

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 124**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/38	(2006.01)
A61K 39/108	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01)
A61K 47/44	(2007.01)
A61K 9/127	(2006.01)
A61K 39/39	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2014 PCT/IB2014/064813**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044886**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014 E 14849986 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3049104**

54 Título: **Composiciones de vacunas y adyuvantes y métodos para el tratamiento de infecciones del tracto urinario**

30 Prioridad:

25.09.2013 US 201361882498 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2019

73 Titular/es:

**SEQUOIA VACCINES, INC. (100.0%)
1912 Innerbelt Business Center Drive
Saint-Louis, MO 63114, US**

72 Inventor/es:

**ELDRIDGE, GARY y
MARTIN, STEVEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 716 124 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

Composiciones de vacunas y adyuvantes y métodos para el tratamiento de infecciones del tracto urinario

5 Campo de la invención:

La invención proporciona nuevas composiciones y formulaciones de adyuvantes con excelente estabilidad a temperatura refrigerada y ambiente, y también hasta aproximadamente 37 °C, que se pueden producir a costes notablemente bajos. Estas nuevas composiciones y formulaciones de adyuvantes se utilizan en vacunas y exhiben propiedades superiores para mejorar las respuestas inmunitarias a los antígenos mientras causan reacciones en el sitio de inyección y sistémicas menos graves. La invención también describe nuevas composiciones y formulaciones de vacunas para tratar y prevenir infecciones del tracto urinario causadas por bacterias gramnegativas que incluyen *Escherichia coli* y *E. coli* resistente a múltiples fármacos. La invención también proporciona nuevos métodos de administración de dichas nuevas formulaciones de vacunas y métodos de tratamiento para prevenir y tratar infecciones del tracto urinario causadas por bacterias gramnegativas que incluyen *E. coli* y *E. coli* resistente a múltiples fármacos.

Descripción de la técnica relacionada:

En Estados Unidos (EE.UU.) y en otros países, la mayoría de las poblaciones están protegidas de numerosas enfermedades infecciosas mediante el uso de vacunas. Las vacunas protegen a las personas de enfermedades infecciosas como la difteria, tétanos, tos ferina, hepatitis, gripe y poliomielitis, por nombrar algunas. La sociedad se basa en las protecciones que ofrecen las vacunas, que han hecho que la mayoría de estas enfermedades infecciosas sean solo una parte de la historia para los ciudadanos de EE.UU. De hecho, en Estados Unidos, los Centros para el Control de Enfermedades (CDC, de sus siglas en inglés) administran el programa Vacunas para Niños que proporcionó vacunas gratuitas para aproximadamente 40 millones de niños en 2010. Aproximadamente el 70 % de estos niños están inscritos en Medicaid. Para prevenir brotes de enfermedades y reducir los costes del tratamiento de estas enfermedades infecciosas, EE.UU. ha hecho de la vacunación una prioridad nacional independiente del estado económico. Se requieren desesperadamente vacunas de bajo coste y estas vacunas son una prioridad nacional ahora y en el futuro previsible.

Dada la importancia de las vacunas, la necesidad de desarrollar continuamente nuevas y mejores vacunas para mejorar la salud de la población es clara. Aún más fundamental es la necesidad de proporcionar vacunas de menor coste para ayudar a reducir los costes disparados del sistema de salud de EE.UU. Una prioridad nacional es reducir los costes del sistema de salud de EE.UU.

Contribuir a estas dificultades, incluso en EE.UU., es el cumplimiento de los requisitos de almacenamiento de vacunas. Un estudio realizado por la Oficina del Inspector General en el Departamento de Salud y Servicios Humanos e informado en 2012 (OEI-04-10-00430) encontró que los proveedores que participan en el Programa de vacunas para niños de los CDC: 1.) exponían vacunas a temperaturas fuera de sus intervalos de temperatura aprobados; 2.) almacenaban vacunas en refrigeradores y congeladores a temperaturas fuera de sus intervalos de temperatura aprobados; y 3.) había almacenadas vacunas caducadas con vacunas no caducadas.

Otro problema con las vacunas es que las vacunas pueden tener una vida útil corta y son propensas a caducar antes de su uso.

Además, el estudio descrito anteriormente realizado por la Oficina del Inspector General encontró que 16 de los 46 proveedores de atención médica del programa Vacunas para niños habían almacenado vacunas caducadas con vacunas caducadas. De media, estas vacunas caducadas habían expirado hacía aproximadamente 6 meses. Por ejemplo, se informó que el 1 de julio de 2010, 40 millones de dosis no utilizadas de la vacuna contra la gripe porcina, que costaron alrededor de 260 millones de dólares para su producción, acababan de expirar y estaban siendo destruidas. La caducidad de las vacunas genera importantes pérdidas económicas cada año en EE.UU.

Los adyuvantes mejoran las respuestas inmunitarias a los antígenos de las vacunas. De las 34 vacunas proporcionadas en el marco del Programa Vacunas para niños administrado por los CDC en EE.UU., 20 contienen adyuvantes. De estas 20 vacunas con adyuvantes, 19 de estas vacunas contienen adyuvantes de alumbre y 1 vacuna contiene monofosforil lípido A adsorbido al alumbre (MPL de GSK) como adyuvante.

A pesar de los amplios intentos de la industria de desarrollar nuevos adyuvantes, en la actualidad solo se utilizan alumbre y MPL de GSK en las vacunas aprobadas en EE.UU. Se han producido numerosos fallos en el desarrollo de adyuvantes en EE.UU., pero la necesidad de adyuvantes nuevos y eficaces sigue siendo alta.

La vacuna Cervarix de GlaxoSmithKline (GSK) que contiene 3'-O-desacil-4'-monofosforil lípido A adsorbido al alumbre (MPL de GSK) fue autorizada en EE.UU. para la prevención del cáncer de cuello de útero causado por el virus del papiloma humano. Debido a que el material de partida para producir MPL se aísla a partir de *Salmonella minnesota*, el producto final es una mezcla dinámica y compleja de análogos de hexa, penta y tetraacilo; cada uno de estos análogos difiere en la actividad biológica. Como resultado de ello, la mezcla de 3'-O-desacil-4'-monofosforil lípido A

presenta desafíos de fabricación, prueba y uso que contribuyen enormemente a los problemas de gastos y suministros con la vacuna.

5 Además de los problemas de almacenamiento, las inyecciones de vacunas a menudo son dolorosas para el receptor. Después de la administración de una vacuna, pueden aparecer enrojecimiento, hinchazón, picazón y sensibilidad en los sitios de inyección. La información de prescripción de la Vacuna Cervarix de GSK que contiene adyuvantes de MPL y alumbre enumera los acontecimientos adversos locales que pueden incluir dolor, enrojecimiento e hinchazón. El dolor local que impidió las actividades de la vida diaria se informó en aproximadamente el 8 por ciento de los sujetos que recibieron la vacuna Cervarix de GSK o el alumbre adyuvante solo. Las reacciones sistémicas adversas observadas después de la administración de vacunas que contienen adyuvantes de MPL y alumbre incluyen dolor de cabeza, fatiga, fiebre, erupción, mialgia, artralgia, urticaria y síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómitos, diarrea y/o dolor abdominal.

15 Adicionalmente, como se describe en la "Clinical Review of Human Papillomavirus Bivalent (Types 16 and 18) vaccine [GSK's Cervarix Vaccine], Recombinant, Biologics License Application Efficacy Supplement" cuatro estudios informaron de acontecimientos adversos locales que incluyen dolor local que previene el movimiento en aproximadamente el 16 por ciento de los sujetos. La hinchazón también se informó a más de 50 mm en aproximadamente el 3 por ciento de los sujetos. Los mismos cuatro estudios informaron acontecimientos sistémicos adversos graves en el 2,4 al 7,8 por ciento para artralgia, fatiga, gastrointestinal, dolor de cabeza y mialgia.

20 La gravedad de las reacciones en el lugar de inyección y las reacciones sistémicas son importantes y requieren tratamiento médico que implique el uso de narcóticos, hidratación IV u otros tratamientos implementados por médicos y la pérdida de trabajo para prevenir la actividad diaria debido a diarrea, mialgia, fatiga, dolor de cabeza y vómitos.

25 El Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización establece recomendaciones para la Estrategia Nacional para la Gripe Pandémica. Esta estrategia incluye la necesidad de "proporcionar una vacuna pandémica a todos los ciudadanos de EE.UU. dentro de los 6 meses posteriores a la declaración pandémica: vacuna pandémica (600 millones de dosis) [Estrategia Nacional para la Gripe Pandémica (noviembre de 2005) y el Plan de Gripe Pandémica del HHS (noviembre de 2005)]" y requiere el uso de adyuvantes para intentar avanzar hacia este objetivo de vacunación aparentemente inaccesible. Como no existe un adyuvante aprobado para una vacuna contra la gripe en general en EE.UU., la reserva nacional de vacunas de EE.UU. no tenía alternativa y compró el adyuvante MF59 de Novartis por aproximadamente 500 millones de dólares. El adyuvante MF59 se suspendió recientemente en un estudio clínico de Fluad Pediátrico debido a la "alta reactividad de la vacuna observada en niños de 9 a 12 años de edad, el protocolo del estudio V7P29 se modificó para excluir a los niños menores de 9 años". Las pruebas confirman que durante una declaración nacional de pandemia se producirá un número significativo de reacciones graves debido al uso del adyuvante MF59 y que requieren atención médica adicional.

40 Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, EE.UU.) introdujo un análogo sintético del monofosforil lípido A en aproximadamente el período de 2004. Avanti Polar Lipids llamó a este análogo sintético disacárido de hexaacilo fosforilado "PHAD" (de sus siglas en inglés), conocido también como "GLA". PHAD existe como un compuesto único, que se muestra en la Figura 1, de una pureza de aproximadamente el 98 % con un peso molecular de 1763 Daltons. La pureza de PHAD está en marcado contraste con el MPL de GSK aislado de *Salmonella minnesota* que, como se describió anteriormente, existe como una mezcla dinámica y compleja. A diferencia del MPL de GSK, el proceso de fabricación, suministro, uso y estabilidad de PHAD se pueden monitorear de cerca y controlar como un compuesto puro.

50 Si un adyuvante específico o una combinación de adyuvantes mejorará o no una respuesta inmunitaria hacia cada antígeno específico es impredecible. Por ejemplo, la vacuna Cervarix de GSK contiene monofosforil lípido A y alumbre, porque esta combinación es superior al alumbre solo (Giannini et al. *Vaccine*, 2006, 24, págs. 5937-5949). Se observó un aumento similar en la eficacia con una vacuna que utilizaba un antígeno de superficie de hepatitis B recombinante. (*Vaccine*, 1998, 16(7), págs. 708-714). Otro ejemplo que demuestra la variabilidad de las combinaciones antígeno-adyuvante para producir una respuesta inmunitaria para un antígeno específico se muestra en la Tabla 6 de la Patente de EE.UU. n.º 6.889.885. Estos inventores demostraron que el adyuvante QS-21 y, por separado, la combinación de adyuvante alumbre más monofosforil lípido A generaron mayores respuestas de anticuerpos a una proteína de 74 kD que el alumbre o monofosforil lípido A solo. Adicionalmente, en 2009, Derek T. O'Hagan y Ennio De Gregorio de Novartis Vaccines publicaron una revisión sobre el desarrollo de adyuvantes. (*Drug Discovery Today*, 14(11/12), junio de 2009, págs. 541-551). Se informó que el alumbre es un adyuvante relativamente débil para ciertas proteínas o antígenos y aún se requieren nuevos adyuvantes.

60 En 2004, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, de sus siglas en inglés) advirtió una crisis pendiente de aumento de bacterias resistentes a antibióticos en todo el mundo, sin nuevos antibióticos en el horizonte para combatir este fenómeno. En 2009, la IDSA identificó que ahora se producen infecciones bacterianas que son resistentes a todos los antibióticos actuales, y que las bacterias resistentes a antibióticos más alarmantes son las bacterias gramnegativas, incluida *E. coli*. En 2010, la IDSA declaró que a pesar de los esfuerzos de muchos laboratorios privados, públicos y gubernamentales, la investigación no había producido nuevas alternativas para tratar las bacterias resistentes a antibióticos y ahora se requería un compromiso global. La urgencia de la IDSA está

respaldada por científicos de GlaxoSmithKline que predijeron que sería más de diez o quince años antes del lanzamiento de cualquier nuevo antibiótico para el tratamiento de infecciones bacterianas gramnegativas (Payne et al. Nature Reviews Drug Discovery. 2007, 6, págs. 29-40).

5 Su predicción se basó en el fracaso de 34 compañías que intentaron desarrollar nuevos antibióticos. Está surgiendo un consenso entre la comunidad científica de que EE.UU. necesita con urgencia nuevos tratamientos para las infecciones bacterianas. Adam L. Hersh y sus colegas informaron una encuesta con 562 médicos de enfermedades infecciosas que respondieron en EE.UU. en la revista *Clinical Infectious Disease* en 2012 (Hersh et al. CID. 2012. 54(11), 1677-8) que el 63 % de estos los médicos trataron a pacientes con infecciones bacterianas resistentes a todos los antibióticos conocidos en el último año. Estos datos enfatizan la necesidad de nuevos tratamientos para las infecciones bacterianas. El fracaso en la técnica para identificar nuevas alternativas terapéuticas para prevenir y tratar infecciones bacterianas gramnegativas está bien documentado.

15 Por otra parte, al menos cinco vacunas en desarrollo para prevenir o tratar infecciones por *Staphylococcus aureus* se han suspendido recientemente. Estas incluyen StaphVAX, Veronate, Aurexis, Aurograb y V710. El fracaso de identificación de nuevas vacunas para prevenir y tratar infecciones bacterianas está bien documentado.

20 Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en todo el mundo y la enfermedad infecciosa número uno que sufren las mujeres en EE.UU. Los síntomas de las ITU incluyen disuria (dolor al orinar), urgencia para orinar y dolor suprapúbico. Las ITU agudas no complicadas ocurren en un estimado de 7 a 11 millones de mujeres en EE.UU. cada año. Más de la mitad de las mujeres adultas sufrirán de una o más ITU en su vida, con un 25-44 % de las mujeres que experimentan una ITU recurrente. De hecho, aproximadamente 1.000.000 de mujeres y hombres en EE.UU. experimentan tres o más episodios de ITU por año. Por otra parte, la recurrencia a menudo ocurre dentro de los 30 a 90 días de la infección a pesar del tratamiento antibiótico apropiado y la eliminación aparente de la infección inicial de la orina.

30 A pesar de los avances recientes en la epidemiología y la patogenia de la ITU, no se han logrado mejoras importantes en la capacidad para prevenir o tratar estas infecciones. El 25 al 44 % de las mujeres con ITU que sufren infecciones recurrentes requieren tratamiento adicional, costes adicionales y, en algunos casos, una evaluación urológica extensa para evitar que surjan complicaciones más graves. Por lo tanto, las vacunas seguras y eficaces que tienen el potencial de mejorar la conveniencia del paciente y disminuir los costes son de considerable interés para los pacientes, proveedores y organizaciones de atención médica. En la población recurrente de ITU, la resistencia antimicrobiana es de gran preocupación ya que las opciones de tratamiento están disminuyendo. Existe, por lo tanto, una necesidad urgente de desarrollar nuevos enfoques para la prevención y el tratamiento de ITU que dependan menos del uso de antimicrobianos.

40 Las ITU suelen ser causadas por *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC, de sus siglas en inglés), que puede ser responsable de hasta el 85 % de las ITU adquiridas en la comunidad. Se ha descubierto una cascada patógena fundamental mediante la cual UPEC evade las defensas del hospedador y se expande rápidamente en número en el tracto urinario para causar la enfermedad. Este trabajo apoya la necesidad clínica de una vacuna contra las ITU.

45 FimH desempeña un papel importante en varias etapas de la cascada de la patogénesis, lo que la convierte en una diana principal de la vacuna. Las cepas de UPEC que carecen de la adhesina FimH son incapaces de colonizar eficazmente la vejiga. Una vacuna contra FimH activará las defensas del hospedador para reconocer y eliminar UPEC en todas las etapas de la infección, incluso cuando esté protegida en IBC o reservorios intracelulares.

50 Los científicos de MedImmune, Inc. y el laboratorio del profesor Scott Hultgren (Patente de EE.UU. n.º 6.500.434) inventaron conjuntamente una vacuna FimCH con MF59 como adyuvante que contiene escualeno. La proteína FimH y la proteína FimC existen como un complejo proteico no covalente, FimCH. FimC estabiliza FimH y los anticuerpos se producen contra ambas proteínas, sin embargo, solo los anticuerpos para FimH han demostrado reducir la colonización de la vejiga de *E. coli* en animales. Por lo tanto, el uso de FimCH como antígeno en una vacuna está limitado por el requisito de un adyuvante eficaz.

55 La vacuna FimCH con el adyuvante MF59 que contiene escualeno (una emulsión de aceite en agua) provocó una respuesta inmunitaria durante los ensayos clínicos de Fase 1 (Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030138449; incorporada en el presente documento en su totalidad). Los ensayos clínicos de Fase 2 se realizaron de nuevo en dos poblaciones distintas con MF59 que contenía escualeno, pero las mujeres no produjeron títulos de IgG relevantes para FimH en ninguno de estos ensayos. El desarrollo de la vacuna FimCH de MedImmune con el adyuvante MF59 se suspendió debido a estos resultados decepcionantes. El MF59 con escualeno tiene un historial de causar reacciones en el sitio de inyección y sistémicas locales graves cuando se utiliza con ciertos antígenos. Durante estos ensayos clínicos de Fase 2, las mujeres experimentaron reacciones graves en el lugar de inyección y reacciones sistémicas graves. Debido a este fallo, no existe una vacuna para el tratamiento o la prevención de ITU en EE.UU.

65 Existe una necesidad continua de una vacuna para prevenir y tratar ITU. El fracaso de que MedImmune y otros no hayan desarrollado una vacuna contra ITU evidencia las dificultades de desarrollar nuevas vacunas para las

infecciones bacterianas. MedImmune demostró que el alumbre no mejora suficientemente la respuesta inmunitaria a FimCH. MedImmune no tenía alternativas claras de adyuvantes para emparejarse con el antígeno FimCH.

5 Por consiguiente, existe una necesidad urgente de vacunas y adyuvantes utilizados para mejorar la respuesta inmunitaria a los antígenos en las vacunas. Hay una necesidad de vacunas y adyuvantes para vacunas que tengan estabilidad extendida sin sacrificar la eficacia. En particular, existe una necesidad urgente y ampliamente reconocida de vacunas y adyuvantes más estables a temperatura ambiente. Además, sería deseable tener vacunas, adyuvantes y composiciones que sean estables a una temperatura superior a la temperatura ambiente.

10 Además, existe la necesidad de adyuvantes y composiciones farmacéuticas que produzcan reacciones en el lugar de inyección y sistémicas menos graves.

15 Existe una necesidad de nuevas vacunas para prevenir y tratar infecciones bacterianas, y de vacunas para la prevención y el tratamiento de ITU en particular.

20 Sería deseable tener vacunas y adyuvantes utilizados para mejorar la respuesta inmunitaria de los antígenos en las vacunas, con una mayor vida útil que se puede producir de manera rentable. Dichas vacunas y adyuvantes reducirían significativamente los costes de atención médica en EE.UU., especialmente si se pueden almacenar a temperatura ambiente o más sin afectar negativamente a su estabilidad.

25 Sería deseable tener adyuvantes y vacunas que produzcan reacciones en el sitio de inyección y sistémicas mínimas. Sería deseable tener formulaciones con la menor cantidad de excipientes posible.

30 Sería deseable tener una vacuna, y un adyuvante para una vacuna, que mejore la respuesta inmunitaria para tratar infecciones bacterianas. Sería deseable tener una vacuna, y un adyuvante para una vacuna, que mejore la respuesta inmunitaria a *Escherichia coli* en pacientes con ITU.

35 La publicación de patente internacional n.º WO 2012/149307 desvela formulaciones de adyuvantes que comprenden PHAD. No obstante, las formulaciones desveladas requieren ser liofilizadas para la conservación a largo plazo, o requieren compuestos adicionales en las formulaciones para la conservación a temperaturas refrigeradas; los compuestos adicionales pueden provocar efectos secundarios indeseables.

Breve resumen de la invención

35 La presente invención aborda muchos problemas de los adyuvantes, vacunas y composiciones farmacéuticas de la técnica anterior descritos en el presente documento. La presente invención proporciona nuevas composiciones y formulaciones de adyuvantes líquidos que proporcionan muchas propiedades inesperadas y ventajosas desconocidas en la técnica de las composiciones de adyuvantes y farmacéuticas.

40 En un aspecto, se proporcionan composiciones y formulaciones de adyuvantes líquidas que exhiben estabilidad a temperatura ambiente durante aproximadamente más de 6 meses y hasta aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 60 días o más. Las nuevas composiciones y formulaciones de adyuvantes líquidas se pueden almacenar en condiciones refrigeradas o a temperatura ambiente, lo que facilita su vida útil durante el envío y el almacenamiento y reduce sus costes de entrega.

