

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 967**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/107</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/015</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/39</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/24</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/113</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2013 PCT/US2013/025204**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13119856**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2013 E 13746983 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2811981**

54 Título: **Formulaciones de adyuvante mejoradas que comprenden agonistas de TLR4 y métodos para usar las mismas**

30 Prioridad:

**07.02.2012 US 201261596066 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.11.2019**

73 Titular/es:

**INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE  
(100.0%)  
1616 Eastlake Avenue East, Suite 400  
Seattle, Washington 98102, US**

72 Inventor/es:

**FOX, CHRISTOPHER;  
REED, STEVEN, G.;  
BALDWIN, SUSAN y  
VEDVICK, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 729 967 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones de adyuvante mejoradas que comprenden agonistas de TLR4 y métodos para usar las mismas

### Antecedentes de la invención

#### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas y de vacunas. Más específicamente, las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a formulaciones farmacéuticas y de vacunas, particularmente emulsiones de aceite en agua, en donde las composiciones comprenden un agonista de TLR4, tal como un adyuvante lipídico de glucopiranosilo (GLA).

#### Descripción de la técnica relacionada

- 10 El sistema inmune de los organismos superiores se ha caracterizado como capaz de distinguir agentes extraños (o "no propios") de componentes familiares o "propios", de modo que los agentes extraños incitan respuestas inmunes mientras que los componentes "propios" se ignoran o se toleran. Las respuestas inmunes se han caracterizado tradicionalmente como respuestas humorales, en las que se producen anticuerpos específicos para antígenos por linfocitos B diferenciados conocidos como células plasmáticas, o respuestas mediadas por células, en las que varios tipos de linfocitos T actúan para eliminar los antígenos mediante una serie de mecanismos. Por ejemplo, las células T auxiliares CD4+ que son capaces de reconocer antígenos específicos pueden responder mediante la liberación de mediadores solubles tales como las citoquinas para reclutar células adicionales del sistema inmune para participar en una respuesta inmune. Además, las células T citotóxicas CD8+ que también son capaces de un reconocimiento específico de antígeno pueden responder al unirse y destruir o dañar una célula o partícula portadora de antígeno. En las técnicas inmunológicas se conoce la administración de ciertas vacunas de acuerdo con una variedad de formulaciones, usualmente con el propósito de inducir una respuesta inmune deseada en un huésped.

- Por ejemplo, se han descrito ciertos sistemas de emulsión para formular composiciones de adyuvantes, que incluyen sistemas de emulsión monofásicos o multifásicos. Se ha sugerido que los adyuvantes de emulsión de aceite en agua per se son útiles como composición de adyuvante (documento EP 0 399 843B), también se han descrito combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos como adyuvantes para vacunas (documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsión de aceite, tales como emulsiones de agua en aceite (Pat. de EE.UU. No. 5.422.109; EP 0 480 982 B2) y emulsiones de agua en aceite en agua (Pat. de EE.UU. No. 5.424.067; EP 0 480 981 B). Alving et al. describen una composición que comprende una emulsión estable de aceite en agua que usa vesículas como único agente estabilizante, una cantidad suficiente de vesículas, vesículas que contienen además inmunógenos o sustancias terapéuticas (Pat. de EE.UU. Co. 6.110.492). Leesman describe una composición de adyuvante que es una emulsión estable de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, tensioactivos, un antioxidante y un componente para hacer que la emulsión sea isotónica (U.S. 2003/0215497; PCT/US99/09978). Los adyuvantes sintéticos de lípido de glucopiranosilo (GLA) se proporcionan en el documento US 2010/0310602.

- 35 A pesar de estos métodos conocidos para producir sistemas de emulsión para preparar composiciones de adyuvantes, las composiciones de adyuvantes en emulsión actuales todavía tienen muchos inconvenientes. Por consiguiente, existe una necesidad de composiciones de adyuvantes de emulsión adicionales mejoradas, tales como formulaciones de emulsión de aceite en agua que comprenden agonistas de TLR4. Como se describe en la presente memoria, la presente invención satisface estas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

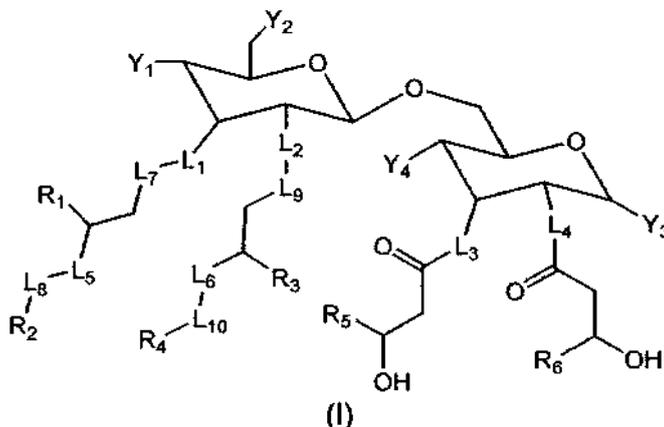
#### Breve resumen de la invención

- La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un agonista de TLR4 y un aceite metabolizable, en donde el aceite metabolizable está presente en la emulsión de aceite en agua a una concentración de aproximadamente el 0,01%-1% v/v, o preferiblemente aproximadamente el 0,01%-0,5% v/v, en donde el equilibrio hidrofóbico:lipofílico (HLB) de la emulsión de aceite en agua es mayor de aproximadamente 9, o mayor de aproximadamente 10, o entre aproximadamente 9-12, en donde el agonista de TLR4 se selecciona del grupo que consiste en MPL, 3D-MPL y adyuvante lipídico de glucopiranosilo sintético (GLA).

- En la presente memoria también se proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un agonista de TLR4, un aceite metabolizable y un tensioactivo, en donde el aceite metabolizable está presente en la emulsión de aceite en agua a una concentración de aproximadamente el 0,01%-1% v/v, o preferiblemente aproximadamente el 0,01%-0,5% v/v. En algunas realizaciones, la concentración del aceite metabolizable es inferior al 1% v/v. En algunas realizaciones, el equilibrio hidrofóbico:lipofílico (HLB) de la emulsión de aceite en agua es mayor de aproximadamente 9, o mayor de aproximadamente 10, o entre aproximadamente 9-12.

- El agonista de TLR4 usado en las emulsiones de aceite en agua de la invención puede seleccionarse de TLR4 del grupo que consiste en MPL, 3D-MPL o un adyuvante GLA sintético.

En algunas realizaciones, el adyuvante GLA sintético tiene la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente -O-, -NH- o - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-;

5 L<sub>7</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub> y L<sub>10</sub> son iguales o diferentes e independientemente ausentes o -C(=O)-;

Y<sub>1</sub> es un grupo funcional ácido;

Y<sub>2</sub> e Y<sub>3</sub> son iguales o diferentes e independientemente -OH-, -SH-, o un grupo funcional ácido;

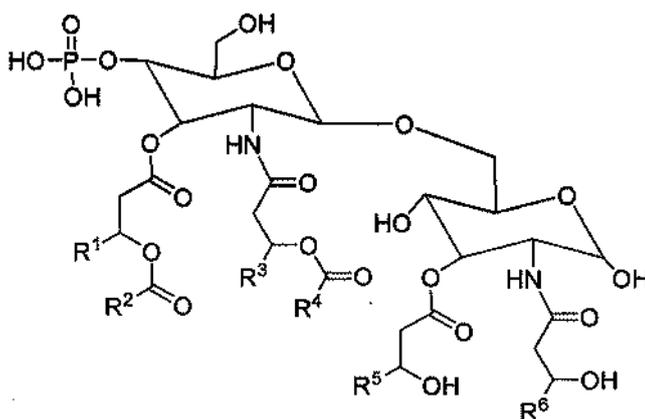
Y<sub>4</sub> es -OH o -SH-;

R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>8-13</sub>; y

10 R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>6-11</sub>.

En algunas realizaciones de la estructura de GLA sintético, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>10</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>8</sub>.

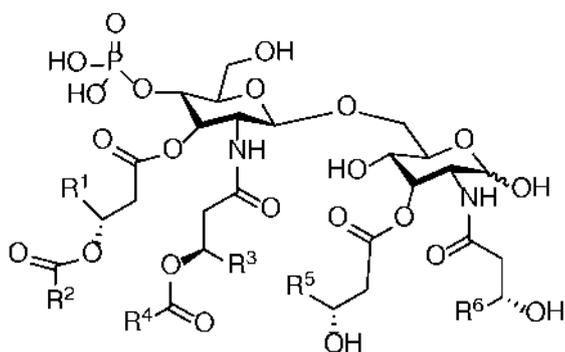
Por ejemplo, en una realización más específica, la emulsión de aceite en agua comprende un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



15 En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>. En una realización más específica, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>13</sub>. En otra realización más específica, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>10</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>8</sub>.

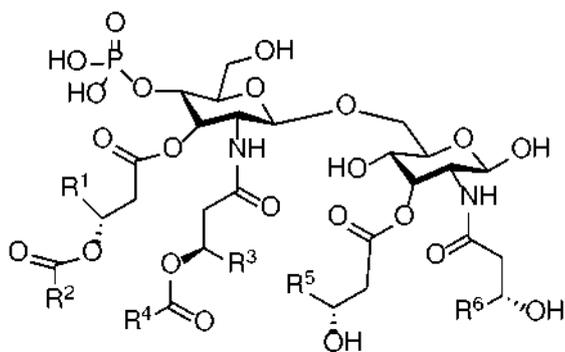
En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>.

20 En ciertas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



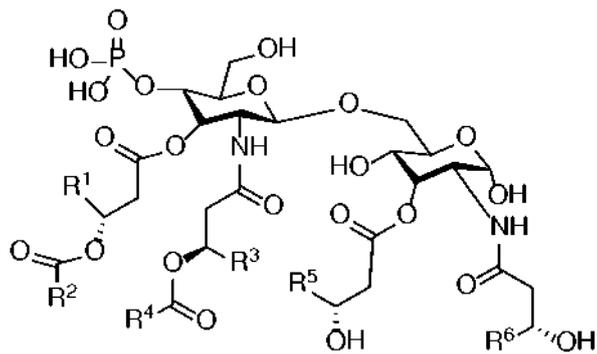
En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>.

5 En ciertas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



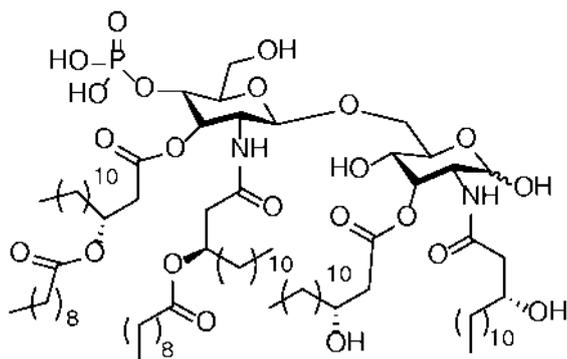
En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>.

10 En ciertas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:

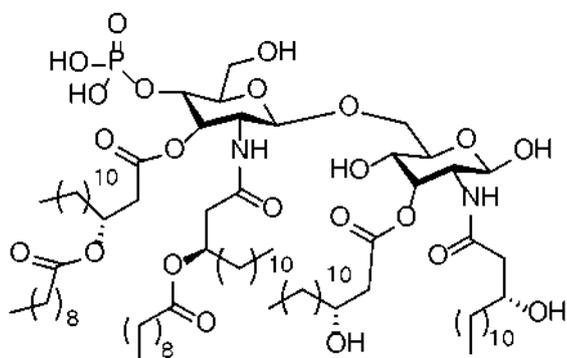


En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>.

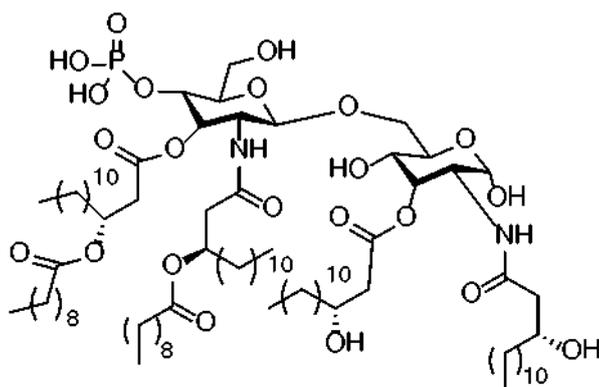
15 En ciertas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



En ciertas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



5 En ciertas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



10 Se entenderá que las emulsiones de la invención pueden incluir otros componentes necesarios o deseados para un efecto pretendido. Por ejemplo, las emulsiones de aceite en agua de la invención, en algunas realizaciones, comprenden además 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC). En algunas realizaciones, la DMPC en las emulsiones de aceite en agua es sintética. En algunas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (POPC). En algunas realizaciones, la POPC en las emulsiones de aceite en agua es sintética. En algunas realizaciones, la emulsión de aceite en agua comprende 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC). En algunas realizaciones, la DOPC en las emulsiones de aceite en agua es sintética. En otras realizaciones, las emulsiones comprenden además un tensioactivo, tal como plurónico F68. En otras realizaciones más, las emulsiones comprenden además un antioxidante, tal como vitamina E.

20 El aceite metabolizable usado en las emulsiones de la invención se puede seleccionar de cualquiera de una variedad de fuentes disponibles. En ciertas realizaciones, el aceite metabolizable comprende escualeno. En otras realizaciones, el aceite metabolizable comprende escualeno derivado de levadura. En otras realizaciones más, el aceite metabolizable comprende un isoprenoide derivado de levadura que es estructuralmente distinto del escualeno.

Por supuesto, se entenderá que las emulsiones se pueden usar en presencia de uno o más antígenos con el fin de incitar respuestas inmunes específicas de antígeno. Alternativamente, las emulsiones se pueden usar en ausencia de

antígeno con el fin de incitar una respuesta inmune no específica.

En otro aspecto, la invención proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un agonista de TLR4 seleccionado de MPL, 3D-MPL y adyuvante GLA sintético, un aceite metabolizable y DMPC o DOPC. En algunas realizaciones, la concentración de aceite metabolizable en la emulsión de aceite en agua es aproximadamente el 0,01%-20% (p. ej., aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 0,2%). En algunas realizaciones, la concentración de DMPC o DOPC en la emulsión de aceite en agua es aproximadamente el 0,002%-2%. En algunas realizaciones, el HLB de la emulsión es mayor de aproximadamente 9 o aproximadamente 10. En algunas realizaciones, la concentración de DMPC o DOPC es de aproximadamente el 0,015% al 0,25%. En algunas realizaciones, la DMPC es DOPC en la emulsión es sintética.

En una realización específica de la invención, se proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un adyuvante GLA sintético, un aceite metabolizable a una concentración de aproximadamente el 0,01%-1% v/v, y DMPC a una concentración de aproximadamente el 0,002%-2% de DMPC, en donde el HLB de la emulsión es mayor de aproximadamente 10. En algunas realizaciones, la concentración de DMPC es de aproximadamente el 0,015% al 0,25%.

La presente invención también proporciona métodos para estimular una respuesta inmune en un sujeto que comprenden administrar una emulsión de aceite en agua como se describe en la presente memoria al sujeto y, por lo tanto, estimular una respuesta inmune en el sujeto. Por supuesto, los métodos se pueden usar para incitar respuestas inmunes no específicas, en donde las emulsiones no contienen antígeno. Más típicamente, las emulsiones contendrán uno o más antígenos, de modo que la respuesta inmune es una respuesta inmune específica de antígeno.

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Además, se exponen varias referencias en la presente memoria que describen con más detalle ciertos aspectos de esta invención.

#### Breve descripción de las varias vistas del o de los dibujos

Figura 1. Concentración de GLA a lo largo del tiempo en lotes de GLA-AF, medida por HPLC-CAD. Las líneas de puntos representan los límites de especificación superior e inferior para el método de HPLC.

Figura 2. Respuestas de anticuerpos a las vacunas de PfcElTOS que contienen diversas formulaciones de adyuvantes con dosis de emulsión del 0,02% al 2% v/v de aceite, medido después de las 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> inmunizaciones. Panel superior de izquierda a derecha: titulaciones de punto final de anticuerpos (a-c) IgG, IgG1 e IgG2a medidas 3 semanas después de la 2<sup>a</sup> inmunización. Panel inferior de izquierda a derecha: titulaciones de punto final de anticuerpos (d-f) IgG, IgG1 e IgG2a medidos 3 semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización. (g) Células secretoras de anticuerpos de larga vida en la médula ósea detectadas 3 semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización.

Figura 3. Respuestas de los anticuerpos a las vacunas de PfcElTOS que contienen diversas formulaciones de adyuvantes con dosis de emulsión del 0,5% al 2% v/v de aceite, medidas después de las 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> inmunizaciones. Panel superior de izquierda a derecha: titulaciones de punto final de anticuerpos (a-c) IgG, IgG1 e IgG2a medidas 3 semanas después de la 2<sup>a</sup> inmunización. Panel inferior de izquierda a derecha: titulaciones de punto final de anticuerpos (d-f) IgG, IgG1 e IgG2a medidas 3 semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización. (g) Células secretoras de anticuerpos de larga vida en la médula ósea detectadas 3 semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización.

Figura 4. Células productoras de citoquinas específicas de antígeno detectadas por el ensayo ELISPOT 3 semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización. (a) Células productoras de IFN- $\gamma$ , (b) células productoras de IL-5.

Figura 5. Producción de citoquinas específicas de antígeno detectada 3 semanas después de la 3<sup>a</sup> inmunización mediante el ensayo de lechos multiplex (Luminex®). (a) IL-2 (b) IL-5 (c) IL-10 (d) IL-13 (e) IL-17 (f) IFN- $\gamma$  (g) TNF- $\alpha$ .

Figura 6. Tamaño de las partículas y polidispersidad de formulaciones de adyuvantes.

Figura 7. Estabilidad del tamaño de las partículas de la emulsión a diferentes temperaturas de almacenamiento. Se muestran los resultados después del almacenamiento a (a) 5 °C (gráfico superior izquierdo), (b) RT (gráfico superior derecho), (c) 37 °C (gráfico inferior izquierdo) y (d) 60 °C (gráfico inferior derecho). El tamaño de las partículas se midió usando Malvern Instruments APS, con las barras de error que representan la desviación del tamaño estándar de tres partes alícuotas separadas de un lote de cada emulsión.

Figura 8. Análisis del perfilado óptico por dispersión láser de la estabilidad de la emulsión. Perfiles de transmisión integrales de la región de 25-30 mm de cubetas que contienen emulsión, medidos durante 4 horas a 60 °C.

Figura 9. Efecto de las emulsiones en las respuestas de anticuerpos inducidas por inmunización con antígeno de malaria recombinante. Los ratones BALB/c se inmunizaron dos veces con antígeno PbCSP formulado con emulsiones que contenían PC de huevo o PC sintética, incluyendo POPC, DOPC y DMPC. La IgG (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) específicas de antígeno se determinaron mediante ELISA. n = 5 por grupo, y los datos se muestran como valores de

ratones individuales ( $\text{Log}_{10}$ ) con la barra que representa la media. \* = valor  $p < 0,05$  frente a la inmunización con proteína sola.

Figura 10. Efecto de la formulación de adyuvante en las respuestas inmunes humorales inducidas por la inmunización con la vacuna de la gripe con virus fragmentado inactivado (Fluzona). Los ratones BALB/c se inmunizaron con Fluzona formulada con emulsiones que contenían PC de huevo o PC sintética, incluyendo POPC, DOPC y DMPC. La IgG (a), IgG1 (b) e IgG2a (c) específicas de antígeno se determinaron mediante ELISA. Las células plasmáticas de médula ósea que secretan IgG frente a Fluzona se determinaron mediante ELIS-POT (d). Los resultados para (a-c) se muestran como la titulación de punto final ( $\text{Log}_{10}$ ), donde cada punto representa ratones individuales y la barra representa la media. Los resultados para (d) también representan ratones individuales en cada grupo, con la barra que representa la media de ASPC/grupo. \* = valor  $p < 0,05$  frente a la inmunización con vacuna sola y # = valor  $p < 0,05$  frente a la inmunización con la vacuna que contiene la emulsión de DMPC.

Figura 11. Las titulaciones de HI se mejoraron mediante la inmunización con Fluzona formulada con PC de huevo o PC sintéticas. Se inmunizaron ratones BALB/c con Fluzona y varias emulsiones, luego se determinaron las titulaciones de HI en suero cuatro semanas después del refuerzo, (a) titulaciones de HI frente al componente A/Islands Salomón/3/2006 (H1N1) de Fluzona. (b) Titulaciones de HI frente al componente A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) de Fluzona. Los datos se muestran como la titulación ( $\text{Log}_2$ ) para cada animal individual, con la barra que representa la media. \* = valor  $p < 0,05$  frente a la inmunización con vacuna sola y # = valor  $p < 0,05$  frente a la inmunización con la vacuna que contiene la emulsión de POPC o la emulsión de DMPC.

Figura 12. Las células productoras de IL-5 aumentan después de la inmunización con Fluzona formulada con emulsiones. Los esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con Fluzona y diversas emulsiones se estimularon bien con (a) 5 HAU de A/Islands Salomón/3/2006 (H1N1) inactivado o (b) 2 HAU de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) inactivado y células productoras de IL-5 determinadas por ELISPOT. Los datos se representan como el número de unidades formadoras de puntos (SFU) por millón de esplenocitos para ratones individuales/grupo, con la barra que representa la media,  $n = 5$  por grupo. \* = valor  $p < 0,05$  frente a la inmunización con vacuna sola y # = valor de  $< 0,05$  frente a la inmunización con la vacuna que contiene la emulsión de DMPC.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención en sus muchos aspectos proporciona composiciones de emulsión que comprenden agonistas de TLR4, particularmente emulsiones de aceite en agua que comprenden agonistas de TLR4, y métodos relacionados de uso de las mismas como composiciones de adyuvantes e inmunoestimulantes como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Como se discute en la presente memoria, las formulaciones de la invención generalmente comprenden una emulsión de aceite en agua que comprende un agonista de TLR4 y un aceite metabolizable, en donde el aceite metabolizable está presente en la emulsión de aceite en agua a una concentración de aproximadamente el 0,01%-1% v/v, o aproximadamente el 0,01%-0,5% v/v, y en donde el equilibrio hidrofóbico:lipo-fílico (HLB) de la emulsión de aceite en agua es mayor de aproximadamente 9, o mayor de aproximadamente 10, o entre aproximadamente 9-12.

Los métodos para determinar el HLB de una emulsión son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la red de redes en [firp.ula.ve/ar-chivos/historicos/76\\_Book\\_HLB\\_ICI.pdf](http://firp.ula.ve/ar-chivos/historicos/76_Book_HLB_ICI.pdf) y en [chemistscorner.com/hlb-the-easiest-way-to-create-an-emulsion/](http://chemistscorner.com/hlb-the-easiest-way-to-create-an-emulsion/).

Los adyuvantes de emulsión de aceite para uso en la presente invención pueden ser naturales o sintéticos, y pueden ser minerales u orgánicos. El experto en la técnica apreciará fácilmente ejemplos de aceites minerales y orgánicos.

