LZ, y col. "Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 in vitro elicits dual human CD8+ and CD4+T cell responses with broad antigen specificity". *J. Immunol.* 2011;186(2):1.218-27.
- 65 8. Tsuji T., Matsuzaki J., Ritter E., Miliotto A., Ritter G., Odunsi K., y col. "Split T cell tolerance against a self/tumor antigen: spontaneous CD4+ but no CD8+ T cell responses against p53 in cancer patients and healthy donors". *PLoS*

- One. 2011;6(8):e23651.
9. Woloszynska-Read A., James SR, Song C., Jin B., Odunsi K., Karpf AR. "BORIS/CTCFL expression is insufficient for cancer-germline antigen gene expression and DNA hypomethylation in ovarian cell lines". *Cancer Immun.* 2010;10:6.
10. Woloszynska-Read A., Zhang W., Yu J., Link PA, Mhawech-Fauceglia P., Collamat G., y col. "Coordinated cancer germline antigen promoter and global DNA hypomethylation in ovarian cancer: association with BORIS/CTCF expression ratio and advanced stage". *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2.170-80.
10. Tomaras GD, Binley JM, Gray ES, Crooks ET, Osawa K., Moore PL, y col. "Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals". *J. Virol.* 2011;85(21):11.502-19.
15. Crooks ET, Tong T., Osawa K., Binley JM. "Enzyme digests eliminate nonfunctional Env from HIV-1 particle surfaces, leaving native Env trimers intact and viral infectivity unaffected". *J. Virol.* 2011;85(12):5.825-39.
15. Moir S., Malaspina A., Fauci AS. "Prospects for an HIV vaccine: leading B cells down the right path". *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011;18(12):1.317-21.
20. Moir S., Chun TW, Fauci AS, "Pathogenic mechanisms of VIH disease". *Annu Rev. Pathol.* 2011;6:223-48.
20. Moir S., Fauci AS. "B cells in HIV infection and disease". *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9(4):235-45.
25. Moir S., Ho J., Malaspina A., Wang W., Dipoto AC, O'Shea MA, y col. "Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals". *J. Exp. Med.* 2008;205(8):797-805.
30. Moir S., Malaspina A., Ho J., Wang W., Dipoto AC, O'Shea MA, y col. "Normalization of B cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease". *J. Infect. Dis.* 2008;197(4):572-9.
30. Moir S., Ogwaro KM, Malaspina A., Vasquez J., Donoghue ET, Hallahan CW, y col. "Perturbations in B cell responsiveness to CD4+ T cell help in HIV-infected individuals". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(10):6057-62.
35. Malaspina A., Moir S., Nickle DC, Donoghue ET, Ogwaro KM, Ehler LA, y col. "Human immunodeficiency virus type 1 bound to B cells: relationship to virus replicating in CD4+ T cells and circulating in plasma". *J. Virol.* 2002;76(17):8.855-63.
40. Raghuraman S., Park H., Osburn WO, Winkelstein E., Edlin BR., Rehermann B. "Spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of T-cell exhaustion". *J. Infect. Dis.* 2012;205(5):763-71.
40. Halliday J., Klenerman P., Barnes E. "Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target". *Expert Rev. Vaccines.* 2011;10(5):659-72.
45. Conry SJ, Meng Q., Hardy G., Yonkers NL, Sugalski JM, Hirsch A., y col., "Genetically Associated CD16+56-Natural Killer Cell Interferon (IFN)-alphaR Expression Regulates Signaling and Is Implicated in IFN-alpha-Induced Hepatitis C Virus Decline". *J. Infect. Dis.* 2012;205(7):1.131-41.
50. Grafmueller S., Billerbeck E., Blum HE, Neumann-Haefelin C., Thimme R. "Differential Antigen Specificity of Hepatitis C Virus-Specific Interleukin 17- and Interferon gamma-Producing CD8+ T cells During Chronic Infection". *J. Infect. Dis.* 2012;205(7):1.142-6.
55. Rahman F., Heller T., Sobao Y., Mizukoshi E., Nascimbeni M., Alter H., y col. "Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C". *Hepatology.* 2004;40(1):87-97.
55. Strickland GT, El-Kamary SS, Klenerman P., Nicosia A. "Hepatitis C vaccine: supply and demand". *Lancet Infect. Dis.* 2008;8(6):379-86.
60. Rajkannan R., Dhanaraju MD, Gopinath D., Selvaraj D., Jayakumar R. "Development of hepatitis B oral vaccine using B-cell epitope loaded PLG microparticles". *Vaccine.* 2006;24(24):5.149-57.
60. Kantele JM, Arvilommi H., Kontiainen S., Salmi M., Jalkanen S., Savilahti E., y col. "Mucosally activated circulating human B cells in diarrhea express homing receptors directing them back to the gut". *Gastrenterology.* 1996;110(4):1.061-7.
65. Hanninen A., Jalkanen S., Salmi M., Toikkanen S., Nikolakaros G., Simell O. "Macrophages, T cell receptor

- usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus". *J. Clin. Invest.* 1992;90(5):1.901-10.
- 5 29. Duijvestijn A., Hamann A. "Mechanisms and regulation of lymphocyte migration". *Immunol. Today.* 1989;10(1):23-8.
30. Hamann A., Thiele HG. "Molecules and regulation in lymphocyte migration". *Immunol. Rev.* 1989;108:19-44.
- 10 31. Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O., Brandtzaeg P. "Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches". *Immunology.* 1994;83(3):457-64.
- 15 32. Halstensen TS, Scott H., Fausa O. Brandtzaeg P. "Gluten stimulation of coeliac mucosa in vitro induces activation (CD25) of lamina propria CD4+ T cells and macrophages but no crypt-cell hyperplasia". *Scand. J. Immunol.* 1993;38(6):581-90.
33. Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O., Brandtzaeg P. "Do human Peyer's patches contribute to the intestinal intraepithelial gamma/delta T-cell population?". *Scand. J. Immunol.* 1993;38(5):451-8.
- 20 34. Nilssen DE, Aukrust P., Froland SS, Muller F., Fausa O., Halstensen TS, y col. "Duodenal intraepithelial gamma/delta T cells and soluble CD8, neopterin, and beta 2-microglobulin in serum of IgA-deficient subjects with or without IgG subclass deficiency". *Clin. Exp. Immunol.* 1993;94(1):91-8.
35. Hanson LA, Brandtzaeg P. "The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system". *Immunol Today.* 1993;14(8):416-7.
- 25 36. Nilssen DE, Friman V., Therman K., Bjorkander J., Kilander A., Holmgren J., y col. "B-cell activation in duodenal mucosa after oral cholera vaccination in IgA deficient subjects with or without IgG subclass deficiency". *Scand. J. Immunol.* 1993;38(2):201-8.
- 30 37. Scott H., Halstensen T., Brandtzaeg P. "The immune system of the gastrointestinal tract". *Pediatr. Allergy Immunol.* 1993;4(3 Supl):7-15.
38. Rognum TO, Thrane S., Stoltenberg L., Vege A., Brandtzaeg P. "Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months". *Pediatr. Res.* 1992;32(2):145-9.
- 35 39. Muller F., Holberg-Petersen M., Rollag H., Degre M., Brandtzaeg P., Froland SS. "Nonspecific oral immunity in individuals with HIV infection". *J. Acquir Immune Defic. Syndr.* 1992;5(1):46-51.
40. Everson MP, Lemak DG, McDuffie DS, Koopman WJ, McGhee JR, Beagley KW. "Dendritic cells from Peyer's patch and spleen induce different T helper cell responses". *J. Interferon Cytokine Res.* 1998;18(2):103-15.
41. Everson MP, McDuffie DS, Lemak DG, Koopman WJ, McGhee JR, Beagley KW. "Dendritic cells from different tissues induce production of different T cell cytokine profiles". *J. Leukoc. Biol.* 1996;59(4):494-8.
- 45 42. Everson MP, Koopman WJ, McGhee JR, Beagley KW. "Dendritic cells regulate development of alloantigenic and mitogenic TH1 versus TH2 responses". *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995;378:347-9.
43. Beagley KW, Eldridge JH, Kiyono H., Everson MP, Koopman WJ, Honjo T., y col. "Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells". *J. Immunol.* 1998;141(6):2.035-42.
- 50 44. Spalding DM, Williamson SI, McGhee JR, Koopman WJ. "Peyer's patch dendritic cells: isolation and functional comparison with murine spleen dendritic cells". *Immunobiology.* 1984;168(3-5):380-90.
45. Spalding DM, Williamson SI, Koopman WJ, McGhee JR. "Preferential induction of polyclonal IgA secretion by murine Peyer's patch dendritic cell-T cell mixtures". *J. Exp. Med.* 1984;160(3):941-6.
- 55 46. Spalding DM, Koopman WJ, Eldridge JH, McGhee JR, Steinman RM. "Accessory cells in murine Peyer's patch. I. Identification and enrichment of a functional dendritic cell". *J. Exp. Med.* 1983;157(5):1.646-59.
- 60 47. Kiyono H., McGhee JR, Mosteller LM, Eldridge JH, Koopman WJ, Kearney JF, y col. "Murine Peyer's patch T cell clones. Characterization of antigen-specific helper T cells for immunoglobulin A responses". *J. Exp. Med.* 1982;156(4):1.115-30.
- 65 48. Torii M., McGhee JR, Koopman WJ, Hamada S., Michalek SM. "Lymphoid cell responses to bacterial cell wall components: polyclonal and immune responses of murine B cells to *Streptococcus mutans* carbohydrate antigens". *J. Immunol.* 1981;127(5):2.106-12.