45 Las formulaciones de adyuvantes de la invención descritas en el presente documento abordan muchos obstáculos actuales en la administración de vacunas al permitir una formulación de adyuvantes de bajo coste e inesperada y notablemente estable que mejora la respuesta inmunitaria al antígeno de *E. coli* con reacciones en el sitio de inyección y sistémicas menos graves.

50 Los datos descritos en el presente documento demuestran que las formulaciones de adyuvantes de la invención mejoran la respuesta inmunitaria a otros antígenos, incluidos los antígenos bacterianos y virales.

55 La invención descrita en el presente documento contribuye a reducir este problema mediante el tratamiento de infecciones del tracto urinario causadas por bacterias gramnegativas, incluida *E. coli*.

En un aspecto, se desvela una nueva composición de adyuvante con una estabilidad notable de 2 °C a 8 °C y una temperatura ambiente de hasta aproximadamente 37 °C.

60 En un aspecto de la presente divulgación, una composición que comprende un adyuvante PHAD producido sintéticamente y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato, succinato y fosfato de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM. Estas nuevas composiciones de PHAD son preferentemente suspensiones tamponadas acuosas. La composición se puede utilizar de varias maneras en el contexto de vacunas y productos farmacéuticos. La composición, preferentemente sin componentes adicionales, mejora significativamente la estabilidad de PHAD en suspensión y logra una estabilidad excepcional a temperatura ambiente y hasta y

aproximadamente 37 °C. Las composiciones también exhiben excelente estabilidad a temperatura refrigerada. Esto representa un avance significativo en tecnología adyuvante y farmacéutica al proporcionar una composición de PHAD eficaz y económica que no requiere refrigeración para una estabilidad a largo plazo.

- 5 En un aspecto de la invención, se proporcionan nuevas formulaciones de adyuvantes como una suspensión acuosa tamponada. En una realización, las formulaciones de adyuvantes incluyen un adyuvante PHAD producido sintéticamente, un tampón citrato de 10 mM a 50 mM, preferentemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM, y una fosfatidilcolina producida sintéticamente, estando comprendida la relación molar entre la al menos una fosfatidilcolina y PHAD entre 1:1 y 40:1 (fosfatidilcolina:PHAD). Cuando se agrega una fosfatidilcolina, las concentraciones de tampón se pueden expandir de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM y lograr la notable estabilidad descrita en el presente documento. Estas nuevas formulaciones de adyuvantes son preferentemente suspensiones tamponadas acuosas. Las formulaciones de adyuvantes tienen una excelente estabilidad a largo plazo cuando se almacenan a temperatura ambiente y refrigerada y una excelente estabilidad hasta y alrededor de 37 °C. Estas formulaciones se pueden producir a costes notablemente bajos.

Las nuevas formulaciones de adyuvantes descritas en el presente documento no requieren liofilización, o proceso equivalente para la estabilidad a temperatura ambiente o la estabilidad hasta y alrededor de 37 °C. Las formulaciones de adyuvantes incluyen un tampón específico y una o más fosfatidilcolinas producidas sintéticamente seleccionadas del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, y POPC, preferentemente DPPC, y un adyuvante producido sintéticamente, PHAD, en una relación molar de aproximadamente 1:1 a 40:1 (fosfatidilcolina:PHAD), preferentemente de aproximadamente 1:1 a 20:1 (fosfatidilcolina:PHAD), más preferentemente de aproximadamente 2:1 a 5:1 (fosfatidilcolina:PHAD), y lo más preferentemente de aproximadamente 2:1 a 5:1 (DPPC:PHAD).

- 25 Uno de los aspectos más valiosos de la invención es que las formulaciones de adyuvantes incluyen solo un adyuvante único PHAD en tampón citrato en concentraciones especificadas como se describe en el presente documento, y preferentemente una única fosfatidilcolina. No se requieren otros ingredientes para producir la estabilidad inesperada a largo plazo a temperatura ambiente. Además, la formulación de adyuvante se puede producir a bajo coste. En este sentido, la estabilidad a largo plazo de estas formulaciones de adyuvantes a temperatura ambiente es notable y se logra sin el uso de colesterol, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, monoacilglicerol, lioprotectores y aceite metabolizable. Los adyuvantes convencionales de la técnica anterior no alcanzan la estabilidad sin el uso de uno o más de estos ingredientes.

Otro aspecto de la presente invención son las formulaciones de adyuvantes que no necesitan dos o más fosfatidilcolinas o la adición de un fosfatidilglicerol. Como se muestra en los ejemplos, se pueden agregar dos o más fosfatidilcolinas o uno o más fosfatidilgliceroles a estas formulaciones, pero preferentemente no es necesario para lograr la notable estabilidad a largo plazo demostrada en el presente documento.

Aunque no está limitado por teoría alguna, se cree que la expansión de las concentraciones de tampón preferidas del tampón citrato de 10 mM a 50 mM para lograr la notable estabilidad de la invención descrita en el presente documento se debe a la adición de excipientes preferidos, preferentemente fosfatidilcolina, en la relación molar definida del aspecto preferido de la invención de fosfatidilcolina a PHAD descrito en el presente documento. Más preferentemente, las concentraciones de tampón preferidas son de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, incluso más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM. Preferentemente, el pH está en un intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5, preferentemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, más preferentemente de aproximadamente 5,0 a 6,0.

Como se muestra en los ejemplos, esta estabilidad excepcional a temperatura ambiente no está presente cuando se formula en agua, tampón acetato, PBS, o tampones citrato o fosfato en o superior a 100 mM. En cambio, la estabilidad es producida por citrato, en concentraciones de 10 mM a 50 mM, pero, preferentemente, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM.

Otra realización de la invención incluye un tensioactivo no iónico, preferentemente polisorbato 80, para reducir la agregación de partículas de la invención.

Eliminar la necesidad de liofilización es una ventaja significativa y un avance inesperado porque se han eliminado muchos pasos costosos y riesgos. Otro aspecto de la presente invención es que estas formulaciones de adyuvantes son superiores para potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno al tiempo que causan reacciones en el sitio de inyección y sistémicas significativamente menos graves durante la administración en comparación con la técnica anterior. Otro aspecto de la presente invención son las formulaciones de adyuvantes sustancialmente libres de aceites metabolizables, incluido el escualeno, y sustancialmente libres de colesterol. En la técnica, se considera ampliamente que el colesterol es necesario para que funcionen las formulaciones de adyuvantes o liposomas. La presente invención produce todos sus beneficios como se describe en el presente documento sin requerir colesterol.

65

Por lo tanto, las ventajas de las formulaciones de adyuvantes y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen: estabilidad a temperatura ambiente como una suspensión acuosa tamponada durante al menos 6 meses, y/o estabilidad hasta y a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 60 días o más; reacciones en el sitio de inyección y sistémicas menos graves por administración al tiempo que mejora las respuestas inmunitarias a antígenos; y, menor coste de producción o fabricación con menos materiales o componentes y menor concentración de los materiales o componentes. Las formulaciones de adyuvantes de la invención proporcionan estos tres beneficios principales combinados no alcanzados previamente por los adyuvantes que son análogos sintéticos de MLA o MPL como alternativas a los adyuvantes basados en alumbre.

5 En otro aspecto de la invención, se proporcionan nuevas composiciones de vacunas que contienen las nuevas formulaciones de adyuvantes para su uso para tratar y prevenir infecciones del tracto urinario causadas por bacterias gramnegativas que incluyen *Escherichia coli* y *E. coli* resistente a múltiples fármacos. También se proporcionan métodos de administración de dichas nuevas composiciones de vacunas y métodos de tratamiento para prevenir y tratar infecciones del tracto urinario causadas por bacterias gramnegativas que incluyen *E. coli* y *E. coli* resistente a múltiples fármacos.

10 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan métodos para inducir la producción de anticuerpos contra FimH en un ser humano con infecciones recurrentes del tracto urinario. Otro aspecto de la presente divulgación son las composiciones de vacunas que inducen la producción de anticuerpos contra FimH en un ser humano con infecciones recurrentes del tracto urinario.

15 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un kit de vacuna que comprende las composiciones o formulaciones de PHAD o composiciones de vacuna, junto con las instrucciones de administración e instrucciones para el almacenamiento. Las instrucciones proporcionan la exposición de las composiciones o formulaciones de PHAD a temperatura ambiente y hasta y alrededor de 37 °C. Estas instrucciones que describen las temperaturas de almacenamiento, envío y exposición pueden ser aprobadas por una autoridad reguladora gubernamental, incluida la FDA de EE.UU. o la Agencia Europea de Medicamentos. Preferentemente, uno o más de los componentes del kit son las composiciones o formulaciones de PHAD en una jeringuilla.

20 Otro aspecto de la presente divulgación es que la composición y formulaciones de PHAD y composiciones de vacuna son composiciones estériles y composiciones farmacéuticas estériles, más preferentemente las composiciones y formulaciones de PHAD estériles están contenidas en una jeringuilla estéril.

Breve descripción de las figuras

35 La Figura 1 muestra la estructura química de PHAD.
 La Figura 2 muestra la estructura química de DPPC.
 La Figura 3 es una gráfica que ilustra ELISA indirecto de FimCH y Q133K utilizando IgG anti-FimH.
 La Figura 4 es una gráfica que ilustra el ensayo de potencia que analiza FimCH y Q133K.
 40 La Figura 5 es una gráfica que ilustra la evaluación de inhibidores de moléculas pequeñas en el ensayo de potencia. Dos moléculas pequeñas, 4-metilumbeliferil- α -D-manopiranosido (UFMP) y metil- α -D-manopiranosido (MDMP) inhiben la unión de manosa a FimH.
 La Figura 6 es un cromatograma representativo de la muestra de sustancia farmacéutica FimCH mediante CEX-HPLC.
 45 La Figura 7 es una gráfica que ilustra la protección contra la infección por *E. coli* después de la inmunización con FimCH/PHAD de ratones.
 La Figura 8 es un ejemplo de cromatograma de DPPC y PHAD mediante HPLC.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

"Aproximadamente" en referencia a la cantidad de PHAD o concentración de tampón (a menos que se defina) significa más y menos el 10 % de la cantidad indicada.

55 "Aproximadamente 25 °C" se refiere a temperaturas de 20 °C a 30 °C.

"Aproximadamente 37 °C" se refiere a temperaturas de 34 °C a 40 °C.

60 "Aproximadamente 50 mM" se refiere a las concentraciones de tampón descritas en el presente documento que significa entre 50 mM y menos de 100 mM. Como se muestra en los ejemplos, 100 mM o más de los tampones especificados no son tan eficaces para permitir la estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente. El extremo superior de las concentraciones de tampón se evalúa normalmente en incrementos de dos veces. Con referencia a aproximadamente 50 mM, las concentraciones de tampón especificadas de la invención son preferentemente menores que 90 mM, preferentemente menores que 80 mM, más preferentemente menores que 70 mM, y lo más preferentemente menores que 60 mM.

"Aproximadamente 10 mM" se refiere a las concentraciones de tampón descritas en el presente documento que significa entre 6 mM y 10 mM.

5 "Vehículo aceptable" se refiere a un vehículo que no es perjudicial para los otros ingredientes de la composición y no es perjudicial para el material al que se va a aplicar.

10 "Adyuvante" se refiere a un agente que aumenta la respuesta antigénica; una sustancia que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno; o un agente que estimula la producción de anticuerpos contra un antígeno. Existen numerosas convenciones de nombres o terminologías en la técnica. Sin hacer referencia a una convención de denominación específica, las composiciones de adyuvantes como se describen en el presente documento pueden simplemente denominarse formulaciones de adyuvantes o preparaciones de adyuvantes.

"Administración" se refiere a cualquier medio para proporcionar un compuesto o composición a un sujeto.

15 "Coloide" se refiere a uno o más productos químicos, compuestos o sustancias dispersadas microscópicamente en una solución acuosa tamponada u otra sustancia. Las formulaciones de adyuvantes descritas en el presente documento también se pueden describir como coloides. Un ejemplo de una dispersión coloidal es Fungizone, que consiste en amfotericina B-desoxicolato de sodio para administración parenteral.

20 "Concentración fundamental de micelas" se refiere a la concentración de surfactante(s) por encima de la cual se forman las micelas y todos los surfactantes adicionales agregados al sistema van a las micelas.

"DLPC" se refiere a 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfolina.

25 "DMPC" se refiere a 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina.

"DOPC" se refiere a 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina.

30 "DPPC" se refiere a 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (fórmula molecular $C_{40}H_{80}NO_8P$ (PM = 734 Da) (la estructura química se muestra en la Figura 2).

"DPPG" se refiere a 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol).

35 "DSPC" se refiere a 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina.

"Cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de FimCH o FimH truncada u otro antígeno en una composición de vacuna que se administra a un ser humano para provocar una respuesta inmunitaria contra FimH u otro antígeno, o una cantidad suficiente de un adyuvante, preferentemente PHAD, para provocar una respuesta inmunitaria aumentada al antígeno.

40 "Esencialmente libre" en referencia a materiales, aditivos, productos químicos o excipientes significa que los materiales, aditivos, productos químicos o excipientes no se han agregado a la composición o formulación de la invención, aunque pueden estar presentes algunas cantidades de niveles de impureza.

45 "Esencialmente libre de reacciones en el sitio de inyección y sistémicas graves" significa que el dos por ciento o menos de los seres humanos experimentan estas reacciones en sitios de inyección y sistémicas graves que son atribuibles a la composición o formulación de adyuvante.

50 "Reacción en el sitio de inyección" se refiere al dolor, sensibilidad, enrojecimiento y/o hinchazón en el sitio de administración o sitio de inyección.

"Invención" significa al menos algunas realizaciones de la presente invención; las referencias a varias características de la "invención" o "presente invención" a lo largo del presente documento no significan que todas las realizaciones o métodos reivindicados incluyan las características referenciadas.

55 "Etiquetado" o "Etiqueta" se refiere a todas las etiquetas y otros materiales escritos, impresos o gráficos en cualquier artículo o cualquiera de sus recipientes o envoltorios, o que acompañan a dicho artículo y, por lo tanto, incluye cualquier prospecto u hoja de información que acompañe a las composiciones o formulaciones de vacuna o de adyuvante de la invención.

60 "Reacciones en el sitio de inyección y sistémicas menos graves" se refiere a reacciones en el sitio de inyección y/o reacciones sistémicas menos graves o de grado 3 en comparación con la vacuna comercial Cervarix como se detalla en el presente documento y en sus documentos de información del producto y el adyuvante de vacuna en investigación GLA-SE como se describe en el presente documento y en Treanor et al. (Vaccine 2013).

65

"Liposoma" se refiere a vesículas en general que consisten en una membrana de bicapa lipídica que rodea un núcleo hidrófilo.

5 "Bajo coste" o "bajos costes" se refiere a una composición con los componentes o materiales en las concentraciones más bajas suficientes para lograr las nuevas características de la invención.

10 "Lioprotectores" se refiere a materiales, productos químicos o excipientes que se utilizan principalmente para proteger los materiales del daño por congelación u otros daños durante la fabricación, el almacenamiento y el uso o para mejorar la reconstitución, incluida la habilitación adecuada de solvatación antes del uso, y también incluye estos materiales, productos químicos o excipientes utilizados para modificar la osmolalidad o ajustar la tonicidad, e incluyen, pero no se limitan a, sorbitol, manitol, manosa, eritritol, xilitol, glicerol, sacarosa, dextrosa, trehalosa, maltosa, lactosa y celobiosa.

15 "Aceite metabolizable" se refiere principalmente al escualeno, o análogos estrechamente relacionados del escualeno como un adyuvante en formulaciones de vacunas o formulaciones de adyuvantes, pero también se refiere a los triglicéridos de cadena media que incluyen Miglyol 810 y aceites de vegetales, animales o pescado cuando se utilizan en formulaciones de vacunas o adyuvantes como excipientes, o para crear un efecto adyuvante, o para producir emulsiones. Los ejemplos incluyen aceite de semilla de uva, aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de maíz y aceite de hígado de tiburón.

20 "Micela" se refiere a un agregado de moléculas tensioactivas dispersadas en una solución acuosa tamponada con las regiones de cabeza hidrófila en contacto con la solución acuosa tamponada circundante, que secuestra las regiones hidrófobas de cola simple en el centro de la micela.

25 "MLA" se refiere a monofosforil lípido A.

"MPL" se refiere a 3'-O-desacil-4'-monofosforil lípido A.

30 "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que no es perjudicial para los otros ingredientes de la composición y no es perjudicial para el receptor humano u otro animal del mismo. En el contexto de los otros ingredientes de la composición, "no perjudicial" significa que el vehículo no reaccionará con ni degradará los otros ingredientes ni interferirá de otro modo con su eficacia. Sin embargo, la interferencia con la eficacia de un ingrediente no se refiere a la mera dilución del ingrediente.

35 "PHAD" se refiere a disacárido de hexaacilo fosforilado sintético (la estructura se muestra en la Figura 1). PHAD está disponible en Avanti Polar Lipids. PHAD es un agonista del receptor 4 tipo Toll.

40 "Composición farmacéutica" se refiere a una composición que se administra a un mamífero para tratar o prevenir una enfermedad, o en el caso de una composición de vacuna, para producir una respuesta inmunogénica que trata o previene una enfermedad, reduce los síntomas o proporciona algún tipo de beneficio terapéutico o en el caso de una composición de adyuvante, para potenciar una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos.

45 "Tampón fosfato" o "fosfato" se refiere a un tampón fosfato seleccionado del siguiente grupo: fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico, fosfato potásico monobásico y fosfato potásico dibásico, o alguna combinación de los mismos. Preferentemente, "fosfato" consiste en fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico y fosfato potásico monobásico. A menos que se indique otra cosa, la referencia al tampón fosfato excluye específicamente el fosfato de amonio.

50 "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato de una composición general de tampón fosfato (Na_2HPO_4 y/o KH_2PO_4), cloruro de potasio y cloruro de sodio. Una composición de PBS típica comprende aproximadamente tampón fosfato 10 mM (Na_2HPO_4 y/o KH_2PO_4), cloruro de potasio 2,7 mM y cloruro de sodio 0,14 M, pH 7,4, a 25 °C.

55 "Tampón fosfato de citrato" se refiere a un tampón fosfato que contiene ácido cítrico y fosfato de sodio donde el pH se mantiene mediante el equilibrio de citrato/ácido cítrico y fosfato/fosfato de hidrógeno. El fosfato puede incluir, por ejemplo, Na_2HPO_4 y/o KH_2PO_4 y puede utilizarse citrato trisódico.

60 "Fosfatidilcolina" (también llamada "PC") se refiere a los lípidos que contienen colina. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina), DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina), DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina) y POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina). Las fosfatidilcolinas están disponibles en Avanti Polar Lipids.

"Fosfatidiletanolamina" se refiere a los lípidos que contienen un grupo fosfato unido a una etanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

65 "Fosfatidilglicerol" se refiere a lípidos que contienen glicerol. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DMPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DPPG), y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DSPG).

ES 2 716 124 T3

"POPC" se refiere a 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

5 Las "infecciones recurrentes del tracto urinario" se refieren a que un ser humano tenga 3 a 4 infecciones del tracto urinario en aproximadamente un año.

"Refrigerado" se refiere a un intervalo de temperatura de 2 °C a 8 °C.

10 "Temperatura ambiente" se refiere a un intervalo de temperatura de 19 °C (66 °F) a 25 °C (77 °F).

"Solución salina" se refiere a aproximadamente 125 mM a aproximadamente 155 mM de NaCl en soluciones acuosas tamponadas. Por ejemplo, PBS generalmente contiene NaCl 137 mM y la solución salina tamponada con Tris puede contener 150 mM.

15 "Reacción en el sitio de inyección grave" se refiere a uno o más de los siguientes: dolor que requiere un analgésico narcótico o que evita la actividad diaria; sensibilidad que causa molestias significativas en el reposo; enrojecimiento de más de 10 cm; e hinchazón de más de 10 cm o que evita la actividad diaria.

20 "Reacción sistémica grave" se refiere a uno o más de los siguientes: náuseas/vómitos que impiden la actividad diaria o requieren una hidratación IV de los sujetos; diarrea que consiste en 6 o más deposiciones acuosas o > 800 gramos en 24 horas o que requiere hidratación IV de los sujetos; dolor de cabeza que consiste en un uso significativo de analgésicos narcóticos o impide la actividad diaria; fatiga que consiste en actividad diaria significativa o impedida; y mialgia que consiste en actividad diaria significativa o impedida.

25 "Sustancialmente libre" en referencia al colesterol significa que el colesterol, si está presente, está a 0,3 mM o menos.

"Sustancialmente libre" en referencia al monoacilglicerol significa que, monoacilglicerol, si está presente, está a 0,5 mM o menos. Un ejemplo de monoacilglicerol es monopalmitoil glicerol.