En una realización particular, una composición de la invención comprende una emulsión de aceite en agua en donde el agonista de TLR4 se incorpora en la fase de aceite. Para que una composición de aceite en agua sea adecuada para la administración a seres humanos, la fase de aceite del sistema de emulsión comprende preferiblemente un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable se puede definir como "que puede de ser transformado por el metabolismo" (Dorland's illustrated Medical Dictionary, WB Saunders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite de plantas, aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no es tóxico para el receptor y puede ser transformado por el metabolismo. Los frutos secos (tal como el aceite de cacahuete), las semillas y los granos son fuentes comunes de aceites vegetales. También se pueden usar aceites sintéticos.

En ciertas realizaciones ilustrativas, las formulaciones de la presente invención comprenden un aceite metabolizable que está presente en una concentración de aproximadamente el 0,01%-1% v/v, aproximadamente el 0,01%-0,5% v/v, a aproximadamente el 0,5% v/v, o aproximadamente el 0,2% v/v. En algunas realizaciones, el aceite metabolizable está presente en una concentración inferior al 1% v/v. Los aceites metabolizables ilustrativos útiles de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, escualeno, aceite de soja, aceite de sésamo y triglicéridos de ácido caprílico/cáprico (aceite MIGLYCOL 810). En una realización preferida, el aceite metabolizable comprende escualeno. En una realización más específica, el aceite metabolizable comprende uno o más isoprenoides derivados de levaduras, tales como el escualeno derivado de levaduras o la estructura isoprenoide relacionada derivada de levaduras.

El escualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno), por ejemplo, es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en cantidades menores en el aceite de oliva, germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levadura, y es un aceite particularmente preferido para uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis del colesterol (índice de Merck, 10ª edición, entrada no. 8619).

En otras realizaciones ilustrativas, ciertas formulaciones de la invención comprenden un antioxidante. Los antioxidantes ilustrativos útiles en la emulsión de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un tocoferol y ácido ascórbico, siendo preferido un tocoferol.

En otras realizaciones ilustrativas más, ciertas emulsiones de la invención comprenden un tensioactivo. Los tensioactivos útiles de acuerdo con la presente invención son Plurónico F68, Tween 80, polisorbato 80 (CAPMUL POE-O tensioactivo con PV bajo, ABITEC Corp., Janesville, WI), polietileno 660 12-hidroxiestearato (SOLUTOL HS15, BASF Corp., Chicago, Ill.) y poloxámero 188 (copolímero de bloque PLURÓNICO Q F68, BASF Corp., Chicago, IL), colato de sodio, glicerodesoxi colato, fosfatidilcolina, siendo preferido el poloxámero 188. Otros tensioactivos adecuados incluyen esfingolípidos tales como esfingomielina y esfingosina y fosfolípidos tales como fosfatidilcolina de huevo, 1,2-Dimiristoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, L-a-Fosfatidiletanolamina y 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) o mezclas de los mismos. DPPC es aceptable para uso en seres humanos. En algunas realizaciones, el tensioactivo es DMPC, DOPC y/o POPC (incluyendo DMPC, DOPC y POPC sintéticas). Se pueden usar uno o más tensioactivos.

Además, en otras realizaciones ilustrativas más, ciertas formulaciones de la invención tienen un equilibrio hidrofóbico:lipofílico (HLB) mayor de aproximadamente 9 o mayor de aproximadamente 10 o mayor de aproximadamente 11. En otras realizaciones relacionadas, las formulaciones tienen un HLB entre aproximadamente 9-12, o entre aproximadamente 10-12, o entre aproximadamente 10-11.

En ciertas otras realizaciones ilustrativas, las formulaciones de la invención comprenden el fosfolípido 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), particularmente DMPC sintética. Además, en algunas realizaciones en donde la emulsión comprende DMPC, la emulsión no comprende un antioxidante. Aún más, en algunas realizaciones en donde la emulsión comprende DMPC, las formulaciones tienen un HLB mayor de aproximadamente 9, o mayor de aproximadamente 10, o mayor de aproximadamente 11, o tienen un HLB entre aproximadamente 9-12, aproximadamente 10-12, o aproximadamente 10-11. Cuando las formulaciones comprenden DMPC, las formulaciones generalmente no comprenden fosfatidilcolina (PC) de huevo.

Los agentes que se pueden añadir a la emulsión de la presente invención para hacer que el adyuvante sea isotónico incluyen dextrosa, glicerol, manitol, sorbitol, PEG 300, PEG 400 y polietilenglicol.

Las emulsiones de aceite ilustrativas son emulsiones de aceite en agua, y, en particular, emulsiones de escualeno en agua. Además, los adyuvantes de emulsión de aceite más preferidos de la presente invención comprenden un antioxidante, que es preferiblemente el aceite alfa-tocoferol (vitamina E, documento EP 0 382 271 B1). Los documentos WO 95/17210 y WO 99/11241 describen adyuvantes de emulsión a base de escualeno, alfa-tocoferol y TWEEN® 80, formulados opcionalmente con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL (que se discutieron anteriormente). El documento WO 99/12565 describe una mejora de estas emulsiones de escualeno con la adición de un esteroide en la fase de aceite. Además, se puede añadir un triglicérido, tal como tricaprilina (C<sub>27</sub>H<sub>50</sub>O<sub>6</sub>) a la fase de aceite con el fin de estabilizar la emulsión (documento WO 98/56414).

El tamaño de las gotitas de aceite que se encuentran dentro de la emulsión estable de aceite en agua es preferiblemente menor de 1 micrómetro, puede estar en el rango de sustancialmente 30-600 nm, preferiblemente sustancialmente alrededor de 30-500 nm de diámetro, y lo más preferiblemente sustancialmente 150-500 nm de diámetro, y, en particular, aproximadamente 150 nm de diámetro, medido por espectroscopía de correlación de fotones. A este respecto, el 80% de las gotitas de aceite en número debe estar dentro de los rangos preferidos, más preferiblemente más del 90% y lo más preferiblemente más del 95% de las gotitas de aceite en número están dentro de los rangos de tamaño definidos.

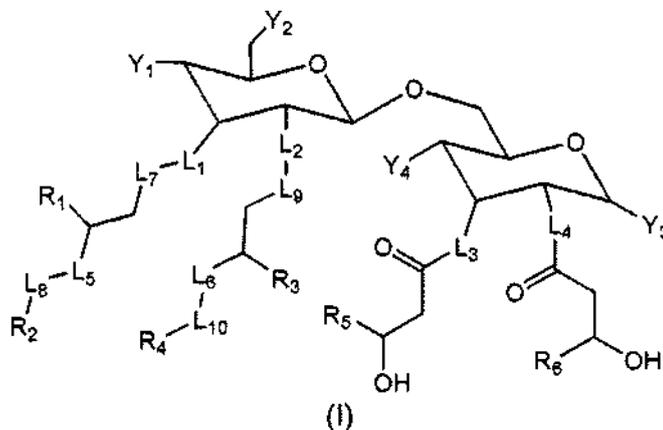
El método para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido por el experto en la técnica. Comúnmente, el método comprende mezclar la fase de aceite con un tensioactivo adecuado, tal como una disolución de PBS/TWEEN80®, seguido de homogeneización utilizando un homogeneizador. Por ejemplo, un método que comprende pasar la mezcla una, dos o más veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el proceso de emulsificación en un microfluidizador (máquina de microfluidos M110S, máximo de 50 pases, durante un período de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar)) podría adaptarse para producir volúmenes menores o mayores de emulsión. Esta adaptación podría lograrse mediante experimentación rutinaria que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se logra una preparación con gotitas de aceite del diámetro requerido.

#### Agonistas de TLR4

En ciertas realizaciones preferidas, un agonista de TLR4 usado en las formulaciones de la invención comprende un adyuvante de lípido de glucopiranosilo (GLA), tal como los descritos en las Publicaciones de Patente de EE.UU. Nos.

US2007/ 021017, US2009/045033, US2010/037466, y US 2010/0310602.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente -O-, -NH- o -(CH<sub>2</sub>)-;

L<sub>7</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub>, y L<sub>10</sub> son iguales o diferentes e independientemente ausentes o -C(=O)-;

Y<sub>1</sub> es un grupo funcional ácido;

Y<sub>2</sub> e Y<sub>3</sub> son iguales o diferentes e independientemente -OH, -SH, o un grupo funcional ácido;

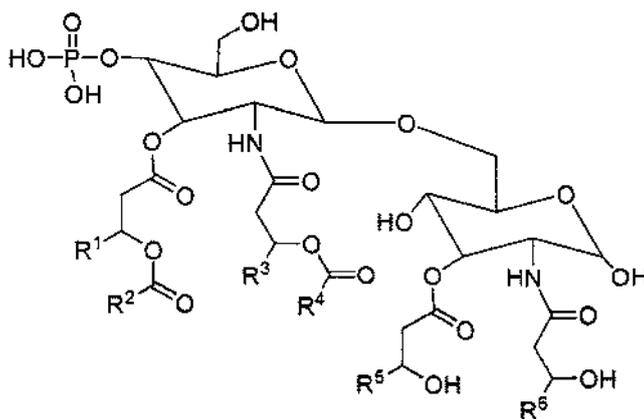
10 Y<sub>4</sub> es -OH o -SH;

R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>8-13</sub>; y

R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>6-11</sub>.

En algunas realizaciones de la estructura de GLA sintético, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>10</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>8</sub>.

15 Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



En una realización específica, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11-20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>12-20</sub>.

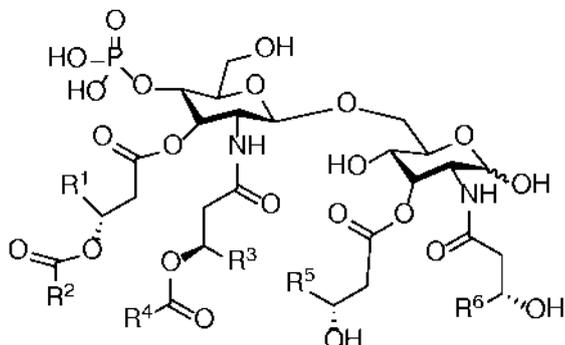
En otra realización específica, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente en donde R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>13</sub>.

20 En otra realización específica, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente en donde R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>10</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>8</sub>.

En otra realización específica, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente en donde R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11-C 20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9-C20</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo

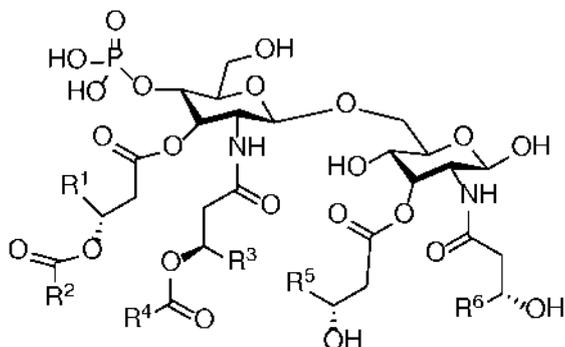
C<sub>9</sub>.

En ciertas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



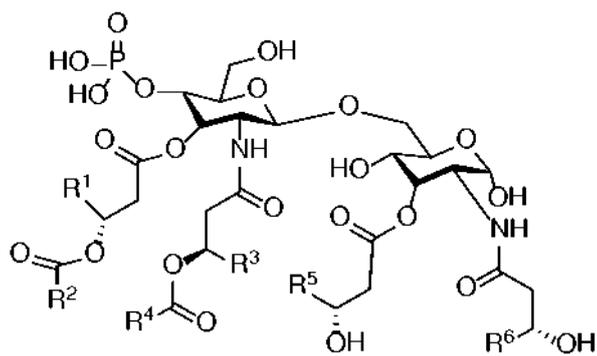
- 5 En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>.

En ciertas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



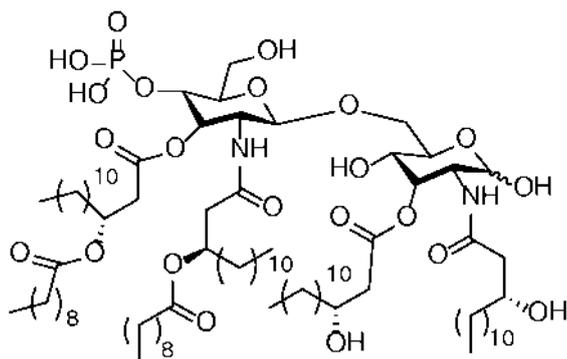
En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>.

- 10 En ciertas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:

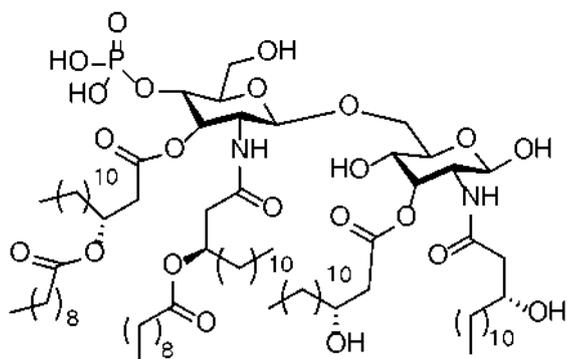


En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>.

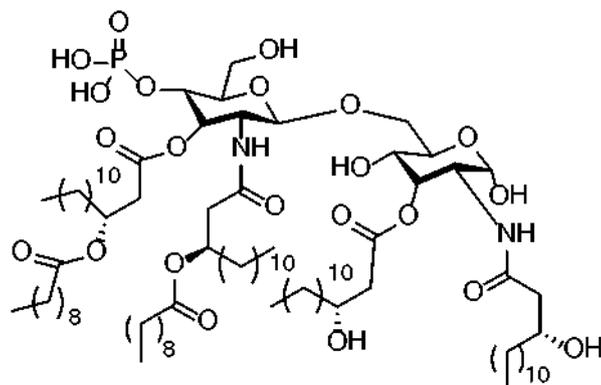
En ciertas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



En ciertas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



En ciertas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



5

En otra realización, se incorpora un derivado de lípido A atenuado (ALD) en las composiciones de la presente invención. Los ALD son moléculas similares al lípido A que se han alterado o construido para que la molécula muestre efectos adversos menores o diferentes del lípido A. Estos efectos adversos incluyen pirogenicidad, reactividad local de Shwarzman y toxicidad según se evalúa en el ensayo de dosis letal al 50% (CELD50) en embrión de pollo. Los ALD útiles de acuerdo con la presente invención incluyen monofosforil lípido A (MLA) y monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MLA). MLA y 3D-MLA son conocidos y no es necesario describirlos con detalle en la presente memoria. Véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. No. 4.436.727 expedida el 13 de marzo de 1984, asignada a Ribi ImmunoChem Research, Inc., que describe el monofosforil lípido A y su fabricación. La Pat. de EE.UU. No. 4.912.094 y el certificado de reexaminación B1 de Pat. de EE.UU. No. 4.912.094 de Myers, et al., también asignada a Ribi ImmunoChem Research, Inc., incorpora el monofosforil lípido A 3-desacilado y un método para su fabricación.

10

15

#### Antígeno

En algunas realizaciones, las formulaciones de la invención también comprenderán uno o más antígenos.

Un antígeno, para su uso en ciertas realizaciones de las composiciones de vacunas y métodos descritos en la presente memoria que emplean GLA, puede ser cualquier epítipo, molécula (incluyendo una biomolécula), complejo molecular (incluyendo complejos moleculares que contienen biomoléculas), ensamblaje subcelular, célula o tejido diana frente al que se desea una incitación o potenciación de la inmunorreactividad en un sujeto. Con frecuencia, el término

20

antígeno se referirá a un antígeno polipeptídico de interés. Sin embargo, el antígeno, tal y como se usa en la presente memoria, también puede referirse a una construcción recombinante que codifica un antígeno polipeptídico de interés (p. ej., una construcción de expresión). En ciertas realizaciones preferidas, el antígeno puede ser, o puede derivar de, o puede reaccionar inmunológicamente de manera cruzada con, un patógeno infeccioso y/o un epítipo, biomolécula, célula o tejido que está asociado con infección, cáncer, enfermedad autoinmune, alergia, asma o cualquier otra afección en la que la estimulación de una respuesta inmune específica de antígeno sea deseable o beneficiosa.

Preferiblemente y en ciertas realizaciones, las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen un antígeno o composición antigénica capaz de incitar una respuesta inmune frente a un patógeno humano o de otro mamífero, antígeno o composición antigénica que puede incluir una composición derivada de un virus tal como de VIH-1, (tal como tat, nef, gp120 o gp160), virus del herpes humano, tal como gD o sus derivados o proteína Inmediata Temprana tal como ICP27 de HSV1 o HSV2, citomegalovirus (esp. Humano) (tal como gB o derivados del mismo), Rotavirus (incluyendo los virus vivos atenuados), virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), virus de Varicela Zóster (tal como gpl, Il y IE63), o de un virus de hepatitis tal como el virus de la hepatitis B (por ejemplo, el antígeno de superficie de la hepatitis B o un derivado del mismo), el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis E, o de otros patógenos virales, tales como los paramixovirus: virus sincitial respiratorio (tales como las proteínas F y G o derivados del mismo), virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo, HPV6, 11, 16, 18, etc.), flavivirus (p. ej., virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la gripe (virus vivo completo o inactivado, virus de la gripe fragmentado, crecidos en huevos o células MDCK, o virosomas de la gripe completos (como lo describe Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como las proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas).

En ciertas otras realizaciones preferidas, las formulaciones de vacunas de la presente invención contienen un antígeno o composición antigénica capaz de incitar una respuesta inmune frente a un patógeno humano o de otro mamífero, antígeno o composición antigénica que puede incluir una composición derivada de uno o más patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina pertussis o derivados de la misma, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo, ESAT6, Antígeno 85A, B o C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina lábil al calor o derivados de la misma, toxina estable al calor o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina semejante a la toxina shiga como o derivados de los mismos); *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo, toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina vacuoladora); *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina tetánica y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas de clostridium A o B y derivados de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina de la difteria y derivados de la misma); *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la Ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.* incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo, las proteínas de membrana externa raras), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; u otros patógenos bacterianos.

En ciertas otras realizaciones preferidas, las formulaciones de vacunas de la presente invención contienen un antígeno o composición antigénica capaz de incitar una respuesta inmune frente a un patógeno humano o de otro mamífero, antígeno o composición antigénica que puede incluir una composición derivada de uno o más parásitos (véase, p. ej., John, DT y Petri, WA, Markell and Voge's Medical Parasitology-9ª Ed., 2006, WB Saunders, Filadelfia; Bowman, DD, Georgis' Parasitology for Veterinarians-8ª Ed., 2002, WB Saunders, Filadelfia) tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia* *Leshmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; o de un helminto capaz de infectar a un mamífero, tal como: (i) infecciones por nematodos (incluyendo, pero no limitadas a, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Dracunculus medinensis*,

*Trichinella spiralis* y *Strongyloides stercoralis*); (ii) infecciones por trematodos (incluyendo, pero no limitadas a, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Opisthorchis sinensis*, *Paragonimus sp.*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola magna*, *Fasciola gigantica*); y (iii) infecciones por céstodos (incluyendo, pero no limitadas a, *Taenia saginata* y *Taenia solium*). Por lo tanto, ciertas realizaciones pueden contemplar composiciones de vacunas que incluyen un antígeno derivado de *Schistosoma spp.*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* y/o *Schistosoma japonicum*, o derivado de levaduras tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son, por ejemplo, Th Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (documento WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas donde al menos dos, preferiblemente tres, polipéptidos de *M. tuberculosis* se fusionan en una proteína mayor. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99151748). Otros antígenos que se pueden usar incluyen antígenos, combinación de antígenos y proteínas de fusión descritos en los documentos US 2010/0129391 y WO 2008/124647.

Los antígenos más preferidos para *Chlamydia* incluyen, por ejemplo, la proteína de alto peso molecular (HWMP) (documento WO 99/17741), ORF3 (documento EP 366 412) y proteínas de membrana potenciales (Pmp). Otros antígenos de *Chlamydia* de la formulación de vacuna pueden seleccionarse del grupo descrito en el documento WO 99128475. Las vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y la proteína antigénica Pneumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y derivados detoxificados mutantes de los mismos (documento WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo, PRP y conjugados del mismo), *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria (Pat. de EE.UU. No. 5.843.464) o variantes de copia múltiple o proteínas de fusión de los mismos.

Los derivados del antígeno de superficie de la hepatitis B son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, los antígenos PreS1, Pars2 S descritos en las solicitudes de patente europea EP-A414 374; EP-A-0304 578, y EP 198474. En un aspecto preferido, la formulación de vacuna de la invención comprende el antígeno de VIH-1, gp120, especialmente cuando se expresa en células CHO. En una realización adicional, la formulación de vacuna de la invención comprende gD2t como se definió anteriormente en la presente memoria.

En una realización preferida de la presente invención, las vacunas que contienen el adyuvante reivindicado comprenden el antígeno derivado del Virus del Papiloma Humano (HPV) que se considera responsable de las verrugas genitales (HPV 6 o HPV 11 y otros), y los virus del HPV responsables del cáncer de cuello uterino (HPV16, HPV18 y otros). Las formas particularmente preferidas de la vacuna profiláctica o terapéutica de verrugas genitales comprenden partículas o capsómeros L1, y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de las proteínas E6, E7, L1 y L2 de HPV 6 y HPV 11. Ciertas formas preferidas de proteína de fusión incluyen L2E7 como se describe en el documento WO 96/26277, y la proteína D(1/3)-E7 descrita en el documento GB 9717953.5 (PCT/EP98/05285). Una composición de vacuna preferida, de profilaxis o terapéutica, de HPV para la infección o cáncer del cuello uterino, puede comprender los antígenos HPV 16 o 18. Por ejemplo, los monómeros de antígeno L1 o L2, o los antígenos L1 o L2 se presentan conjuntamente como una partícula similar a virus (VLP) o la proteína L1 sola presentada sola en una estructura de VLP o de capsómero. Dichos antígenos, partículas similares a virus y capsómero son conocidos por sí mismos. Véanse, por ejemplo, los documentos WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792 y WO93/02184.

Pueden incluirse proteínas tempranas adicionales solas o como proteínas de fusión tales como E7, E2 o preferiblemente F5, por ejemplo; las realizaciones particularmente preferidas incluyen una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (documento WO 96/11272). Los antígenos de HPV 16 particularmente preferidos comprenden las proteínas tempranas E6 o F7 en fusión con un vehículo de proteína D para formar fusiones de Proteína D-E6 o E7 a partir de HPV 16, o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (documento WO 96/26277). Alternativamente, las proteínas tempranas E6 y E7 del HPV 16 o 18, pueden presentarse en una sola molécula, preferiblemente una fusión de Proteína D-E6/E7. Dicha vacuna puede contener opcionalmente una o ambas proteínas E6 y E7 de HPV 18, preferiblemente en forma de una proteína de fusión de Proteína D-E6 o Proteína D-E7 o proteína de fusión Proteína D E6/E7. La vacuna de la presente invención puede comprender adicionalmente antígenos de otras cepas de HPV, preferiblemente de las cepas HPV 31 o 33.