49. Cassilly D., Kantor S., Knight LC, Maurer AH, Fisher RS, Semler J., y col. "Gastric emptying of a non-digestible solid: assessment with simultaneous SmartPill pH and pressure capsule, antroduodenal manometry, gastric emptying scintigraphy". *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20(4):311-9.
- 5 50. Rao SS, Kuo B., McCallum RW, Chey WD, DiBaise JK, Hasler WL, y col. "Investigation of colonic and whole-gut transit with wireless motility capsule and radiopaque markers in constipation". *Clin. Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(5):537-44.
- 10 51. Eldridge JH, Gilley RM, Staas JK, Moldoveanu Z., Meulbroek JA, Tice TR. "Biodegradable microspheres: vaccine delivery system for oral immunization". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1989;146:59-66.
- 15 52. Theilacker C., Kropec A., Hammer F., Sava I., Wobser D., Sakinc T., y col. "Protection Against *Staphylococcus aureus* by Antibody to the Polyglycerolphosphate Backbone of Heterologous Lipoteichoic Acid". *J. Infect. Dis.* 2012;205(7):1076-85.
53. Sovran L. World Vaccine Congress Lyon – Terrapinn's 11th Annual Congress. *IDrugs.* 2009;12(12):738-41.
- 20 54. *Staphylococcus aureus* vaccine conjugate—Nabi: Nabi-StaphVAX, StaphVAX. *Drugs R D.* 2003;4(6):383-5.
55. Jones T. "StaphVAX(Nabi)". *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2003;3(1):48-50.
- 25 56. Fattom A., Fuller S., Propst M., Winston S., Muenz L., He D., y col. "Safety and immunogenicity of a booster dose of *Staphylococcus aureus* types 5 and 8 capsular polysaccharide conjugate vaccine (StaphVAX) in hemodialysis patients". *Vaccine.* 2004;23(5):656-63.
57. Fattom AI, Horwith G., Fuller S., Propst M., Naso R. "Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials". *Vaccine.* 2004;22(7):880-7.
- 30 58. Weisman LE. "Antibody for the prevention of neonatal nosocomial staphylococcal infection: a review of the literature". *Arch. Pediatr.* 2007;14 Supl 1:S31-4.
59. Rescia VC, Takata CS, de Araujo PS, Bueno da Costa MH. "Dressing liposomal particles with chitosan and poly(vinylic alcohol) for oral vaccine delivery". *J. Liposome Res.* 2011;21(1):38-45.
- 35 60. Faure GC, Hauer S., Mole C., Bene MC. "Peripheral blood specific antibody-forming cells after oral stimulation with a ribosomal vaccine". *Dev. Biol. Stand.* 1992;77:175-81.
61. Li FQ, Fei YB, Su H., Hu JH. "[Oral vaccination and vaccine-entrapped microparticle delivery system]". *Yao Xue Xue Bao.* 2007;42(3):245-51.
- 40 62. Pniewski T., Kapusta J., Bociag P., Wojciechowicz J., Kostrzak A., Gdula M., y col. "Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation". *J. Appl. Genet.* 2001;52(2):125-36.
63. Pniewski T., Kapusta J. Bociag P., Kostrzak A., Fedorowicz-Stronska O., Czyz M., y col. "Plant expression, lyophilisation and storage of HBV medium and large surface antigens for a prototype oral vaccine formulation". *Plant. Cell Rep.* 2012;31(3):585-95.
- 45 64. Larhed A., Sterman L., Edvardsson E., Sjoholm I. "Starch microparticles as oral vaccine adjuvant: antigen-dependent uptake in mouse intestinal mucosa". *J. Drug Target.* 2004;12(5):289-96.
65. Prabakaran M., Madhan S., Prabhu N., Geng GY, New R., Kwang J. "Reverse micelle-encapsulated recombinant baculovirus as an oral vaccine against H5N1 infection in mice". *Antiviral Res.* 2010;86(2):180-7.
- 55 66. Carter KC, Ferro VA, Alexander J., Mullen AB. "Translation of an experimental oral vaccine formulation into a commercial product". *Methods.* 2006;38(2):65-8.
67. Louie JK, Acosta M., Samuel MC, Schechter R., Vugia DJ, Harriman K., y col. "A novel risk factor for a novel virus: obesity and 2009 pandemic influenza A (H1N1)". *Clin. Infect. Dis.* 2011;52(3):301-12.
- 60 68. Kim YH, Kim JK, Kim DJ, Nam JH, Shim SM, Choi YK, y col. "Diet-induced obesity dramatically reduces the efficacy of a 2009 pandemic H1N1 vaccine in a mouse model". *J. Infect. Dis.* 2012;205(2):244-51.
69. Kim YC, Quan FS, Yoo DG, Compans RW, Kang SM, Prausnitz MR. "Enhanced memory responses to seasonal H1N1 influenza vaccination of the skin with the use of vaccine-coated microneedles". *J. Infect. Dis.* 2010;201(2):190-8.