30 "Sustancialmente libre" en referencia a fosfatidilglicerol o fosfatidiletanolamina significa que estas sustancias, si está presente, están a 0,1 mM o menos.

35 "Sustancialmente libre" en referencia a los lioprotectores significa que estas sustancias, si está presente, se encuentran en una concentración de la composición o formulación del 0,5 % o menos.

"Sustancialmente libre de solución salina" significa menos de NaCl 30 mM en la composición o formulación de la invención.

40 "Reacciones sistémicas" se refiere a náuseas/vómitos, diarrea, dolor de cabeza, fatiga y/o mialgia.

"Tampón succinato" o "succinato" se refiere a succinato disódico o succinato de sodio dibásico. Se puede utilizar succinato de potasio, pero es menos preferido.

45 "Estabilidad" o "estable" en referencia a los adyuvantes, activos, proteínas, antígenos o fármacos se refiere a la calidad de la sustancia o producto para que permanezca aceptable para su uso previsto durante un cierto período de tiempo desde su fecha de fabricación, mientras está bajo la influencia de dichas variables como la temperatura y/o la humedad. La estabilidad de una sustancia a menudo se demuestra mediante datos analíticos (u otra evidencia equivalente).

50 "Citrato trisódico" se refiere a los tampones citrato (también denominados "citrato") como, por ejemplo, citrato trisódico dihidratado, citrato de sodio, citrato de sodio tribásico hidratado o sal trisódica de ácido cítrico dihidratada, como lo mencionan los proveedores incluidos Sigma-Aldrich y BDH Chemicals. Se pueden utilizar citrato de potasio, citrato de sodio monobásico y citrato de sodio dibásico, pero son menos preferidos. Por ejemplo, el producto de imiglucerasa para inyección utiliza una combinación de citrato trisódico y citrato de hidrógeno disódico. Estos tipos de combinaciones son aceptables. El ácido cítrico, CAS 77-92-9, se puede utilizar para ajustar el pH del tampón, pero no puede sustituir a los tampones enumerados en el presente documento.

60 "FimH truncado" se refiere a la proteína FimH truncada para incluir al menos de aproximadamente 25 a aproximadamente 175 restos de aminoácidos de los primeros 175 aminoácidos de FimH. Con referencia a FimH truncada, la proteína FimH truncada incluye preferentemente al menos el 9 % de la proteína FimH, más preferentemente al menos el 30 % de la proteína FimH, y lo más preferentemente al menos el 60 % de la proteína FimH.

65 "Infecciones del tracto urinario" se refiere a un diagnóstico médico caracterizado por 1 o más de los siguientes signos y síntomas: evacuación irritativa como la frecuencia, la urgencia y la disuria; hematuria macroscópica; o sensibilidad suprapúbica provocada en el examen; y/o 1 o más de los siguientes resultados de laboratorio: prueba de tira reactiva

de orina positiva de una muestra limpia de orina o catéter; análisis de orina microscópico de una muestra limpia de orina o catéter (leucocitos, bacterias y cilindros pueden estar presentes); o cultivo de orina de una muestra limpia de orina o catéter para *E. coli* a $\geq 10^3$ UFC/ml.

- 5 "Vacuna" o "composición de vacuna" se refiere a una composición que mejora la inmunidad a una enfermedad. Las composiciones de vacuna son composiciones inmunogénicas que provocan respuestas inmunitarias y producción de anticuerpos hacia el antígeno de la composición.

Realizaciones de la invención

- 10 En el presente documento se desvelan composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas o los vehículos farmacéuticamente aceptables están compuestos por PHAD y un tampón (denominada "composición de PHAD" o "composición que contiene PHAD" o "composición y vehículos que contienen PHAD"). Las composiciones de PHAD de la invención son preferentemente suspensiones tamponadas acuosas. El tampón se selecciona del grupo que consiste en citrato, succinato y fosfato de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM. Preferentemente, el pH está en un intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5, preferentemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, más preferentemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0. La composición farmacéutica o el vehículo con esta combinación (PHAD y el tampón) demuestra una excelente estabilidad como base para las composiciones farmacéuticas y mejora la estabilidad general de las composiciones de PHAD. Específicamente, estas composiciones y vehículos que contienen PHAD consiguen estabilidad a temperatura ambiente y hasta aproximadamente 37 °C. Estas composiciones y vehículos que contienen PHAD de la presente invención también exhiben una excelente estabilidad a largo plazo desde temperaturas refrigeradas a temperatura ambiente.

- 25 Las composiciones farmacéuticas y los vehículos farmacéuticos que contienen PHAD (que como se describió anteriormente incluyen PHAD y un tampón específico) pueden incluir opcionalmente otros ingredientes típicos de vacunas, formulaciones de adyuvantes y otras composiciones farmacéuticas tales como excipientes, modificadores, tensioactivos y aditivos. Para un ejemplo, las fosfatidilcolinas (como se describe con más detalle a continuación) se pueden agregar opcionalmente, solas o en combinación con otros vehículos lipídicos. En una realización, se pueden añadir fosfatidilcolinas de origen natural de soja o huevo o fosfatidilcolinas hidrogenadas de soja o huevo o acilfosfatidilcolinas mezcladas sintéticas o naturales.

- 35 En una realización preferida, se añaden uno o más antígenos de vacuna a las composiciones que contienen PHAD para formar una vacuna. Los antígenos de la vacuna pueden ser cualquier antígeno utilizado en vacunas, que incluyen, pero sin limitación, difteria, tétanos, tos ferina, poliomielitis, hepatitis y/o preparaciones antigénicas del virus de la gripe. Preferentemente, el antígeno de la vacuna es un complejo proteico FimCH como se describe en detalle a continuación.

- 40 Las composiciones y vehículos que contienen PHAD se pueden preparar a cualquier concentración, pero normalmente se preparan de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1,0 mg/ml de PHAD, preferentemente de aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/ml de PHAD, pero generalmente no más de aproximadamente 2,5 mg/ml de PHAD.

- 45 Las composiciones que contienen PHAD pueden administrarse a animales o seres humanos como un adyuvante de vacunas para administrar preferentemente de aproximadamente 10 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis. La dosis exacta puede modificarse de acuerdo con el antígeno utilizado. Más preferentemente, se administran de aproximadamente 20 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis. Incluso más preferentemente se administran de aproximadamente 40 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis.

- 50 Como se muestra en el presente documento, la estabilidad inesperada de la composición que contiene PHAD a temperatura ambiente y hasta 37 °C está ausente cuando se formula en agua, tampón acetato, PBS, o tampones citrato o fosfato en o superior a 100 mM. Las composiciones de PHAD contienen tampón citrato, succinato o fosfato para producir la estabilidad inesperada, preferentemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM.

- 55 Más particularmente, en los tampones preferidos de la composición de PHAD, las concentraciones de los tampones se seleccionan del grupo que consiste en de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM; de 25 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM; de 28 mM a aproximadamente 50 mM; de 30 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 30 mM; de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM; de 40 mM a aproximadamente 50 mM; aproximadamente 40 mM; y aproximadamente 50 mM.

- 65 Además, tal como se muestra en los ejemplos más adelante, el uso de PBS en las composiciones y formulaciones que contienen PHAD no presenta las nuevas características de la invención, y en particular las características de estabilidad de la invención. Por el contrario, el uso de tampón citrato, succinato y fosfato como se define específicamente en el presente documento permite las nuevas características de estabilidad de la invención.

Preferentemente, las composiciones de PHAD de la invención están esencialmente libres de escualeno.

5 Preferentemente, las composiciones de PHAD de la invención están esencialmente libres de aceite metabolizable utilizado como adyuvante.

Preferentemente, las composiciones de PHAD de la invención están esencialmente libres de aceite metabolizable.

10 Las composiciones de PHAD de la invención son preferentemente suspensiones tamponadas acuosas, y preferentemente estas suspensiones tamponadas acuosas tienen tamaños de partícula menores que 150 nm, incluso más preferentemente menores que 130 nm, y preferentemente estas composiciones de PHAD no son emulsiones de aceite en agua.

15 Preferentemente, las composiciones de PHAD de la invención están esencialmente libres de un segundo adyuvante que incluye alumbre, escualeno, QS21, MF59, agonistas del receptor 9 de tipo Toll y otros adyuvantes que incluyen adyuvantes basados en escualeno. Los segundos adyuvantes tienen el potencial de generar reacciones locales y sistémicas más graves en los seres humanos sin el beneficio de aumentar aún más la respuesta inmunitaria para mejorar los resultados terapéuticos.

20 Las composiciones de PHAD contienen preferentemente menos de 5 mM de colesterol, más preferentemente menos de 1 mM de colesterol, e incluso más preferentemente sustancialmente libres de colesterol y, lo más preferentemente, esencialmente libres de colesterol.

25 Preferentemente, las composiciones de PHAD están sustancialmente libres de fosfatidilglicerol y, más preferentemente, están esencialmente libres de fosfatidilglicerol.

Preferentemente, las composiciones de PHAD están sustancialmente libres de fosfatidiletanolamina y, más preferentemente, esencialmente libres de fosfatidiletanolamina.

30 Preferentemente, las composiciones de PHAD están sustancialmente libres de monoacilglicerol y, más preferentemente, esencialmente libres de monoacilglicerol.

35 Preferentemente, las composiciones de PHAD están sustancialmente libres de solución salina, preferentemente contienen menos de NaCl 20 mM, y más preferentemente contienen menos de NaCl 10 mM, e incluso, más preferentemente, esencialmente libres de NaCl.

Preferentemente, las composiciones de PHAD están sustancialmente libres de lioprotectores, e incluso, más preferentemente, esencialmente libres de lioprotectores.

40 Las composiciones de PHAD no requieren liofilización, o procesos equivalentes, para preservar la concentración de PHAD para la vida útil o la estabilidad. Por lo tanto, las composiciones de PHAD preferentemente no están liofilizadas o no se produce liofilización; las composiciones de PHAD preferentemente no se secan después de la preparación; las composiciones de PHAD preferentemente no requieren reconstitución a partir de material seco con líquido o tampón después de la preparación; y las composiciones de PHAD preferentemente permanecen como una suspensión acuosa tamponada después de la fabricación antes de la administración.

Preferentemente, las composiciones de PHAD están sustancialmente libres de colesterol, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina, y están esencialmente libres de aceites metabolizables y un segundo adyuvante.

50 Más preferentemente, las composiciones de PHAD están esencialmente libres de colesterol, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina, y están esencialmente libres de aceites metabolizables y un segundo adyuvante.

55 Preferentemente, las composiciones de PHAD de la invención están sustancialmente libres de materiales o excipientes como se describe en el presente documento que no se requieren para lograr las nuevas características de la invención, pero, incluso más preferentemente, las composiciones de PHAD de la invención están esencialmente libres de materiales o excipientes como se describe en el presente documento que no se requieren para lograr las nuevas características de la invención.

60 Preferentemente, las composiciones de PHAD de la invención están sustancialmente libres de uno, dos, tres o más de materiales o excipientes por composición como se describe en el presente documento, y esta limitación no es exclusiva de solo un material o excipiente por composición.

65 Preferentemente, las composiciones de PHAD de la invención están esencialmente libres de uno, dos, tres o más materiales o excipientes por composición como se describe en el presente documento, y esta limitación no es exclusiva de solo un material o excipiente por composición.

Preferentemente, cuando una composición o formulación que contiene PHAD de la invención se almacena, envía, mantiene o administra a temperatura ambiente o hasta aproximadamente 37 °C, lo más preferido es haber sido esterilizada por filtración o preparada utilizando técnicas estériles, más preferentemente las composiciones y formulaciones de PHAD estériles están contenidas en una jeringuilla estéril.

5 La invención proporciona más particularmente nuevas formulaciones de adyuvantes. Las formulaciones de adyuvantes incluyen un PHAD producido sintéticamente, un tampón citrato de 10 mM a 50 mM y una fosfatidilcolina producida sintéticamente (denominada "formulaciones de PHAD" o "formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD" o "formulaciones que contienen PHAD"). La fosfatidilcolina y PHAD están presentes en una relación molar de
10 aproximadamente 1 (PC) a 1 (PHAD) a aproximadamente 40 (PC) a 1 (PHAD, preferentemente de aproximadamente 2,5 (PC) a 1 (PHAD). La referencia a formulaciones de PHAD se aplica a las formulaciones de adyuvantes a menos que se indique lo contrario. Estas nuevas formulaciones de PHAD son preferentemente suspensiones tamponadas acuosas. Las formulaciones de adyuvantes tienen una excelente estabilidad a largo plazo cuando se almacenan de
15 temperaturas refrigeradas a temperaturas ambiente, y hasta aproximadamente 37 °C. Además, las formulaciones de adyuvantes se pueden producir a bajos costes.

Las formulaciones de adyuvantes incluyen una fosfatidilcolina producida sintéticamente, preferentemente DPPC, y un PHAD adyuvante producido sintéticamente, en una relación molar de aproximadamente 1:1 a 40:1 (DPPC:PHAD), y
20 tampón citrato de 10 mM a 50 mM, pero preferentemente de aproximadamente 25 mM a 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM. Preferentemente, el pH está en un intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5, preferentemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, más preferentemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente
25 6,0. De manera importante, las formulaciones de adyuvantes de PHAD se pueden producir con un solo PHAD de adyuvante y preferentemente una fosfatidilcolina, lo que permite que se produzcan a bajo coste. Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes contienen PHAD como el único adyuvante, sin embargo, se pueden utilizar adyuvantes adicionales. El atributo de estabilidad a largo plazo de la invención reduce aún más los costes de utilizar estas formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD.

Aunque no está limitado por teoría alguna, se cree que la expansión de las concentraciones de tampón del tampón
30 citrato de 10 mM a 50 mM en las formulaciones de PHAD para lograr la notable estabilidad de la invención descrita en el presente documento se debe a la adición de un excipiente preferido, preferentemente fosfatidilcolina, en la relación molar definida del aspecto preferido de la invención de fosfatidilcolina a PHAD descrito en el presente documento.

Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD de la invención están esencialmente libres
35 de escualeno.

Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD de la invención están esencialmente libres de aceite metabolizable utilizado como adyuvante.

40 Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD de la invención están esencialmente libres de aceites metabolizables.

Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD de la invención son suspensiones
45 tamponadas acuosas y, preferentemente, estas suspensiones tamponadas acuosas tienen tamaños de partículas menores de 150 nm, incluso más preferentemente menores de 130 nm, y preferentemente estas formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD no son emulsiones de aceite en agua.

Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD de la invención están esencialmente libres
50 de un segundo adyuvante que incluye alumbre, escualeno, QS21, MF59, agonistas del receptor 9 de tipo Toll y otros adyuvantes que incluyen adyuvantes basados en escualeno. Preferentemente, las formulaciones de PHAD están esencialmente libres de otros adyuvantes o adicionales porque tienen el potencial de generar reacciones locales y sistémicas más graves en los seres humanos sin el beneficio de aumentar aún más la respuesta inmunitaria o mejorar sustancialmente los resultados terapéuticos.

55 Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD contienen menos de 5 mM de colesterol, más preferentemente menos de 1 mM de colesterol, incluso están, más preferentemente, sustancialmente libres de colesterol y, lo más preferentemente, esencialmente libres de colesterol.

60 Preferentemente, las formulaciones de adyuvante que contienen PHAD están sustancialmente libres de fosfatidilglicerol y, más preferentemente, están esencialmente libres de fosfatidilglicerol.

Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD están sustancialmente libres de
fosfatidiletanolamina y, más preferentemente, esencialmente libres de fosfatidiletanolamina.

65 Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD están sustancialmente libres de monoacilglicerol y, más preferentemente, esencialmente libres de monoacilglicerol.

Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD de la invención están sustancialmente libres de solución salina, preferentemente, contienen menos de NaCl 20 mM y, más preferentemente, las formulaciones de PHAD contienen menos de NaCl 10 mM e, incluso, más preferentemente, están esencialmente libres de NaCl.

5 Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD están sustancialmente libres de lioprotectores y, más preferentemente, esencialmente libres de lioprotectores.

10 Preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD están sustancialmente libres de colesterol, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina, y están esencialmente libres de aceites metabolizables y un segundo adyuvante.

15 Más preferentemente, las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD están esencialmente libres de colesterol, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina, y están esencialmente libres de aceites metabolizables y un segundo adyuvante.

20 Preferentemente, las formulaciones que contienen PHAD de la invención están sustancialmente libres de materiales o excipientes como se describe en el presente documento que no se requieren para lograr las nuevas características de la invención, pero incluso más preferentemente las formulaciones que contienen PHAD de la invención están esencialmente libres de materiales o excipientes como se describe en el presente documento que no se requieren para lograr las nuevas características de la invención.

25 Preferentemente, las formulaciones que contienen PHAD de la invención están sustancialmente libres de uno, dos, tres o más de materiales o excipientes por formulación que contiene PHAD como se describe en el presente documento, y esta limitación no es exclusiva de solo un material o excipiente por formulación que contiene PHAD.

30 Preferentemente, las formulaciones que contienen de PHAD de la invención están esencialmente libres de uno, dos, tres o más materiales o excipientes por formulación que contiene PHAD como se describe en el presente documento, y esta limitación no es exclusiva de solo un material o excipiente por formulación que contiene PHAD. En otro aspecto, se proporcionan vacunas y métodos para tratar y prevenir enfermedades con vacunas.

35 Para preparar las vacunas, se añaden uno o más antígenos de vacuna a las formulaciones de adyuvantes que contienen PHAD descritas anteriormente. Los antígenos pueden ser un complejo proteico FimCH como se describe en el presente documento u otros antígenos que incluyen, pero no se limitan a, antígenos asociados con difteria, tétanos, tétanos, tos ferina, poliomielitis, hepatitis y/o preparaciones antigénicas del virus de la gripe.

40 Una vacuna preparada con la formulación de PHAD no requiere liofilización para preservar la concentración de PHAD para su conservación o estabilidad. La liofilización es un proceso de deshidratación o un proceso de secado por congelación utilizado principalmente para preservar materiales. Existen procesos equivalentes para lograr el mismo objetivo de preservar materiales. Una formulación de vacuna o adyuvante que no necesita liofilización es una ventaja inesperada y significativa en la preparación de vacunas y de las composiciones de PHAD descritas en el presente documento. Mediante la eliminación de la necesidad de liofilización, se eliminan muchas etapas costosas. En primer lugar, se elimina la etapa de liofilización, lo que no solo elimina una etapa de fabricación costosa que debe ocurrir en condiciones estériles bien controladas, sino que también elimina la validación y revisión de esta etapa de fabricación.

45 A continuación, la eliminación de la etapa representa un ahorro de costes continuo. Por ejemplo, cada vez que se prepara un lote, se ahorra una etapa de liofilización. Además, la eliminación de esta etapa ahorra etapas de validación adicionales cuando se preparan lotes más grandes o el procedimiento de fabricación se transfiere a otra instalación. En segundo lugar, la liofilización requiere que un vial estéril de diluyente sea fabricado o adquirido, enviado y almacenado con el producto liofilizado para su reconstitución. La eliminación de la etapa de reconstitución elimina el coste de este vial de diluyente y su gestión en la cadena de suministro. En tercer lugar, la reconstitución de las formulaciones de adyuvantes puede comprometer su esterilidad, lo que requiere su uso inmediato o el desperdicio del producto si no se utiliza en un período de tiempo preestablecido. En cuarto lugar, el proceso de reconstitución es propenso a errores, por lo que el fabricante pierde el control de la concentración exacta del producto que finalmente se administra a un paciente. Las composiciones y formulaciones de adyuvantes descritas en el presente documento

50 han eliminado estas cuatro desventajas mediante la eliminación del requisito de liofilización. Por lo tanto, preferentemente, las formulaciones que contienen PHAD no están liofilizadas o no se produce liofilización; preferentemente, las formulaciones que contienen PHAD no se secan después de la preparación; preferentemente, las formulaciones que contienen PHAD no requieren reconstitución a partir de material seco con líquido o tampón después de la preparación; y, preferentemente, las formulaciones que contienen PHAD permanecen como una suspensión acuosa tamponada después de la fabricación antes de la administración.

60

Otra ventaja notable de la invención descrita en el presente documento se realiza ahora. Sin necesidad de liofilización o proceso equivalente, las composiciones de PHAD o las formulaciones que contienen PHAD de la invención se pueden empaquetar de manera eficaz y económica en jeringuillas inmediatamente después de la fabricación.

65 Preferentemente, las composiciones y formulaciones son estériles y, preferentemente, las jeringuillas son estériles. Estas jeringuillas precargadas se pueden enviar, almacenar, entregar o transferir de temperaturas refrigeradas a

temperatura ambiente y hasta aproximadamente 37 °C. Esta ventaja proporciona los medios más eficaces y rentables para obtener las composiciones de PHAD y las formulaciones que contienen PHAD en un sitio para su administración.