Las vacunas de la presente invención comprenden además antígenos derivados de parásitos que causan la malaria. Por ejemplo, los antígenos preferidos de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS, S y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la porción C-terminal de la proteína de circunsporozoítos (CS) de *P. falciparum* unida a través de cuatro aminoácidos de la porción preS2 del antígeno de superficie de la hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de la hepatitis B. Su estructura completa se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP92/02591, publicada como WO 93/10152 que reivindica la prioridad de la solicitud de patente del Reino Unido No. 9124390.7. Cuando se expresa en levaduras, RTS se produce como una partícula de lipoproteínas, y cuando se coexpresa con el antígeno S del HBV produce una partícula mixta conocida como RTS,S.

Los antígenos TRAP se describen en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/GB89/00895 publicada como WO 90/01496. Una realización preferida de la presente invención es una vacuna frente a la malaria en donde la preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de plasmodios que son probables candidatos a ser componentes de una vacuna en múltiples etapas frente a la malaria son MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PFXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 de *P. falciparum* y sus análogos en *Plasmodium* spp.

Por consiguiente, cierta realización descrita en la presente memoria contempla un antígeno que deriva de al menos un patógeno infeccioso tal como una bacteria, un virus o un hongo, incluyendo un Actinobacterium tal como *M. tuberculosis* o *M. leprae* u otra micobacteria; una bacteria tal como un miembro del género *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Chlamydia* o *Bordetella*; un virus tal como el virus del herpes simple, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el citomegalovirus, el virus de la varicela zóster, el virus de la hepatitis, el virus de Epstein Barr (EBV), el virus sincitial respiratorio, el virus del papiloma humano (HPV) y un citomegalovirus; VIH tal como VIH-1 o VIH-2; un hongo tal como *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* y *Pneumocystis* o una levadura, incluyendo las especies de *Candida* tales como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*; un parásito tal como un protozoo, por ejemplo, una especie de *Plasmodium* incluyendo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; u otro parásito tal como uno o más de *Acanthamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Angiostrongylus*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Cryptosporidium*, *Ancylostoma*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Wuchereria bancrofti*, *Giardia*, y *Leishmania*.

Por ejemplo, en realizaciones de vacunas que contienen GLA que contienen antígenos derivados de *Borrelia* sp., los antígenos pueden incluir ácido nucleico, antígeno o preparaciones antigénicas derivados del patógeno, proteínas o péptidos producidos de forma recombinante y proteínas de fusión quiméricas. Uno de dichos antígenos es OspA. El OspA puede ser una proteína madura completa en forma lipídada en virtud de su biosíntesis en una célula huésped (Lipo-OspA) o, alternativamente, puede ser un derivado no lipídado. Dichos derivados no lipídados incluyen la proteína de fusión NS1-OspA no lipídada que tiene los primeros 81 aminoácidos N-terminales de la proteína no estructural (NS1) del virus de la influenza y la proteína OspA completa, y otra, MDP OspA es una forma no lipídada de OspA que porta 3 aminoácidos N-terminales adicionales.

En la técnica se conocen las composiciones y los métodos para identificar a sujetos que tienen, o se sospecha que están en riesgo de tener, una infección con un patógeno infeccioso como se describe en la presente memoria.

Por ejemplo, la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* causa tuberculosis (TB). Las bacterias generalmente atacan los pulmones, pero también pueden atacar el riñón, la columna vertebral y el cerebro. Si no se trata adecuadamente, la enfermedad TB puede ser mortal. La enfermedad se disemina de una persona a otra en el aire cuando una persona infectada estornuda o tose. En 2003, se reportaron más de 14.000 casos de TB en los Estados Unidos.

Aunque la tuberculosis generalmente se puede controlar con una terapia antibiótico prolongada, dicho tratamiento no es suficiente para prevenir la diseminación de la enfermedad y existen preocupaciones con respecto a la selección potencial de cepas resistentes a los antibióticos. Los individuos infectados pueden ser asintomáticos, pero contagiosos, durante algún tiempo. Además, aunque el cumplimiento con el régimen de tratamiento es crítico, el comportamiento del paciente es difícil de monitorizar. Algunos pacientes no completan el curso del tratamiento, lo que puede dar lugar a un tratamiento inefectivo y al desarrollo de resistencia a los fármacos. (p. ej., Patente de EE.UU. 7.087.713)

Actualmente, la vacunación con bacterias vivas es el método más eficiente para inducir inmunidad protectora frente a la tuberculosis. El *Mycobacterium* más común empleado para este propósito es el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), una cepa avirulenta de *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, la seguridad y eficacia de BCG es una fuente de controversia y algunos países, tal como los Estados Unidos, no vacunan al público en general. El diagnóstico se logra comúnmente mediante una prueba cutánea, que implica la exposición intradérmica a la PPD de tuberculina (derivado purificado de proteínas). Las respuestas de células T específicas de antígeno dan como resultado una induración mensurable en el sitio de la inyección a las 48-72 horas después de la inyección, lo que indica la exposición a antígenos micobacterianos. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad han sido un problema con este ensayo, y los individuos vacunados con BCG no pueden distinguirse de los individuos infectados. (p. ej., Patente de EE.UU. 7.087.713)

Si bien se ha demostrado que los macrófagos actúan como los principales efectores de la inmunidad frente a *M. tuberculosis*, las células T son los inductores predominantes de dicha inmunidad. El papel esencial de las células T en la protección frente a la infección por *M. tuberculosis* se ilustra por la aparición frecuente de *M. tuberculosis* en pacientes con SIDA, debido a la depleción de las células T CD4 asociadas con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se ha demostrado que las células T CD4 reactivas a *Mycobacterium* son potentes productoras de interferón gamma (IFN-gamma), que, a su vez, se ha demostrado que desencadena los efectos antimicobacterianos de los macrófagos en ratones. Si bien el papel de IFN-gamma en los seres humanos es menos claro, los estudios han mostrado que la 1,25-dihidroxivitamina D3, ya sea sola o en combinación con IFN-gamma o factor de necrosis tumoral alfa, activa a los macrófagos humanos para inhibir la infección por *M. tuberculosis*. Además, se sabe que el IFN-gamma estimula a los macrófagos humanos para producir 1,25-dihidroxi-vitamina D3. De manera similar, se ha mostrado que la IL-12 desempeña un papel en la estimulación de la resistencia a la infección por *M.*

tuberculosis. Para una revisión de la inmunología de la infección por *M. tuberculosis*, véase Chan y Kaufmann, en *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, Bloom (ed.), ASM Press. Washington, DC (1994).

5 Los compuestos y los métodos existentes para diagnosticar la tuberculosis o para inducir inmunidad protectora frente a la tuberculosis incluyen el uso de polipéptidos que contienen al menos una porción inmunogénica de una o más proteínas de *Mycobacterium* y moléculas de ADN que codifican dichos polipéptidos. Se pueden usar kits de diagnóstico que contienen dichos polipéptidos o secuencias de ADN y un reactivo de detección adecuado para la detección de la infección por *Mycobacterium* en pacientes y muestras biológicas. También se proporcionan anticuerpos dirigidos frente a dichos polipéptidos. Además, dichos compuestos pueden formularse en vacunas y/o composiciones farmacéuticas para la inmunización frente a la infección por *Mycobacterium*. (Patentes de EE.UU. Nos. 6.949.246 y 6.555.653).

10 La malaria se eliminó en muchas partes del mundo en la década de 1960, pero la enfermedad aún persiste y están surgiendo nuevas cepas de la enfermedad que son resistentes a los fármacos existentes. La malaria es un importante problema de salud pública en más de 90 países. Nueve de cada diez casos de malaria ocurren en el África subsahariana. Más de un tercio de la población mundial está en riesgo, y entre 350 y 500 millones de personas se infectan con malaria cada año. Cuarenta y cinco millones de mujeres embarazadas corren el riesgo de contraer malaria este año. De los individuos que ya están infectados, más de 1 millón de los infectados mueren cada año por una enfermedad que se puede prevenir. La mayoría de esas muertes son niños en África.

15 La malaria generalmente se transmite cuando una persona es picada por un mosquito *Anopheles* hembra infectado. Para la transmisión, el mosquito tiene que infectarse al extraer sangre de una persona ya infectada con malaria. La malaria está causada por un parásito y los síntomas clínicos de la enfermedad incluyen fiebre y enfermedad similar a la gripe, tal como escalofríos, dolor de cabeza, dolores musculares y cansancio. Estos síntomas pueden estar acompañados de náuseas, vómitos y diarrea. La malaria también puede causar anemia e ictericia debido a la pérdida de glóbulos rojos. La infección con un tipo de malaria, *Plasmodium falciparum*, si no se trata de inmediato, puede causar insuficiencia renal, convulsiones, confusión mental, coma y muerte.

20 Se conoce un método de diagnóstico in vitro para la malaria en un individuo, que comprende poner un tejido o un fluido biológico tomado de un individuo en contacto con una molécula o composición polipeptídica, en donde dicha molécula o composición polipeptídica comprende una o más secuencias peptídicas que portan todo o parte de uno o más epítomos T de las proteínas resultantes de la actividad infecciosa de *P. falciparum*, en condiciones que permiten que se produzca una reacción inmunológica in vitro entre dicha composición y los anticuerpos que pueden estar presentes en el tejido o fluido biológico, y la detección in vitro de los complejos antígeno-anticuerpo formados (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. 7.087.231).

25 Se ha descrito la expresión y la purificación de un ectodominio de AMA-1 recombinante *Plasmodium falciparum* (3D7). Los métodos anteriores han producido una proteína altamente purificada que retiene el plegamiento y la formación de puentes disulfuro de la molécula nativa. El AMA-1 recombinante es útil como reactivo de diagnóstico, así como en la producción de anticuerpos, y como una proteína para su uso sola o como parte de una vacuna para prevenir la malaria. (Patente de EE.UU. 7.029.685)

30 En la técnica se han descrito polinucleótidos que codifican antígenos del péptido de la malaria *P. vivax* específicos de la especie que son proteínas o fragmentos de proteínas secretados en el plasma de un huésped mamífero susceptible después de la infección, al igual que anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos frente a estos antígenos. Los antígenos peptídicos, los anticuerpos monoclonales y/o los anticuerpos policlonales se utilizan en los ensayos usados para diagnosticar la malaria, así como para determinar si *Plasmodium vivax* es la especie responsable de la infección. (Patente de EE. UU. 6.706.872) También se han reportado antígenos del péptido de la malaria de *P. vivax* específicos de especie, que son proteínas o fragmentos de proteínas secretados en el plasma de un huésped mamífero susceptible después de la infección, al igual que anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos frente a estos antígenos. Los antígenos peptídicos, los anticuerpos monoclonales y/o los anticuerpos policlonales se utilizan en los ensayos usados para diagnosticar la malaria, así como para determinar si *Plasmodium vivax* es la especie responsable de la infección (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. 6.231.861).

35 Un ectodominio de AMA-1 recombinante de *Plasmodium falciparum* (3D7) también se ha expresado mediante un método que produce una proteína altamente purificada que retiene el plegamiento y la formación de puentes disulfuro de la molécula nativa. El AMA-1 recombinante es útil como reactivo de diagnóstico, para uso en la producción de anticuerpos y como una vacuna. (Patente de EE.UU. 7.060.276). De forma similar, se conoce la expresión y purificación de un MSP-1<sub>42</sub> de *Plasmodium falciparum* recombinante (3D7), que retiene el plegamiento y la formación de puentes disulfuro de la molécula nativa. El MSP-1<sub>42</sub> recombinante es útil como reactivo de diagnóstico, para uso en la producción de anticuerpos y como una vacuna. (Patente de EE.UU. 6.855.322)

55 Los métodos de diagnóstico para la detección de infecciones de malaria en seres humanos para identificar a un sujeto que tiene o se sospecha que está en riesgo de tener una infección con un patógeno infeccioso de la malaria son, por lo tanto, conocidos de acuerdo con estas y otras descripciones relacionadas. Específicamente, por ejemplo, las muestras de sangre se combinan con un reactivo que contiene dinucleótido de adenina 3-acetilpiridina (APAD), un sustrato (p. ej., una sal de lactato o ácido láctico) y un tampón. El reactivo está diseñado para detectar la presencia de

una enzima glucolítica única producida por el parásito de la malaria. Esta enzima se conoce como deshidrogenasa del ácido láctico del parásito (PLDH). La PLDH se distingue fácilmente de la LDH del huésped usando el reactivo descrito anteriormente. La combinación del reactivo con una muestra de sangre parasitada da como resultado la reducción de APAD. Sin embargo, la APAD no se reduce por la LDH del huésped. La APAD reducida puede detectarse entonces mediante diversas técnicas, incluyendo análisis espectral, fluorimétrico, electroforético o colorimétrico. La detección de la APAD reducida de la manera anterior proporciona una indicación positiva de infección por malaria (p. ej., Patente de EE. UU. 5.124.141). En otra metodología para diagnosticar la malaria, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos característica derivado del antígeno GLURP de Plasmodium falciparum, es reconocido en una muestra de ensayo por un anticuerpo específico generado frente a o reactivo con el polipéptido. (Patente de EE.UU. 5.231.168).

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria generalizada con epidemias frecuentes en el subcontinente indio, África y América Latina, y es una prioridad de la Organización Mundial de la Salud para el desarrollo de vacunas. Un complejo de diferentes enfermedades, los parásitos de Leishmania causan infecciones mortales de los órganos internos, así como enfermedades graves de la piel. Una de las formas más devastadoras de la leishmaniasis es una infección desfigurante de la nariz y la boca. El número de casos de leishmaniasis está aumentando, y ahora está fuera de control en muchas áreas. La leishmaniasis también está aumentando en algunos países desarrollados, específicamente en el sur de Europa como resultado de la infección por VIH. Los fármacos disponibles son tóxicos, caros y requieren inyecciones diarias a largo plazo.

Leishmania son parásitos protozoarios que habitan en los macrófagos o las células blancas de la sangre del sistema inmune. Los parásitos se transmiten por la picadura de pequeños insectos chupadores de sangre (moscas de la arena), que son difíciles de controlar, ya que habitan en vastas áreas del planeta.

La leishmaniasis visceral es la más peligrosa de las tres manifestaciones de la enfermedad. Se estima que cada año se producen aproximadamente 500.000 casos nuevos de la forma visceral (kala-azar o "la enfermedad mortal"). Más de 200 millones de personas están actualmente en riesgo de contraer leishmaniasis visceral. Más del 90 por ciento de los casos de leishmaniasis visceral ocurren en India, Bangladesh, Sudán, Brasil y Nepal. La mayoría de las muertes ocurren en niños. Aquellos con las formas cutáneas suelen quedar desfigurados permanentemente.

Las infecciones por Leishmania son difíciles de diagnosticar y típicamente implican el análisis histopatológico de muestras de biopsia de tejido. Sin embargo, se han desarrollado varios ensayos de diagnóstico serológico e inmunológico. (Patente de EE.UU. 7.008.774; Senaldi et al., (1996) J. Immunol. Methods 193: 9 5; Zijlstra, et al., (1997) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91: 671 673; Badaro, et al., (1996) J. Inf. Dis. 173: 758 761; Choudhary, S., et al., (1992) J. Comm. Dis. 24:32 36; Badaro, R., et al., (1986) Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:72 78; Choudhary, A., et al., (1990) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 363 366; y Reed, S.G., et al., (1990) Am. J. Trop. Med. Hyg. 43: 632 639). Los promastigotes liberan productos metabólicos en el medio de cultivo para producir un medio condicionado. Estos productos metabólicos son inmunogénicos para el huésped. Véase, Schnur, L.F., et al., (1972) Isrl. J. Med. Sci. 8: 932 942; Sergeiev, V.P., et al., (1969) Med. Parasitol. 38: 208 212; ElOn, J., et al., (1979) Exper. Parasitol. 47: 254 269; y Bray, R.S., et al., (1966) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60: 605 609; Pat. de EE.UU. No. 6.846.648, Pat. de EE.UU. 5.912.166; Pat. de EE.UU. 5.719.263; Pat. de EE.UU. 5.411.865).

Aproximadamente 40 millones de personas en todo el mundo están infectadas con el VIH, el virus que causa el SIDA. Alrededor de 3 millones de personas mueren de la enfermedad cada año, el 95 por ciento de ellas en el mundo en desarrollo. Cada año, cerca de 5 millones de personas se infectan con el VIH. Actualmente, el África subsahariana tiene la mayor carga de la enfermedad, pero se está extendiendo rápidamente a otros países tales como India, China y Rusia. La epidemia está creciendo más rápidamente entre las poblaciones minoritarias. En los Estados Unidos se han reportado más de 950.000 casos de SIDA desde 1981. El SIDA afecta a las personas durante sus años más productivos. Las mujeres, tanto por razones biológicas como sociales, tienen un mayor riesgo de contraer VIH/SIDA.

El SIDA está causado por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que mata y daña las células del sistema inmune del cuerpo y destruye progresivamente la capacidad del cuerpo para combatir infecciones y ciertos tipos de cáncer. El VIH se disemina lo más comúnmente al tener relaciones sexuales sin protección con una pareja infectada. La solución más robusta al problema es evitar que el virus se disemine. Hacer una vacuna frente al VIH segura, efectiva y asequible es una forma de alcanzar este objetivo. En todo el mundo, menos de una de cada cinco personas con alto riesgo de infección por VIH tiene acceso a una prevención efectiva.

Se conocen métodos para diagnosticar infecciones por el VIH, incluyendo mediante el cultivo del virus, PCR de secuencias de ácido nucleico definitivas de muestras de pacientes y ensayos de anticuerpos para detectar la presencia de anticuerpos anti-VIH en sueros de pacientes (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. Nos. 6.979.535, 6.544.728, 6.316.183, 6.261.762, 4.743.540).

De acuerdo con ciertas otras realizaciones como se describe en la presente memoria, las composiciones de vacuna y las formulaciones relacionadas y los métodos de uso pueden incluir un antígeno que deriva de una célula cancerosa, ya que puede ser útil para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación de adyuvante puede encontrar utilidad con los antígenos de rechazo de tumores, tales como aquellos para los cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, páncreas, riñón o melanoma. Los antígenos del cáncer o derivados de células cancerosas ejemplares incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 u otros antígenos MAGE tales como los descritos en el documento

WO99/40188, PRAME, BAGE, Lage (también conocido como NY Eos 1) SAGE y HAGE (documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996 *Current Opinions in Immunology* 8, p. 628-636; Van den Eynde et al., *International Journal of Clinical & Laboratory Research* (1997 y 1998); Correale et al., (1997), *Journal of the National Cancer Institute* 89, p. 293. Estos ejemplos no limitantes de antígenos del cáncer se expresan en un amplio rango de tipos de tumores, tales como el melanoma, el carcinoma de pulmón, el sarcoma y el carcinoma de vejiga. Véase, p. ej., la Patente de EE.UU. No. 6.544.518.

Otros antígenos específicos de tumores son adecuados para su uso con GLA de acuerdo con ciertas realizaciones actualmente descritas que incluyen, pero no están restringidos a, gangliósidos específicos de tumores o asociados a tumores tales como GM<sub>2</sub> y GM<sub>3</sub> o conjugados de los mismos con proteínas transportadoras; o un antígeno para uso en una composición de vacuna GLA para incitar o potenciar una respuesta inmune anticancerosa puede ser una autohormona peptídica tal como la hormona liberadora de hormona gonadotropina de longitud completa (GnRH, documento WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, útil en el tratamiento de muchos cánceres. En otra realización, se usan antígenos de próstata, tales como el antígeno específico de la próstata (PSA), PAP, PSCA (p. ej., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (4) 1735-1740 1998), PSMA o, en una realización preferida, un antígeno conocido como Prostasa. (p. ej., Nelson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96: 3114-3119; Ferguson, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 3114-3119; documento WO 98/12302; Pat. de EE.UU. No. 5.955.306; documento WO 98/20117; Pat. de EE.UU. Nos. 5.840.871 y 5.786.148; documento WO 00/04149. Se conocen otros antígenos específicos de la próstata a partir del documento WO 98/137418 y el documento WO/004149. Otro es STEAP (PNAS 96 14523 14528 7-12 1999).

Otros antígenos asociados a tumores útiles en el contexto de la presente invención incluyen: Plu-1 (*J Biol. Chem* 274 (22) 15633-15645, 1999), HASH-1, HasH-2, Cripto (Salomon et al. *Bioessays* 199, 21: 61-70, Pat. de EE.UU. No. 5.654.140) y Criptina (Pat. de EE.UU. No. 5.981.215). Además, los antígenos particularmente relevantes para las vacunas en la terapia del cáncer también comprenden tirosinasa y survivina.

Las realizaciones descritas en la presente memoria que pertenecen a composiciones de vacunas que contienen GLA que comprenden un antígeno de cáncer serán útiles frente a cualquier cáncer caracterizado por la expresión de antígenos asociados a tumores, tales como la expresión de HER-2/neu u otros antígenos específicos de cáncer o asociados a cáncer.

El diagnóstico del cáncer en un sujeto que tiene o se sospecha que está en riesgo de tener cáncer puede realizarse mediante cualquiera de un amplio rango de metodologías aceptadas en la técnica, que pueden variar dependiendo de una variedad de factores, incluyendo la presentación clínica, el grado de progresión del cáncer, el tipo de cáncer, y otros factores. Los ejemplos de diagnósticos del cáncer incluyen el examen histopatológico, histocitoquímico, inmunohistocitoquímico e inmunohistopatológico de muestras de pacientes (p. ej., sangre, biopsia de piel, otra biopsia de tejido, muestras quirúrgicas, etc.), ensayos de PCR para marcadores genéticos definidos (p. ej., ácido nucleico), ensayos de serología para detectar antígenos asociados con cáncer circulantes o células que portan dichos antígenos, o para detectar anticuerpos de especificidad definida, u otras metodologías con las que estarán familiarizados los expertos en la técnica. Véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. Nos. 6.734.172; 6.770.445; 6.893.820; 6.979.730; 7.060.802; 7.030.232; 6.933.123; 6.682.901; 6.587.792; 6.512.102; 7.078.180; 7.070.931; JP5-328975; Waslylyk et al., 1993 *Eur. J Bioch.* 211 (7): 18.

Las composiciones de vacunas y los métodos de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención también pueden usarse para la profilaxis o terapia de enfermedades autoinmunes, que incluyen enfermedades, afecciones o trastornos en los que el sistema inmune de un huésped o sujeto media de manera perjudicial una respuesta inmune que se dirige frente a tejidos, células, biomoléculas (p. ej., péptidos, polipéptidos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, proteolípidos, lípidos, glicolípidos, ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, oligosacáridos, polisacáridos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos o similares, y otros componentes moleculares de las células y tejidos del sujeto) "propios" o epítomos (p. ej., estructuras de reconocimiento inmunológicamente definidas específicas, tales como aquellas reconocidas por una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del anticuerpo o por una CDR del receptor de células T.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan así por una respuesta inmune anormal que implica a células o anticuerpos, que en ambos casos se dirigen frente a tejidos autólogos normales. Las enfermedades autoinmunes en mamíferos generalmente pueden clasificarse en una de dos categorías diferentes: enfermedad mediada por células (es decir, células T) o trastornos mediados por anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunes mediadas por células incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus tipo I (diabetes de aparición juvenil) y uvetinitis autoinmune. Los trastornos autoinmunitarios mediados por anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (o LES), enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, asma autoinmune, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, esclerosis biliar primaria y anemia perniciosa. El o los antígenos asociados con: el lupus eritematoso sistémico son pequeñas proteínas del ácido ribonucleico nuclear (snRNP); la enfermedad de Graves es el receptor de tirotropina, tiroglobulina y otros componentes de las células epiteliales de la tiroides (Akamizu et al., 1996; Kellerman et al., 1995; Raju et al., 1997; y Texier et al., 1992); el pénfigo es antígenos del pénfigo similares a la cadherina, tales como desmogleína 3 y otras moléculas de adhesión (Memar et al., 1996; Stanley, 1995; Plott et al., 1994; y Hashimoto, 1993); y la púrpura trombocitopénica trombótica son antígenos de las plaquetas. (Véase, p. ej., la

Patente de EE.UU. 6.929.796; Gorski et al. (Eds.), *Autoimmunity*, 2001, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA; Radbruch y Lipsky, P.E. (Eds.) *Current Concepts in Autoimmunity and Chronic Inflammation (Curr. Top. Microbiol. and Immunol.)* 2001, Springer, NY.)