70. Shamsuzzaman S., Ahmed T., Mannoor K., Begum YA, Bardhan PK, Sack RB, y col. "Robust gut associated vaccine-specific antibody-secreting cell responses are detected at the mucosal surface of Bangladeshi subjects after immunization with an oral killed bivalent *V. cholerae* O1/O139 whole cell cholera vaccine: comparison with other mucosal and systemic responses". *Vaccine*. 2009;27(9):1.386-92.
- 5 71. Ano G., Esquimal A., Pastor M., Talavera A., Cedre B., Fernandez S., y col. "A new oral vaccine candidate based on the microencapsulation by spray-drying of inactivated *Vibrio cholerae*". *Vaccine*. 2011;29(34):5.758-64.
- 10 72. Clark S., Cross ML, Smith A., Court P., Vipond J., Nadian A., y col. "Assesment of different formulations of oral *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine in rodent models for immunogenicity and protection against aerosol challenge with *M. bovis*". *Vaccine*. 2008;26(46):5.791-7.
- 15 73. Delgado A., Lavelle EC, Hartshorne M., Davis SS. "PLG microparticles stabilised using enteric coating polymers as oral vaccine delivery systems". *Vaccine*. 1999;17(22):2.927-38.
74. Kozbor D. "Cancer vaccine with mimotopes of tumor-associated carbohydrate antigens". *Immunol. Res.* 2010;46(1-3):23-31.
- 20 75. Segal BH, Wang XY, Dennis CG, Youn R., Repasky EA, Manjili MH, y col. "Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer". *Drug Discov. Today*. 2006;11(11-12):534-40.
76. Wang XY, Kazim L., Repasky EA, Subjeck JR. "Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity". *J. Immunol.* 2001;166(1):490-7.
- 25 77. Odunsi K., Jungbluth AA, Stockert E., Qian F., Gnjatic S., Tammela J., y col. "NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer". *Cancer Res.* 2003;63(18):6.076-83.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de vacuna oral que administra un antígeno en la proximidad del íleo distal del tracto gastrointestinal y el apéndice, comprendiendo la formulación:

- 5 (a) una pluralidad de núcleos, cada uno de los cuales comprende:
- (1) un antígeno;
 (2) un primer revestimiento entérico que encapsula el antígeno, el cual es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,6, y el cual está comprendido por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en poli(dl-láctido-co-glicólico), quitosano (Chi) estabilizado con APV (alcohol poli-vinílico), un lípido, un alginato, carboximetilecelulosa (CMEC), celulosa acetato trimelitato (CAT), hidroxipropilmelcelulosa ftalato (HPMCP), hidroxipropilmelcelulosa, etil celulosa, glaseado alimenticio y mezclas de hidroxipropilmelcelulosa y etil celulosa, polivinil acetato ftalato (PVAP), celulosa acetato ftalato (CAP), shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo a los cuales se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización; y
 (3) un segundo revestimiento entérico que es composicionalmente diferente del primer revestimiento, el cual es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, el cual está encapsulado dentro del primer revestimiento, y el cual está comprendido de una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en polivinil acetato ftalato (PVAP), celulosa acetato ftalato (CAP), shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo al cual se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización.
- 20 2. La formulación de vacuna oral según la reivindicación 1 en la que dicho antígeno es un virus que entra por el tracto GI.
- 25 3. La formulación de vacuna oral de la reivindicación 1, en la que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) un virus o antígeno derivado del mismo, seleccionado del grupo que consiste en *Adenoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Herpadnaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papovaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*;
- 30 (b) patógenos intracelulares o parásitos o antígeno derivado de los mismos seleccionados del grupo que consiste en *Afipia* spp, *Brucella* spp, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia*, *Coxiella burnetti*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rickettsiae*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*, *Plasmodium* spp, *Theileria parva*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y *Cryptococcus neoformans*, *Giardia*, *Cryptosporidia*; o
 (c) un antígeno transmitido por vector que incluye *Plasmodium* o *Borrelia*; o
 (d) bacterias intestinales o antígeno derivado de las mismas, que incluyen cólera, salmonela, *Shigella*, *Campylobacter*, *Leptospirosis*, *Helicobacter pylori* y *E. coli* enterotoxigénica incluyendo *E. coli* 0157, y bacterias de *Listeria*, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*; y
 (e) un antígeno relacionado con cáncer mostrado por ser inmunogénico en pacientes humanos, y más específicamente seleccionados del grupo que consiste en el ONT-10, dirigido a MUC1, y otras vacunas terapéuticas dirigidas de Oncothyreon con o sin el lípido A de PET adyuvante acompañante; antígeno NY-ESO-1 para tumores de vejiga, cerebro, mama, esofágicos, gastrointestinales, hepatocelulares, de riñón, pulmón, melanoma, de ovario, próstata, sarcoma, cervical y uterino, gangliósido GD2, mimotopo 47-LDA de GD2, proteínas de choque térmico, antígenos de testículos cancerosos (TC), antígeno de cáncer de ovario epitelial (COE); antígenos de cáncer cervical y de ovario, pancreático, hepatocelular, de colon, mama, pulmón, y cerebro.
- 40 4. La formulación de vacuna oral de la reivindicación 2 en la que el antígeno es un componentes de un virus mostrado por ser inmunogénico en pacientes humanos, y más específicamente seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, herpes simplex, varicela zóster, citomegalovirus, virus de Epstein Bar, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la gripe, virus del papiloma humano, virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, poliovirus, virus Coxsackie, rinovirus, virus vacuna, virus de la varicela, rotavirus, virus-1 linfotrópico T humano, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la rabia, virus de la rubeola, arbovirus, enterovirus tales como polio, coxsackie y virus de Norwalk.
- 45 5. La formulación de vacuna oral de la reivindicación 2, en la que el antígeno se un virus vivo atenuado.
- 50 6. La formulación de vacuna oral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el antígeno se mezcla con una sustancia adyuvante para respuesta inmune refuerzo.

7. Una cápsula en una formulación de vacuna oral en cápsula que administra un antígeno en la proximidad del íleo distal y el colon derecho o apéndice, comprendiendo la formulación:

(a) una primera cápsula que comprende:

- (1) un antígeno y opcionalmente, un adyuvante;
 (2) un primer revestimiento entérico que encapsula la primer cápsula, el cual es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,6, y el cual está comprendido por una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en poli(dl-láctido-co)-glicólido, quitosano (Chi) estabilizado con APV (alcohol poli-vinílico), un lípido, un alginato, carboximetiletilcelulosa (CMEC), celulosa acetato trimelitato (CAT), hidroxipropilmelcelulosa ftalato (HPMCP), hidroxipropilmelcelulosa, etil celulosa, glaseado alimenticio y mezclas de hidroxipropilmelcelulosa y etil celulosa, polivinil acetato ftalato (PVAP), celulosa acetato ftalato (CAP), shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo a los cuales se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización;

(b) una segunda cápsula encapsulada en la primera cápsula que comprende:

- (1) el antígeno y opcionalmente un adyuvante; y
 (2) un revestimiento entérico que encapsula la segunda cápsula, el cual es básicamente insoluble a un pH de menos de un intervalo de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5, y el cual se seleccionada del grupo que consiste en shellac, copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo, y copolímeros de ácido metacrílico y acrilato de etilo al cual se ha añadido un monómero de acrilato de metilo durante la polimerización; en la cual la segunda cápsula se expone cuando la primera cápsula se disuelve en el íleo distal.