5 En otra realización, se añade un tensioactivo no iónico a la formulación de adyuvante. Preferentemente, el tensioactivo no iónico es polisorbato 80, aunque se pueden utilizar otros. El tensioactivo no iónico se agrega normalmente a una concentración de aproximadamente 0,001 % a 1,0 %, preferentemente del 0,01 % al 0,1 %, a la composición de adyuvante. Esta adición puede evitar una ligera agregación o un ligero aumento en el tamaño de partícula promedio de las formulaciones de PHAD mientras se almacenan a temperatura ambiente y hasta aproximadamente 37 °C. Preferentemente, los tensioactivos no iónicos proceden de sorbitán polietoxilado e incluyen, pero no se limitan a, polisorbato 20 y polisorbato 80.

15 Las formulaciones de adyuvantes preferidas comprenden un tampón citrato de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM, y una fosfatidilcolina producida sintéticamente seleccionada del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, y POPC, preferentemente DPPC, y un adyuvante producido sintéticamente, PHAD, en una relación molar de aproximadamente 1:1 a 40:1 (fosfatidilcolina:PHAD), preferentemente de aproximadamente 1:1 a 20:1 (fosfatidilcolina:PHAD), más preferentemente de aproximadamente 2:1 a 5:1 (fosfatidilcolina:PHAD), y lo más preferentemente de aproximadamente 2:1 a 5:1 (DPPC:PHAD). El tampón citrato se utiliza en las formulaciones de PHAD de 10 mM a 50 mM, preferentemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM.

25 Como se describe en el presente documento con referencia a las concentraciones de los tampones preferidos de la formulación de PHAD, las concentraciones de los tampones se seleccionan del grupo que consiste en 10 mM a 50 mM; de 15 mM a aproximadamente 50 mM; de 20 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM; de 25 mM a aproximadamente 50 mM; de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM; de 28 mM a aproximadamente 50 mM; de 30 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 30 mM; de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM; de 40 mM a aproximadamente 50 mM; aproximadamente 40 mM; y aproximadamente 50 mM. Preferentemente, las formulaciones que contienen PHAD descritas en el presente documento están sustancialmente libres de solución salina, preferentemente, contienen menos de NaCl 20 mM y, más preferentemente, las composiciones de PHAD contienen menos de NaCl 10 mM e, incluso, más preferentemente, están esencialmente libres de NaCl.

35 Además, tal como se muestra en los ejemplos más adelante, el uso de PBS en las composiciones y formulaciones que contienen PHAD no presenta las nuevas características de la invención, y en particular las características de estabilidad de la invención. Por el contrario, los tampones fosfato como se definen específicamente en el presente documento permiten las nuevas características de la invención.

40 Las formulaciones de PHAD se preparan preferentemente mediante la selección de una fosfatidilcolina individual preparada sintéticamente con alta pureza. Sin embargo, las fosfatidilcolinas de origen natural de soja o huevo o fosfatidilcolinas hidrogenadas de soja o huevo o acil fosfatidilcolinas sintéticas o naturales mezcladas también se pueden utilizar para preparar las formulaciones de adyuvantes.

45 Las formulaciones de PHAD se pueden preparar a cualquier concentración, pero normalmente se preparan a aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1,0 mg/ml de PHAD, preferentemente de 0,05 a aproximadamente 1,0 mg/ml de PHAD, pero preferentemente no más de aproximadamente 2,5 mg/ml de PHAD. La fosfatidilcolina de la formulación de PHAD se puede preparar a cualquier concentración, pero, preferentemente, se prepara de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 16 mg/ml (0,007 mM a 22 mM), más preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 8 mg/ml (0,07 mM a 11 mM) e incluso más preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,8 mg/ml (de 0,07 mM a 1 mM).

55 Las formulaciones de PHAD de la invención se preparan como sigue para producir una relación molar de aproximadamente 40:1 a aproximadamente 1:1 de fosfatidilcolina a PHAD, preferentemente de DPPC a PHAD, preferentemente de aproximadamente 2,5:1 de DPPC a PHAD. PHAD se pesa en un vial de vidrio apropiado, tal como un vial de vidrio Schott type 1 Plus. Se agrega una cantidad apropiada de fosfatidilcolina, preferentemente DPPC, en etanol. Esta preparación se somete a tratamiento con ultrasonidos durante aproximadamente 1 minuto mientras se agita suavemente la preparación, y luego se elimina adecuadamente el etanol mediante evaporación. La película se reconstituye con tampón citrato, preferentemente citrato de trisodio de 10 mM a 50 mM, pH 6,0, y se somete a tratamiento con ultrasonidos a aproximadamente 50 °C a 65 °C, preferentemente a 55 °C, durante aproximadamente 60 30 minutos, y puede haber más de un ciclo de tratamiento con ultrasonidos, como se prefiera. La formulación de PHAD preparada tiene normalmente tamaños de partículas desde aproximadamente 60 nm hasta aproximadamente 500 nm. Para permitir la filtración estéril, la formulación de PHAD se procesa preferentemente de manera adicional para lograr un tamaño de partícula homogéneo reducido y apropiado, preferentemente entre aproximadamente 70 nm y 130 nm. Las formulaciones de PHAD se extruyen a través de una membrana de policarbonato de poro de 80 nm (Avestin, LFLM-80) con un extrusor Avestin, o equivalente, de aproximadamente 7 a aproximadamente 12 pasas a aproximadamente 45 °C a 65 °C, preferentemente 55 °C para lograr un tamaño de partícula homogéneo por debajo

de aproximadamente 130 nm. Para garantizar una recuperación aceptable después de la filtración estéril, preferentemente los tamaños de partícula de las formulaciones de PHAD son 150 nm o menos, pero incluso más preferentemente 130 nm o menos.

5 Las formulaciones de PHAD pueden opcionalmente diluirse luego con tampón citrato a las concentraciones descritas en el presente documento, pero preferentemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM, pH 6,0, que contiene una cantidad apropiada de polisorbato 80 para lograr una concentración final de preferentemente 0,02 % de polisorbato 80, pero de 0,01 % a 0,1 % de polisorbato 80 es aceptable. Normalmente, las formulaciones de PHAD se diluirán hasta aproximadamente una concentración de 0,05 mg/ml a 0,5 mg/ml. Las formulaciones de PHAD luego se filtran de forma estéril a través de un filtro de 0,2 μ m, preferentemente Sartorius. Las formulaciones de PHAD y adyuvantes de la invención descritas en el presente documento exhiben potenciales zeta de aproximadamente -20 mV a -80 mV.

15 Las formulaciones de PHAD descritas en el presente documento, en una realización, se utilizan en la preparación de vacunas y se administran a animales y seres humanos como un adyuvante de vacunas. Preferentemente, las formulaciones están diseñadas para administrar aproximadamente 10 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis, preferentemente aproximadamente 20 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis, e incluso más preferentemente aproximadamente 40 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis.

20 PHAD existe como un compuesto único de aproximadamente el 98 % de pureza con un peso molecular de 1763 Daltons. Una fuente para PHAD es Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, EE.UU.).

25 La pureza de PHAD está en marcado contraste con el monofosforil lípido A de GSK aislado de *Salmonella minnesota* que existe como una mezcla dinámica y compleja de análogos de hexa, penta y tetraacilo; cada uno de estos análogos difiere en la actividad biológica. Los expertos en la técnica del desarrollo de fármacos y vacunas saben que el PHAD es superior al monofosforil lípido A de GSK porque el proceso de fabricación, el suministro, el uso y la estabilidad del PHAD se pueden monitorear de cerca y controlar como un compuesto puro.

30 La concentración de tampón citrato se utiliza para mejorar la estabilidad de la formulación de PHAD a temperatura ambiente y hasta aproximadamente 37 °C. Aunque no está limitado por la teoría, se cree que un efecto sinérgico resulta de la composición de la relación molar de PC:PHAD y citrato, tampón dentro de un intervalo de concentración específico como se describe en el presente documento.

35 De manera importante, las formulaciones de PHAD se formulan preferentemente para estar sustancialmente libres de diversos excipientes o productos químicos. Por lo tanto, no se requiere la adición de colesterol o dos o más fosfatidilcolinas o uno o más fosfatidilglicerol, y preferentemente no se incluye en las formulaciones de la invención. Se prefieren formulaciones de adyuvantes esencialmente libres de aceites metabolizables, incluyendo escualeno, y sustancialmente libres de colesterol. Además, aunque la técnica anterior sugiere que el colesterol es un producto químico necesario para liposomas o formulaciones de adyuvantes, las formulaciones de adyuvantes descritas en el presente documento no requieren colesterol para que el adyuvante proporcione todas las ventajas significativas sobre las formulaciones de la técnica anterior, y preferentemente no se agrega colesterol a las formulaciones de adyuvantes. Tal como se muestra en los Ejemplos, dos o más fosfatidilcolinas o uno o más fosfatidilglicerol (para un total de dos o más fosfatidilcolinas o fosfatidilglicerol) pueden agregarse opcionalmente a las formulaciones en concentraciones menores, pero son innecesarias y no se requieren para lograr la estabilidad a temperatura ambiente o hasta aproximadamente 37 °C de la invención o para prevenir, disminuir o reducir las reacciones en el sitio de inyección y sistémicas graves mientras se mejora la respuesta inmunitaria.

50 Tal como se detalla en el presente documento, los expertos en la técnica han estado trabajando con liposomas y otras formulaciones diversas que contienen MLA, MPL o análogos sintéticos de estos adyuvantes durante más de veinte años y no han sido capaces de producir una formulación que permita la estabilidad como se describe en el presente documento en soluciones acuosas. La estabilidad a temperatura ambiente y de hasta aproximadamente 37 °C para los adyuvantes de vacunas es un objetivo muy buscado por los expertos en la técnica. A pesar de los esfuerzos, no se han desarrollado formulaciones para mantener MLA, MPL o análogos sintéticos estables a las temperaturas y durante los períodos de tiempo descritos en el presente documento. La invención descrita en el presente documento resuelve este problema.

Preparación de vacunas

60 Otra realización de la presente invención describe además nuevas composiciones de vacuna que comprenden las formulaciones de adyuvante o PHAD y FimCH. Dichas vacunas se utilizan para tratar y prevenir infecciones del tracto urinario causadas por bacterias gramnegativas que incluyen *Escherichia coli* y *E. coli* resistente a múltiples fármacos. FimCH es un complejo no covalente de proteínas recombinantes FimC y FimH. Una vacuna de formulación de FimCH y PHAD se prepara mediante la adición de un volumen predeterminado de una formulación de PHAD a un vial de FimCH.

El siguiente es un ejemplo de una vacuna preparada de acuerdo con la invención. En general, para preparar una vacuna para su administración, se combina una cantidad eficaz de un antígeno de FimCH o FimH truncada con una formulación de adyuvante que contiene de aproximadamente 0,005 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de PHAD para administrar de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg de PHAD por inyección a un ser humano.

5 En la práctica, el siguiente es un ejemplo de un procedimiento que puede ser utilizado por el personal médico para preparar y administrar una vacuna de acuerdo con la invención. Las condiciones y procedimientos son ejemplares y no limitan el alcance de la invención.

10 Se retira un vial de FimCH del almacenamiento a aproximadamente -20 °C y se deja reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente veinte minutos para alcanzar la temperatura ambiente aproximada. Una vez que el vial de FimCH alcanza aproximadamente la temperatura ambiente, el vial se invierte varias veces para mezclar el contenido. Por separado, un vial que contiene la formulación de PHAD se retira de un recipiente de almacenamiento de 2 °C a 8 °C. El vial de la formulación de PHAD se invierte varias veces para mezclar el contenido, y luego se extraen aproximadamente 0,2 ml con una jeringuilla estéril de 1,0 ml y se inyectan en el vial de FimCH a través del tapón. 15 Nuevamente, el vial se invierte varias veces para mezclar el contenido. El agua estéril para inyección (AEI) o, más preferentemente, el tampón estéril preferido de la invención se extrae en una cantidad de 0,2 ml utilizando una jeringuilla estéril de 1,0 ml y se inyecta en el vial de FimCH/PHAD a través del tapón. Nuevamente, el vial se invierte varias veces. Por último, se extraen aproximadamente 0,3 ml de la vacuna FimCH/PHAD preparada con una jeringuilla estéril de 1,0 ml. La vacuna preparada contiene 50 µg de FimCH y 20 µg de PHAD por una dosis de 0,3 ml. Esta vacuna preparada se puede almacenar a temperatura ambiente o refrigerada antes de la administración.

En general, FimCH se almacena a -70 °C, -20 °C, o de 2 °C a 8 °C durante largos períodos de tiempo, o incluso a temperatura ambiente durante un período corto de tiempo de aproximadamente 4 días a dos a tres semanas. 25 Normalmente, solo los productos estériles deben almacenarse a temperatura ambiente porque si los productos no son estériles, el crecimiento microbiano es posible, aunque no está garantizado. La vacuna se administra preferentemente mediante inyección intramuscular. Normalmente, se administrarán de aproximadamente 5 microgramos de FimCH a aproximadamente 200 microgramos de FimCH a un ser humano, preferentemente de aproximadamente 20 microgramos a aproximadamente 110 microgramos. Normalmente, se administrarán con FimCH de aproximadamente 30 10 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis, más preferentemente de aproximadamente 20 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis, incluso más preferentemente de aproximadamente 40 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis, aunque se puede utilizar más o menos. Normalmente, se administran de tres a cuatro dosis de FimCH con la formulación de PHAD a un paciente que lo necesita. Estas dosis ocurren normalmente en el día 0 y luego aproximadamente en los días 30 a 60, luego aproximadamente en 90 a 180 días, y luego, si se prefiere, aproximadamente en 180 a 360 días desde la primera administración. Según sea necesario, pueden darse inyecciones adicionales de 12 a 36 meses después de la vacunación inicial.

40 Como se ha descrito anteriormente, el aspecto más preferible de la invención es que las composiciones y formulaciones de PHAD se almacenan por separado del antígeno o FimCH porque las composiciones y formulaciones de PHAD tienen una excelente estabilidad y se formulan o mezclan adecuadamente con el antígeno o FimCH en algún momento antes de la administración a un paciente o ser humano. Sin embargo, otros métodos para mezclar, preparar y administrar vacunas son posibles y funcionarán de manera eficaz.

45 Los datos en las siguientes secciones demuestran que las formulaciones de adyuvantes de la invención mejoran la respuesta inmunitaria de otros antígenos, incluidos los antígenos bacterianos y virales. Se pueden añadir uno o más antígenos de vacuna a las formulaciones de PHAD preparadas de acuerdo con la invención. Estos antígenos pueden ser el complejo proteico FimCH como se describe en el presente documento u otros antígenos que incluyen, pero sin limitación, difteria, tétanos, tos ferina, poliomielitis, hepatitis y/o preparaciones antigénicas del virus de la gripe.

50 También se desvelan en el presente documento, métodos de administración de las nuevas composiciones de vacuna que comprenden formulaciones de adyuvantes o PHAD y FimCH o FimH truncado. En particular, se desvelan métodos de tratamiento para prevenir y tratar infecciones del tracto urinario causadas por bacterias gramnegativas que incluyen *E. coli* y *E. coli* resistente a múltiples fármacos. Normalmente, se administrarán de aproximadamente 5 microgramos de FimCH a aproximadamente 200 microgramos de FimCH a un ser humano, preferentemente de aproximadamente 20 microgramos a aproximadamente 110 microgramos. Normalmente, se administrarán de aproximadamente 10 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis, preferentemente de aproximadamente 20 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis, incluso más preferentemente de aproximadamente 40 microgramos de PHAD por dosis a aproximadamente 50 microgramos de PHAD por dosis. Se pueden utilizar otras cantidades y regímenes de dosificación dependientes del antígeno utilizado y de la afección que se está tratando.

En el presente documento también se desvelan métodos para inducir la producción de anticuerpos contra FimH en un ser humano con infecciones recurrentes del tracto urinario.

65 En el presente documento también se desvelan composiciones de vacunas que inducen la producción de anticuerpos contra FimH en un ser humano con infecciones recurrentes del tracto urinario.

En el presente documento también se desvelan composiciones estériles y se proporcionan composiciones farmacéuticas estériles que contienen PHAD; preferentemente estas composiciones de suspensiones tamponadas acuosas tienen tamaños de partícula menores que 150 nm, incluso más preferentemente menores que 130 nm. Las composiciones y formulaciones de PHAD estériles se almacenan en un recipiente farmacéutico que está en contacto directo con las composiciones y formulaciones de PHAD. Ejemplos de estos recipientes farmacéuticos son viales o jeringuillas, más preferentemente, las composiciones y formulaciones de PHAD estériles están contenidas en una jeringuilla estéril. Estos recipientes farmacéuticos que contienen la composición o formulación de PHAD se pueden almacenar en un recipiente validado para temperatura, por ejemplo, una incubadora, a temperatura ambiente. Estos recipientes farmacéuticos que contienen la formulación o composición de PHAD estéril se pueden agregar a un recipiente de envío ensamblado para ser transferidos a otra ubicación a temperatura ambiente o hasta aproximadamente 37 °C. Estos recipientes de envío se pueden transferir a través de un servicio postal del gobierno o un servicio de envío comercial. Debido a la notable estabilidad de las invenciones descritas en el presente documento, la ubicación que recibe dichas composiciones y formulaciones de PHAD puede ser una ubicación sin refrigeración o acceso intermitente a la refrigeración o una ubicación sin electricidad o con electricidad intermitente.

También se desvela en el presente documento, un kit de vacuna que comprende las composiciones o formulaciones de adyuvantes o PHAD o la composición de vacuna. El kit puede incluir opcionalmente métodos de preparación y administración de la vacuna y/o instrucciones para el almacenamiento y la exposición de las composiciones o formulaciones de PHAD a temperatura ambiente y hasta y aproximadamente 37 °C. Estas instrucciones que describen las temperaturas de almacenamiento, envío y exposición pueden ser aprobadas por una autoridad reguladora gubernamental, incluida la FDA de EE.UU. o la Agencia Europea de Medicamentos. Preferentemente, uno o más de los componentes del kit son las composiciones o formulaciones de PHAD en una jeringuilla. Preferentemente, las composiciones de PHAD o formulaciones que contienen PHAD son estériles y están en una jeringuilla estéril.

El kit puede incluir una etiqueta para las composiciones o formulaciones de PHAD o adyuvantes de la invención que proporciona instrucciones o limitaciones para el almacenamiento y la exposición de las composiciones o formulaciones de PHAD a temperatura ambiente y hasta y aproximadamente 37 °C. Las etiquetas o instrucciones que describen las temperaturas de almacenamiento, envío y exposición pueden ser aprobadas por una autoridad reguladora gubernamental, incluida la FDA de EE.UU. o la Agencia Europea de Medicamentos.

Como se indica en el presente documento, las nuevas características de la invención permiten que las composiciones y formulaciones de PHAD se puedan fabricar, probar, analizar, almacenar, enviar, mantener, mover, transferir o administrar a temperaturas refrigeradas, temperatura ambiente, hasta y aproximadamente 37 °C, temperaturas entre temperaturas refrigeradas y temperatura ambiente durante períodos de tiempo como se describe en el presente documento. Debido a la notable estabilidad de las invenciones descritas en el presente documento, la ubicación que recibe dichas composiciones y formulaciones de PHAD puede ser una ubicación sin refrigeración o acceso intermitente a la refrigeración o una ubicación sin electricidad o con electricidad intermitente.

Ejemplos

Ciertas realizaciones y aspectos específicos de la presente divulgación se explicarán con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la divulgación de ninguna manera. Las cantidades utilizadas no representan una limitación y el proceso puede ampliarse para producir lotes más grandes

EJEMPLO 1: Formulaciones de PHAD se preparan como sigue para producir una relación molar de aproximadamente 2,5:1 de DPPC a PHAD

PHAD, hexaacil disacárido fosforilado y DPPC se pueden obtener de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, EE.UU.) como material no GMP o GMP (el Certificado de análisis se proporciona en la Tabla 1). PHAD es una versión sintética de monofosforil lípido A. PHAD se formula con DPPC para preparar la formulación de adyuvante de la invención. Las especificaciones de liberación de DPPC se encuentran en la tabla 2. La temperatura de transición de DPPC es de 41 °C.

PHAD se pesa en un vial de vidrio apropiado, preferentemente un vial de vidrio Schott type 1 Plus. Se agrega una cantidad apropiada de una solución de DPPC de aproximadamente 2,3 mg/ml, o equivalente, en etanol. Esta preparación se somete a tratamiento con ultrasonidos durante aproximadamente 1 minuto mientras se agita suavemente la preparación, y luego se elimina adecuadamente el etanol mediante evaporación con cuidado. La película se reconstituye con citrato trisódico 10 mM, pH 6,0, y se somete a tratamiento con ultrasonidos a aproximadamente 50 °C a 65 °C, preferentemente a 55 °C, durante aproximadamente 30 minutos. Las formulaciones de PHAD se preparan normalmente de aproximadamente 0,5 a 1,0 mg/ml, pero no más de aproximadamente 2,5 mg/ml. (Como se describe en el presente documento, las relaciones molares de, por ejemplo, aproximadamente 13:1 DPPC:PHAD también se pueden preparar utilizando este mismo procedimiento mediante el ajuste de la cantidad de DPPC según sea necesario.