5 La autoinmunidad desempeña un papel en más de 80 enfermedades diferentes, incluyendo la diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, lupus, artritis reumatoide, escleroderma y enfermedades de la tiroides. Faltan estimaciones cuantitativas vigorosas de morbilidad para la mayoría de las enfermedades autoinmunes. Los estudios más recientes realizados a finales de la década de 1990 revelan que las enfermedades autoinmunes son la tercera enfermedad importante más común en los Estados Unidos; y las enfermedades autoinmunes más comunes afectan a más de 8,5 millones de estadounidenses. Las estimaciones actuales de la prevalencia de la enfermedad varían del 5 al 8 por ciento de la población de los Estados Unidos. La mayoría de las enfermedades autoinmunes afectan desproporcionadamente a las mujeres. Las mujeres son 2,7 veces más propensas que los hombres para adquirir una enfermedad autoinmune. Las mujeres son más susceptibles a las enfermedades autoinmunes; los hombres parecen tener niveles más altos de actividad de células asesinas naturales que las mujeres. (Jacobsen et al, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 84: 223-243, 1997.)

15 Las enfermedades autoinmunes se producen cuando el sistema inmune confunde los tejidos propios con los no propios y monta un ataque inapropiado. El cuerpo puede verse afectado de diferentes formas por las enfermedades autoinmunes, incluyendo, por ejemplo, el intestino (enfermedad de Crohn) y el cerebro (esclerosis múltiple). Se sabe que un autoanticuerpo ataca a las células propias o a los tejidos propios para lesionar su función y como resultado causa enfermedades autoinmunes, y que el autoanticuerpo puede detectarse en el suero del paciente antes de la aparición real de una enfermedad autoinmune (p. ej., aparición de signos y síntomas clínicos). Por lo tanto, la detección de un autoanticuerpo permite el descubrimiento o reconocimiento temprano de la presencia o riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune. Sobre la base de estos descubrimientos, se ha descubierto una variedad de autoanticuerpos frente a autoantígenos y los autoanticuerpos frente a autoantígenos se han medido en ensayos clínicos (p. ej., Patente de EE.UU. 6.919.210, 6.596.501, 7.012.134, 6.919.078), mientras que otros diagnósticos autoinmunes pueden implicar la detección de un metabolito relevante (p. ej., Patente de EE.UU. No. 4.659.659) o la reactividad inmunológica (p. ej., Pat. de EE.UU. Nos. 4.614.722 y 5.147.785, 4.420.558, 5.298.396, 5.162.990, 4.420.461, 4.595.654, 5.846.758, 6.660.487).

30 En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención serán particularmente aplicables en el tratamiento de los ancianos y/o los inmunosuprimidos, incluyendo sujetos en diálisis renal, sujetos en quimioterapia y/o radioterapia, receptores de trasplantes y similares. Dichos individuos generalmente presentan respuestas inmunes disminuidas frente a las vacunas y, por lo tanto, el uso de las composiciones de la invención puede potenciar las respuestas inmunes logradas en estos sujetos.

35 En otras realizaciones, el antígeno o antígenos usados en las composiciones de la invención incluyen antígenos asociados con enfermedades respiratorias, tales como las causadas o exacerbadas por infección bacteriana (p. ej., neumocócica), para la profilaxis y terapia de afecciones tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC se define fisiológicamente por la presencia de obstrucción irreversible o parcialmente reversible de las vías respiratorias en pacientes con bronquitis crónica y/o enfisema (*Am J Respir Crit Care Med.* 1995 nov; 152 (5 Pt 2): S77-121). Las exacerbaciones de la EPOC a menudo están causadas por una infección bacteriana (p. ej., neumocócica) (*Clin Microbiol Rev.* 2001 abr; 14 (2): 336-63).

40 TLR

Como se describe en la presente memoria, ciertas realizaciones de la presente invención contemplan composiciones de vacunas y composiciones de adyuvantes inmunológicas, incluyendo composiciones farmacéuticas, que incluyen uno o más agonistas de receptores tipo Toll (agonistas de TLR). Los receptores tipo Toll (TLR) incluyen receptores transmembrana de la superficie celular del sistema inmune innato que confieren la capacidad de reconocimiento de fase temprana a las células huésped para una variedad de estructuras moleculares microbianas conservadas, tales como las que pueden estar presentes en o sobre un gran número de patógenos infecciosos. (p. ej., Armant et al., 2002 *Genome Biol.* 3 (8): reviews3011.1-3011.6; Fearon et al., 1996 *Science* 272: 50; Medzhitov et al., 1997 *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4; Lustre 2002 *Curr. Opin. Immunol.* 14: 129; Lien et al. 2003 *Nat. Immunol.* 4: 1162; Medzhitov, 2001 *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135; Takeda et al., 2003 *Ann Rev Immunol.* 21: 335; Takeda et al. 2005 *Int. Immunol.* 17: 1; Kaisho et al., 2004 *Microbes Infect.* 6: 1388; Datta et al., 2003 *J. Immunol.* 170: 4102).

55 La inducción de la transducción de la señal mediada por TLR para potenciar el inicio de respuestas inmunes a través del sistema inmune innato puede efectuarse por agonistas de TLR, que se acoplan a TLR de la superficie celular. Por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS) puede ser un agonista de TLR a través de TLR2 o TLR4 (Tsan et al., 2004 *J. Leuk. Biol.* 76: 514; Tsan et al., 2004 *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286: C739; Lin et al., 2005 *Shock* 24: 206); poli(inosinacitidina) (poliI:C) puede ser un agonista de TLR a través de TLR3 (Salem et al., 2006 *Vaccine* 24: 5119); las secuencias CpG (oligodesoxinucleótidos que contienen citosina-guanosina no metilada o restos de dinucleótido "CpG", p. ej., CpG 7909, Cooper et al., 2005 *AIDS* 19:1473; CpG 10101 Bayes et al. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27: 193; Vollmer et al. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5:673; Vollmer et al., 2004 *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2314; Deng et al., 2004 *J. Immunol.* 173: 5148) pueden ser agonistas de TLR a través de TLR9 (Andaloussi et al., 2006 *Glia* 54: 526; Chen et al., 2006 *J. Immunol.* 177: 2373); los peptidoglicanos pueden ser agonistas de TLR2 y/o TLR6 (Soboll et

al., 2006 Biol. Reprod. 75: 131; Nakao et al., 2005 J. Immunol. 174: 1566); 3M003 (hidrato de 4-amino-2-(etoximetil)-a,a-dimetil-6,7,8,9-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol, peso molecular 318 Da de 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, que también es una fuente de los compuestos relacionados 3M001 y 3M002; Gorden et al., 2005 J. Immunol. 174: 1259) puede ser un agonista de TLR7 (Johansen 2005 Clin. Exp. Allerg. 35: 1591) y/o un agonista de TLR8 (Johansen 2005); la flagelina puede ser un agonista de TLR5 (Feuillet et al., 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103: 12487); y los antígenos de la hepatitis C pueden actuar como agonistas de TLR a través de TLR7 y/o TLR9 (Lee et al., 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103: 1828; Horsmans et al., 2005 Hepatol. 42: 724). Se conocen otros agonistas de TLR (p. ej., Schirmbeck et al., 2003 J. Immunol. 171: 5198) y se pueden usar de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas actualmente.

10 Por ejemplo, y como antecedente (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 6.544.518), los oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen dinucleótidos CpG ("CpG") no metilados se conocen como adyuvantes cuando se administran por vía sistémica y mucosal (documento WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., J. Immunol. 1998. 160 (2): 870-876; McCluskie y Davis, J. Immunol., 1998, 161 (9): 4463-6). CpG es una abreviatura de los restos de dinucleótido de citosina-guanosina presentes en el ADN. El papel central del resto CG en la inmunoestimulación fue dilucidado por Krieg, Nature 374, p. 546 1995. El análisis detallado ha mostrado que el resto CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencia, y que dichas secuencias son comunes en el ADN bacteriano, pero son raras en el ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora suele ser: purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en donde el resto de dinucleótido CG no está metilado, pero se sabe que otras secuencias de CpG no metiladas son inmunoestimuladoras y se pueden usar en ciertas realizaciones de la presente invención. La CpG cuando se formula en vacunas, se puede administrar en disolución libre junto con antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugarse covalentemente con un antígeno (Publicación PCT No. WO 98/16247), o formularse con un vehículo tal como hidróxido de aluminio (p. ej., Davis et al. *supra*, Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8).

25 Los oligonucleótidos preferidos para uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención contienen preferiblemente dos o más restos de dinucleótido CpG separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque el fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos están dentro del alcance de la invención, incluyendo oligonucleótidos con enlaces internucleotídicos mixtos. Los métodos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en las Pat. de EE.UU. Nos. 5.666.153, 5.278.302 y en el documento WO95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen secuencias que se describen en las siguientes publicaciones; para ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, las secuencias contienen preferiblemente enlaces internucleotídicos modificados con fosforotioato:

35 CPG 7909: Cooper et al., "CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults." AIDS, 2005 sep 23;19(14):1473-9.

CpG 10101: Bayes et al., "Gateways to clinical trials." Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2005 abr; 27 (3): 193-219. Vollmer J., "Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9." Expert Opinion on Biological Therapy. 2005 mayo; 5(5): 673-682

40 Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender variantes de las secuencias preferidas descritas en las publicaciones citadas anteriormente que se diferencian en que tienen sustituciones, inserciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de nucleótidos intrascendentes. Los oligonucleótidos CpG utilizados en ciertas realizaciones de la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquier método conocido en la técnica (p. ej., documento EP 468520). Convenientemente, dichos oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automatizado. Los oligonucleótidos son típicamente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el enlace internucleotídico en el oligonucleótido es un fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque los fosfodiésteres también están dentro del alcance de las realizaciones contempladas actualmente. También se contemplan oligonucleótidos que comprenden diferentes enlaces internucleotídicos, p. ej., fosfodiésteres de fosforotioato mixtos. También se pueden usar otros enlaces internucleotídicos que estabilizan el oligonucleótido.

#### Coadyuvante

50 Ciertas realizaciones como se proporcionan en la presente memoria incluyen composiciones de vacunas y composiciones inmunológicas de adyuvante, incluyendo composiciones farmacéuticas, que contienen, además de GLA, al menos un coadyuvante, que se refiere a un componente de dichas composiciones que tiene actividad adyuvante pero que es diferente de GLA. Un coadyuvante que tiene dicha actividad adyuvante incluye una composición que, cuando se administra a un sujeto tal como un ser humano (p. ej., un paciente humano), un primate no humano, un mamífero u otro organismo eucariótico superior que tiene un sistema inmune reconocido, es capaz de alterar (es decir, aumentar o disminuir de manera estadísticamente significativa y, en ciertas realizaciones preferidas, potenciar o aumentar) la potencia y/o la longevidad de una respuesta inmune. (Véase, p. ej., Powell y Newman, "Vaccine design - The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, Nueva York). En ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, GLA y un antígeno deseado, y opcionalmente uno o más coadyuvantes, pueden

alterar, p. ej., incitar o potenciar, de esta manera una respuesta inmune que se dirige frente al antígeno deseado que se puede administrar al mismo tiempo que GLA o se puede separar en el tiempo y/o el espacio (p. ej., en un sitio anatómico diferente) en su administración, pero ciertas realizaciones de la invención no pretenden ser tan limitadas y, por lo tanto, también contemplan la administración de GLA en una composición que no incluye un antígeno especificado, pero que también puede incluir uno o más de un agonista de TLR, un coadyuvante, un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y un modificador inmune de bucle de doble tallo (dSLIM).

En consecuencia, y como se indicó anteriormente, los coadyuvantes incluyen composiciones distintas de GLA que tienen efectos adyuvantes, tales como saponinas y miméticos de saponinas, incluyendo QS21 y miméticos de QS21 (véase, p. ej., la Pat. de EE.UU. No. 5.057.540; documento EP 0 362 279 B1; documento WO 95/17210), alumbre, alcaloides vegetales tales como tomatina, detergentes tales como (pero no limitados a) saponina, polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, una o más citoquinas (p. ej., GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-alfa, IFN-gamma), un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina, y un modificador inmune de bucle de doble tallo (dSLIM, p. ej., Weeratna et al., 2005 Vaccine 23: 5263).

Los detergentes que incluyen saponinas se enseñan, p. ej., en la patente de EE. UU. 6.544.518; Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996 Phytomedicine 2: 363-386), Pat. de EE.UU. No. 5.057.540, Kensil, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55, y documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras particuladas, denominadas complejos estimulantes inmunes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A (saponina) son hemolíticas y se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B., documento EP 0 109 942 B1). Se ha reportado que estas estructuras tienen actividad adyuvante (documento EP 0 109 942 B1; documento WO 96/11711). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos, y el método de su producción se describe en la Pat. de EE.UU. 5.057.540 y en el documento EP 0 362 279 B1. También se describe en estas referencias el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como un potente adyuvante para las vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe adicionalmente en Kensil et al. (1991. J. Immunology 146: 431-437). También se conocen combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas adyuvantes particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas de otras especies de plantas tales como *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford et al., Vaccine, 10 (9): 572-577, 1992).

La escina es otro detergente relacionado con las saponinas para uso en las composiciones de adyuvante de las realizaciones descritas en la presente memoria. La escina se describe en el índice de Merck (12ª Ed.: entrada 3737) como una mezcla de saponina que se encuentra en la semilla del castaño de indias, *Aesculus hippocastanum*. Su aislamiento se describe mediante cromatografía y purificación (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), y por resinas de intercambio iónico (Erbring et al., Pat. de EE.UU. No. 3.238.190). Las fracciones de escina (también conocida como aescina) se han purificado y se ha mostrado que son biológicamente activas (Yoshikawa M, et al. (Chem Pharm Bull (Tokio) 1996 agosto; 44 (8): 1454-1464)). La digitonina es otro detergente, que también se describe en el índice Merck (12ª Ed., Entrada 3204) como saponina, que deriva de las semillas de *Digitalis purpurea* y se purifica de acuerdo con el procedimiento descrito por Gisvold et al., J. Am. Pharm.Assoc., 1934, 23, 664; y Rubenstroth-Bauer, Physiol. Chem., 1955, 301, 621.

Otros coadyuvantes para uso de acuerdo con ciertas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen un copolímero de bloque o polímero biodegradable, que se refiere a una clase de compuestos poliméricos con los que estarán familiarizados los expertos en la técnica. Los ejemplos de un copolímero de bloque o polímero biodegradable que puede incluirse en una composición de vacuna GLA o un adyuvante inmunológico GLA incluyen Pluronic® L121 (BASF Corp., Mount Olive, NJ; véase, p. ej., Yeh et al., 1996 Pharm. Res. 13: 1693; Patente de EE.UU. No. 5.565.209), CRL1005 (p. ej., Triozzi et al., 1997 Clin Canc. Res. 3: 2355), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli-(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG), y poli:C. (Véase, p. ej., Powell y Newman, "Vaccine design - The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, Nueva York)

Ciertas realizaciones contemplan vacunas de GLA y adyuvantes inmunológicos de GLA que incluyen un aceite, que en algunas de dichas realizaciones puede contribuir a la actividad coadyuvante y en otras de dichas realizaciones puede proporcionar adicionalmente o alternativamente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se conoce cualquier número de aceites adecuados y pueden seleccionarse para su inclusión en composiciones de vacunas y composiciones adyuvantes inmunológicas basadas en la presente descripción. Los ejemplos de dichos aceites, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen escualeno, escualano, aceite mineral, aceite de oliva, colesterol y un monooleato de manida.

Los modificadores de la respuesta inmune, tales como los modificadores de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina, también se conocen en la técnica y también pueden incluirse como coadyuvantes en ciertas realizaciones actualmente descritas. Ciertos modificadores de la respuesta inmune de imidazoquinolina preferidos incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, resiquimod (R848), imiquimod y gardiquimod (Hemmi et al., 2002 Nat. Immunol. 3: 196; Gibson et al., 2002 Cell. Immunol. 218: 74; Gorden et al., 2005 J. Immunol. 174: 1259); estos y otros modificadores de la respuesta inmune de imidazoquinolina pueden, bajo condiciones apropiadas, tener también actividad agonista de TLR como se describe en la presente memoria. Otros modificadores de la respuesta inmune son los modificadores inmunes de doble tallo en bucle basados en ácido nucleico (dSLIM). Los ejemplos específicos de

dSLIM que se contemplan para su uso en ciertas de las realizaciones actualmente descritas se pueden encontrar en Schmidt et al., 2006 Allergy 61:56; Weihrauch et al. 2005 Clin Cancer Res. 11 (16): 5993-6001; Modern Biopharmaceuticals, J. Knablein (Editor). John Wiley & Sons, 6 de diciembre, 2005. (dSLIM discutido en las páginas 183 a -200), y de Mologen AG (Berlín, FRG: [obtenido en línea el 18/8/06 en <http://www.mologen.com/English/04.20-dSLIM.shtml>].

Como también se señaló anteriormente, un tipo de coadyuvante para uso con GLA como se describe en la presente memoria puede ser los coadyuvantes de aluminio, que generalmente se conocen como "alumbre". Los coadyuvantes de alumbre se basan en lo siguiente: oxihidróxido de aluminio; hidroxifosfato de aluminio; o varias sales patentadas. Las vacunas que usan coadyuvantes de alumbre pueden incluir vacunas para las cepas del tétanos, el VPH, la hepatitis A, el virus de la polio inactivado y otros antígenos como se describe en la presente memoria. Los coadyuvantes de alumbre son ventajosos porque tienen un buen registro de seguridad, aumentan las respuestas de los anticuerpos, estabilizan los antígenos y son relativamente simples para la producción a gran escala. (Edelman 2002 Mol. Biotechnol. 21: 129-148; Edelman, R. 1980 Rev. Infect. Dis. 2: 370-383.)

Otros coadyuvantes que pueden combinarse con GLA para la estimulación inmune efectiva incluyen saponinas y miméticos de saponinas, incluyendo QS21 y compuestos relacionados estructuralmente que confieren efectos similares y referidos en la presente memoria como miméticos de QS21. QS21 ha sido reconocido como un coadyuvante preferido. QS21 puede comprender una fracción no tóxica purificada por HPLC derivada de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. La producción de QS21 se describe en la Pat. de EE.UU. No. 5.057.540. (Véanse también las Patentes de EE. UU. Nos. 6.936.255, 7.029.678 y 6.932.972.)

El GLA también se puede combinar en ciertas realizaciones con "complejos inmunoestimulantes" conocidos como ISCOMS (p. ej., Las Patentes de EE. UU. Nos. 6.869.607, 6.846.489, 6.027.732, 4.981.684), incluyendo ISCOMATRIX® derivado de saponina, que está disponible comercialmente, por ejemplo, en Iscotec (Estocolmo, Suecia) y CSL Ltd. (Parkville, Victoria, Australia).

#### Construcción de expresión recombinante

De acuerdo con ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, la composición de vacuna GLA puede contener al menos una construcción de expresión recombinante que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno. En ciertas realizaciones adicionales, la construcción de expresión recombinante está presente en un vector viral, tal como un vector de adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, lentivirus, poxvirus o retrovirus. Las composiciones y métodos para preparar y usar dichas construcciones de expresión y vectores son conocidos en la técnica, para la expresión de antígenos polipeptídicos tal como se proporciona en la presente memoria, por ejemplo, de acuerdo con Ausubel et al. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 2006 John Wiley & Sons, NY. En general, los ejemplos no limitantes de construcciones de expresión recombinantes se pueden encontrar, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. Nos. 6.844.192; 7.037.712; 7.052.904; 7.001.770; 6.106.824; 5.693.531; 6.613.892; 6.875.610; 7.067.310; 6.218.186; 6.783.981; 7.052.904; 6.783.981; 6.734.172; 6.713.068; 5.795.577 y 6.770.445 y en otros lugares, con enseñanzas que pueden adaptarse a la expresión de antígenos polipeptídicos como se proporciona en la presente memoria, para su uso en ciertas realizaciones actualmente descritas.

#### Respuesta inmune

La invención proporciona así composiciones para alterar (es decir, aumentar o disminuir de manera estadísticamente significativa, por ejemplo, en relación con un control apropiado como será familiar para los expertos en la técnica) respuestas inmunes en un huésped capaz de desarrollar una respuesta inmune. Como sabrán los expertos en la técnica, una respuesta inmune puede ser cualquier alteración activa del estado inmune de un huésped, que puede incluir cualquier alteración en la estructura o función de uno o más tejidos, órganos, células o moléculas que participan en el mantenimiento y/o regulación del estado inmune del huésped. Típicamente, las respuestas inmunes pueden detectarse mediante cualquiera de una variedad de parámetros bien conocidos, incluyendo pero no limitado a, la determinación *in vivo* o *in vitro* de: inmunoglobulinas o anticuerpos solubles; mediadores solubles tales como citoquinas, linfoquinas, quimioquinas, hormonas, factores de crecimiento y similares, así como otros mediadores solubles pequeños de péptidos, carbohidratos, nucleótidos y/o lípidos; los cambios en el estado de activación celular según lo determinado por las propiedades funcionales o estructurales alteradas de las células del sistema inmune, por ejemplo, la proliferación celular, la motilidad alterada, la inducción de actividades especializadas tales como la expresión de genes específicos o el comportamiento citolítico; la diferenciación celular por células del sistema inmune, incluyendo los perfiles alterados de expresión del antígeno de superficie o el inicio de la apoptosis (muerte celular programada); o cualquier otro criterio por el cual se pueda detectar la presencia de una respuesta inmune.

Las respuestas inmunes a menudo se pueden considerar, por ejemplo, como una discriminación entre las estructuras propias y no propias por parte de las células y los tejidos del sistema inmune de un huésped en los niveles molecular y celular, pero la invención no debería ser tan limitada. Por ejemplo, las respuestas inmunes también pueden incluir cambios en el estado del sistema inmune que resultan del reconocimiento inmune de moléculas, células o tejidos propios, como puede acompañar cualquier número de condiciones normales, tales como la regulación típica de los componentes del sistema inmune, o como puede estar presente en condiciones patológicas tales como las respuestas

autoinmunes inapropiadas observadas en enfermedades autoinmunes y degenerativas. Como otro ejemplo, además de la inducción por la regulación al alza de determinadas actividades del sistema inmune particulares (tal como la producción de anticuerpos y/o de citoquinas, o la activación de la inmunidad mediada por células), las respuestas inmunes también pueden incluir la supresión, la atenuación o cualquier otra regulación a la baja de la inmunidad detectable, que puede ser la consecuencia del antígeno seleccionado, la vía de administración del antígeno, la inducción de tolerancia específica u otros factores.