8. La cápsula en una formulación de vacuna oral en cápsula de la reivindicación 7, en la que el antígeno es un virus vivo atenuado.

30 9. La formulación de vacuna oral de la reivindicación 1, en la que el antígeno se mezcla con una sustancia nutricional seleccionada del grupo que consiste en azúcares, ácidos grasos libres, polipéptidos, aminoácidos y composiciones que producen azúcares, ácidos grasos libres, polipéptidos, o aminoácidos tras la digestión y el antígeno mezclado y la sustancia nutricional están encapsulados por el primer revestimiento entérico.

35 10. La formulación de vacuna oral de la reivindicación 1, en la que los núcleos son micropartículas que tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 1 nanómetro a aproximadamente 100 micras de diámetro.

40 11. La formulación de vacuna oral de la reivindicación 10, en la que los núcleos de la primera población núcleo y la segunda población núcleo son micropartículas, el diámetro promedio de los núcleos de la primera población núcleo es mayor que el diámetro promedio de los núcleos de la segunda población núcleo, los núcleos de la segunda población núcleo tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 1 nanómetro a aproximadamente 99 micras de diámetro, y los núcleos de la primera población núcleo tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 2 nanómetros a aproximadamente 100 micras.

45 12. La cápsula en una formulación de vacuna oral en cápsula de la reivindicación 7, en la que el antígeno se mezcla con una sustancia nutricional seleccionada del grupo que consiste en azúcares, ácidos grasos libres, polipéptidos, aminoácidos, y composiciones que producen azúcares, ácidos grasos libres, polipéptidos, o aminoácidos tras la digestión, y en la que el antígeno y la sustancia nutricional mezclados están encapsulados por el primer revestimiento entérico.

50 13. La cápsula en una formulación de vacuna oral en cápsula de la reivindicación 7, en la que el antígeno es un virus seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, herpes simplex, varicela zóster, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la gripe, virus del papiloma humano, virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, poliovirus, virus Coxsackie, rinovirus, virus vacuna, virus de la varicela, rotavirus, virus-1 linfotrópico T humano, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la rabia, virus de la rubeola, arbovirus, enterovirus tales como polio, cocksackie y virus de Norwalk.

60 14. La cápsula en una formulación de vacuna oral en cápsula de la reivindicación 7, en la que el antígeno es un antígeno a bacterias intestinales seleccionadas del grupo que consiste en cólera, salmonela, *Shigella*, *Campylobacter*, *Leptospiro*, *Helicobacter pylori* y *E. coli* enterotoxigénica incluyendo *E. coli* 0157, y bacterias de *Listeria*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus neumoniae*.

65 15. La cápsula en una formulación de vacuna oral en cápsula de la reivindicación 7, en la que el agente es un virus seleccionado del grupo que consiste en *Adenoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Herpadnaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papovaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*,

Rhabdoviridae y Togaviridae.

16. La cápsula en una formulación de vacuna oral en cápsula de la reivindicación 7, en la que el antígeno es un patógeno intracelular o parásito seleccionado del grupo que consiste en *Afipia* spp, *Brucella* spp, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia*, *Coxiella burnetti*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rickettsiae*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*, *Plasmodium* spp, *Theileria parva*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y *Cryptococcus neoformans*, *Giardia* y *Cryptosporidia*.
- 5 17. La cápsula en una formulación de vacuna oral en cápsula de la reivindicación 7, en la que el antígeno es un antígeno a las bacterias intestinales que incluyen cólera, salmonela, *Shigella*, *Campylobacter*, *Leptospirosis*, *Helicobacter pylori* y *E. coli* enterotoxigénica incluyendo *E. coli* 0157, y bacterias de *Listeria* incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.
- 10 18. Una cantidad farmacéuticamente eficaz de una formulación de vacuna oral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento o prevención de la aparición de un trastorno vírico.
- 15

FIGURA 1

Liberación entérica convencional - objetivo duodenal, que es proximal al objetivo para la vacunación