- Las formulaciones de PHAD preparadas tienen normalmente tamaños de partículas desde aproximadamente 60 nm hasta aproximadamente 500 nm. Para permitir la filtración estéril, las formulaciones de PHAD deben procesarse aún más para lograr un tamaño de partícula homogéneo reducido y apropiado, normalmente entre aproximadamente 70 nm y 130 nm. A pesar de que numerosas referencias bibliográficas, incluida la Patente de EE.UU. n.º 6.630.161, informan que la homogeneización a alta presión es un método preferido para reducir el tamaño de partícula de los liposomas, la homogeneización a alta presión utilizando un homogeneizador Avestin de presiones de hasta 25.000 psi no reduce significativa ni relevantemente el tamaño de partícula de estas formulaciones de PHAD. Esta dificultad fue inesperada. Estas formulaciones de PHAD deben extraerse a través de una membrana de policarbonato de poro de 80 nm (Avestin, LFLM-80) con un extrusor Avestin, o equivalente, de aproximadamente 7 a aproximadamente 12 pases a aproximadamente 45 °C a 65 °C, preferentemente 55 °C para lograr un tamaño de partícula homogéneo por debajo de aproximadamente 130 nm. La extrusión de 45 °C a 65 °C es un parámetro importante. Para garantizar una recuperación aceptable después de la filtración estéril, preferentemente los tamaños de partícula de las formulaciones de adyuvantes de PHAD son de 150 nm o menos, pero más preferentemente 130 nm o menos.
- Las formulaciones de PHAD se pueden diluir luego con citrato trisódico 10 mM, pH 6,0 que contiene una cantidad apropiada de polisorbato 80 para lograr una concentración final de lo más preferentemente el 0,02 % de polisorbato 80, pero de 0,01 % a 0,1 % de polisorbato 80 es aceptable. Normalmente, las formulaciones de PHAD se diluirán hasta aproximadamente una concentración de 0,05 mg/ml a 0,5 mg/ml. Estas formulaciones de PHAD luego se filtran de forma estéril a través de un filtro de 0,2 µm, preferentemente Sartorius.
- Como se determina mediante microscopía electrónica de transmisión criogénica, las formulaciones de adyuvantes descritas en el presente documento son suspensiones.
- Se pueden agregar etapas adicionales o alternativas al procedimiento anterior para preparar las formulaciones de PHAD. Para un ejemplo, el etanol puede evaporarse mediante evaporación rotatoria, o equivalente, o por medio de una corriente de nitrógeno, o equivalente. Para otro ejemplo, la etapa de tratamiento con ultrasonidos que incluye un tampón de la invención puede repetirse dos o más veces, la formulación puede enfriarse a temperatura ambiente o menos entre los tratamientos con ultrasonidos repetidos, y la formulación puede mantenerse a una temperatura similar a la etapa del tratamiento con ultrasonidos durante una o más horas antes, durante o después de dicho tratamiento con ultrasonidos.

Tabla 1: Certificado de información de análisis para PHAD de Avanti Polar Lipids, Inc.

Análisis	Especificación	Resultados
Examen físico	Polvo blanco a blanquecino o torta liofilizada que no contiene material extraño.	Aprobado
TLC (65:25:4 (v/v/v) cloroformo: metanol:agua)	Aerosol de ninhidrina, yodo negativo, 1 aerosol de fósforo para puntos principales, carbonización positiva, inmersión de agua positiva, 1 Rf para puntos principales compatible con la estructura	Todo aprobado
HPLC	NLT al 97 % de pureza	99,2 %
Protones de NMR	Compatible con la estructura	Compatible con la estructura
Fósforo de NMR	Compatible con la estructura	Compatible con la estructura
MS	Compatible con la estructura (masa exacta = 1762,3)	Compatible con la estructura
Titulación de agua Karl Fischer	NMT al 5 % de agua	1,4 %
Disolventes residuales (GC/FID)*	NMT a 2000 ppm de metanol NMT a 2000 ppm de etanol NMT a 2000 ppm de acetona NMT a 200 ppm de hexano NMT a 2000 ppm de ciclohexano NMT a 500 ppm de tolueno NMT a 50 ppm de cloroformo/acetato de etilo NMT a 5000 ppm de disolventes residuales totales	Ninguno detectado Ninguno detectado Ninguno detectado Ninguno detectado Ninguno detectado Ninguno detectado Ninguno detectado Ninguno detectado
Paladio (ICPMS)*	NMT a 10 ppm	< 0,1 ppm
Selección de metales pesados + Rutenio + Iridio mediante ICPMS*	NMT a 20 ppm	< 20 ppm

Tabla 2: Certificado de información de análisis para DPPC de Avanti Polar Lipids, Inc.

Análisis	Especificación	Resultados
Examen físico	Sólido blanco que no contiene materia extraña.	Aprobado
TLC	Aerosol de ninhidrina, yodo negativo, 1 aerosol de fósforo para puntos principales, carbonización positiva, inmersión de agua negativa, 1 Rf para puntos principales compatible con la estructura	Todo aprobado
NMR de fósforo cuantitativo	NMT al 1% de 16:0 dimetil PE	Ninguno detectado
HPLC	NMT al 1 % de ácido palmítico	Ninguno detectado
	NMT al 1% de 16:0 lyso PE	0,7 %
	NLT al 99 % de pureza	99,3 %
Éster metílico del ácido graso mediante GC/FID	NLT al 99 % (AUC) palmitoil metil éster	100,0 %
Titulación de agua Karl Fischer	NMT al 8 % de agua	0,5 %
Disolventes residuales mediante GC/FID	NMT a 100 ppm de metanol	Ninguno detectado
	NMT a 100 ppm de etanol	Ninguno detectado
	NMT a 100 ppm de acetona	Ninguno detectado
	NMT a 100 ppm de hexano	Ninguno detectado
	NMT a 100 ppm de ciclohexano	Ninguno detectado
	NMT a 100 ppm de tolueno	Ninguno detectado
	NMT a 20 ppm de cloroformo	Ninguno detectado
NMT a 250 ppm de disolventes residuales totales	Ninguno detectado	

Ejemplo 2:

- 5 Los antígenos para la vacuna se pueden preparar como sigue.

FimCH es un complejo no covalente de proteínas recombinantes FimC y FimH. Las proteínas recombinantes proceden del cultivo de *E. coli* transgénico. Las proteínas FimC y FimH se expresan por separado en *E. coli* y forman espontáneamente un complejo no covalente. El peso molecular del complejo FimCH es de aproximadamente 51.700 Daltons.

La proteína FimH del complejo tiene un peso molecular de 29.065 Daltons, y consta de 279 restos de aminoácidos representados por la siguiente secuencia:

Phe Ala Cys Lys Thr Ala Asn Gly Thr Ala Ile Pro Ile Gly Gly Gly Ser Ala Asn Val Tyr
 Val Asn Leu Ala Pro Val Val Asn Val Gly Gln Asn Leu Val Val Asp Leu Ser Thr Gln Ile
 Phe Cys His Asn Asp Tyr Pro Glu Thr Ile Thr Asp Tyr Val Thr Leu Gln Arg Gly Ser Ala
 Tyr Gly Gly Val Leu Ser Asn Phe Ser Gly Thr Val Lys Tyr Ser Gly Ser Ser Tyr Pro Phe

15

ES 2 716 124 T3

Pro Thr Thr Ser Glu Thr Pro Arg Val Val Tyr Asn Ser Arg Thr Asp Lys Pro Trp Pro Val
Ala Leu Tyr Leu Thr Pro Val Ser Ser Ala Gly Gly Val Ala Ile Lys Ala Gly Ser Leu Ile Ala
Val Leu Ile Leu Arg Gln Thr Asn Asn Tyr Asn Ser Asp Asp Phe Gln Phe Val Trp Asn Ile
Tyr Ala Asn Asn Asp Val Val Val Pro Thr Gly Gly Cys Asp Val Ser Ala Arg Asp Val
Thr Val Thr Leu Pro Asp Tyr Arg Gly Ser Val Pro Ile Pro Leu Thr Val Tyr Cys Ala Lys
Ser Gln Asn Leu Gly Tyr Tyr Leu Ser Gly Thr His Ala Asp Ala Gly Asn Ser Ile Phe Thr
Asn Thr Ala Ser Phe Ser Pro Ala Gln Gly Val Gly Val Gln Leu Thr Arg Asn Gly Thr Ile
Ile Pro Ala Asn Asn Thr Val Ser Leu Gly Ala Val Gly Thr Ser Ala Val Ser Leu Gly Leu
Thr Ala Asn Tyr Ala Arg Thr Gly Gly Gln Val Thr Ala Gly Asn Val Gln Ser Ile Ile Gly
Val Thr Phe Val Tyr Gln

La proteína FimC del complejo tiene un peso molecular de 22.700 Daltons, y consta de 205 restos de aminoácidos representados por la siguiente secuencia:

5

Gly Val Ala Leu Gly Ala Thr Arg Val Ile Tyr Pro Ala Gly Gln Lys Gln Val Gln Leu Ala
Val Thr Asn Asn Asp Glu Asn Ser Thr Tyr Leu Ile Gln Ser Trp Val Glu Asn Ala Asp Gly
Val Lys Asp Gly Arg Phe Ile Val Thr Pro Pro Leu Phe Ala Met Lys Gly Lys Lys Glu Asn
Thr Leu Arg Ile Leu Asp Ala Thr Asn Asn Gln Leu Pro Gln Asp Arg Glu Ser Leu Phe Trp
Met Asn Val Lys Ala Ile Pro Ser Met Asp Lys Ser Lys Leu Thr Glu Asn Thr Leu Gln Leu
Ala Ile Ile Ser Arg Ile Lys Leu Tyr Tyr Arg Pro Ala Lys Leu Ala Leu Pro Pro Asp Gln
Ala Ala Glu Lys Leu Arg Phe Arg Arg Ser Ala Asn Ser Leu Thr Leu Ile Asn Pro Thr Pro
Tyr Tyr Leu Thr Val Thr Glu Leu Asn Ala Gly Thr Arg Val Leu Glu Asn Ala Leu Val
Pro Pro Met Gly Glu Ser Ala Val Lys Leu Pro Ser Asp Ala Gly Ser Asn Ile Thr Tyr Arg
Thr Ile Asn Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Pro Lys Met Thr Gly Val Met Glu

10

Para producir la línea celular transgénica, el gen FimC de la cepa J96 de *E. coli* se amplificó con los cebadores SLC4-28-fimC5 y SLC4-28-FimC3 a partir de ADN genómico J96 purificado para dar un producto de 771 pares de bases. Este se digirió con BamHI y EcoRI, se purificó y se ligó en pTRC99a cortado con las mismas enzimas (BamHI y EcoRI). El producto de ligación se transformó en células C600 de *E. coli* y se seleccionó en ampicilina, produciendo el plásmido pSJH-32.

15

La resistencia a antibióticos de la ampicilina se cambió a kanamicina mediante el siguiente procedimiento: Los cebadores pKD4-pr1 y pKD4-pr2 se utilizaron para amplificar el gen de resistencia a kanamicina a partir de pKD4. Este producto de PCR se fosforiló con polinucleótido quinasa T4 y se purificó en gel. pSJH-32 se cortó con Scal y BglI, se atenuó con ADN polimerasa T4, se desfosforiló con fosfatasa alcalina intestinal de ternera, y luego se ligó con el producto de PCR del gen de resistencia a kanamicina fosforilado. El producto de ligación se transformó luego en células C600 de *E. coli* y se seleccionó en kanamicina, creando el plásmido pSJH-319.

20

El gen FimH de la cepa J96 se amplificó con los cebadores FimH5 y FimH3 a partir del ADN genómico J96 purificado para dar un producto de 978 pares de bases. Se digirió con SacI y HindIII, se purificó y se ligó en pBAD33 digerido con SacI y HindIII. Posteriormente, la construcción se transformó en células C600 y se seleccionó en cloranfenicol.

25

Ejemplo 3

Bioprocésamiento (Proceso para obtener antígenos de la vacuna).

La etapa de bioprocesamiento se inicia con la inoculación del banco de células maestras (MCB, de sus siglas en inglés) en matraces de agitación que contienen medio APS LB con kanamicina (50 µg/ml) y cloranfenicol (20 µg/ml). Cuando la DO alcanza las 2,0-3,0 unidades (después de aproximadamente 15 horas de crecimiento), el cultivo celular se transfiere asepticamente a los reactores para la fermentación semicontinua. El medio que contiene APS Super
 5 Broth, aproximadamente glicerol al 0,8 % y antibióticos se esteriliza antes de la inoculación. La expresión de la proteína FimH se induce a DO ≥ 10 con IPTG. Cinco minutos después de la adición de IPTG, la expresión de la proteína FimC se induce con arabinosa. Las células se recogen aproximadamente una hora después. Después de la recolección, las células se separan de los componentes del medio mediante centrifugación continua o discontinua.

10 *Recuperación de proteínas*

El FimCH recombinante se expresa en el periplasma de *E. coli*. *E. coli*, como bacteria gramnegativa, posee una membrana de bicapa lipídica interna y externa. El espacio entre las bicapas lipídicas es el periplasma. Inmediatamente después de la centrifugación, FimCH se recupera de la célula utilizando una preparación de periplasma. Las células
 15 se hacen reaccionar con lisozima recombinante en presencia de sacarosa, Tris y EDTA a 2-8 °C. Luego se centrifuga la mezcla y se recoge la solución de proteína periplásmica resultante. Luego, la proteína se precipita con sulfato de amonio, se centrifuga, se resuspende en MES 20 mM, pH 5,9, y se filtra mediante diálisis en MES 20 mM, pH 5,9 utilizando una membrana de diálisis SpectraPor 2 (Spectrum Labs 132680). Cuando la conductividad de la solución disminuye a aproximadamente ≤ 1,5 mS/cm, la solución se recolecta y se transfiere para purificación.

20 *Purificación de proteínas*

La purificación consta de tres etapas de cromatografía en columna (1. CEX, 2. HIC, 3. CEX), una etapa de intercambio de tampón mediante diafiltración con membrana de diálisis SpectraPor 2 (Spectrum Labs 132680) seguida de filtración
 25 y una etapa final de filtración aseptica. La etapa de diafiltración se utiliza para intercambiar la proteína en un tampón MES 20 mM, pH 5,9, de modo que se unirá a la segunda columna CEX.

Las dos etapas de CEX utilizan Source 15S (GE Healthcare 17-1273-02) en una columna XK26. Para ambas columnas CEX se utilizan las siguientes condiciones: Tampón A: MES 20 mM, pH 5,9; Tampón B: MES 20 mM/cloruro de sodio
 30 500 mM, pH 5,9; 8 ml/min para todas las etapas excepto la carga para la columna XK26/10, pre equilibrar la columna con 5 VC de tampón B, equilibrar la columna con 4 VC de tampón A, cargar la muestra de FimCH dializado a 5 ml/min para XK26/10 utilizando una bomba de muestra y, específicamente, no a través de la bomba de cromatografía, lavar la columna con 4 VC de tampón A y eluir la columna con un gradiente lineal de 5 VC de 0-25 % de tampón B con recogida de fracciones.

Para la columna HIC se utilizó Butyl Sepharose 4FF (GE Healthcare 17-0980-01) en la columna XK26. Tampón C: MES 20 mM/sulfato de amonio 550 mM, pH 5,9; 8 ml/min para XK26/10, excepto la carga, pre-equilibrar la columna
 35 con 3 VC de tampón A (como anteriormente), equilibrar la columna con 6 VC de tampón C, cargar la muestra de FimCH agrupada a 5 ml/min para la columna XK26/10, lavar la columna con 6 VC de tampón C, eluir la columna con un gradiente lineal de 4 VC de 0-100 % de tampón A con recogida de fracciones. FimCH se formula en una concentración de 0,3 mg/ml en MES 20 mM, pH 5,9 o citrato trisódico 20 mM, pH 5,4. Luego se filtra asepticamente a través de un filtro estéril de 0,2 µm. FimCH es estable y se puede almacenar a -20 °C durante al menos 2 años.

45 EJEMPLO 4: La potencia mediante la unión *in vitro* de manosa (Demuestra la actividad biológica de FimCH)

La actividad biológica de la sustancia farmacéutica FimCH (por ejemplo, del Ejemplo 3) se determina mediante un ensayo de unión a manosa *in vitro*. La proteína FimH es una adhesina bacteriana utilizada por *E. coli* para unir restos de manosa en proteínas glucosiladas. Durante las infecciones del tracto urinario, la adhesina FimH se une a las proteínas uroplaquinas manosiladas en las células epiteliales de la vejiga, lo que promueve la internalización de *E. coli*
 50 unida. La unión de FimH a uroplaquina manosilada es esencial para que *E. coli* cause infecciones del tracto urinario. Para controlar la actividad de unión a manosa de FimH *in vitro*, se observa la unión de FimH a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés). HRP es una proteína glucosilada que contiene restos de manosa y se ha utilizado anteriormente para estudiar los receptores de unión a manosa de mamíferos. Los complejos de HRP y la lectina ConA, que se une a los grupos α-D-manosilo y α-D-glucosilo, también se han generado y estudiado. Estos resultados demuestran que HRP actúa como un ligando para otras proteínas de unión a manosa conocidas. Utilizando este ensayo de potencia como se describe a continuación, se muestra que la unión de HRP a FimH depende de la concentración y se inhibe mediante pequeñas moléculas que bloquean la unión de manosa a FimH.

En el ensayo de potencia de FimCH *in vitro*, FimCH se "captura" mediante antisueros anti-FimH purificados y calificados unidos a una placa ELISA. Los antisueros anti-FimH utilizados en este ensayo han demostrado la capacidad de unirse a FimH en ELISA indirectos (como los antisueros de detección, Figura 3) y transferencias de Western. Luego se agrega HRP, se enjuaga el exceso de HRP y se detecta la actividad de la HRP unida. La actividad de HRP medida es proporcional a la concentración de FimCH agregada (Figura 4). Estos resultados demuestran que la HRP se une a FimH de una manera dependiente de la dosis.

65

Para demostrar que la unión de HRP a FimH requiere la actividad de unión a manosa de FimH, se analizó un mutante de FimH deficiente en la unión a manosa llamado Q133K, que también forma un complejo con FimC, y se comparó con FimCH. Q133K comparte la misma secuencia de aminoácidos que FimH, excepto que una glutamina fundamental en la posición 133 es reemplazada por lisina. Esta mutación se encuentra en el bolsillo de unión a manosa de FimH y hace que Q133K sea funcionalmente deficiente en la unión a manosa y proteínas manosiladas. Como se muestra en la Figura 4, Q133K FimCH no se une a HRP. En un ELISA indirecto (Figura 3), el complejo mutante Q133K es reconocido por los antisueros anti-FimH purificados. Esto demuestra que la falta de señal HRP con Q133K no se debe a una incapacidad de los antisueros purificados para unirse a Q133K; en cambio, se debe a la incapacidad de Q133K para unir restos de manosa en HRP. Estos resultados también demuestran que HRP no se une a FimC, porque Q133K también forma complejo con FimC.

Como se demostró en Hung et al. 2002, las mutaciones puntuales en FimH en las posiciones 54, 133, 135 y 140 anulan completamente la unión a manosa. Según lo informado por Hung et al., "... incluso el cambio más leve en el bolsillo de unión a manosa, en un átomo que no se une directamente a manosa, reduce significativamente la unión", lo que sugiere que las mutaciones que podrían ocurrir *in vitro* podrían limitar o anular severamente la actividad de unión a manosa de FimH. La falta de unión de HRP al mutante Q133K apoya la capacidad de este ensayo para evaluar la actividad biológica de unión de FimH a las proteínas manosiladas.

Se han descrito varios inhibidores de moléculas pequeñas de unión a manosa de FimH. Dos de estos inhibidores, 4-metilumbeliferil- α -D-manopiranosido (UFMP) y metil- α -D-manopiranosido (MDMP), se han utilizado para calificar aún más este ensayo de potencia. La constante de disociación (Kd) informada para la unión de UFMP a FimH es 20 nM, que es aproximadamente 100 veces más potente que la Kd de MDMP de 2,2 μ M. Como cabía esperar, la adición de cualquiera de estos inhibidores de unión a manosa de FimH en la etapa de unión de la HRP bloquea la unión de la HRP a la FimH de una manera dependiente de la dosis (véase la Figura 5). Para UFMP, se observa una inhibición del 50 % a 10 ng/ml (30 nM). Para MDMP, se observa una inhibición del 50 % a aproximadamente 1 μ g/ml (5,1 μ M), que es aproximadamente 100 veces mayor que la concentración de UFMP.

Estos resultados demuestran la capacidad de este ensayo para evaluar la actividad biológica de FimH y verificar la consistencia del proceso de fabricación de un lote a otro. Adicionalmente, este ensayo de potencia confirma el plegamiento adecuado del epítipo de FimH y es predictivo de la generación de IgG anti-FimH que se ha demostrado que reduce la UFC de *E. coli* en vejigas de ratones mediante la administración de la vacuna FimCH/PHAD.