La determinación de la inducción de una respuesta inmune por las vacunas de la presente invención se puede establecer mediante cualquiera de una serie de ensayos inmunológicos bien conocidos con los que los expertos en la técnica estarán familiarizados. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan necesariamente a, la determinación *in vivo* o *in vitro* de: anticuerpos solubles; mediadores solubles tales como citoquinas, linfoquinas, quimioquinas, hormonas, factores de crecimiento y similares, así como otros mediadores solubles pequeños de péptidos, carbohidratos, nucleótidos y/o lípidos; los cambios en el estado de activación celular según lo determinado por las propiedades funcionales o estructurales alteradas de las células del sistema inmune, por ejemplo, la proliferación celular, la motilidad alterada, la inducción de actividades especializadas tales como la expresión de genes específicos o el comportamiento citolítico; la diferenciación celular por células del sistema inmune, incluyendo los perfiles alterados de expresión del antígeno de superficie o el inicio de la apoptosis (muerte celular programada). Los procedimientos para realizar estos y otros ensayos similares son ampliamente conocidos y se pueden encontrar, por ejemplo, en Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998; véase también Current Protocols in Immunology; véase también, p. ej., Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986 Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell y Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, 1979 Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green y Reed, 1998 Science 281:1309 y las referencias citadas en estos).

La detección de la proliferación de células T reactivas al antígeno puede realizarse mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de células T puede detectarse midiendo la tasa de la síntesis de ADN, y la especificidad del antígeno puede determinarse controlando los estímulos (tales como, por ejemplo, células presentadoras de antígeno pulsadas con un antígeno específico deseado o un antígeno control) a los que se exponen las células T reactivas a antígeno candidatas. Las células T que han sido estimuladas para proliferar presentan una mayor tasa de síntesis de ADN. Una forma típica de medir la tasa de la síntesis de ADN es, por ejemplo, mediante marcaje por pulsos de cultivos de células T con timidina tritiada, un precursor de nucleósidos que se incorpora en el ADN recién sintetizado. La cantidad de timidina tritiada incorporada se puede determinar usando un espectrofotómetro de centelleo líquido. Otras formas de detectar la proliferación de las células T incluyen medir los aumentos en la producción de interleuquina-2 (IL-2), el flujo de  $Ca^{2+}$  o la captación de colorante, tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio. Alternativamente, se puede medir la síntesis de linfoquinas (tal como el interferón-gamma) o se puede cuantificar el número relativo de células T que pueden responder a un antígeno particular.

La detección de la producción de anticuerpos específicos de antígeno se puede lograr, por ejemplo, analizando una muestra (p. ej., una muestra que contiene inmunoglobulina, tal como suero, plasma o sangre) de un huésped tratado con una vacuna de acuerdo con la presente invención usando metodologías *in vitro* tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), diálisis en equilibrio o inmunotransferencia en fase sólida, incluyendo la transferencia Western. En realizaciones preferidas, los ensayos ELISA pueden incluir además la inmovilización por captura de antígeno del antígeno diana con un anticuerpo monoclonal en fase sólida específico para el antígeno, por ejemplo, para aumentar la sensibilidad del ensayo. La elaboración de mediadores solubles (p. ej., citoquinas, quimioquinas, linfoquinas, prostaglandinas, etc.) también se puede determinar fácilmente mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), por ejemplo, usando métodos, aparatos y reactivos que están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (p. ej., Sigma, St. Louis, MO; véase también el Catálogo de R & D Systems 2006, R & D Systems, Minneapolis, MN).

Se puede monitorizar cualquier número de otros parámetros inmunológicos usando ensayos de rutina que son bien conocidos en la técnica. Estos pueden incluir, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), respuestas secundarias de anticuerpos *in vitro*, análisis de inmunocitofluorimetría de flujo de varias subpoblaciones de células mononucleares linfoides o de sangre periférica usando sistemas de antígenos marcadores bien establecidos, inmunohistoquímica u otros ensayos relevantes. Estos y otros ensayos se pueden encontrar, por ejemplo, en Rose et al. (Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5ª Ed., 1997 American Society of Microbiology, Washington, DC.

Por consiguiente, se contempla que las composiciones de vacunas y adyuvantes proporcionadas en la presente memoria serán capaces de incitar o potenciar en un huésped al menos una respuesta inmune que se selecciona de una respuesta de linfocitos T de tipo  $T_H1$ , una respuesta de linfocitos T de tipo  $T_H2$ , una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), una respuesta de anticuerpos, una respuesta de citoquinas, una respuesta de linfoquinas, una respuesta de quimioquinas y una respuesta inflamatoria. En ciertas realizaciones, la respuesta inmune puede comprender al menos uno de la producción de una o una pluralidad de citoquinas en donde la citoquina se selecciona de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la producción de una o una pluralidad de interleuquinas en donde la interleuquina se selecciona de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e IL-23, la producción de una o una pluralidad de quimioquinas en donde la quimioquina se selecciona de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1  $\beta$ , RANTES, CCL4 y CCL5, y una respuesta de linfocitos que se selecciona de una respuesta de células T de memoria, una respuesta de células B de memoria, una respuesta de células T efectoras, una respuesta de células T

5 citotóxicas y una respuesta de células B efectoras. Véanse, p. ej., los documentos WO 94/00153; WO 95/17209; WO 96/02555; U.S. 6.692.752; U.S. 7.084.256; U.S. 6.977.073; U.S. 6.749.856; U.S. 6.733.763; U.S. 6.797.276; U.S. 6.752.995; U.S. 6.057.427; U.S. 6.472.515; U.S. 6.309.847; U.S. 6.969.704; U.S. 6.120.769; U.S. 5.993.800; U.S. 5.595.888; Smith et al., 1987 J. Biol Chem. 262: 6951; Kriegler et al., 1988 Cell 53:45 53; Beutler et al., 1986 Nature 320: 584; U.S. 6.991.791; U.S. 6.654.462; U.S. 6.375.944.

#### Composiciones farmacéuticas

10 En la presente memoria se proporcionan composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden emulsiones de aceite en agua descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición comprende además un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una composición de vacuna. Las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse a un sujeto para estimular una respuesta inmune en el sujeto (incluyendo una respuesta no específica y una respuesta específica de antígeno). En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero (p. ej., un animal incluyendo animales de granja (vacas, cerdos, cabras, caballos, etc.) y mascotas (gatos, perros, etc.) o un ser humano). En algunas realizaciones, el sujeto es un animal de sangre caliente.

15 Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden GLA (disponible en Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; número de producto 699800) y pueden comprender además uno o más componentes como se proporciona en la presente memoria que se seleccionan de antígeno, agonista de TLR, coadyuvante (incluyendo opcionalmente citoquina, un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina y/o un dSLIM), y/o una construcción de expresión recombinante, en combinación con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 Por lo tanto, en ciertos aspectos, la presente invención está dirigida a la "monoterapia" de GLA en donde GLA, como se describe en la presente memoria, se formula en una emulsión que carece sustancialmente de otros antígenos, y se administra a un sujeto con el fin de estimular una respuesta inmune, p. ej., una respuesta inmune no específica, con el propósito de tratar o prevenir una enfermedad u otra afección, tal como una infección por un organismo. En una realización, por ejemplo, las composiciones y métodos de la invención emplean un disacárido monofosforilado para estimular una respuesta inmune en un sujeto. En otra realización particular, las composiciones y métodos emplean una forma 2-monoacilo de lípido A para estimular una respuesta inmune en un sujeto. En otra realización particular, el GLA está en la forma de una pulverización, opcionalmente proporcionada en un kit.

25 El GLA se puede formular preferiblemente en una emulsión estable como se describe en la presente memoria. En una realización particular, por ejemplo, se proporciona una composición que comprende un derivado de lípido A en una emulsión estable sustancialmente desprovista de otros antígenos. En otra realización particular, se proporciona una composición que comprende un derivado de lípido A monofosforilado 3-acilado, adecuado para uso en mamíferos, en donde la posición de amina 2 tiene una única cadena de acilo, y que está sustancialmente desprovista de otros antígenos.

30 En ciertas otras realizaciones, la composición farmacéutica es una composición de vacuna que comprende tanto GLA como un antígeno y puede comprender además uno o más componentes, como se proporciona en la presente memoria, que se seleccionan de agonista de TLR, coadyuvante (incluyendo, p. ej., una citoquina, un modificador de la respuesta inmune de imidazoquinolina y/o un dSLIM) y similares y/o una construcción de expresión recombinante, en combinación con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 Los vehículos ilustrativos no serán tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Para las vacunas basadas en ácido nucleico más GLA, o para las vacunas que comprenden GLA más un antígeno, se administrarán de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, típicamente por la ruta intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa. o por otras rutas.

40 Una dosificación preferida es de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, prefiriéndose particularmente aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 200 µg/kg. Será evidente para los expertos en la técnica que el número y la frecuencia de la administración dependerán de la respuesta del huésped. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (AR Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, se puede usar disolución salina estéril y disolución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes saporíferos. Por ejemplo, se pueden añadir benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido *p*-hidroxibenzoico como conservantes. Id. a 1449. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. Id.

45 "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de los compuestos de la presente invención derivadas de la combinación de dichos compuestos y un ácido orgánico o inorgánico (sales de adición de ácido) o una base orgánica o inorgánica (sales de adición de base). Las composiciones de la presente invención se pueden usar en forma de base libre o en forma de sal, considerándose ambas formas dentro del alcance de la presente invención.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las rutas típicas de administración incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral (p. ej., sublingual o bucal), sublingual, rectal, vaginal

e intranasal (p. ej., como una pulverización). El término parenteral tal y como se usa en la presente memoria incluye administración iontoforética (p. ej., U.S. 7.033.598; 7.018.345; 6.970.739), sonoforética (p. ej., U.S. 4.780.212; 4.767.402; 4.948.587; 5.618.275; 5.656.016; 5.722.397; 6.322.532; 6.018.678), térmica (p. ej., U.S. 5.885.211; 6.685.699), transdérmica pasiva (p. ej., U.S. 3.598.122; 3.598.123; 4.286.592; 4.314.557; 4.379.454; 4.568.343; 5.464.387; Espec. de Pat. del Reino Unido No. 2232892; U.S. 6.871.477; 6.974.588; 6.676.961), con microaguja (p. ej., U.S. 6.908.453; 5.457.041; 5.591.139; 6.033.928) y también inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral o técnicas de infusión. En una realización particular, una composición como se describe en la presente memoria (incluyendo composiciones de vacunas y farmacéuticas) se administra por la ruta intradérmica mediante una técnica seleccionada de iontoforesis, microcavitación, sonoforesis o microagujas.

La composición farmacéutica se formula para permitir que los ingredientes activos contenidos en ella estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un paciente toman la forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación unitaria, y un contenedor de uno o más compuestos de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Para la administración oral, puede estar presente un excipiente y/o aglutinante. Los ejemplos son sacarosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato de sodio, carboximetilcelulosa y etilcelulosa. Pueden estar presentes agentes colorantes y/o saporíferos. Puede emplearse una cubierta de revestimiento.

La composición puede estar en la forma de un líquido, p. ej., un elixir, jarabe, disolución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para administración por inyección, como dos ejemplos. Cuando están destinadas a la administración oral, las composiciones preferidas contienen uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición destinada a ser administrada por inyección, se pueden incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

Una composición farmacéutica líquida tal y como se usa en la presente memoria, ya sea en la forma de una disolución, suspensión u otra forma similar, puede incluir uno o más de los siguientes vehículos o excipientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, disolución salina, preferiblemente disolución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como escualeno, escualano, aceite mineral, un monooleato de manida, colesterol y/o mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como el cloruro de sodio o la dextrosa. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

En una realización particular, una composición farmacéutica o de vacuna de la invención comprende una suspensión acuosa estable de menos de 0,2µm y comprende además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, tensioactivos, detergentes, saponinas, lípidos fluorados, y similares.

En otra realización, una composición de la invención se formula de una manera que se puede aerosolizar.

También puede ser deseable incluir otros componentes en una composición de vacuna o farmacéutica, tales como vehículos de administración incluyendo, pero no limitado a, sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, vehículos de aceite biodegradable, emulsiones de aceite en agua, microcápsulas biodegradables y liposomas. Los ejemplos de sustancias inmunoestimuladoras adicionales (coadyuvantes) para uso en dichos vehículos también se han descrito anteriormente y pueden incluir N-acetilmuramil-L-alanina-D-iso-glutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, interferón gamma e IL-12.

Si bien cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la técnica puede emplearse en las composiciones farmacéuticas de esta invención, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración y si se desea una liberación sostenida. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo comprende preferiblemente agua, disolución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede emplear cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También se pueden emplear microesferas biodegradables (p. ej., galactida poliláctica) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Las microesferas biodegradables adecuadas se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.897.268 y 5.075.109. En este sentido, es preferible que la microesfera sea más mayor de aproximadamente 25 micrómetros.

Las composiciones farmacéuticas (incluyendo las vacunas de GLA y los adyuvantes inmunológicos de GLA) también pueden contener diluyentes tales como tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa,

sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. La disolución salina tamponada neutra o la disolución salina mezclada con albúmina sérica no específica son diluyentes apropiados ejemplares. Preferiblemente, el producto puede formularse como un liofilizado usando disoluciones de excipientes apropiadas (p. ej., sacarosa) como diluyentes.

5 Como se describió anteriormente, en ciertas realizaciones, la presente invención incluye composiciones capaces de administrar moléculas de ácido nucleico que codifican antígenos deseados. Dichas composiciones incluyen vectores virales recombinantes (p. ej., retrovirus (véanse los documentos WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698, y WO 94/03622), adenovirus (véase Berkner, *Biotechniques* 6: 616-627, 1988; Li et al., *Hum. Gene Ther.* 4: 403-409, 1993; Vincent et al., *Nat. Genet.* 5: 130-134, 1993; y Kolls et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 91: 215-219, 1994), virus de la viruela (véase la Patente de EE. UU. No. 4.769.330; Patente de EE. UU. No. 5.017.487; y documento WO 89/01973), moléculas de ácido nucleico de construcción de expresión recombinante formando complejo con una molécula policatiónica (véase el documento WO 93/03709) y ácidos nucleicos asociados con liposomas (véase Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7851, 1987). En ciertas realizaciones, el ADN puede estar unido a un adenovirus inactivado o muerto (véase Curiel et al., *Hum. Gene Ther.* 3: 147-154, 1992; Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6094, 1992). Otras composiciones adecuadas incluyen combinaciones de ADN-ligando (véase Wu et al., *J. Biol. Chem.* 264: 16985-16987, 1989) y de lípido-ADN (véase Feigner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417, 1989).

Además de los procedimientos directos *in vivo*, se pueden usar procedimientos *ex vivo* en los que las células se retiran de un huésped, se modifican y se ponen en el mismo u otro animal huésped. Será evidente que se puede utilizar cualquiera de las composiciones indicadas anteriormente para la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican antígeno en células de tejido en un contexto *ex vivo*. Los protocolos para los métodos de captación virales, físicos y químicos son bien conocidos en la técnica.

Por consiguiente, la presente invención es útil para potenciar o incitar, en un huésped, un paciente o en un cultivo celular, una respuesta inmune. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente, un ser humano. Un paciente puede estar afectado por una enfermedad infecciosa, cáncer, tal como el cáncer de mama, o una enfermedad autoinmune, o puede ser normal (es decir, que carece de enfermedad y/o infección detectable). Un "cultivo celular" es cualquier preparación que contenga células inmunocompetentes o células aisladas del sistema inmune (incluyendo, pero no limitado a, células T, macrófagos, monocitos, células B y células dendríticas). Dichas células pueden aislarse mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (p. ej., centrifugación de densidad Ficoll-hypaque). Las células pueden (pero no necesariamente) haber sido aisladas de un paciente que padece cáncer, y pueden ser reintroducidas en un paciente después del tratamiento.

En ciertas realizaciones, una composición líquida prevista para administración parenteral u oral debe contener una cantidad de composición de vacuna GLA de manera que se obtenga una dosificación adecuada. Típicamente, esta cantidad es al menos el 0,01% en peso de un antígeno en la composición. Cuando se destina a la administración oral, esta cantidad puede variar para ser entre el 0,1 y aproximadamente el 70% del peso de la composición. Las composiciones orales preferidas contienen entre aproximadamente el 4% y aproximadamente el 50% del antígeno. Las composiciones y preparaciones preferidas se preparan de manera que una unidad de dosificación parenteral contenga entre el 0,01 y el 1% en peso de composición activa.

La composición farmacéutica puede estar destinada a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede comprender adecuadamente una disolución, emulsión, pomada o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: petrolato, lanolina, polietilenglicoles, cera de abejas, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizantes. Los agentes espesantes pueden estar presentes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si se destina a la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del antígeno (p. ej., composición de la vacuna GLA-antígeno) o GLA (p. ej., composición inmunológica adyuvante; GLA está disponible en Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; (p. ej., número de producto 699800) de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10% p/v (peso por unidad de volumen).

La composición puede estar destinada para administración rectal, en la forma, p. ej., de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como un excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol. En los métodos de la invención, las composiciones de vacunas/adyuvantes se pueden administrar mediante el uso de inserto(s), perla(s), formulación(es) de liberación programada, parche(s) o formulación(es) de liberación rápida.

También se contemplan en ciertas realizaciones los kits que comprenden las composiciones de vacuna de GLA descritas en la presente memoria y/o las composiciones de adyuvantes inmunológicos de GLA, que pueden proporcionarse en uno o más contenedores. En una realización, todos los componentes de las composiciones de vacuna de GLA y/o las composiciones de adyuvante inmunológicos de GLA están presentes juntos en un solo contenedor, pero las realizaciones de la invención no pretenden ser tan limitadas y también contemplan dos o más contenedores en los que, por ejemplo, una composición de adyuvante inmunológico de GLA está separada de, y no está en contacto con, el componente antigénico. A modo de teoría no limitativa, se cree que en algunos casos la

administración solo de la composición de adyuvante inmunológico de GLA se puede realizar de manera beneficiosa, mientras que en otros casos dicha administración se puede separar de manera beneficiosa temporal y/o espacialmente (p. ej., en un sitio anatómico diferente) a partir de la administración del antígeno, mientras que en otros casos, la administración al sujeto se realiza de manera beneficiosa de una composición de vacuna de GLA como se describe en la presente memoria y que contiene tanto antígeno como GLA, y también, opcionalmente, otros componentes descritos en la presente memoria.

Un contenedor de acuerdo con dichas realizaciones del kit puede ser cualquier contenedor, recipiente, vial, ampolla, tubo, taza, caja, botella, frasco, jarra, placa, pocillos de un aparato de un solo pocillo o de múltiples pocillos, depósito, tanque, o similar, u otro dispositivo en el que las composiciones descritas en la presente memoria pueden colocarse, almacenarse y/o transportarse, y ser accesibles para retirar el contenido. Típicamente, dicho contenedor puede estar hecho de un material que sea compatible con el uso previsto y del cual se pueda lograr fácilmente la recuperación de los contenidos contenidos. Los ejemplos preferidos de dichos contenedores incluyen tubos y ampollas sellados o resellables de vidrio y/o plástico, incluyendo los que tienen un tapón de goma u otro medio de sellado que es compatible con la extracción del contenido usando una aguja y una jeringa. Dichos contenedores pueden, por ejemplo, estar hechos de vidrio o de un plástico o resina químicamente compatible, que puede estar hecho de, o puede estar recubierto con, un material que permite la recuperación eficiente del material del contenedor y/o protege al material, p. ej., de condiciones de degradación tales como la luz ultravioleta o las temperaturas extremas, o de la introducción de contaminantes no deseados incluyendo contaminantes microbianos. Los contenedores son preferiblemente estériles o esterilizables, y están hechos de materiales que serán compatibles con cualquier transportador, excipiente, disolvente, vehículo o similar, tales como los que se pueden usar para suspender o disolver las composiciones de vacunas descritas en la presente memoria y/o las composiciones de adyuvantes inmunológicas y/o antígenos y/o construcciones de expresión recombinante, etc.

Los siguientes Ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Titulación de la dosis de adyuvante en emulsión y efectos de la formulación de agonista de tlr4 en la inmunogenicidad de una vacuna recombinante frente a la malaria

#### Introducción

Las emulsiones de aceite en agua (o/w) se han usado de manera segura y exitosa como adyuvantes en las vacunas modernas. Las emulsiones o/w más notables son MF59® y AS03®, que son producidas por Novartis y GSK Biologicals, respectivamente. Ambos adyuvantes contienen escualeno al ~2,5% v/v en la formulación final de la vacuna [1]. Sin embargo, hasta hace poco solo se publicaron unos pocos informes sobre la motivación para seleccionar esta concentración de escualeno [2-4]. Además, un estudio reciente mostró que la dilución de MF59 no comprometía la respuesta inmune en un ensayo clínico de vacuna contra la gripe pandémica [5]. Si la actividad adyuvante se puede mantener con una reducción de la dosis de escualeno, la reactividad local de emulsiones de o/w podría reducirse potencialmente. Además, el coste de la vacuna podría disminuir, mientras que el suministro de adyuvante disponible aumentaría, lo que hace que la producción de vacuna y adyuvante en los países de escasos recursos sea más alcanzable.

El antígeno de malaria recombinante PfCelTOS (proteína transversal de células de *Plasmodium falciparum* para oocinetos y esporozoítos) combinado con adyuvante en emulsión (Montanide® ISA 720) ha demostrado eficacia protectora en el 60% de los ratones en un modelo de pulso heterólogo [6]. PfCelTOS inhibe la motilidad de los esporozoítos y la infectividad de los hepatocitos, y podría ser un componente importante de las vacunas frente a la malaria de próxima generación. Tanto la respuesta inmune celular como humoral son importantes para la eficacia protectora [6, 7].

En este trabajo, evaluamos los efectos de la dosis de adyuvante en emulsión estable (SE) basada en escualeno sobre las respuestas inmunes humorales y celulares frente a PfCelTOS. Además, investigamos el efecto de incluir un agonista de TLR4 sintético, adyuvante lipídico glucopiranosilo (GLA), en la formulación de la vacuna. Mostramos que las concentraciones de escualeno menores del 2% v/v en GLASE pueden inducir respuestas adyuvantes equivalentes a la concentración de escualeno del 2% v/v. Este descubrimiento tiene implicaciones importantes para la producción y la dosificación de adyuvantes de vacunas, así como nuevas rutas de administración (tal como la intradérmica), que pueden ser más sensibles a las concentraciones de aceite. Además, mostramos que la presencia de GLA configura la actividad inmune hacia una respuesta de tipo Th1, incitando niveles más altos de titulaciones de anticuerpos IgG2a, células productoras de IFN- $\gamma$  y células plasmáticas secretoras de anticuerpos de larga vida, que pueden ser importantes para la eficacia de la vacuna.