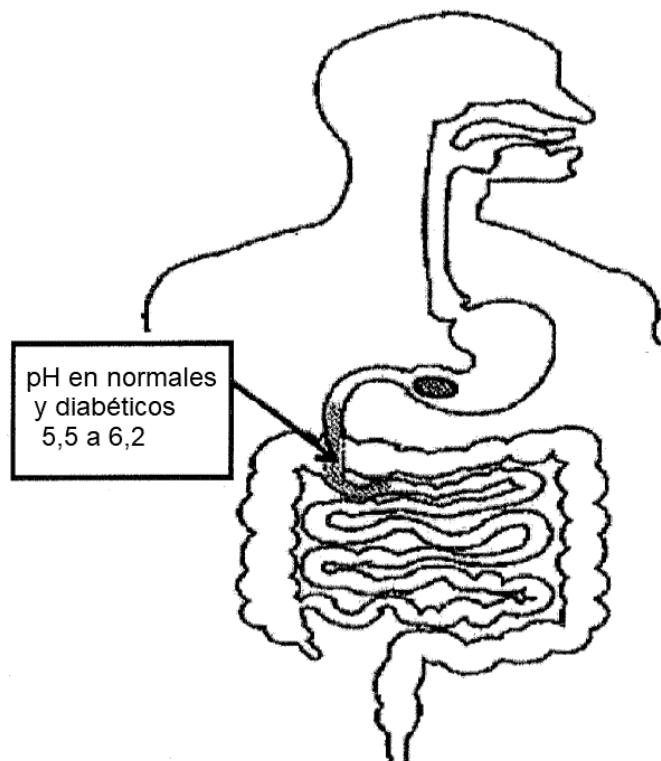


FIGURA 2

Administración al freno ileal de Vacunas: pH objetivo para liberación es 7,2 a 7,5

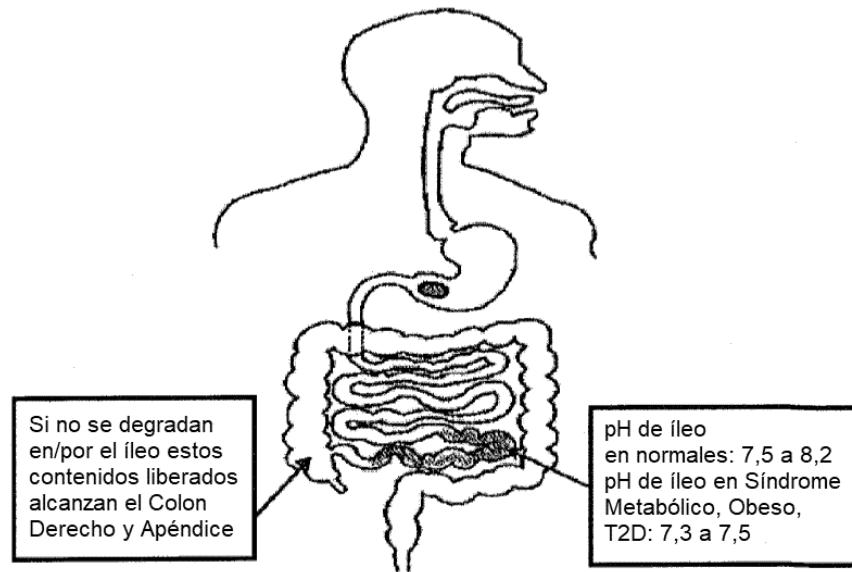


FIGURA 3

Composición para la liberación en íleo de Antígeno, Adyuvante, Hormonas de freno ileal