EJEMPLO 5: Impurezas de la sustancia farmacéutica FimCH mediante CEX-HPLC

La CEX-HPLC se utiliza para la determinación del complejo FimCH, FimC no unido e impurezas en la sustancia farmacéutica final FimCH. La proteína se eluye a partir de una columna GE Healthcare Mono S 5/50 GL utilizando un gradiente de NaCl 0,3 M en un tampón MES 20 mM, pH 6,2 (tampón B) (el tampón A es un tampón MES 20 mM, pH 6,2). En T = 0, la fase móvil es tampón A al 100 %, y en T = 22 minutos, la fase móvil es tampón B al 100 %. El contenido relativo de FimC no unido e impurezas se determina en función de las áreas máximas. En la Figura 6 se proporciona un cromatograma representativo.

EJEMPLO 6: Formulación de FimCH y PHAD: Estudio de toxicidad intramuscular/inmunogenicidad durante 85 días en conejos con un período de recuperación de 21 días (GLP)

El estudio fundamental de toxicidad GLP para evaluar la toxicidad e inmunogenicidad de la vacuna FimCH que contiene una formulación de PHAD de la invención (DPPC:PHAD - relación molar de aproximadamente 2,4:1) se realizó en conejos hembra. El estudio examinó los hallazgos oftalmológicos, la evaluación de anticuerpos y la histopatología. A las conejas hembras se les administraron un total de 5 dosis de control de solución salina (N = 6), PHAD solo de 40 a 50 μ g (N = 12), FimCH a 100 μ g más 20 μ g de PHAD (N = 6; dosis baja), o FimCH a 125 μ g más de 40 a 50 μ g de PHAD (N = 12; dosis alta) mediante inyección IM cada 3 semanas (días 1, 22, 43, 64 y 85) durante 13 semanas. Tres días después de la quinta dosis (día 88), 6 conejos por grupo se sacrificaron con los 6 conejos restantes en el grupo de solo PHAD y los grupos de dosis alta de FimCH se sacrificaron después de un período de recuperación de 3 semanas (día 106).

La toxicidad se evaluó según la observación clínica, la oftalmología, la temperatura corporal, el peso corporal, el consumo de alimentos, la patología clínica, la necropsia general, el peso de los órganos y los datos histopatológicos. Las temperaturas corporales se obtuvieron antes y 2, 4, 6, 24, 48 y 72 horas después de cada inyección. Además de los parámetros de patología clínica estándar (predosis, días 2 y 88), la proteína C reactiva (CRP, de sus siglas en inglés) y el fibrinógeno se evaluaron 2 y 7 días después de la administración. Las reacciones potenciales en el sitio de inyección se calificaron para el edema y el eritema utilizando la escala de Draize y se evaluaron para detectar otras manifestaciones de toxicidad local (es decir, escara, vesiculación, ulceración y hematoma) 24, 48 y 72 horas después de la dosis. La evaluación de anticuerpos anti-FimH se realizó en muestras de suero recolectadas antes de la dosis en los días 1, 22, 43, 64 y 85, y antes de la necropsia en los días 88 y 106, en muestras de orina recolectadas antes de la dosis, el día 64 y antes de la necropsia en los días 88 y 106, y en los lavados vaginales recogidos antes de la dosificación en los días 1 y antes de la necropsia en los días 88 y 106. La evaluación de anticuerpos de las muestras de orina y lavado vaginal fue cualitativa utilizando un ensayo MSD-ECL calificado. Los niveles de anticuerpos en suero

se determinaron utilizando un ensayo validado de MSD-ECL. De los 18 conejos vacunados con FimCH y PHAD, 17 demostraron títulos de IgG anti-FimH en aproximadamente 1:3.200.000 en aproximadamente el día 88.

Todos los conejos sobrevivieron hasta la necropsia programada. Los datos preliminares indicaron que FimCH más PHAD así como PHAD solo fueron bien tolerados. Los hallazgos demostraron que no hubo PHAD aparente solo o efectos relacionados con la vacuna en las observaciones clínicas, el peso corporal, el consumo de alimentos, la temperatura corporal, la patología clínica, o el peso de los órganos. La reacción local, basada en observaciones en vida, fue limitada.

Se realizó un estudio similar en conejos utilizando FimCH con PHAD preparado como DPPC:PHAD en aproximadamente una proporción molar de 1:3,9. En este estudio, solo 5 de 16 conejos en aproximadamente el día 43 demostraron títulos de IgG anti-FimH de 1:400.000 a 1:800.000. Por el contrario, 16 de los 18 conejos vacunados con FimCH con PHAD preparado como DPPC:PHAD en aproximadamente una relación molar de 2,4:1 (enumerados anteriormente) demostraron títulos de IgG anti-FimH de 1:400.000 a 3.200.000 en aproximadamente el día 43. Estas diferencias inmunogénicas son compatibles con los estudios realizados en ratones descritos en el presente documento que demuestran que una relación molar de DPPC:PHAD de aproximadamente 2,4:1 es superior a una relación molar de DPPC:PHAD de aproximadamente 1:3,9.

Ejemplo 7

Para probar la eficacia de PHAD como adyuvante para la vacunación sistémica en el modelo de infección de ITU de ratón, se infectaron los ratones C3H/HeN con aproximadamente 1×10^8 UFC del aislado UT189 de *E. coli* para cistitis clínica a través de cateterización transuretral tras inmunización IM. Se compraron ratones hembra C3H/HeN (aproximadamente de 9 semanas de edad) de los laboratorios Charles River (Wilmington, MA). Los ratones se inyectaron a través de la vía intramuscular (IM) en el muslo derecho bajo anestesia con isoflurano ligero (Henry Schein, Melville, NY) en un volumen de 50 μ l utilizando una aguja de calibre 30. En estos estudios de eficacia, los ratones se inmunizaron con 12,5 μ g de PHAD/15 μ g de FimCH. Los ratones inmunizados utilizando PHAD como adyuvante y FimCH como antígeno mostraron una disminución estadísticamente significativa de UFC de *E. coli* en vejigas uno o dos días después de la infección en comparación con los ratones inmunizados con adyuvante solo y con ratones indiferenciados (el experimento con PHAD se muestra en la Figura 7). Estos datos demuestran que una vacuna FimCH adyuvada con PHAD produce anticuerpos en ratones que reducen la colonización por *E. coli* en la vejiga. Estos datos ofrecen evidencia de que una vacuna FimCH adyuvada con PHAD preparada de acuerdo con las composiciones descritas en el presente documento y utilizada de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento administrados a un paciente humano que lo necesite también reducirá la colonización por *E. coli* en vejigas en seres humanos.

EJEMPLO 8: FimH truncada (FimHt) adyuvada con formulación de PHAD o adyuvante de Freund: un estudio de inmunogenicidad en conejos

A las conejas hembras se les administraron un total de 3 dosis de FimHt a 100 μ g más aproximadamente 50 μ g de la formulación de PHAD de la invención (N = 2) en los días 0, 21 y 42, o un total de 5 dosis de FimHt a 100 μ g más el adyuvante de Freund (completo para la vacunación inicial e incompleto para cada refuerzo en los días 14, 21, 49 y 70) (N = 2) mediante inyección IM. En este experimento, FimH truncada tiene una serie de histidinas o marcadores de histidina, y los expertos en la técnica entienden que también se pueden utilizar otras versiones truncadas de FimH, lo más preferentemente, que requiera el dominio de unión a manosa. La FimH truncada en este ejemplo consiste en los restos de FimH 1 a 175 con un marcador 6-histidina C-terminal. La secuencia de FimH se describe en el Ejemplo 2. Las evaluaciones de anticuerpos anti-FimH se realizaron en muestras de suero recogidas aproximadamente el día 30 o aproximadamente los días 35 y 56. Los niveles de anticuerpos en suero se determinaron utilizando un ELISA como se describe en el presente documento. El antígeno de captura para este experimento fue una FimH truncada equivalente sin un marcador de histidina. Los conejos vacunados con ambas formulaciones demostraron IgG anti-FimH superior a 1:1.600.000 (sueros preinmunes < 1:10.000). Las versiones truncadas anteriores de FimH se han divulgado públicamente y un ejemplo es el de la Patente de EE.UU. n.º 6.737.063, que se incorpora específicamente en su totalidad.

EJEMPLO 9: Vacuna FimCH con formulación de PHAD administrada a conejos

Dos grupos de conejos (N = 3) se inmunizaron el día 0 y se reforzaron en los días 21, 42, mediante inyección IM con 50 μ g de FimCH y 54 μ g de PHAD con y sin polisorbato 80 al 0,1 % (formulación de PHAD de la invención, citrato trisódico 10 mM, pH 6,0). Los niveles de anticuerpos en suero se determinaron utilizando un ELISA como se describe en el presente documento. El suero se recogió de ambos grupos, incluido aproximadamente el día 30. Los títulos de IgG anti-FimH fueron aproximadamente equivalentes a o más de 1:1.600.000 en ambos grupos (sueros preinmunes < 1:10.000). Los datos descritos en el presente documento demuestran que la vacuna FimCH con formulaciones de PHAD de la invención con o sin polisorbato 80 genera una respuesta inmunogénica equivalente.

EJEMPLO 10: Análisis de HPLC de PHAD y DPPC en composiciones

Las concentraciones de PHAD y DPPC en la formulación de PHAD se analizan mediante HPLC-ELSD utilizando una columna Agilent Eclipse XBD C18, 1,8 μ m, 4,6 mm x 50 mm. Las fases móviles son las siguientes: FM A: acetato de amonio 20 mM/ácido acético al 1 % en agua; FM B: acetato de amonio 20 mM/ácido acético al 1 % en metanol; y FM C: acetato de amonio 20 mM/ácido acético al 1 % en metanol/cloroforma (50/50). Método 1: el gradiente comienza en la FM A al 5 % y la FM B al 95 %, a los 2 minutos es FM B al 100 % y a los 8 minutos es FM C al 100 %. Método 2: el gradiente comienza en la FM A al 5 % y la FM B al 95 %, a los 2 minutos es FM B al 100 %, y a los 15 minutos es FM C al 100 %. Diluyente de muestra 1:85:15 (75:15:10 metanol:cloroforma:agua con acetato de amonio 20 mM/ácido acético al 1 %):(1:1 metanol:cloroforma con acetato de amonio 20 mM/ácido acético al 1 %) La muestra y los estándares se diluyen 1:4 con el diluyente de muestra 1. Diluyente de muestra 2: (70:25:5) metanol:cloroforma:agua con acetato de amonio 20 mM/ácido acético al 1 %. Si se utiliza el diluyente de muestra 2, la muestra y los estándares se diluyen 1:10 con el diluyente de muestra 2. La ganancia de ELSD es de 8 con temperatura a 60 °C y flujo de nitrógeno ajustado a aproximadamente 3,7 bares. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de cromatograma utilizando el método 2 y el diluyente de muestra 2.

15 **EJEMPLO 11: Estudios de estabilidad de composiciones y formulaciones de PHAD**

Utilizando el método de HPLC como se describe en el Ejemplo 10, se monitorizaron las estabilidades de diferentes preparaciones de PHAD como una suspensión o formulaciones de PHAD como una suspensión que incluye fosfatidilcolinas mediante el análisis de estas preparaciones para la concentración de PHAD y comparándolas con sus resultados iniciales. Un resultado APROBADO significa que la concentración de PHAD estuvo dentro de más/menos el 20 % de los resultados de las pruebas iniciales de las muestras de liberación, lo que está dentro de los límites del método de HPLC utilizando un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD). Las concentraciones de PHAD de estas preparaciones se compararon cuando se almacenaron de 2 °C a 8 °C o de 25 °C a 37 °C para proyectar (estimar) la estabilidad de estas preparaciones durante meses a años. Para los expertos en la técnica, los datos a 25 °C son una condición intermedia/acelerada y los datos de 37 °C son una condición acelerada que se utiliza para proyectar una vida útil de almacenamiento a largo plazo entre 2 °C y 8 °C. Los tampones que permitieron una estabilidad superior para PHAD se determinaron primero; luego, estos tampones preferidos se evaluaron con una formulación de PHAD que incluye una fosfatidilcolina.

30 Tabla 3. Estabilidad de PHAD a 25 °C durante 7 días en tampones seleccionados

		Estado/punto de tiempo	Resultado
1	0,5 mg/ml de PHAD en AGUA	25 °C/7 días	FALLIDO
2	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/7 días	APROBADO
3	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, pH 5,0	25 °C/7 días	APROBADO
4	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 50 mM, pH 6,0	25 °C/7 días	APROBADO
5	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 100 mM, pH 6,0	25 °C/7 días	FALLIDO
6	0,5 mg/ml de PHAD en acetato de sodio 10 mM, pH 6,0	25 °C/7 días	FALLIDO
7	0,5 mg/ml de PHAD en succinato disódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/7 días	APROBADO
8	0,5 mg/ml de PHAD en solución salina tamponada con fosfato (PBS)	25 °C/7 días	FALLIDO
9	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 200 mM y ácido cítrico 100 mM, pH 6,0	No aplicable	precipitado
10	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 20 mM y ácido cítrico 10 mM, pH 6,0	25 °C/7 días	APROBADO
11	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 6,0	25 °C/7 días	APROBADO

Los datos de la tabla anterior demuestran que los tampones citrato, succinato y fosfato de aproximadamente 10 mM a 50 mM son superiores a otros tampones examinados, y proporcionan estabilidad a las temperaturas indicadas para los períodos de tiempo enumerados.

35 Tabla 4. Estabilidad de PHAD a 25 °C durante 30 o 60 días y 37 °C durante 7, 60 días o 4 meses en tampones seleccionados

		Estado/punto de tiempo	Resultado
1	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 20 mM y ácido cítrico 10 mM, pH 6,0	25 °C/30 días	FALLIDO
2	0,5 mg/ml de PHAD en solución salina tamponada con fosfato (PBS)	25 °C/30 días	FALLIDO
3	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, pH 5,0	25 °C/30 días	APROBADO
4	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/30 días	FALLIDO
5	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	FALLIDO
6	0,5 mg/ml de PHAD en succinato disódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	FALLIDO

		Estado/punto de tiempo	Resultado
7	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 50 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO
8	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, pH 6,0	37 °C/7 días	APROBADO
9	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 30 mM, pH 6,0	37 °C/7 días	APROBADO
10	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 50 mM, pH 6,0	37 °C/7 días	APROBADO
11	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 6,0	37 °C/7 días	APROBADO
12	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 50 mM, pH 6,0	37 °C/7 días	APROBADO
13	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 6,0	37 °C/7 días	APROBADO
14	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, pH 6,0	37 °C/60 días	FALLIDO
15	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 30 mM, pH 6,0	37 °C/60 días	APROBADO
16	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 50 mM, pH 6,0	37 °C/60 días	APROBADO
17	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 50 mM, pH 6,0	37 °C/60 días	APROBADO
18	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 6,0	37 °C/60 días	FALLIDO
19	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 10 mM, pH 6,0	37 °C/4 meses	FALLIDO
20	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 30 mM, pH 6,0	37 °C/4 meses	APROBADO
21	0,5 mg/ml de PHAD en citrato trisódico 50 mM, pH 6,0	37 °C/4 meses	APROBADO
22	0,5 mg/ml de PHAD en Na ₂ HPO ₄ 50 mM, pH 6,0	37 °C/4 meses	APROBADO

Los datos en la tabla 4 demuestran que los tampones citrato y fosfato de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM son superiores a los otros tampones examinados. Los tampones citrato y fosfato proporcionan estabilidad a las temperaturas indicadas para los períodos de tiempo enumerados. Los datos demuestran el notable beneficio de la estabilidad de aumentar las concentraciones de citrato y fosfato de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 28 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente de 30 mM a aproximadamente 50 mM. El uso preferido de succinato como tampón se muestra a partir de todos los datos colectivamente como se describe en el presente documento. La estabilidad de PHAD a 37 °C durante 60 días o más en tampones citrato y fosfato 30 mM a 50 mM es desconocida en la técnica anterior y es un aspecto importante de la invención.

Tabla 5. Estabilidad de una formulación de PHAD 0,5 mg/ml de la invención en tampones seleccionados y fosfatidilcolinas seleccionadas a 25 °C durante 60 días sin polisorbato 80 y sin extrusión. Las fosfatidilcolinas se prepararon a aproximadamente una relación molar de 2,5 a 1 a PHAD.

		Punto de tiempo/estado	Resultado
1	Formulación de PHAD con DPPC en citrato trisódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO
2	Formulación de PHAD con POPC en citrato trisódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO
3	Formulación de PHAD con DMPC en citrato trisódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO
4	Formulación de PHAD con DPPC en citrato trisódico 50 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO
5	Formulación de PHAD con DPPC en succinato disódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO
6	Formulación de PHAD con POPC en succinato disódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO
7	Formulación de PHAD con DMPC en succinato disódico 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO
8	Formulación de PHAD con DPPC en Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 6,0	25 °C/60 días	APROBADO

Los datos en la Tabla 5 demuestran el beneficio notable e inesperado de combinar los tampones citrato, succinato y fosfato de aproximadamente 10 mM a 50 mM con una fosfatidilcolina de la invención. La combinación de los tampones preferidos de la invención con una fosfatidilcolina da como resultado una estabilidad superior de PHAD en la formulación en comparación con el tampón solo.

Tabla 6.

		Punto de tiempo/estado	Resultado
1	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1, excepto reconstituida en AGUA, no extruida y sin polisorbato 80	25 °C/14 días	FALLIDO
		2-8 °C/1 meses	APROBADO
		25 °C/1 mes	FALLIDO
		2-8 °C/2 meses	APROBADO

ES 2 716 124 T3

		Punto de tiempo/estado	Resultado
		25 °C/2 meses	FALLIDO
2	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 (en citrato trisódico, pH 6,0 como se indicó anteriormente) sin extruir y sin polisorbato 80	25 °C/7 días	APROBADO
		25 °C/14 días	APROBADO
		25 °C/1 mes	APROBADO
		25 °C/2 meses	APROBADO
3	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 (lote 1214P69)	2-8 °C/8 meses	APROBADO
		25 °C/8 meses	APROBADO
4	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 (lote ENG-1)	2-8 °C/3 meses	APROBADO
		25 °C/2 meses	APROBADO
		2-8 °C/5 meses	APROBADO
		25 °C/4 meses	APROBADO
5	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1	2-8 °C/3 meses	APROBADO
		25 °C/3 meses	APROBADO
		2-8 °C/6 meses	APROBADO
		25 °C/6 meses	APROBADO
6	Vacuna FimCH, citrato trisódico 17 mM, pH 5,4, que consiste en:	2-8 °C/4 días	APROBADO
		25 °C/4 días	APROBADO
	• 0,1 mg/ml de formulación de adyuvante del Ejemplo 1 sin polisorbato 80	2-8 °C/3 meses	APROBADO
	• 0,2 mg/ml de FimCH, pH 5,4	2-8 °C/4 meses	APROBADO

Como se muestra en la Tabla 6, es la combinación de citrato a aproximadamente 10 mM con relaciones molares específicas de DPPC a PHAD la que proporciona estabilidad a largo plazo a aproximadamente 25 °C.

- 5 Como se muestra en las tablas anteriores, las formulaciones preparadas en agua son estables a corto plazo cuando se almacenan entre 2 °C y 8 °C; sin embargo, el objetivo largamente buscado es reducir el almacenamiento y la gestión de la cadena de frío. La formulación de adyuvante de la invención desvelada en el presente documento logró este objetivo proporcionando una formulación de adyuvante con estabilidad extendida a temperatura ambiente hasta aproximadamente 37 °C. Los datos en la Tabla 6 muestran claramente que la concentración de PHAD de estas
- 10 formulaciones preparadas en tampón citrato se mantendrá estable durante al menos aproximadamente 6 meses o más a aproximadamente 25 °C y potencialmente de 2 a 3 años a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

- La adición de tampón citrato, succinato o fosfato a las formulaciones de fosfatidilcolina: PHAD permiten de manera notable e inesperada el almacenamiento a temperatura ambiente y la exposición hasta a 37 °C aproximadamente. Las
- 15 formulaciones de fosfatidilcolina:PHAD preparadas en agua pueden producir respuestas inmunogénicas equivalentes en ratones y conejos, pero no son estables a aproximadamente 25 °C.

Ejemplo 12

- 20 Los tamaños de partícula y los potenciales zeta se determinaron en formulaciones de PHAD utilizando la dispersión dinámica de la luz con Malvern Zetasizer® ZS90 o Brookhaven Instruments Corp. utilizando el software ZetaPlus Particle Sizing. Se siguieron las instrucciones y recomendaciones del fabricante. La tabla 7 proporciona datos representativos. Los valores de potencial Zeta se utilizan como una pieza de datos cualitativos que estiman la carga eléctrica en una bicapa y cómo se describen en el presente documento. La estabilidad de las formulaciones de PHAD
- 25 se determina experimentalmente a partir del tamaño de partícula de la formulación y la concentración de PHAD.