#### Materiales y métodos

Formulaciones de vacunas. Se adquirió escualeno de hígado de tiburón ( $\geq 98\%$  de pureza) en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El glicerol y el  $\alpha$ -tocoferol se adquirieron en Spectrum Chemical (Gardena, CA). El poloxámero 188 (Pluronic®

F68) se obtuvo de BASF (Ludwigshafen, Alemania) o Spectrum Chemical. La fosfatidilcolina de huevo (PC de huevo), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y adyuvante lipídico de glucopiranosilo (GLA) se obtuvieron de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). Los componentes del tampón de fosfato de amonio también se obtuvieron de J.T. Baker. La formulación de la emulsión se preparó haciendo fases acuosas y de aceite separadas. El poloxámero 188, el glicerol y los componentes del tampón se disolvieron en la fase acuosa con agitación, mientras que la fosfatidilcolina de huevo se disolvió en la fase de aceite con sonicación y calentamiento. La fase acuosa y de aceite (aceite al 10% v/v) se mezclaron entonces con un emulsionador mezclador de laboratorio Silverson Heavy Duty (fijación de tamiz de alto cizallamiento con orificio tubular cuadrado de 2 cm; East Longmeadow, MA) a -7.000 RPM durante diez minutos para rendir una emulsión cruda. La emulsión cruda se procesó a través de un homogeneizador de alta presión Microfluidics M110P (Newton, MA) durante 12 pases a -207 MPa (-30.000 psi). La suspensión acuosa de GLA se formó premezclando GLA con DPPC a una relación molar de 4,2:1 en un disolvente orgánico, seguido de evaporación del disolvente e hidratación con agua ultrapura. La sonicación en baño de agua a -70 °C formó la suspensión acuosa de nanopartículas GLA-AF. Las formulaciones se monitorizaron por tamaño y concentración de GLA a 5 °C, a lo largo de la duración del programa de inmunización. El tamaño de las partículas se midió por dispersión dinámica de la luz como se ha descrito anteriormente [8]. La concentración de GLA se monitorizó mediante HPLC-CAD [9]. El día de la inmunización, la emulsión se diluyó con PBS a las concentraciones de aceite especificadas y se mezcló con antígeno y GLA-AF (cuando sea aplicable). Montanide® ISA 720 se adquirió en Seppic Inc. (Fairfield, NJ) y se preparó mezclando con una fase acuosa al 30% v/v antes de la inmunización. A lo largo del manuscrito, la dosis de emulsión se refiere como % v/v de aceite en la formulación final de la vacuna; la relación de aceite a emulsionante se mantiene constante en todas las dosis. El antígeno recombinante armonizado con codones, PfCelTOS, se desarrolló y produjo en el Instituto de Investigación Walter Reed Army y se proporcionó a IDRI como un producto a granel purificado en tampón de fosfato, cortesía de la Dra. Evelina Angov.

#### Métodos de inmunología...

La titulación de punto final se determinó usando Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) después de un ajuste sigmoideal (pendiente variable) de los valores determinados en la dilución, con la titulación de punto final correspondiente a un valor de corte (C) determinado como se ha descrito anteriormente [10] con  $C = \frac{X}{SDf}$ , donde X es el promedio y SD es la desviación estándar de la placa de control de sueros negativos, y f es el multiplicador en el nivel de confianza del 99,9%. Se asignó un valor de corte de 0,1 DO si el valor de corte como se determinó anteriormente fue menor de 0,1 DO. En raras ocasiones, los pocillos de placas individuales registraron una lectura anormalmente alta cerca de las diluciones más altas. Estos se excluyeron del ajuste sigmoideal empleando el ensayo de Grubb en el valor sospechoso, en comparación con las 4 diluciones que rodean la dilución en cuestión al nivel de confianza del 99% [11].

#### Resultados

GLA-AF y SE son formulaciones de nanopartículas estables [12]. La GLA-AF es una nanosuspensión acuosa de GLA y partículas de fosfolípidos. La SE es una nanoemulsión basada en escualeno que se usa típicamente al 2% v/v de escualeno para la inmunización. Con el fin de facilitar la titulación de la dosis de emulsión mientras se mantiene constante la concentración de GLA, se añadió GLA-AF a la concentración especificada de SE inmediatamente antes de la inmunización para los grupos experimentales marcados con GLA-SE. Los tamaños de partículas promedio de los lotes de formulación usados en el presente estudio están entre 88 y 98 nm y se muestran en la Tabla 1. En la Figura 1, se muestra la concentración de GLA a lo largo del tiempo en diferentes lotes de GLA-AF, demostrando la estabilidad de la concentración del agonista de TLR durante la duración de los estudios in vivo descritos a continuación y al menos 6 meses. Montanide® ISA 720 es un adyuvante de agua en aceite que se usa típicamente al 70% v/v de escualeno para la inmunización, y que anteriormente mostró una protección estéril significativa con PfCelTOS en un modelo de pulso de malaria [6]. Montanide® ISA 720 se emplea, por lo tanto, como control positivo para los estudios de inmunogenicidad descritos a continuación.

Se inmunizaron ratones BALB/c 3 veces con composiciones de vacuna PfCelTOS con 3 semanas entre las inyecciones. La Figura 2 presenta las titulaciones de punto final de los anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2a después de la 2ª y 3ª inmunizaciones. Después de la 3ª inmunización (Figura 2d-f), el impacto de la titulación de la dosis de SE fue evidente en las respuestas reducidas de IgG total, IgG1 e IgG2a del grupo con SE al 0,02% en comparación con el grupo con SE al 2%. Los grupos con SE al 0,1% y 0,5% también mostraron una menor respuesta de IgG2a que el grupo con SE al 2%. Sin embargo, la adición de GLA pareció anular este efecto de la titulación de la dosis de SE: todos los grupos GLA-SE, independientemente de la dosis de emulsión, incitaron respuestas equivalentes de IgG, IgG1 e IgG2a. De hecho, el grupo GLA-AF (que no contiene emulsión) incitó respuestas de anticuerpos equivalentes en comparación con los grupos GLA-SE. Claramente, la presencia de GLA (ya sea SE o AF) incita una respuesta de IgG2a más fuerte en comparación con la misma composición de vacuna sin GLA. El grupo Montanide® mostró las respuestas más altas de IgG1, aunque no fue significativamente diferente en comparación con el grupo de SE al 2% o de GLA-SE al 0,5%. Las respuestas de anticuerpos después de la 2ª inmunización mostraron patrones similares a los descritos anteriormente, aunque las titulaciones globales fueron algo más bajas (Figura 2a-c). Además, varios de los grupos de GLA-SE mostraron respuestas de IgG2a e IgG1 significativamente mayores en comparación con GLA-AF. Finalmente, las vacunas que contenían GLA (SE o AF), Montanide®, o SE al 2%, incitaron un mayor número de células plasmáticas que secretan anticuerpos en la médula ósea, en comparación con el grupo de antígeno solo (Figura 2g). De manera interesante, el SE al 0,02% mostró niveles reducidos de células plasmáticas que secretan

anticuerpos en comparación con la dosis completa de SE al 2%, lo que refleja las titulaciones de punto final del anticuerpo IgG.

En otro experimento, se empleó un rango más estrecho de la titulación de dosis de SE (0,5%-2%), y se investigaron las respuestas celulares y humorales. En la Figura 3, se presentan las titulaciones de punto final de los anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2a medidos después de la 2ª y 3ª inmunizaciones. Después de la 3ª inmunización (Figura 3d-f), todos los grupos con adyuvante mostraron mayores respuestas de IgG total en comparación con el antígeno solo. Sin embargo, la dosis de SE al 0,5% no logró incitar anticuerpos IgG1 más altos en comparación con el antígeno solo, y ninguna de las dosis de SE obtuvo respuestas de IgG2a más altas en comparación con el antígeno solo. En contraste, todos los grupos que contenían GLA mostraron mayores respuestas de IgG, IgG1 e IgG2a en comparación con el antígeno solo. GLA incrementó dramáticamente las respuestas de IgG2a en todos los grupos en comparación con la misma composición sin GLA. Mientras que el grupo de Montanide® mostró titulaciones de IgG1 significativamente más altas en comparación con todos los demás grupos, los grupos de GLA-SE en las dosis de SE al 0,5% y 1% incitaron respuestas de IgG2a más altas en comparación con el grupo de Montanide®. Fueron evidentes patrones similares después de la 2ª inmunización (Figura 3a-c), aunque la dosis de SE al 0,5% incitó una alta respuesta de IgG1, en contraste con los resultados posteriores a la 3ª inmunización. Se incitó un mayor número de células plasmáticas que secretan anticuerpos con vacunas que contenían GLA o Montanide® (Figura 3g), aunque no fue evidente ningún efecto de titulación de la dosis en las diversas concentraciones de SE.

Las respuestas celulares se investigaron mediante el ensayo ELISPOT de citoquinas. Los grupos de GLA-SE incitaron niveles más altos de células productoras de IFN- $\gamma$  en las dosis de SE al 1% o 2%, en comparación con los grupos de antígeno solo, GLA-AF, SE sin GLA, o Montanide® (Figura 4a). En contraste, los grupos de GLA-SE mostraron niveles insignificantes de células secretoras de IL-5 (Figura 4b), mientras que el grupo con SE al 2% incitó niveles más altos de células secretoras de IL-5 que el grupo de antígeno solo o el grupo de Montanide®. Una tendencia similar es evidente en los resultados del ensayo de perlas de citoquinas múltiples, donde la producción de la citoquina IFN $\gamma$  de Th1 es inducida por los grupos de GLA-SE, mientras que el aumento de citoquinas de Th2 tales como IL-5, IL-10 e IL-13 se asocian con los grupos de emulsión que no contienen GLA (Figura 5). La dosis de SE al 2% incitó la mayor respuesta celular de citoquinas de Th2 (p. ej., IL-5 e IL-13).

#### Discusión

La inclusión de GLA en las composiciones de vacuna anteriores da forma a la respuesta inmune hacia un sesgo de Th1 como se demostró por los anticuerpos IgG2a significativamente más altos y producción de IFN- $\gamma$ . Aunque no se encontró que la producción de anticuerpos totales se correlacionara con la eficacia protectora en estudios CeTOS anteriores, no se realizó el análisis de isotipos de anticuerpos [6, 7]. Por lo tanto, no está claro si una mayor producción de anticuerpos IgG2a significa un mayor potencial protector. Sin embargo, la producción de IFN- $\gamma$  parece estar relacionada con la eficacia de la vacuna [6, 7]. Por lo tanto, los adyuvantes de GLA-SE pueden ser buenos candidatos para generar una eficacia protectora en las vacunas CeTOS. Observamos aquí que la emulsión parece ser necesaria para la producción de IFN- $\gamma$  (es decir, grupos de GLA-SE), mientras que las titulaciones de anticuerpos incitadas por los grupos de GLA-AF fueron similares a los grupos de GLA-SE después de una 3ª inmunización. De forma interesante, la reducción de la dosis de la emulsión del 2% al 1% no redujo la producción de IFN- $\gamma$  ni de anticuerpos en los grupos de GLA-SE. Finalmente, la inclusión de GLA también indujo niveles células secretoras de anticuerpos de larga vida significativamente mayores en comparación con el antígeno solo. En general, el GLA configura la respuesta inmune hacia un sesgo de Th1 e induce un mayor número de células plasmáticas secretoras de anticuerpos en la médula ósea, aunque parece que las concentraciones de emulsión menores del 2% pueden ser suficientes para estos efectos.

En los grupos de emulsión que no contenían GLA, los efectos de la concentración reducida de adyuvante fueron más evidentes. Por lo tanto, los niveles de células productoras de IL-5 fueron menores en el grupo de SE al 1%, en comparación con el grupo de SE al 2%, y solo el grupo de SE al 2% mostró mayores cantidades de IL-13 en comparación con el antígeno solo. El efecto de la titulación de la dosis de la emulsión se demostró en las titulaciones de punto final de anticuerpo, especialmente en el grupo de concentración de emulsión más baja (SE al 0,02%), que incitó IgG, IgG1 e IgG2a inferiores, así como niveles más bajos de células plasmáticas secretoras de anticuerpos en comparación con el grupo de SE al 2%. Sin embargo, las concentraciones de SE del 0,5% y 1% parecían incitar niveles similares de titulaciones de anticuerpos IgG e IgG1, así como niveles similares de células plasmáticas secretoras de anticuerpos en comparación con la dosis completa de SE al 2%. Sin embargo, la respuesta inmune global parece estar algo reducida con concentraciones más bajas de SE, especialmente a la dilución más alta del 0,02%.

La reducción de la concentración de la emulsión en las vacunas puede tener múltiples aplicaciones, tales como ahorro de costes, reactogenicidad local reducida, rutas alternativas de administración y facilitación de la inmunización de niños pequeños. Hemos mostrado que los adyuvantes que contienen cantidades más bajas de emulsión en presencia de un agonista de TLR4 pueden producir respuestas inmunes equivalentes a la dosis completa de emulsión de aceite al 2%. Estudios clínicos recientes han evaluado los efectos de la dosis de adyuvante usando los productos líderes de emulsión de aceite en agua MF59® y AS03, ambos aprobados para su uso en Europa, aunque ninguna de las formulaciones contiene un agonista de TLR. Por lo tanto, un ensayo clínico de vacuna contra la gripe pandémica encontró que la dosis típica de aceite del -2,3% del adyuvante MF59® podría reducirse a la mitad (pero no en 4 veces) sin comprometer la inmunogenicidad y aun así cumplir con los criterios europeos para la acreditación como vacuna pandémica [5]. Además, se observó una disminución dependiente de la dosis en el dolor en el lugar de la inyección

en los participantes del ensayo. En contraste, un estudio que empleó antígeno de gripe estacional y MF59® a las dosis de 0,125, 0,25, 0,5 o dosis completa en niños de 6 a 36 meses de edad no encontró diferencias en la reactogenicidad entre las diferentes dosis de adyuvantes [4]. Las respuestas de anticuerpos siguieron una respuesta a la dosis según la concentración de adyuvante, aunque todas las formulaciones cumplieron con los criterios del Comité Europeo de Productos Medicinales para Uso Humano (CHMP) después de la 2ª inmunización.

Se evaluaron dos dosis diferentes de AS03 (AS03A que contenía una dosis completa de escualeno al 2,5% y  $\alpha$ -tocoferol al 2,5% frente a AS03B que contenía la mitad de la dosis) en otro ensayo clínico de gripe, donde se concluyó que aunque las respuestas inmunes iniciales incitadas por las dos dosis de adyuvantes diferentes fueron equivalentes, la durabilidad de la respuesta medida 182 días después de la vacunación fue algo mejor con la dosis más alta de adyuvante [3]. Además, el grupo de edad de 41-64 años mostró respuestas de anticuerpos significativamente reducidas a la dosis más baja de adyuvante. Finalmente, se observó una reducción moderada del dolor a la dosis más baja de adyuvante en comparación con la dosis completa. Tomados en conjunto, los ensayos clínicos con MF59® y AS03 demuestran que el efecto de la titulación de la dosis de adyuvante puede depender de cada composición de vacuna y sus receptores previstos.

## Conclusión

Las vacunas PfCelTOS que contienen adyuvante GLA-SE incitan fuertes respuestas inmunes de tipo Th1 (incluyendo una mayor producción de IFN- $\gamma$  que una vacuna PfCelTOS que contiene Montanide® ISA 720) en ratones BALB/c. La dosis de emulsión se puede reducir del 2% al 1% sin comprometer la inmunogenicidad en los grupos adyuvantes de GLA-SE. En general, la reducción de la dosis de emulsión en los grupos de SE (que no contienen el agonista de TLR4, GLA) mostró una inmunogenicidad algo reducida, especialmente a la dilución de dosis de adyuvante más baja (0,02%). Los resultados de los estudios de protección que usan PfCelTOS con adyuvante GLA-SE se están compilando para una publicación posterior, y se planea un ensayo clínico de fase I para 2012.

## Referencias

[1] Fox CB. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules* 2009; 14: 3286-312.

[2] Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, van Hoogevest P, Van Nest G. MF59: design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. En: Powell MF, Newman MJ, editores. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*. Nueva York: Plenum Press, 1995: 277-96.

[3] Langley JM, Frenette L, Ferguson L, Riff D, Sheldon E, Risi G, et al. Safety and cross-reactive immunogenicity of candidate AS03-adjuvanted prepandemic H5N1 influenza vaccines: A randomized controlled phase 1/2 trial in adults. *J Infect Dis* 2010;201:1644-53.

[4] Cioppa GD, Vesikari T, Sokal E, Lindert K, Nicolay U. Trivalent and quadrivalent MF59-adjuvanted influenza vaccine in young children: A dose- and schedule-finding study. *Vaccine* 2011;29:8696-704.

[5] Keitel W, Groth N, Lattanzi M, Praus M, Hilbert AK, Borkowski A, et al. Dose ranging of adjuvant and antigen in a cell culture H5N1 influenza vaccine: Safety and immunogenicity of a phase 1/2 clinical trial. *Vaccine* 2010;28:840-8.

[6] Bergmann-Leitner ES, Mease RM, De La Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, Ockenhouse C, et al. Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from *Plasmodium falciparum* elicits cross-species protection against heterologous challenge with *Plasmodium berghei*. *PLoS One* 2010;5:e12294.

[7] Bergmann-Leitner ES, Legler PM, Savranskaya T, Ockenhouse C, Angov E. Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CelTOS. *Vaccine* 2011;29:5940-9.

[8] Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Vedvick TS. Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. *Vaccine* 2011;29:9563-72.

[9] Anderson RC, Fox CB, Dutill TS, Shaverdian N, Evers TL, Poshusta GR, et al. Physicochemical characterization and biological activity of synthetic TLR4 agonist formulations. *Coll Surf B: Biointerfaces* 2010;75:123-32.

[10] Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunological Methods* 1998;221:35-41.

[11] Hibbert DB, Gooding JJ. *Data Analysis for Chemistry*. Nueva York: Oxford University Press, 2006.

[12] Coler RN, Bertholet S, Moutafsi M, Guderian JA, Plessner Windish H, Baldwin SL, et al. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PLoS ONE* 2011;6:e16333.

## Ejemplo 2

Efectos inmunomoduladores y físicos de la composición de fosfolípidos en emulsiones de adyuvantes en vacunas

## Introducción

Se ha demostrado que las emulsiones metabolizables de aceite en agua son adyuvantes de vacunas, suplementos nutricionales y vehículos para la administración de fármacos seguros y efectivos. Existen varias composiciones emulsionantes, siendo el escualeno el aceite metabolizable preferido para las aplicaciones de adyuvantes de vacunas (1-3). Los emulsionantes usados comúnmente incluyen Pluronic®, Tweens®, Spans® y fosfolípidos. La selección del emulsionante se basa en la capacidad de estabilización de la emulsión y/o en la actividad biológica, ya que los emulsionantes son activos en membranas por definición y se ha mostrado que tienen varios efectos biológicos relacionados con la estimulación inmune (4).

La lecitina y su componente principal, la fosfatidilcolina (PC), se han utilizado con éxito como emulsionantes en emulsiones administradas por la ruta parenteral seguras y efectivas. Quizás el uso más amplio de los emulsionantes de fosfolípidos sea en la aplicación de suplementación nutricionales intravenosa (5), tal como en Intralipid®, una emulsión de aceite de soja/lecitina de huevo. Sin embargo, puede haber algunas desventajas asociadas con la lecitina de huevo (o PC de huevo) como emulsionante, y ventajas de sustituir los fosfolípidos derivados del huevo con fosfolípidos sintéticos. En primer lugar, hay una considerable heterogeneidad de estructura: la PC de huevo puede contener al menos 17 especies diferentes de PC (6), mientras que varias PC sintéticas están disponibles comercialmente con una pureza del 99%. En segundo lugar, la lecitina de huevo consiste en múltiples cadenas de acilo monoinsaturadas y poliinsaturadas, que son propensas a la degradación oxidativa, mientras que varias PC sintéticas están compuestas de cadenas de acilo saturadas y, por lo tanto, son más estables químicamente (7). En tercer lugar, los fosfolípidos de huevo derivan de una fuente animal en lugar de producirse sintéticamente.

Hemos publicado previamente el perfil de estabilidad física de las emulsiones de escualeno estabilizadas con PC de huevo (8, 9). Además, mostramos que la POPC sintética (un componente principal de la PC de huevo) proporcionaba una estabilidad equivalente a la de una emulsión de escualeno en comparación con la PC de huevo. Sin embargo, no se evaluaron otras PC sintéticas. Los fosfolípidos sintéticos y homogéneos se han vuelto ampliamente disponibles y ahora son relativamente baratos. Mediante la selección apropiada de fosfolípido sintético, se podría optimizar la estabilidad química del emulsionante y la estabilidad física de la emulsión. La equivalencia biológica también debe abordarse; previamente se ha demostrado que los cambios en la fuente o la pureza de los emulsionantes en las emulsiones de adyuvantes de vacunas afectan dramáticamente la potencia de la vacuna (10, 11). En el presente manuscrito, buscamos 1) ampliar nuestro trabajo anterior mediante la evaluación de la estabilidad física de las emulsiones de escualeno que contienen otras PC sintéticas (además de POPC), y 2) comparar la actividad biológica de las emulsiones de PC sintéticas, así como una emulsión de PC de huevo en el contexto de formulaciones de vacunas frente a la malaria y la gripe.

## Materiales y métodos

Formulaciones de adyuvante. Se adquirió escualeno de hígado de tiburón ( $\geq 98\%$  de pureza) en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La fosfatidilcolina de huevo (PC de huevo), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-di-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) y 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC) se obtuvieron de Avanti Polar Lipids, Inc. con una pureza del 99% (Alabaster, AL). Todas las formulaciones de emulsión se prepararon mezclando a alta velocidad una fase de aceite (que contenía escualeno y fosfolípido) y una fase acuosa a través de la homogeneización a alta presión, como se ha descrito anteriormente (8). La concentración final de fosfolípido fue de 25 mM. Las formulaciones se monitorizaron para determinar su estabilidad durante 6 meses a 5 °C, temperatura ambiente (RT), 37 °C y 60 °C. El tamaño de las partículas, el potencial zeta, la viscosidad, la hemólisis y las mediciones de perfilado óptico por dispersión de luz se realizaron como se ha descrito anteriormente (8). Brevemente, el tamaño de las partículas se determinó en los puntos de tiempo indicados diluyendo una parte alícuota de cada emulsión 1:100 veces en agua y midiendo el promedio de tamaño sesgado por la intensidad de la dispersión (Z-avg) mediante dispersión dinámica de la luz (Malvern Zetasizer APS). El potencial zeta se midió poco después de la fabricación de la emulsión diluyendo una parte alícuota de cada emulsión 1:20 veces en agua y midiendo el potencial zeta mediante microelectroforesis (Malvern Zetasizer Nano-ZS). Una muestra de 20 ml de cada emulsión se retiró del almacenamiento a 5 °C y se dejó equilibrar a temperatura ambiente antes de medir la viscosidad mediante un viscosímetro rotacional (Brookfield DV-E). La actividad hemolítica de la emulsión se ensayó siguiendo una versión modificada de una técnica previamente publicada (12); una suspensión de glóbulos rojos de un voluntario humano se mezcló en disolución salina con cada emulsión durante -20 min, después de lo cual la muestra se centrifugó, el sobrenadante se diluyó en una mezcla de etanol:HCl (39:1, v:v), y la absorbancia se midió a 398 nm. Las mediciones de perfilado óptico por dispersión láser se recogieron cada 10 min durante 4 h en muestras de emulsión sin diluir a 60 °C usando un láser de 870 nm y un detector de carga acoplada (LUMiReader).