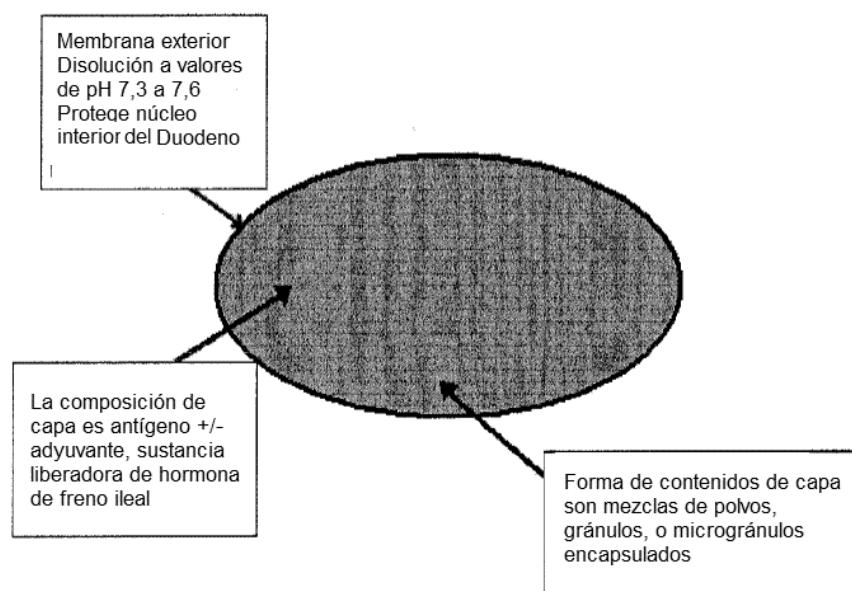


FIGURA 4

Debido a la liberación de revestimiento entérico a pH 5,5 solo se dirige al duodeno y el antígeno liberado en el duodeno no sobreviviría al tránsito para alcanzar el colon, la liberación en Colon Derecho y Apéndice requiere ambas una píldora interior y una exterior

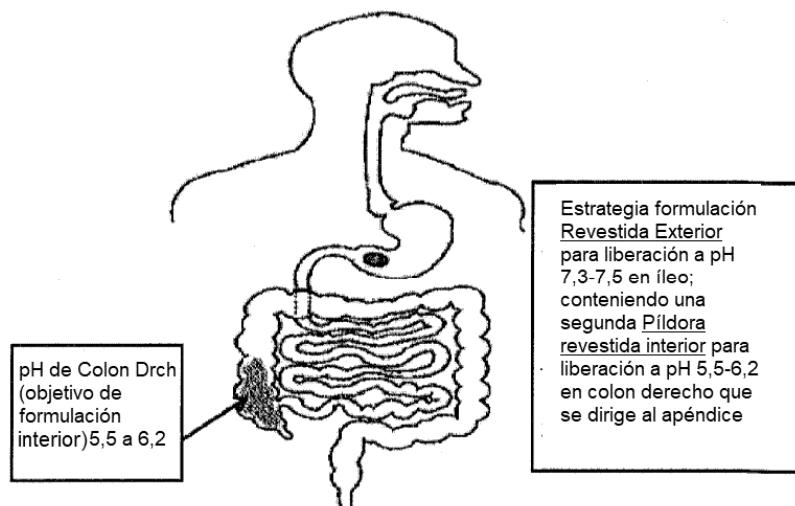


FIGURA 5

Composición "Píldora dentro de una Píldora" para íleo y apéndice

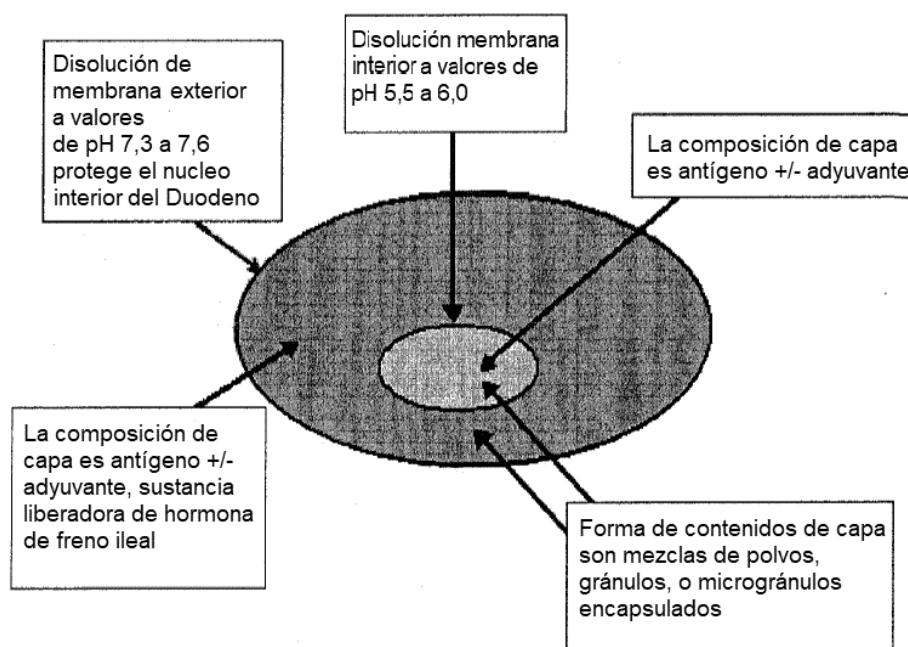


FIGURA 6

Píldora dentro de una Píldora: liberación dirigida a freno ileal (pH 7,3-7,5) de píldora interior, que contiene formulación de vacuna para liberación en Apéndice a pH 5,5-6,2