Tabla 7.

	Muestra	Diámetro medio eficaz (nm)	Potencial zeta (mV)
1	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1, no extruida y sin polisorbato 80	207	-56
2	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1, que contiene DPPC:PHAD en una relación molar de aproximadamente 13:1, no extruida y sin polisorbato 80	309	-37
3	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1, que contiene DMPC pero no DPPC, no extruida y sin polisorbato 80	293	-72

ES 2 716 124 T3

	Muestra	Diámetro medio eficaz (nm)	Potencial zeta (mV)
4	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1, que contiene DMPC:DLPC pero no DPPC, en una relación molar aproximada con PHAD a 1,2:1,2:1 (DMPC:DLPC:PHAD) no extruida y sin polisorbato 80	202	-76
5	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 sin polisorbato 80	79	-46
6	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1	71	-40
7	Formulación de adyuvante del Ejemplo 1, extruida a temperatura ambiente y sin polisorbato 80	185	-73
8	DPPC solo (sin PHAD) preparado como en el Ejemplo 1 sin extrusión y sin polisorbato 80	1393	-6

5 Como se ha mostrado anteriormente, la DPPC sola tiene un potencial zeta significativamente menor y un tamaño de partícula medio mucho mayor en comparación con las formulaciones de la invención que contienen PHAD. La concentración crítica de micelas de DPPC es de aproximadamente 0,46 nanomolar. Estos datos ofrecen evidencia de que la DPPC sola es una composición significativamente diferente de la composición de DPPC y PHAD.

Ejemplo 13

10 Los tamaños de partículas de las formulaciones de PHAD del Ejemplo 1 preparadas con o sin polisorbato 80 o glicerol se compararon cuando se almacenaron a una temperatura de 2 °C a 8 °C o aproximadamente a 25 °C para proyectar (estimar) la estabilidad de los tamaños de partículas de las formulaciones de PHAD durante 12 a 36 meses. Se prepararon múltiples lotes de formulaciones de PHAD y normalmente exhibieron tamaños de partículas entre 70 y 100 nm inmediatamente después de la extrusión. El objetivo de estas formulaciones de PHAD es asegurar que su diámetro promedio eficaz permanezca preferentemente en menos de 150 nm durante su vida útil, incluso más preferentemente en menos de 130 nm, que se predice que será de 2 a 3 años o más, según los datos descritos en el presente documento. Es importante determinar el diámetro medio eficaz durante un cierto período de tiempo en condiciones intermedias/aceleradas, por ejemplo, 25 °C, para ayudar a predecir el tamaño de partícula entre 2 °C a 8 °C en aproximadamente 2 o más años.

20 Los tamaños de partícula y los potenciales zeta se determinaron utilizando la dispersión dinámica de la luz con Malvern Zetasizer® ZS90 o Brookhaven Instruments Corp. utilizando el software ZetaPlus Particle Sizing. Se siguieron las instrucciones y recomendaciones del fabricante del instrumento.

Tabla 8.

Muestra	Punto de tiempo/estado	Diámetro medio eficaz (nm)
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 sin polisorbato 80	1 mes/25 °C	99
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 con polisorbato 80 al 0,1 %	1 mes/25 °C	104
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1	1 mes/2-8 °C	79
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1	1 mes/25 °C	82
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 con polisorbato 80 al 0,01 %	1 mes/25 °C	105
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 sin polisorbato 80	4 meses/2-8 °C	83
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 sin polisorbato 80	4 meses/25 °C	114
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 con polisorbato 80 al 0,1 %	4 meses/2-8 °C	94
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 con polisorbato 80 al 0,1 %	4 meses/25 °C	106
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 con polisorbato 80 al 0,01 %	4 meses/2-8 °C	90
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 con polisorbato 80 al 0,01 %	4 meses/25 °C	114
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1	4 meses/25 °C	86
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1	5 meses/2-8 °C	82
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1	6 meses/25 °C	101
Formulación de adyuvante del Ejemplo 1	6 meses/2-8 °C	94

Formulación de adyuvante del Ejemplo 1 sin polisorbato 80	8 meses/2-8 °C	117
---	----------------	-----

Los datos presentados en la Tabla 8 en este ejemplo proyectan que los tamaños de partícula de las formulaciones de PHAD almacenados entre 2 °C y 8 °C sin polisorbato 80 permanecerán por debajo de 150 nm durante aproximadamente un mínimo de 2 años, y sugieren potencialmente 3 años como se describe a continuación. En este ejemplo específico y solo para el propósito de esta prueba, estable significa que el diámetro promedio eficaz permanece por debajo de 150 nm dentro de las limitaciones del instrumento. Para los expertos en la técnica, los datos a 25 °C son una condición intermedia/acelerada utilizada para proyectar una vida útil en la condición de almacenamiento a largo plazo entre 2 °C y 8 °C. Estos datos proyectan claramente que los tamaños de partícula de estas formulaciones de PHAD se mantendrán estables durante al menos 6 meses o más a aproximadamente 25 °C y potencialmente 3 años entre 2 °C y 8 °C. Como se describe en el presente documento, esta estabilidad de estas formulaciones de PHAD a 25 °C es desconocida en la técnica anterior e inesperada.

EJEMPLO 14: Una comparación de las formulaciones de la invención con otras formulaciones de adyuvantes en la inducción de anticuerpos anti-FimH en ratones

La formulación de PHAD de la invención o formulación acuosa (la formulación acuosa en este ejemplo se refiere a la relación molar de lípido a adyuvante descrita en la patente de EE.UU. 6.491.919 y la solicitud de patente de EE.UU. 20080131466) utilizada a continuación en este ejemplo se preparó como se describe en el Ejemplo 1 con los siguientes excepciones. Se utilizaron los lípidos especificados y/o las relaciones molares (mostradas entre paréntesis) y se produjo un tratamiento con ultrasonidos a aproximadamente 45 °C durante aproximadamente de 30 minutos a 2 horas según fuese necesario para lograr una suspensión homogénea. Todos los lípidos se adquirieron de Avanti Polar Lipids como se describe anteriormente en el presente documento.

Se compraron ratones hembra C3H/HeN (aproximadamente de 9 semanas de edad) de los laboratorios Charles River (Wilmington, MA). Los ratones se inyectaron a través de la vía intramuscular (IM) en el muslo derecho bajo anestesia con isoflurano ligero (Henry Schein, Melville, NY) en un volumen de 50 µl utilizando una aguja de calibre 30. Los ratones se vacunaron con 12,5 µg de PHAD o adyuvante de Freund (administración subcutánea) y 15 µg de FimCH, en los días 1 y 29. Como conocen los expertos en la técnica, cuando se utiliza, el adyuvante completo de Freund se administró el día 1 y el adyuvante incompleto de Freund el día 29.

ELISA para la detección de anticuerpos séricos: se recogieron los sueros de los ratones en el sacrificio y se analizaron mediante ELISA para detectar anticuerpos anti-FimH. T3 truncada con FimH se adhirió a las placas Immulon 4 HBX (ThermoFisher) a 2 µg/ml en PBS durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS + Tween 20 al 0,05 %, los sitios de unión abiertos se bloquearon con BSA al 1,5 % (Sigma Aldrich) en PBS durante 1 hora. Después del lavado, las diluciones de los sueros de muestra (en PBS con Tween 20 al 0,05 %, BSA al 0,1 %, metil α-D-manopiranosido al 0,5 %) se incubaron durante 2 horas. Después del lavado, se incubaron antisueros de detección de IgG anti-ratón de cabra biotinilados diluidos 1:500 (Sigma Aldrich) en el tampón de dilución de la muestra en los pocillos durante la noche a 4 °C. Después del lavado, se incubó Avidina-peroxidasa de rábano picante diluida 1:25.000 (HRP, Sigma Aldrich) en tampón de dilución de muestra en los pocillos durante 20 minutos. Después del lavado, la actividad de HRP se detectó utilizando un sustrato TMB en un tampón fosfocitrato (Sigma Aldrich). La densidad óptica se leyó a 630 nm utilizando un lector de microplacas VersaMaxPLUS y se analizó con el software SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, California). El título de anticuerpos se definió como la dilución más alta con señal sobre el fondo.

Tabla 9.

Adyuvante/Formulación	Títulos de dilución de anticuerpos
Sin Adyuvante; N = 6 ratones	1:20.000
Experimento 1: Adyuvante de referencia:adyuvante de Freund; N = 6 ratones	1:200.000
Experimento 2: Adyuvante de referencia:adyuvante de Freund; N = 7 ratones	1:200.000
Experimento 1: DPPC:PHAD (1:3,9) formulación acuosa; N = 8 ratones	1:200.000
Experimento 2: DPPC:PHAD (1:3,9) formulación acuosa; N = 10 ratones	1:200.000
DPPC:PHAD (2,6:1) formulación de adyuvante; N = 10 ratones	1:400.000
DPPC:PHAD (13:1) formulación de adyuvante; N = 10 ratones	1:400.000
DPPC:DPPG:PHAD (2,6:0,3:1) formulación de adyuvante; N = 10 ratones	1:400.000
DPPC:DPPG:PHAD (2,6:2,6:1) formulación de adyuvante; N = 10 ratones	1:400.000

Como se muestra claramente en la Tabla 9, una relación molar de DPPC a PHAD de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 13:1 fue superior para mejorar la respuesta inmunitaria a FimH en ratones cuando se comparó con ningún adyuvante, adyuvante de Freund o la formulación acuosa de DPPC a PHAD en una relación molar de 1:3,9. El adyuvante de Freund se considera un adyuvante estándar utilizado en experimentos con animales. Los datos muestran que la relación molar de la invención descrita en el presente documento de aproximadamente 2:1 a 13:1 es superior a este adyuvante preclínico utilizado frecuentemente. Este es un aspecto de la invención que demuestra su

superioridad con respecto a las formulaciones de la técnica anterior. Los datos en la Tabla 9 también demuestran que agregar DPPG en estas formulaciones no disminuye el uso previsto de las formulaciones de PHAD, es decir, para mejorar una respuesta inmunitaria a FimH.

5 EJEMPLO 15: Determinación de que las formulaciones de la invención siguen siendo una mezcla homogénea dentro de las 24 horas

El procedimiento del Ejemplo 1 se utilizó para preparar la formulación de PHAD con una relación molar de DPPC:PHAD de aproximadamente 2,5 a 1, excepto que no se añadió polisorbato 80. El vial que contenía la formulación de PHAD se invirtió suavemente entre tres y cinco veces. Después, se dejó que la formulación de PHAD permaneciera a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. Después de 24 horas y sin invertir, agitar o remover la formulación de PHAD, se retiraron cuidadosamente pequeñas alícuotas de la parte superior, media e inferior de la suspensión de PHAD. Estas alícuotas se analizaron para determinar la concentración de PHAD mediante HPLC como se describió anteriormente en el presente documento. Los resultados demostraron que las alícuotas de la parte superior, media e inferior contenían concentraciones de PHAD equivalentes. Estos resultados demuestran que la formulación de PHAD de la invención no se asienta en 24 horas.

EJEMPLO 16: Formulaciones de la invención utilizadas en estudios clínicos en seres humanos

La formulación de adyuvante del Ejemplo 1 y FimCH se prepararon bajo cGMP para su uso en un estudio clínico en seres humanos con mujeres de aproximadamente 21 a 64 años de edad. Se preparó una vacuna de FimCH y formulación de PHAD mediante la adición de un volumen predeterminado de una formulación de PHAD a un vial de FimCH como se describe anteriormente en el presente documento para obtener las concentraciones preferidas de FimCH y PHAD por cada vial. Se inyectó IM (intramuscular) un volumen apropiado de la vacuna preparada para administrar 50 µg o aproximadamente 107 µg de FimCH con 10 µg, 20 µg o aproximadamente 40 µg de PHAD a cada sujeto femenino.

A partir de estas inyecciones IM en seres humanos, la vacuna demuestra que la formulación de adyuvante de la invención con FimCH produce reacciones en el sitio de inyección y sistémicas menos graves en seres humanos en comparación con otras formulaciones de adyuvantes conocidas utilizadas en seres humanos. Este es un aspecto notable de la invención. Los datos provisionales de las reacciones en el sitio de inyección y sistémicas se muestran a continuación para el número de inyecciones a partir del análisis intermedio por mujer. El estudio en seres humanos está en curso y las mujeres en el estudio están programadas para recibir 4 inyecciones.

Tabla 10.

	Número de mujeres	Dosis de FimCH/PHAD en microgramos	Número de inyecciones	Reacciones en el sitio de inyección y sistémicas graves
Grupo 1	5	107 µg/0 µg	3 a 4	Ninguna
Grupo 2	8	50 µg/10 µg	2 a 3	Ninguna
Grupo 3	16	50 µg/20 µg	1 a 2	Ninguna
Grupo 4	8	50 µg/40 µg	1	Ninguna

En el momento de este análisis provisional, se habían realizado más de 60 inyecciones IM a 37 mujeres y no se habían observado reacciones en el sitio de inyección ni sistémicas graves. En el momento de este análisis provisional, las mujeres en el Grupo 2 demostraron una respuesta de anticuerpos a FimH después de dos inyecciones IM superiores a 10 veces de los valores iniciales antes de la vacunación. Estos datos demuestran que la vacuna está produciendo la respuesta de anticuerpos prevista contra FimH. Las mujeres en este estudio recibirán hasta 4 inyecciones IM de la vacuna. Los grupos 5 y 6 abrirán la inscripción para mujeres con un historial de ITU recurrente.

En comparación, la administración de la vacuna Cervarix que contiene los adyuvantes MPL con alumbre da como resultado aproximadamente del 8 % a más del 10% de los sujetos que presentan reacciones en el sitio de la inyección y reacciones sistémicas graves. Como se informó en la publicación de Treanor et al. (Vaccine, 2013, 31(48), 5760-5), PHAD se ha preparado en diferentes formulaciones con escualeno y se ha administrado a seres humanos. Según este informe, 5 µg de PHAD en esta formulación dieron lugar a reacciones locales graves, escalofríos y rigidez y fueron tan limitantes que el uso de esta formulación en estudios futuros solo contenía 2 microgramos o menos de PHAD. En 1 microgramos de PHAD en esta formulación, todavía se observaron reacciones en el sitio de inyección y reacciones sistémicas graves. En esta formulación de Treanor et al. a 2 o menos microgramos de PHAD, los beneficios del PHAD adyuvante que produce una respuesta inmunitaria están limitados, por lo que se elimina el potencial de PHAD debido a una formulación inferior. Sin embargo, la formulación de adyuvante de la invención supera esta limitación con formulaciones superiores que permiten la administración de hasta 50 µg de PHAD, o potencialmente más, con reacciones en el sitio de inyección y sistémicas menos graves. Estos datos en seres humanos ofrecen evidencia de que PHAD se puede administrar a seres humanos a 100 µg o más microgramos con las formulaciones descritas en el presente documento. Las formulaciones de adyuvantes de la invención son superiores a las formulaciones previamente intentadas.

- En un aspecto, se desvela un método para tratar infecciones recurrentes del tracto urinario en un ser humano. El método incluye la etapa de administrar al ser humano una composición de vacuna que comprende (i) una cantidad eficaz de un antígeno de FimCH o FimH truncada, y (ii) una formulación de adyuvante que contiene de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg de PHAD. La cantidad de PHAD administrada al ser humano es preferentemente de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 50 µg, más preferentemente de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 50 µg. Preferentemente, la composición de vacuna está esencialmente libre de escualeno. Preferentemente, la composición de vacuna está esencialmente libre de aceite metabolizable. Preferentemente, la composición de vacuna está esencialmente libre de un segundo adyuvante. Preferentemente, la composición de vacuna está sustancialmente libre de colesterol. Preferentemente, la composición de vacuna está sustancialmente libre de fosfatidilglicerol. Preferentemente, la composición de vacuna está sustancialmente libre de fosfatidiletanoamina. Preferentemente, la composición de vacuna está sustancialmente libre de monoacilglicerol. Preferentemente, la composición de vacuna está esencialmente libre de colesterol, fosfatidilglicerol, aceite metabolizable y un segundo adyuvante. El antígeno puede ser preferentemente FimCH.
- 15 La formulación de adyuvante puede comprender PHAD y fosfatidilcolina en una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:40, en donde la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, POPC y DOPC. La PHAD y la fosfatidilcolina están preferentemente en una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:20, y más preferentemente de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:5.
- 20 El método puede incluir además exponer la formulación de adyuvante durante 60 días o más a temperatura ambiente antes de la etapa de administración de la composición de vacuna. El método puede incluir además repetir la etapa de administrar al ser humano la composición de vacuna tres veces en aproximadamente 1 año. El método puede incluir además la etapa de exponer la formulación de adyuvante durante 30 días o más a temperaturas entre la temperatura ambiente y 37 °C antes de la etapa de administración de la composición de vacuna. En una realización, la formulación de adyuvante estaba contenida en una jeringuilla estéril durante la exposición a dicha temperatura.
- 25 La formulación de adyuvante puede comprender PHAD y fosfatidilcolina en una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:40, en donde la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, POPC y DOPC; y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato, succinato o fosfato en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM a aproximadamente un pH de 4,0 a aproximadamente 7,5. La cantidad de PHAD administrada es preferentemente de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 50 µg, más preferentemente de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 50 µg.
- 30 En una realización, el tampón es citrato de 28 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 40 mM a aproximadamente 50 mM. En otro aspecto, el tampón es fosfato seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio dibásico, fosfato sódico monobásico, fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico de 28 mM a aproximadamente 50 mM, preferentemente de 40 mM a aproximadamente 50 mM. En otro aspecto, el tampón es succinato de 28 mM a aproximadamente 50 mM, preferentemente de 40 mM a aproximadamente 50 mM. La formulación de adyuvante puede incluir además un tensioactivo no iónico, preferentemente polisorbato 80. La formulación de adyuvante preferentemente no se ha sometido a liofilización.
- 35 En una realización, la formulación de adyuvante consiste esencialmente en (i) PHAD, (ii) fosfatidilcolina, (iii) un tampón, en donde el PHAD y la fosfatidilcolina están presentes en una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:40, en donde la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, POPC y DOPC; y en donde el tampón está en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM a aproximadamente un pH de 4,0 a aproximadamente 7,5.
- 40 En otro aspecto, se proporciona una composición de vacuna. La composición de vacuna incluía una cantidad eficaz de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en FimCH o FimH truncada; y, una formulación de adyuvante que comprende PHAD y un tampón que consiste en citrato, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. La formulación de adyuvante incluye PHAD y fosfatidilcolina en una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:40, e incluye además un tampón que consiste en citrato, de 25 mM a aproximadamente 50 mM a aproximadamente un pH de 4.5 a aproximadamente 6.5. La fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, POPC y DOPC. La formulación de adyuvante puede comprender además un tensioactivo no iónico.
- 45 Preferentemente, el PHAD en dicha composición de vacuna es estable durante 6 meses o más a temperatura ambiente antes de su uso en dicha composición de vacuna. Más preferentemente, el PHAD en dicha composición de vacuna es estable durante 60 días o más a temperaturas entre la temperatura ambiente y 37 °C antes de su uso en dicha composición de vacuna. El antígeno es preferentemente FimCH.
- 50 Preferentemente, la composición de vacuna está esencialmente libre de escualeno. Preferentemente, la composición de vacuna está esencialmente libre de aceite metabolizable utilizado como adyuvante. Preferentemente, la composición de vacuna está esencialmente libre de aceite metabolizable. Preferentemente, la composición de vacuna está sustancialmente libre de un segundo adyuvante. Preferentemente, la composición de vacuna está
- 55
- 60
- 65

sustancialmente libre de colesterol. Preferentemente, la composición de vacuna está sustancialmente libre de fosfatidilglicerol o fosfatidiletanoamina o de ambos. Preferentemente, la composición de vacuna está sustancialmente libre de monoacilglicerol.

5 En una realización, preferentemente, la composición de vacuna está esencialmente libre de colesterol, fosfatidilglicerol, aceite metabolizable y un segundo adyuvante.

10 En una realización, el PHAD y la fosfatidilcolina están en una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:20, más preferentemente, de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:5. Preferentemente, la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en DMPC, DPPC y DSPC. En una realización, el tampón es citrato de 28 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de 40 mM a aproximadamente 50 mM. En otro aspecto, dicho tampón es fosfato seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio dibásico, fosfato sódico monobásico, fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico de 28 mM a aproximadamente 50 mM, preferentemente de 40 mM a aproximadamente 50 mM. En otro aspecto, dicho tampón es succinato de 28 mM a aproximadamente 50 mM, preferentemente de 40 mM a aproximadamente 50 mM.

15 En otra realización, la formulación de adyuvante consiste esencialmente en (i) PHAD, (ii) fosfatidilcolina y (iii) un tampón, en donde el PHAD y la fosfatidilcolina están presentes en una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:40, en donde la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, POPC y DOPC; y en donde el tampón es citrato, en el intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM a aproximadamente un pH de 4,5 a aproximadamente 6,5.