Inmunización, recogida de suero y ensayos inmunológicos. Se inmunizaron ratones BALB/c hembra, de seis a siete semanas de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) mediante inyección intramuscular en cada cuádriceps posterior. Se ensayaron dos antígenos distintos: 1) 2007-2008 vacuna de virus fragmentado inactivado por Fluzona, que incorpora las cepas de influenza representativas A/Islas Salomón/2/2006 (H1N1), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) y B/Malasia/2506/2004; y 2) proteína de circumsporozoito de *Plasmodium berghei* recombinante (PbCSP) producida internamente usando la construcción armonizada en codones desarrollada por el Instituto de Investigación Walter

Reed Army. Las formulaciones de vacuna para la gripe y la malaria, los regímenes de inmunización y la recogida de suero fueron como se ha descrito anteriormente (8), excepto que la dosis de antígeno de la gripe fue de 0,02 µg de HA total. Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones específicas libres de patógenos y de acuerdo con las regulaciones y pautas del comité de uso y cuidado de animales de IDRI.

5 Respuestas de anticuerpos. Los ratones se inmunizaron dos veces, con tres semanas de diferencia. Los sueros se analizaron para determinar los anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a específicos de antígeno y la actividad de anticuerpos en la inhibición de la hemaglutinación (HI), como se ha descrito anteriormente, con unidades arbitrarias anti-PbCSP asignadas por comparación con una curva estándar, mientras que las titulaciones de punto final se determinaron para los anticuerpos frente a influenza (8). Se usó un ensayo ELISPOT de médula ósea para determinar la inducción de  
10 células plasmáticas secretoras de anticuerpos de larga duración específicas de la vacuna en muestras recogidas cuatro semanas después de la inmunización con refuerzo de Fluzona con y sin adyuvante como se ha descrito previamente con modificaciones menores (13).

15 Respuestas de citoquinas específicas de antígeno. Las placas de filtración MultiScreen de 96 pocillos (Millipore, Bedford, MA) se recubrieron con Ab de captura de rata anti-IL-5 de ratón (eBioscience, San Diego, CA) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS, se bloquearon con RPMI 1640 y FBS al 10% durante al menos 1 hora a RT, y luego se lavaron de nuevo. Los bazos se recogieron cuatro semanas después de la segunda inyección de Fluzona. Se prepararon suspensiones de células individuales y se sembraron a  $2 \times 10^5$  células por pocillo por duplicado con medio solo, concanavilina A (0,75 µg/ml), 5 unidades hemaglutinantes (HAU) de A/Isas Salomón/2/2006 (H1N1) inactivado o 2 HAU de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) inactivado durante 48 horas a 37 °C. A  
20 continuación, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0,1% y se incubaron durante la noche con un Ab secundario de rata anti-IL-5 de ratón conjugado con biotina (eBioscience). Los filtros se desarrollaron usando el conjugado de peroxidasa de avidina VectaStain ABC y los kits de sustrato Vectastain AEC de acuerdo con el protocolo del fabricante (Vector Laboratories). La reacción se detuvo lavando las placas con agua desionizada, las placas se secaron en la oscuridad y las manchas se contaron usando un lector ELISPOT automatizado (Analizador C.T.L. Serie3A, Cellular  
25 Technology Ltd.). Los datos se analizaron usando el software ImmunoSpot® (CTL Analyzer LLC).

Análisis estadístico. Todos los experimentos con ratones analizaron cinco animales individuales por grupo por punto de tiempo. Los recuentos de ELISPOT y las titulaciones de anticuerpos transformadas con  $\log_{10}$  se compararon usando ANOVA con el ensayo de comparación múltiple de Tukey. Las titulaciones de HI se compararon mediante ANOVA con el ensayo de comparación múltiple de Tukey usando las titulaciones de HI transformadas con  $\log_2$ .

### 30 Resultados

Estabilidad física de las emulsiones. La Tabla 1 describe la composición de los emulsionantes empleados en este estudio. La PC de huevo es una mezcla heterogénea de fosfatidilcolinas con varias longitudes de cadena de acilo y grados de saturación, aunque se ha identificado un componente principal como POPC (6, 14). En contraste, los fosfolípidos sintéticos mostrados en la Tabla 1 son altamente puros ( $\geq 99\%$ ) y tienen temperaturas de transición de  
35 fase principal ( $T_m$ ) bien definidas como ensamblajes de lípidos. La DOPC y POPC, que contienen ambas cadenas de acilo monoinsaturadas, tienen bajas temperaturas de transición de fase ( $< 0$  °C) debido al desorden de empaquetamiento impuesto por las cadenas insaturadas. La PC de huevo, que contiene cadenas de acilo monoinsaturadas y poliinsaturadas, también tiene una baja  $T_m$ . La DLPC consiste en cadenas de acilo saturadas pero solo tienen 12 carbonos de longitud, lo que resulta en una baja  $T_m$ . La DMPC, DPPC y DSPC tienen cadenas de acilo saturadas más largas (14, 16 y 18 carbonos, respectivamente) y sus temperaturas de transición de fase aumentan según la longitud de la cadena. Por ejemplo, la configuración de DPPC a temperatura ambiente es la fase de gel altamente ordenada, mientras que a más de 41 °C, el lípido forma una fase cristalina líquida que se caracteriza por un mayor desorden de empaquetamiento debido a los cambios inducidos por la temperatura en la conformación de la  
40 cadena de acilo (15).

45 La Tabla 2 muestra las propiedades físicas y de hemocompatibilidad de las emulsiones poco después de su fabricación. Los valores de viscosidad son cercanos a los del agua ( $\sim 1$  cP), lo que indica el bajo contenido de aceite en estas emulsiones (10% v/v cuando se mide la viscosidad, pero se diluye al 2% v/v para la inmunización). Los valores del potencial zeta son negativos para emulsiones que emplean fosfolípidos con valores de  $T_m$  bajos (p. ej., DOPC, DLPC), mientras que las emulsiones con fosfolípidos con  $T_m$  mayores son positivos (DSPC, DPPC). Ninguna de las emulsiones muestra una actividad hemolítica notable cuando se incuba con una suspensión de RBC, aunque la emulsión de DLPC parece ligeramente más hemolítica que las otras.

Recientemente informamos de que la estabilidad del tamaño de las partículas de una emulsión de POPC sintética-escualeno almacenada a 5 °C o temperatura ambiente era equivalente o mejorada en comparación con una emulsión de PC de huevo-escualeno (9). Intentamos desarrollar este trabajo mediante la fabricación de emulsiones de  
55 escualeno con varios otros fosfolípidos sintéticos además de POPC; la Figura 1 muestra la estabilidad del tamaño de las partículas de las emulsiones almacenadas a diferentes temperaturas. El tamaño inicial de la emulsión de POPC se reportó anteriormente (9); aquí, hemos monitorizado la estabilidad a largo plazo de este mismo lote para compararlo con las otras emulsiones de PC sintéticas. Las anomalías obvias en la apariencia física, tal como la separación de fases, cualificó a las emulsiones como visualmente inestables. Teniendo en cuenta los datos de todas las  
60 temperaturas, las emulsiones de DMPC y POPC demostraron una mayor estabilidad en el tamaño de las partículas

que las otras emulsiones estudiadas. El cambio mínimo en el tamaño de las partículas fue evidente a 5 °C, y el cambio gradual en el tamaño de las partículas fue evidente al aumentar la temperatura (Figura 1). Comparativamente, el cambio en el tamaño de las gotas de la emulsión de DOPC fue mínimo a 5 °C, pero notable a las temperaturas de almacenamiento más altas. La estabilidad de la emulsión de DPPC fue altamente dependiente de la temperatura. Cuando se almacenó por encima de la  $T_m$  de DPPC (41 °C), la emulsión de DPPC mostró una buena estabilidad en comparación con las otras emulsiones. Sin embargo, a las tres temperaturas de almacenamiento por debajo de la  $T_m$ , la emulsión de DPPC fue o visualmente inestable o mostró más cambio en el tamaño de las partículas que las emulsiones más estables. De forma interesante, la emulsión de DLPC, que contiene el emulsionante de cadena saturada más corta, fue visualmente inestable en los primeros puntos de tiempo a las cuatro temperaturas de almacenamiento. La emulsión de DSPC también se volvió visualmente inestable antes del punto de tiempo de 6 meses a todas las temperaturas de almacenamiento. Los valores de polidispersidad de tamaño fueron similares entre las emulsiones más estables (Figura 1 complementaria).

El perfilado óptico por dispersión de láser proporciona información complementaria sobre la estabilidad de la emulsión. Los cambios en la emulsión debidos a cremado, coalescencia, etc., se detectan como cambios en la transmisión de la luz a través del perfil vertical de la emulsión (8). Los perfiles ópticos de dispersión de láser de las emulsiones se midieron cada 10 minutos durante un período de 4 horas a 60 °C (Figura 2 complementaria). Con el fin de comparar los datos de diferentes emulsiones, la transmisión integral entre una región específica (25 a 30 mm) en el perfil vertical de la muestra se representa en la Figura 2. Una disminución en la transmisión integral es indicativa de coalescencia o crecimiento del tamaño de las partículas, ya que las partículas más grandes dispersarán más luz, lo que permitirá que se transmita menos al detector. Un aumento en la transmisión integral es generalmente representativo del cremado o separación de fases. La emulsión de DMPC muestra poco cambio en comparación con las emulsiones de POPC o DOPC, lo que indica una estabilidad superior a esta temperatura. Estos datos de perfil óptico confirman el tamaño de las partículas y las observaciones de estabilidad visual descritas anteriormente. Las emulsiones de DLPC, DPPC y DSPC no se muestran, ya que estas emulsiones ya se clasificaron como visualmente inestables a 5 °C antes de que se realizaran las mediciones del perfilado óptico.

En conjunto, los datos de estabilidad física indican que entre los lípidos sintéticos, DMPC, POPC y, en menor medida, DOPC son los emulsionantes más efectivos del aceite de escualeno. El análisis del tamaño de las partículas y de SDS-PAGE después de mezclar las emulsiones con una vacuna de la gripe inactivada indicó una buena compatibilidad (datos no mostrados). Por lo tanto, las emulsiones de PC sintéticas estables anteriores, junto con una emulsión de PC de huevo, se evaluaron posteriormente para determinar la actividad biológica en un modelo de ratón.

Las emulsiones potencian selectivamente las respuestas de anticuerpos a una proteína recombinante de la malaria. Las respuestas de anticuerpos frente a un antígeno de la malaria recombinante, proteína de circumsporozoito de *Plasmodium berghei* (PbCSP), se midieron en sueros de ratones individuales dos semanas después de una segunda inmunización con proteína sola o con proteína combinada con formulaciones de emulsión. Los niveles de anticuerpos IgG anti-PbCSP fueron significativamente más altos en los ratones inmunizados con PbCSP inyectada en presencia de emulsiones que en los ratones que recibieron proteína sola (Figura 3a, valores de  $p < 0,05$ ). Los anticuerpos IgG1 también fueron más altos en los ratones inmunizados con PbCSP con emulsiones de PC de huevo, POPC y DMPC en comparación con ratones inmunizados con proteína sola (Figura 3b, valores de  $p < 0,05$ ). Por el contrario, no se detectaron diferencias entre los diversos grupos en los niveles de anticuerpos IgG2a anti-PbCSP (Figura 3c, valores de  $p > 0,05$ ). Estos datos indican que los anticuerpos IgG1 específicos de antígeno se potencian selectivamente mediante la inclusión de emulsiones durante la exposición al antígeno.

Las emulsiones potencian las respuestas de anticuerpos frente a las proteínas de la gripe. Anteriormente, hemos observado elevadas respuestas de anticuerpos en animales a los que se inyectó Fluzona formulada con emulsiones que incorporan PC derivadas de huevo (8, 13), pero no hemos investigado si estos efectos se observan cuando se incorporan lípidos sintéticos. Para determinar si las emulsiones elevaban la respuesta de anticuerpos frente a las proteínas nativas de la gripe, inmunizamos ratones con una dosis baja de vacuna Fluzona en presencia o ausencia de formulaciones de emulsión que incorporan fosfolípidos naturales o sintéticos. En comparación con la vacunación con la vacuna Fluzona sola, las titulaciones de anticuerpos IgG total, IgG1 e IgG2a fueron mayores para todos los grupos que recibieron Fluzona con formulaciones de emulsión (Figura 4).

También evaluamos el efecto de las formulaciones de emulsión en la generación de células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos de antígeno (ASPC) en la médula ósea, ya que estas células de larga duración secretan anticuerpos durante períodos de tiempo prolongados después de la exposición antigénica y pueden proporcionar una base para la protección a largo plazo. En general, nuestros resultados indican que se generaron números similares de ASPC entre los diversos grupos de formulación de emulsiones. Sin embargo, solo la vacuna que contenía la emulsión de DOPC indujo un número significativamente mayor de células plasmáticas de larga vida que la vacuna Fluzona sola (Figura 4d).

El ensayo de la inhibición de la hemaglutinación (HI) es un indicador predictivo significativo de la eficacia de la vacuna frente a la gripe, con una titulación que generalmente se considera suficiente para proporcionar una protección (16). Para determinar si las formulaciones de emulsión podrían generar anticuerpos de mayor calidad capaces de potenciar la protección que ofrece la vacuna Fluzona, comparamos las titulaciones de HI de ratones vacunados con Fluzona sola o Fluzona con varias formulaciones de emulsión. Cuando se mide 4 semanas después de la inmunización final,

la adición de la formulación de la emulsión induce titulaciones más altas de HI que la vacuna Fluzona sola frente a los componentes de la vacuna A/Islas Salomón/3/2006 (H1N1) y A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (Figura 5). Frente al componente A/Islas Salomón/3/2006 (H1N1), todas las vacunas que contenían emulsión indujeron titulaciones de HI más altas que la Fluzona sola. Frente al componente A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), las emulsiones de PC de huevo y DOPC indujeron titulaciones de HI más altas que la Fluzona sola.

Los experimentos adicionales indicaron que, con la excepción de la emulsión de DMPC, un mayor número de células T específicas de antígeno de ratones inmunizados con Fluzona más emulsiones secretó mayores niveles de IL-5 que las células de ratones inmunizados con Fluzona sola (Figura 6, valores de  $p < 0,05$ ). En conjunto, los datos de la secreción de anticuerpos y citoquinas indican que las vacunas que contienen estas emulsiones incitan una respuesta inmune de tipo Th2 potenciada.

#### Discusión

Las respuestas de anticuerpos incitadas con las vacunas frente a la malaria y la gripe se potenciaron en una materia equivalente independientemente de la PC sintética o derivada de huevo como componentes emulsionantes. Este descubrimiento es significativo para el desarrollo continuo de emulsiones emulsionadas con PC basadas en componentes sintéticos en lugar de naturales. La bibliografía ha mostrado por qué la equivalencia biológica de este tipo de sustitución de componentes no debería darse por sentado; hay varios casos en los que la sustitución de un emulsionante de fosfolípido con otro ha dado lugar a diferencias en la actividad biológica. Por ejemplo, Yasuda et al. encontraron que los liposomas compuestos POR fosfatidilcolinas sintéticas mostraban una correlación directa entre la inmunogenicidad (como lo indica el número de células secretoras de anticuerpos en el bazo) y la temperatura de transición de la fase lipídica cuando se usan para inmunizar ratones de forma intraperitoneal con un antígeno sintético a base de lípidos; se encontró que la transición de fase más alta se correlacionaba directamente con un aumento de la inmunogenicidad (17). Esta correlación entre la temperatura de transición de fase y la inmunogenicidad no fue evidente en el trabajo actual, aunque los fosfolípidos con las temperaturas de transición de fase más altas (DPPC y DSPC) no se evaluaron inmunológicamente debido a la escasa estabilidad de la emulsión. En otro ejemplo de la importancia de la fuente de emulsionante, los resultados de ensayos clínicos recientes con una emulsión de adyuvante de vacuna de agua en aceite, Montaide® ISA 51, revelaron que la sustitución del emulsionante de fuente animal con material de fuente vegetal puede haber sido la causa de una eficacia in vivo significativamente reducida (11). Los datos inmunológicos en el presente trabajo demuestran que las vacunas frente a la gripe y la malaria adyuvadas con emulsiones hechas con diferentes fosfatidilcolinas naturales o sintéticas incitan respuestas de anticuerpos similares. Además, la inmunogenicidad cualitativa de las emulsiones empleadas en este trabajo está en línea con los informes de la bibliografía; por ejemplo, las emulsiones (sin agonistas de TLR) parecen inducir solo aumentos modestos en las respuestas de IgG2a en comparación con el antígeno solo (18). Fueron evidentes diferencias sutiles entre las emulsiones en experimentos con la vacuna frente a la gripe, lo que ilustra que los emulsionantes lipídicos pueden diferir ligeramente en los efectos biológicos. Sin embargo, en general, parece que la PC de huevo puede ser reemplazada por fosfolípidos sintéticos sin un efecto perjudicial sobre la actividad biológica en el contexto de una vacuna frente a la malaria de antígeno recombinante simple o una vacuna frente a la gripe de virus fragmentado inactivado más compleja.

Además de la actividad biológica, es importante considerar la estabilidad física de la emulsión, ya que se relaciona con la estructura de la cadena de acilo del emulsionante. Se ha reportado ocasionalmente que las moléculas de PC purificadas no estabilizan de manera efectiva las emulsiones (19). Por ejemplo, una mezcla de DOPC:DPPC:DPPE sintética no produjo emulsiones tan estables como las observadas con lecitina de huevo cuando se usa para emulsionar los perfluorocarbonos (20). Sin embargo, la reivindicación de que las PC sintéticas puras no emulsionan de manera efectiva es fácilmente refutada por otros reportes (21), que ponen de manifiesto que la estabilidad depende de la estructura y propiedades tanto del aceite como del emulsionante (22). La curvatura o la estructura de empaquetamiento espontánea de los emulsionantes determinan su efectividad en la estabilización de las emulsiones (21). La curvatura o el empaquetamiento espontáneo del emulsionante se ve afectado por a) el comportamiento de la fase de los fosfolípidos, b) el grado de insaturación de las cadenas de acilo lipídico, y c) la miscibilidad de los fosfolípidos en el aceite (21). En el presente trabajo, la importancia de la transición de la fase lipídica es evidente ya que las emulsiones que contienen los fosfolípidos con las temperaturas de transición de fase más altas (DPPC y DSPC) no fueron estables a la mayoría de las temperaturas de almacenamiento sobre la base del tamaño y la apariencia visual. De forma interesante, la DPPC produjo una emulsión estable solo cuando se almacenó por encima de su temperatura de transición de fase principal. Sin embargo, la temperatura de transición de fase no fue el único factor determinante para la estabilidad física; obsérvese que la emulsión de DMPC mostró una buena estabilidad (a todas las temperaturas de almacenamiento, incluyendo las temperaturas por encima y por debajo de la transición de fase) en comparación con la emulsión de DLPC, aunque DMPC tiene una temperatura de transición de fase más alta. Por lo tanto, la complejidad de las interacciones entre el emulsionante y el aceite se pone de manifiesto por el hecho de que la estabilidad de las emulsiones descritas en el presente trabajo no podría predecirse únicamente en función de la temperatura de transición de la fase de los fosfolípidos, la longitud de la cadena de acilo o la saturación. Del mismo modo, el efecto de la temperatura de transición de la fase lipídica y la estructura de la cadena de acilo sobre la estabilidad de la emulsión fue difícil de predecir en el contexto de las emulsiones de trioctanoato de glicerilo: las emulsiones de DLPC, DMPC y DPPC fueron más estables que las emulsiones de DSPC, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfolcolina, y de DOPC (23).

El crecimiento del tamaño de las gotitas de emulsión puede ocurrir por dos mecanismos: la maduración de Ostwald (las diferencias de presión de Laplace hacen que las moléculas de aceite se difundan de gotitas más pequeñas a gotitas más grandes), o la coalescencia (las gotitas de aceite separadas se fusionan y forman una sola gotita) (24). Dado que el escualeno es esencialmente insoluble en agua, es poco probable que la maduración de Ostwald sea responsable del crecimiento del tamaño en las emulsiones del presente trabajo (25-28). Por lo tanto, la coalescencia es el mecanismo probable para el crecimiento del tamaño reportado aquí. Se espera que la tasa de coalescencia aumente con las temperaturas más altas debido a las tasas incrementadas de eventos de difusión y de interacción de las gotitas, y los datos de tamaño presentados aquí son consistentes con esta expectativa. Los emulsionantes que no proporcionan una estabilización estérica o electrostática efectiva a la gotita de aceite a través de una capa interfacial bien empaquetada pueden ser responsables de mayores tasas de coalescencia. Nuestros descubrimientos indican que, en general, los emulsionantes de lípidos insaturados fueron más efectivos que los lípidos saturados en la estabilización de las emulsiones de escualeno, con la excepción de DMPC que produjo una emulsión altamente estable, aunque solo contiene cadenas de acilo saturadas. Esto enfatiza nuevamente que es difícil predecir la estabilidad de la emulsión basándose únicamente en la transición de fase y la estructura de la cadena de acilo de los emulsionantes de fosfolípidos.

Finalmente, observamos que varios datos de caracterización física que se muestran en este manuscrito se correlacionan bien con los reportes bibliográficos anteriores. Por ejemplo, la relación de valores de potencial zeta más negativos para lípidos en fase cristalina líquida frente a lípidos en fase de gel se ha reportado anteriormente; se atribuye a un mayor desorden y defectos de empaquetamiento en las membranas de fase líquida que causa la exposición de los grupos de cabeza polar y permite más sitios de unión disponibles para los aniones en disolución (29, 30). Además, la tendencia hemolítica ligeramente aumentada de la emulsión de DLPC se corresponde con otro reporte de la bibliografía que indica que la DLPC y otros fosfolípidos de cadena corta inducen la hemólisis a través de la creación de poros no específicos en las bicapas lipídicas a través de la separación de la fase lipídica, permitiendo la permeación de iones (31).

## Conclusión

En el presente trabajo, se ha mostrado que las emulsiones de adyuvantes de vacunas que contienen emulsionantes de aceite de escualeno y fosfolípidos sintéticos, concretamente, DMPC o POPC, demostraron una estabilidad del tamaño de las partículas a largo plazo a varias temperaturas. En general, las emulsiones de PC de huevo y PC sintéticas indujeron respuestas inmunes similares en combinación con un antígeno de malaria recombinante simple o una vacuna frente a la gripe de virus fragmentado inactivado. Por lo tanto, la sustitución de la fosfatidilcolina de huevo con fosfatidilcolina sintética no dio lugar a la pérdida de la actividad biológica del adyuvante de la vacuna. El trabajo en curso en nuestro laboratorio comparará la estabilidad y la inmunogenicidad de las emulsiones de escualeno-fosfolípido con otras clases de estructuras de tensioactivos distintos de fosfolípidos, concretamente, polisorbato 80 y poloxámero 188.