25 En otro aspecto se proporciona un kit de vacuna. El kit incluía un primer recipiente de una composición que contenía FimCH; un segundo recipiente de una formulación de adyuvante descrita en el presente documento; e instrucciones de uso, en donde las instrucciones incluyen instrucciones para almacenar la formulación de adyuvante a temperatura ambiente durante 60 días o más antes de su uso en dicha composición de vacuna. Las instrucciones para su uso incluyen preferentemente instrucciones para permitir la exposición de la formulación de adyuvante a temperatura ambiente durante 6 meses o más antes de su uso en dicha composición de vacuna. En una realización, las instrucciones para su uso incluyen instrucciones para permitir la exposición de la formulación de adyuvante entre la temperatura ambiente y aproximadamente 37 °C durante 2 meses o más antes de su uso en dicha composición de vacuna. En otra realización, las instrucciones para su uso incluyen instrucciones para permitir la exposición de la formulación de adyuvante durante 30 días o más entre la temperatura ambiente y aproximadamente 37 °C antes de su uso en la composición de la vacuna. En otra realización, las instrucciones para su uso incluyen instrucciones para enviar o transferir la formulación de adyuvante a través del servicio postal del gobierno o un servicio de envío comercial a otra ubicación con exposición entre temperatura ambiente y aproximadamente 37 °C. En una realización, el segundo
30 recipiente es una jeringuilla estéril.

40 En otro aspecto, se proporciona un método para preparar una vacuna. El método incluye las etapas de proporcionar una formulación de adyuvante que comprende PHAD y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato, succinato y fosfato de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM; y la combinación de la formulación de adyuvante con una cantidad eficaz de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en FimCH o FimH truncada; en donde la formulación de adyuvante es estable durante 60 días o más a temperatura ambiente y durante 30 días o más a temperaturas entre temperatura ambiente y 37 °C antes de su uso en dicha composición de vacuna. Preferentemente, la formulación de adyuvante no se ha sometido a liofilización. Preferentemente, La formulación de adyuvante está contenida en una jeringuilla estéril.

45 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende PHAD y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato y succinato de 25 mM a aproximadamente 50 mM, a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5.

50 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende PHAD y un tampón seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio dibásico, fosfato sódico monobásico, fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico de 28 mM a aproximadamente 50 mM, a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, en donde dicha composición está sustancialmente libre de una solución salina.

55 En otro aspecto, se proporciona un método para administrar una composición de vacuna a un ser humano. El método incluye las etapas de administrar al ser humano una composición de vacuna que comprende una formulación de adyuvante que contiene fosfatidilcolina, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 50 µg de PHAD, y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato y succinato de 25 mM a aproximadamente 50 mM.

60 En otro aspecto, se proporciona un método para tratar infecciones recurrentes del tracto urinario en un ser humano. El método incluye la etapa de administrar al ser humano una composición de vacuna que comprende (i) una cantidad eficaz de FimCH, (ii) una formulación de adyuvante que contiene fosfatidilcolina, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 50 µg de PHAD, y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato, succinato y fosfato de 10 mM a aproximadamente 50 mM, en donde la composición está esencialmente libre de escualeno.

65

En otro aspecto, se proporciona un método para inducir la producción de anticuerpos contra FimH en un ser humano con infecciones recurrentes del tracto urinario. El método de administración de una composición de vacuna comprende (i) una cantidad eficaz de un antígeno de FimCH o FimH truncada, y (ii) una formulación de adyuvante que contiene de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg de PHAD.

5 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende PHAD, fosfatidilcolina y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato y succinato de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende PHAD, fosfatidilcolina y un tampón seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio dibásico, fosfato sódico monobásico, fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición está sustancialmente libre de una solución salina.

10

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende PHAD y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato y succinato de 25 mM a aproximadamente 50 mM,. En una realización, la composición comprende fosfatidilcolina en una relación molar con PHAD de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1, en donde la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, POPC y DOPC. Preferentemente, la concentración de tampón es de 30 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente la concentración de tampón es de 40 mM a aproximadamente 50 mM, y está a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5. En una realización, el tampón es citrato. En una realización, el tampón es succinato. La composición puede incluir una cantidad eficaz de FimCH.

15
20

En una realización, la composición se expone a temperatura ambiente durante 60 días o más antes de administrarse a un ser humano como adyuvante. En otra realización, la composición es estable cuando se almacena a aproximadamente la temperatura ambiente durante 6 o más meses y entre la temperatura ambiente y aproximadamente 37 °C durante 2 meses o más.

25

En una realización, la composición está sustancialmente libre de una solución salina. En otra realización, la composición contiene menos de 10 mM de NaCl, preferentemente, esencialmente libre de NaCl. En otra realización, la composición está esencialmente libre de colesterol, fosfatidilglicerol y escualeno. En otra realización, la composición no se ha sometido a liofilización. En otra realización, la composición comprende una cantidad eficaz de FimCH. Preferentemente, la composición no se ha sometido a liofilización.

30

En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende PHAD y un tampón seleccionado del grupo que consiste en fosfato de sodio dibásico, fosfato sódico monobásico, fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico de 28 mM a aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición está sustancialmente libre de una solución salina. En una realización, la composición incluye una fosfatidilcolina en una relación molar con PHAD de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1, en donde la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en DMPC, DPPC, DSPC, POPC y DOPC. Preferentemente, la concentración de tampón es de 30 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente la concentración de tampón es de 40 mM a aproximadamente 50 mM, a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5.

35
40

En otra realización, la composición contiene menos de 10 mM de NaCl, más preferentemente, esencialmente libre de NaCl. En otra realización, la composición está esencialmente libre de colesterol, fosfatidilglicerol y escualeno.

45 En otra realización, la composición se expone a temperatura ambiente durante 60 días o más antes de administrarse a un ser humano como adyuvante. En otra realización, la composición es estable cuando se almacena a temperatura ambiente durante 6 meses o más y entre la temperatura ambiente y aproximadamente 37 °C durante 2 meses o más.

En otro aspecto, se proporciona un método para administrar una composición de vacuna a un ser humano. El método incluye la etapa de administrar al ser humano una composición de vacuna que comprende una formulación de adyuvante que contiene fosfatidilcolina, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 50 µg de PHAD, y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato y succinato de 25 mM a aproximadamente 50 mM. Preferentemente, la formulación de adyuvante está esencialmente libre de colesterol y fosfatidilglicerol.

50

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar infecciones recurrentes del tracto urinario en un ser humano. El método incluye la etapa de administrar al ser humano una composición de vacuna que comprende (i) una cantidad eficaz de FimCH, (ii) una formulación de adyuvante que contiene fosfatidilcolina, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 50 µg de PHAD, y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato, succinato y fosfato de 10 mM a aproximadamente 50 mM, en donde la composición está esencialmente libre de escualeno. Preferentemente, la composición está sustancialmente libre de solución salina. En una realización, el tampón se selecciona del grupo de citrato y succinato de 25 mM a aproximadamente 50 mM, a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5.

55
60

Se pretende que todas las referencias a "un" y "uno/una" y las referencias subsiguientes a "el/la" que se refieren a la base antecedente denotada por "un" o "uno/una" se lean en sentido amplio en el sentido de "al menos uno/una". De manera similar, a menos que sea claramente contrario al contexto, la palabra "o", cuando se utiliza con respecto a los

65

elementos nombrados alternativos, debe interpretarse de manera amplia para significar, como alternativa, cualquiera de los elementos nombrados, cualquier subconjunto de los elementos nombrados y todos los elementos nombrados.

5 En vista de lo anterior, se verá que se logran las diversas ventajas de la invención y se obtienen otros resultados ventajosos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende disacárido de hexaacilo fosforilado (PHAD), al menos una fosfatidilcolina y un tampón citrato de 10 mM a 50 mM;
- 5 en donde la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) y 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC); y en donde la relación molar entre la al menos una fosfatidilcolina y PHAD está comprendida entre 1:1 y 40:1 (fosfatidilcolina:PHAD).
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde la concentración de tampón es de 20 mM a 50 mM.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la concentración de tampón es de 25 mM a 50 mM.
- 15 4. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición tiene un pH de 4,5 a 6,5.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición es una suspensión acuosa tamponada con un tamaño de partícula medio de 150 nanómetros o menos.
- 20 6. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un tensioactivo no iónico, en particular, polisorbato 80.
7. Una composición de vacuna que comprende una formulación de adyuvante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una cantidad eficaz de un antígeno.
- 25 8. La composición de vacuna de la reivindicación 7, en donde el antígeno es FimCH.

FIGURA 1

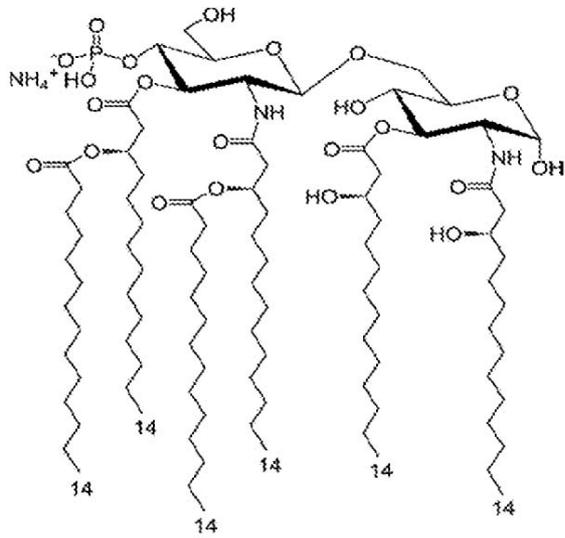


FIGURA 2

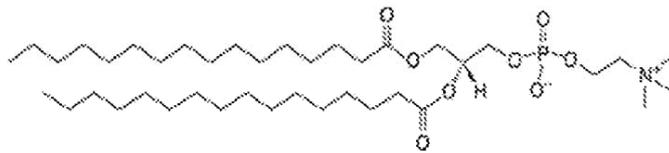


FIGURA 3

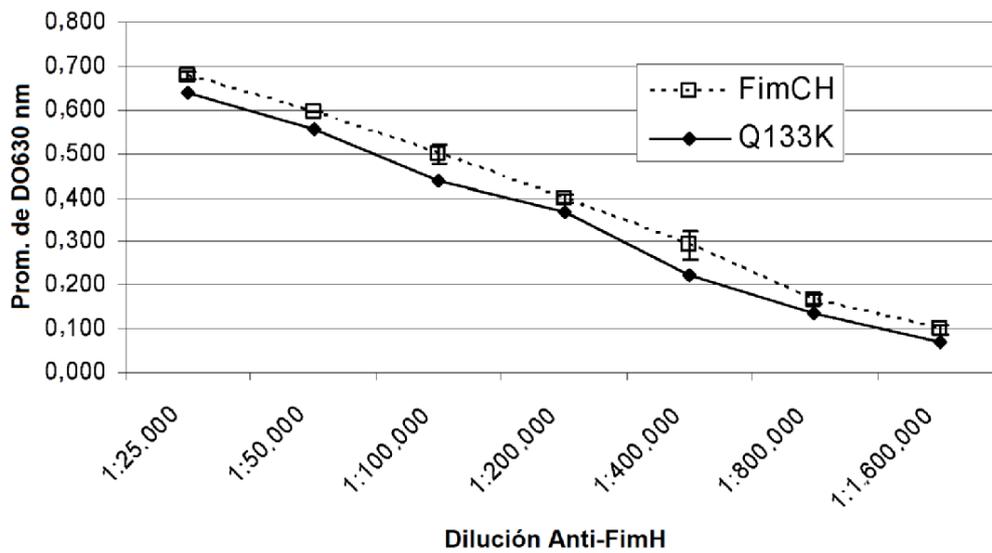


FIGURA 4

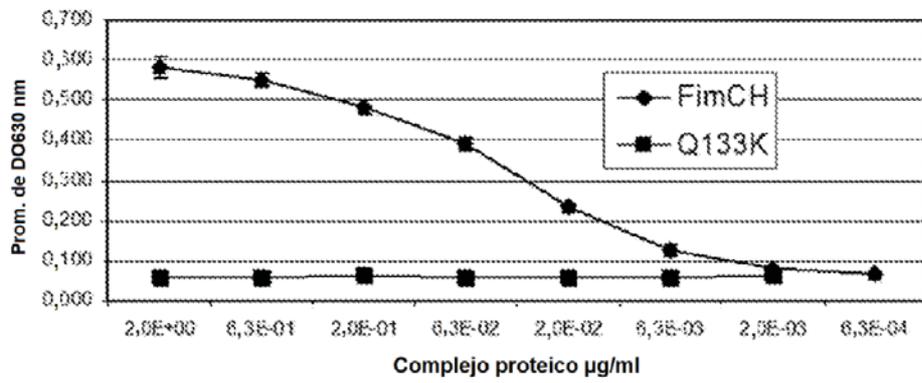
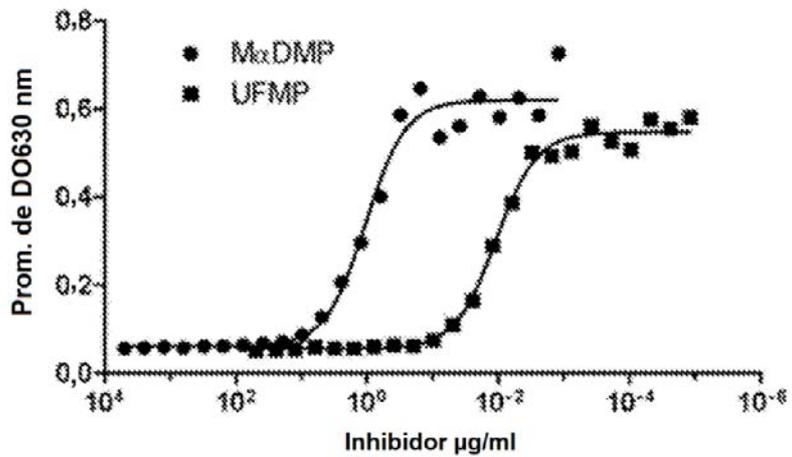


FIGURA 5



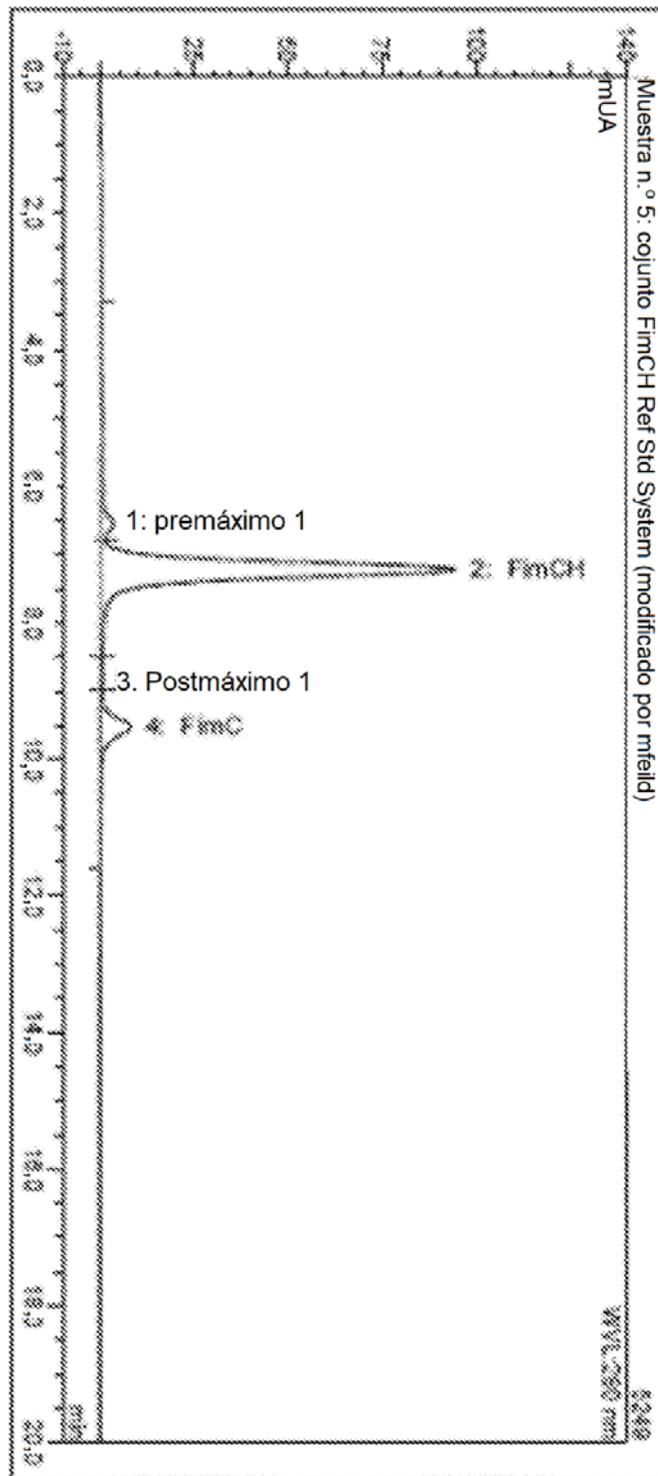
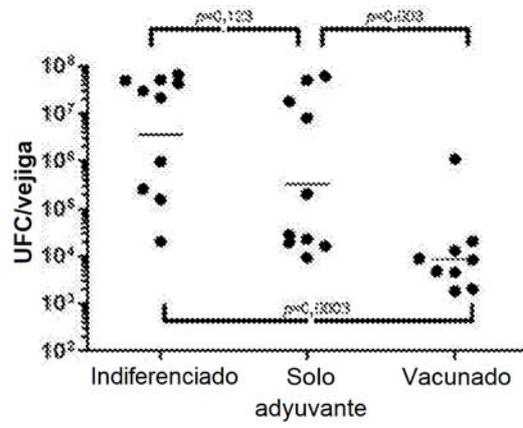


FIGURA 6

FIGURA 7



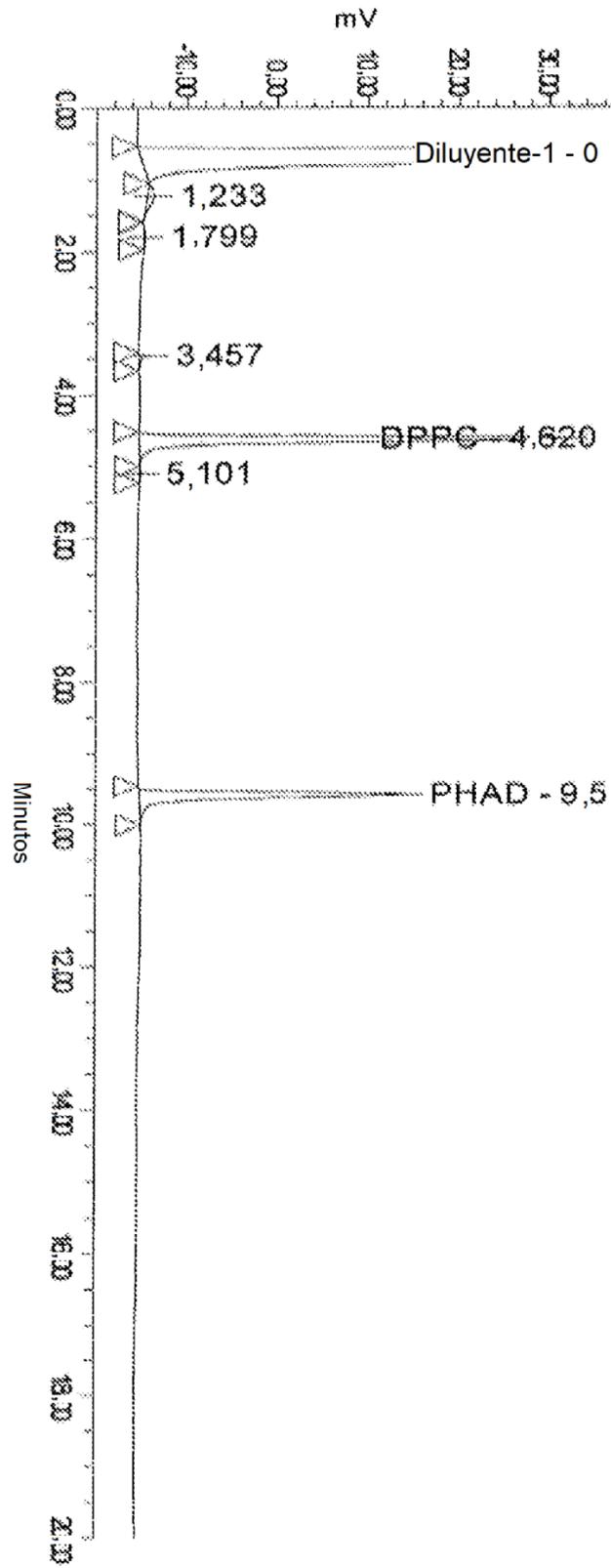


FIGURA 8