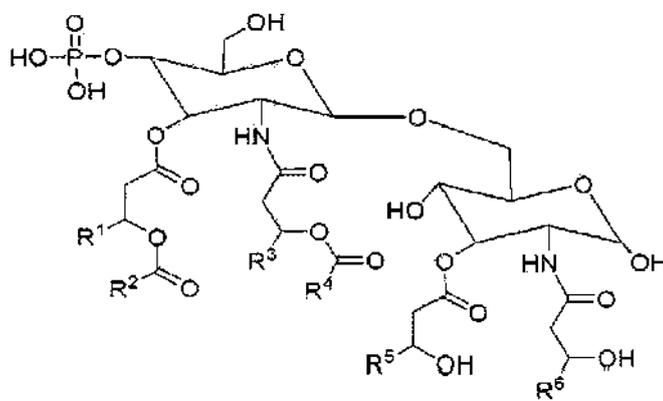
## Referencias

1. Fox CB. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules*. 2009;14:3286-312.
2. Reddy LH, Couvreur P. Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy. *Adv Drug Del Rev*. 2009;61:1412-26.
3. Brito LA, Chan M, Baudner B, Gallorini S, Santos G, O'Hagan DT, et al. An alternative renewable source of squalene for use in emulsion adjuvants. *Vaccine*. 2011;29:6262-8
4. Yang YW, Wu CA, Morrow WJW. Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. *Vaccine*. 2004;22:1524-36.
5. Forchielli ML, Bersani G, Tala S, Grossi G, Puggioli C, Masi M. The spectrum of plant and animal sterols in different oil-derived intravenous emulsions. *Lipids*. 2010;45:63-71.
6. Vernooij EAAM, Kettens - van den Bosch JJ, Crommelin DJA. Rapid determination of acyl chain position in egg phosphatidylcholine by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spec*. 1998;12:83-6.
7. deMan JM. Chemical and physical properties of fatty acids. En: Chow CK, editor. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008. p. 17-46.
8. Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Vedvick TS. Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. *Vaccine*. 2011;29:9563-72.
9. Fox CB, Lin S, Sivananthan SJ, Dutil TS, Forseth KT, Reed SG, et al. Effects of emulsifier concentration, composition, and order of addition in squalene-phosphatidylcholine oil-in-water emulsions. *Pharm Dev Technol*. 2011;16:511-9.

10. Hilleman MR. Personal historical chronicle of six decades of basic and applied research in virology, immunology, and vaccinology. *Immunol Rev.* 1999;170:7-27.
11. Rosenberg SA, Yang JC, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Schwarz SL, et al. Different adjuvanticity of incomplete Freund's adjuvant derived from beef or vegetable components in melanoma patients immunized with a peptide vaccine. *J Immunother.* 2010;33:626-9.
12. Bock TK, Muller BW. A novel assay to determine the hemolytic activity of drugs incorporated in colloidal carrier systems. *Pharm Res.* 1994;11:589-91.
13. Baldwin SL, Shaverdian N, Goto Y, Duthie MS, Raman VS, Evers T, et al. Enhanced humoral and Type 1 cellular immune responses with Fluzone adjuvanted with a synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion. *Vaccine.* 2009;27:5956-63.
14. Vernooij EAAM, Brouwers JFHM, Kettenes-van den Bosch JJ, Crommelin DJA. RP-HPLC/ESI MS determination of acyl chain positions in phospholipids. *J Sep Sci.* 2002;25:285-9.
15. Fox CB, Uibel RH, Harris JM. Detecting phase transitions in phosphatidylcholine vesicles by Raman microscopy and self-modeling curve resolution. *J Phys Chem B.* 2007;111(39):11428-36.
16. Falsey AR. Half-dose influenza vaccine. *Arch Intern Med.* 2008;168:2402-3.
17. Yasuda T, Dancey GF, Kinsky SC. Immunogenicity of liposomal model membranes in mice: Dependence on phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74:1234-6.
18. Baudner BC, Ronconi V, Casini D, Tortoli M, Kazzaz J, Singh M, et al. MF59 emulsion is an effective delivery system for a synthetic TLR4 agonist (E6020). *Pharm Res.* 2009;26:1477-85.
19. Mikrut B. Case study: formulation of an intravenous fat emulsion. En: Burgess DJ, editor. *Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance.* Boca Raton, FL: Taylor y Francis; 2005. p. 415-25.
20. Yoon JK, Burgess DJ. Interfacial properties as stability predictors of lecithin-stabilized perfluorocarbon emulsions. *Pharm Dev Tech.* 1996;1:333-41.
21. Kabalnov A, Tarara T, Arlauskas R, Weers J. Phospholipids as emulsion stabilizers: phase behavior versus emulsion stability. *J Coll Inter Sci.* 1996;184:227-35.
22. Mollet H, Grubenmann A. *Formulation Technology: Emulsions, Suspensions, Solid Forms.* Verlag: Wiley-VCH; 2001.
23. Nii T, Ishii F. Properties of various phosphatidylcholines as emulsifiers or dispersing agents in microparticle preparations for drug carriers. *Coll Surf B: Biointerfaces.* 2004;39(1-2):57-63.
24. Fox CB, Anderson RC, Dutil TS, Goto Y, Reed SG, Vedvick T. Monitoring the effects of component structure and source and formulation stability and adjuvant activity of oil-in-water emulsions. *Coll Surf B: Biointerfaces.* 2008;65:98-105.
25. Bibette J, Morse DC, Witten TA, Weitz DA. Stability criteria for emulsions. *Phys Rev Lett.* 1992;69(16):2439.
26. Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv Coll Inter Sci.* 2004;107(2-3):125-55.
27. Dalgleish DG. Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends Food Sci Tech.* 1997;8(1):1-6.
28. McClements DJ. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Crit Rev Food Sci Nutri.* 2007;47:611-49.
29. Tatulian SA. Binding of alkaline-earth metal cations and some anions to phosphatidylcholine liposomes. *Eur J Biochem.* 1987;170:413-20.
30. Tatulian SA. Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1983;736:189-95.
31. Tanaka Y, Mashino K, Inoue K, Nojima S. Mechanism of human erythrocyte hemolysis induced by short-chain phosphatidylcholines and lysophosphatidylcholine. *J Biochem.* 1983;94:833-40.

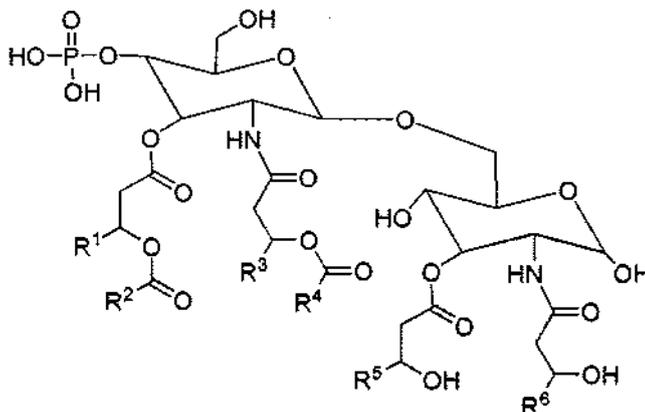
REIVINDICACIONES

1. Una emulsión de aceite en agua que comprende un agonista de TLR4 y un aceite metabolizable, en donde el aceite metabolizable está presente en la emulsión de aceite en agua a una concentración del 0,01%-1% v/v, y en donde el equilibrio hidrofóbico:lipofílico (HLB) de la emulsión de aceite en agua es mayor de 9, o mayor de 10, o entre 9-12, en donde el agonista de TLR4 se selecciona del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), monofosforil lípido A 3-O-desacilado y adyuvante lipídico de glucopiranosilo (GLA) sintético.
2. La emulsión de aceite en agua de la reivindicación 1, en donde el aceite metabolizable está presente en la emulsión de aceite en agua a una concentración del 0,01%-0,5% v/v.
3. La emulsión de aceite en agua de la reivindicación 1, en donde la emulsión comprende además 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), opcionalmente en donde la emulsión no comprende un antioxidante.
4. La emulsión de aceite en agua de la reivindicación 1, en donde el agonista de TLR4 comprende GLA sintético.
5. La emulsión de aceite en agua de la reivindicación 4, en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura: (i)



donde: R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>;

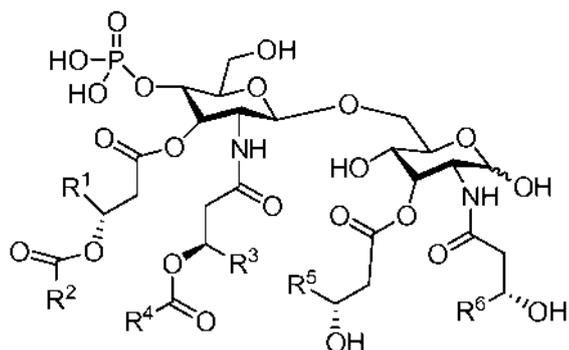
- 15 o, en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura: (ii)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11-20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9-20</sub>;

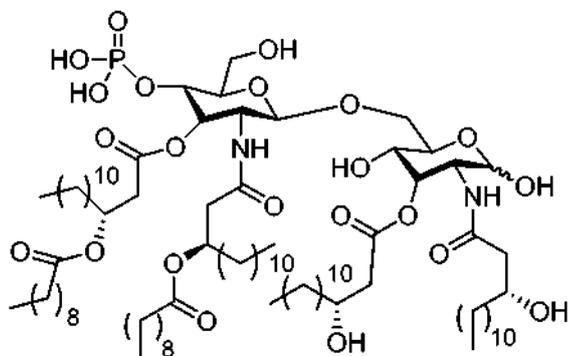
- o, en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura: (iii)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>;

o en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura: (iv)



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. La emulsión de aceite en agua de la reivindicación 5(i), en donde R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>13</sub>.

10 7. La emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la emulsión comprende además un tensioactivo, opcionalmente en donde el agente tensioactivo es plurónico F68.

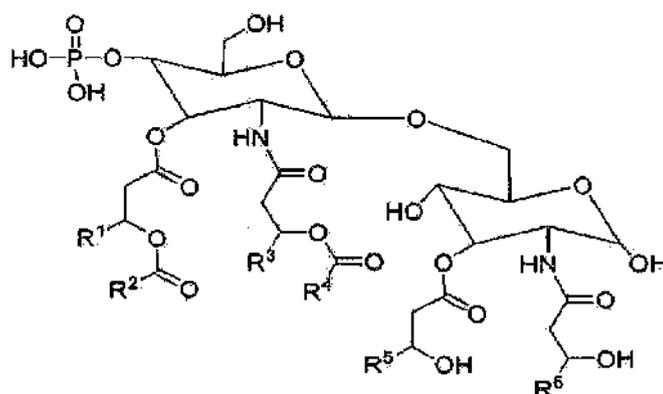
8. La emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el aceite metabolizable es escualeno.

9. La emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la emulsión comprende además un antioxidante, opcionalmente en donde el antioxidante es vitamina E.

15 10. La emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la emulsión comprende además al menos un antígeno.

11. La emulsión de aceite en agua de la reivindicación 1, en donde el agonista de TLR4 es GLA sintético, en donde el HLB de la emulsión es mayor de aproximadamente 10 y en donde la emulsión comprende además DMPC a una concentración de aproximadamente el 0,002%-2%.

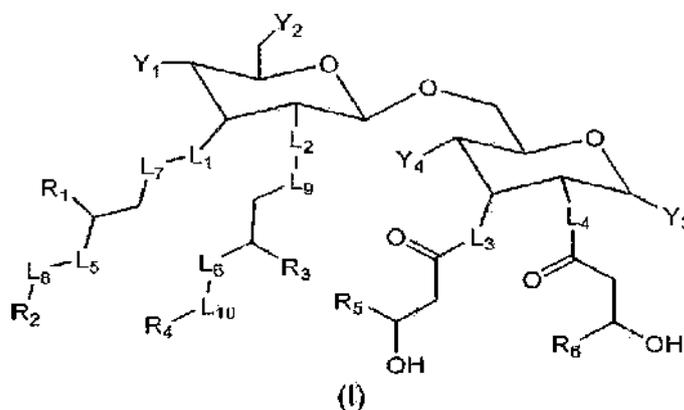
20 12. La emulsión de aceite en agua de la reivindicación 11, en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura:



donde: R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>, opcionalmente,

donde R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>13</sub>;

o, en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente -O-, -NH- o -(CH<sub>2</sub>)-;

L<sub>7</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub> y L<sub>10</sub> son iguales o diferentes e independientemente ausentes o -C(=O)-;

Y<sub>1</sub> es un grupo funcional ácido;

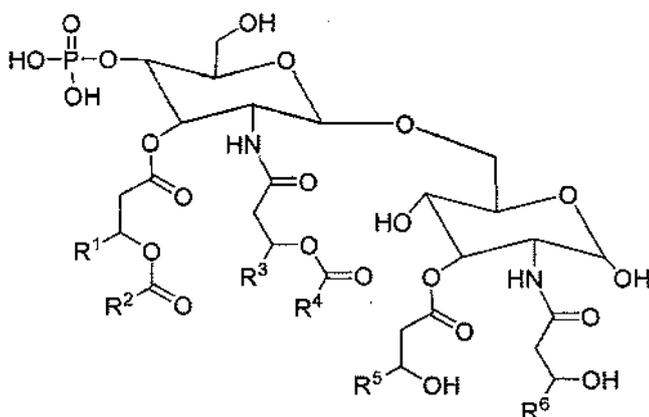
10 Y<sub>2</sub> e Y<sub>3</sub> son iguales o diferentes e independientemente -OH-, -SH-, o un grupo funcional ácido;

Y<sub>4</sub> es -OH o -SH-;

R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>8-13</sub>; y

R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>6-11</sub>, opcionalmente, en donde R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>10</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>8</sub>;

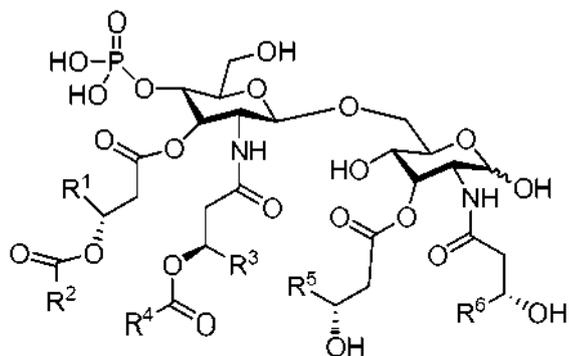
15 o en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11-20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9-20</sub>;

o, en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura:

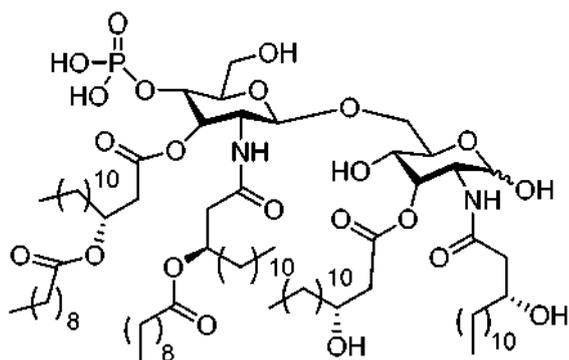


5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11-20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>9-20</sub>;

o, en donde el GLA sintético tiene la siguiente estructura:



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. La emulsión de aceite en agua de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para uso en un método terapéutico para estimular una respuesta inmune en un sujeto.

14. La emulsión de aceite en agua para uso según la reivindicación 13, en donde la respuesta inmune es una respuesta inmune no específica o una respuesta inmune específica de antígeno.

15. La emulsión de aceite en agua para uso según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde la emulsión de aceite en agua se administra por vía intradérmica.

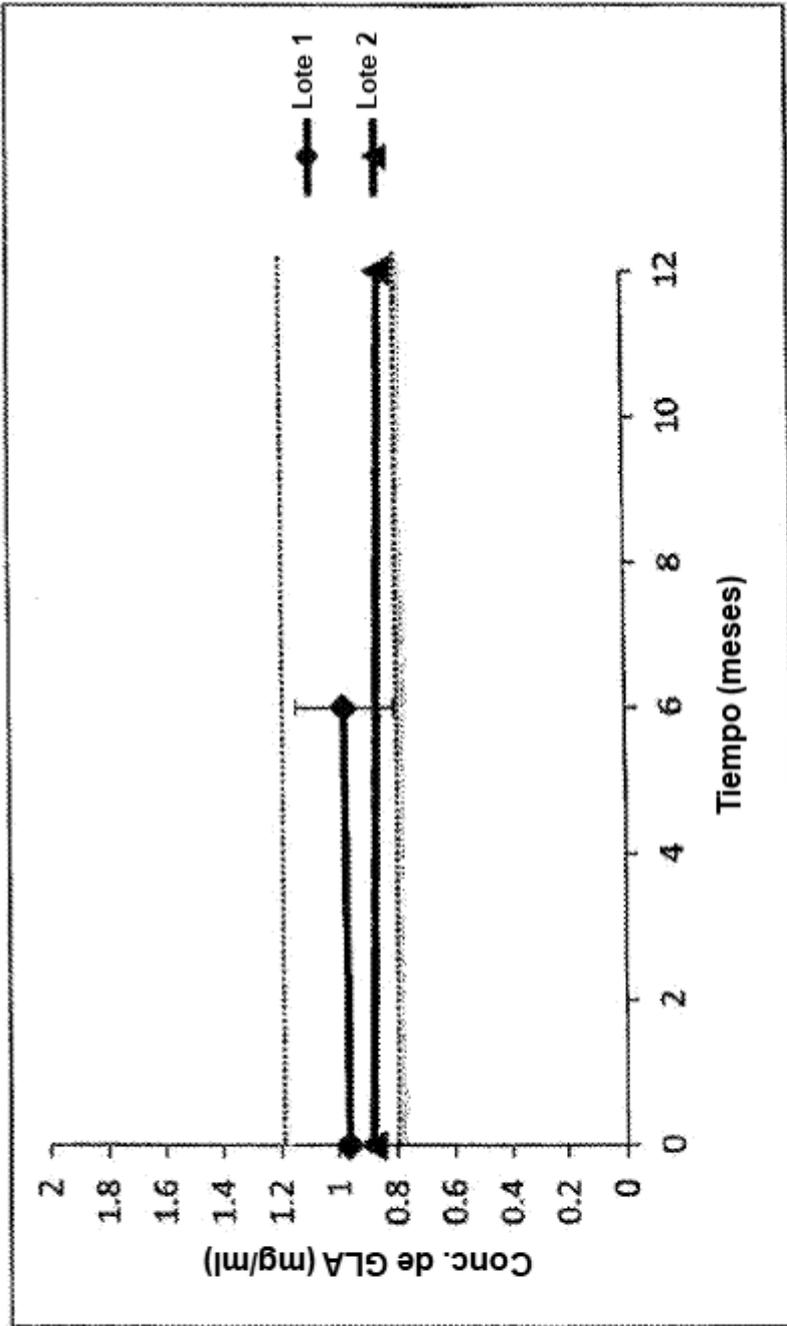
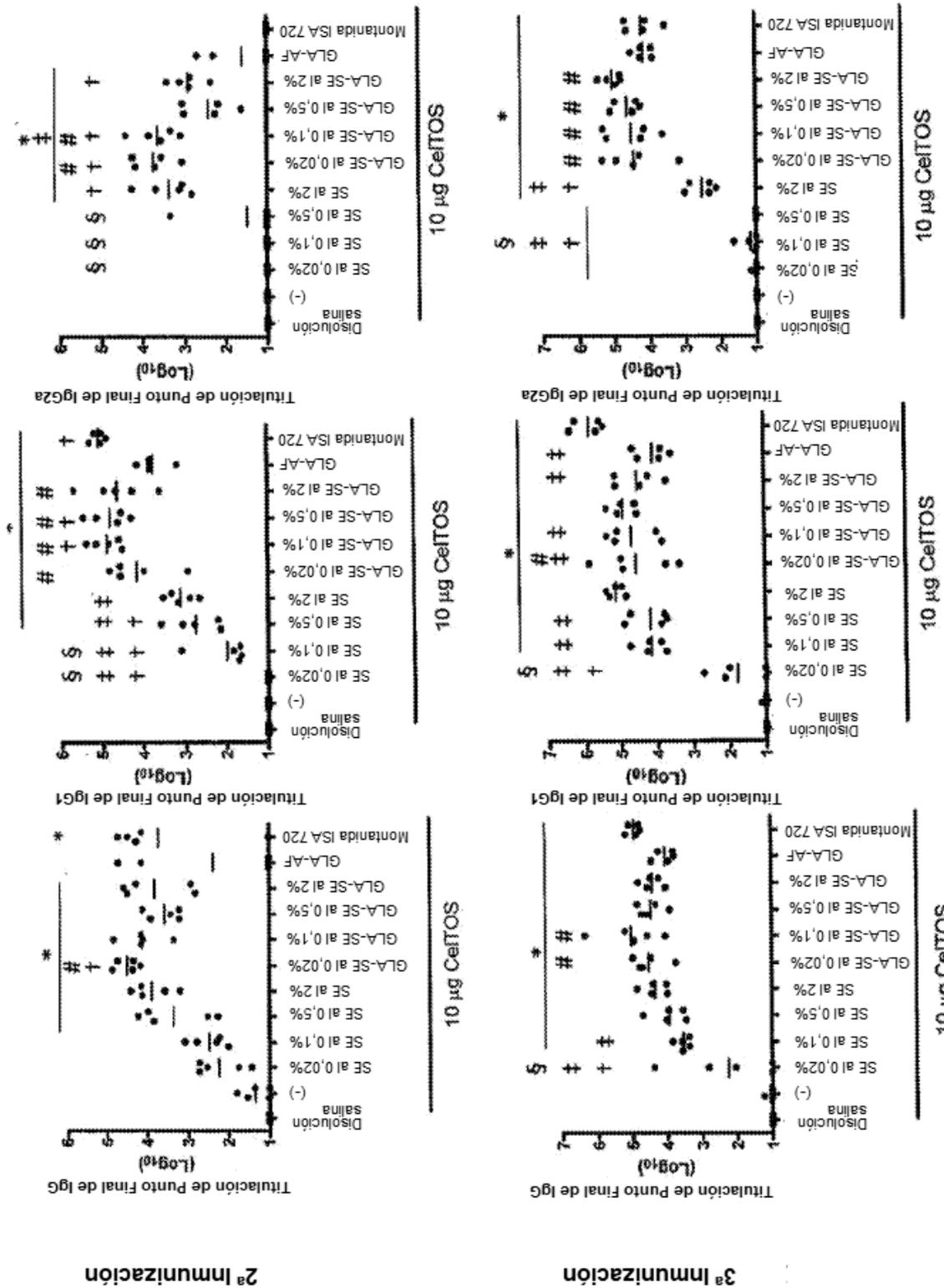


Figura 1. Estabilidad de GLA-AF por HPLC



**Figura 2 (a-f)**

\*p <0,05 frente a Ag, #p <0,05 frente a Mismo % de aceite +/- GLA, \$p <0,05 frente a SE al 2%, tp <0,05 frente a GLA-AF, +p <0,05 frente a Montanide

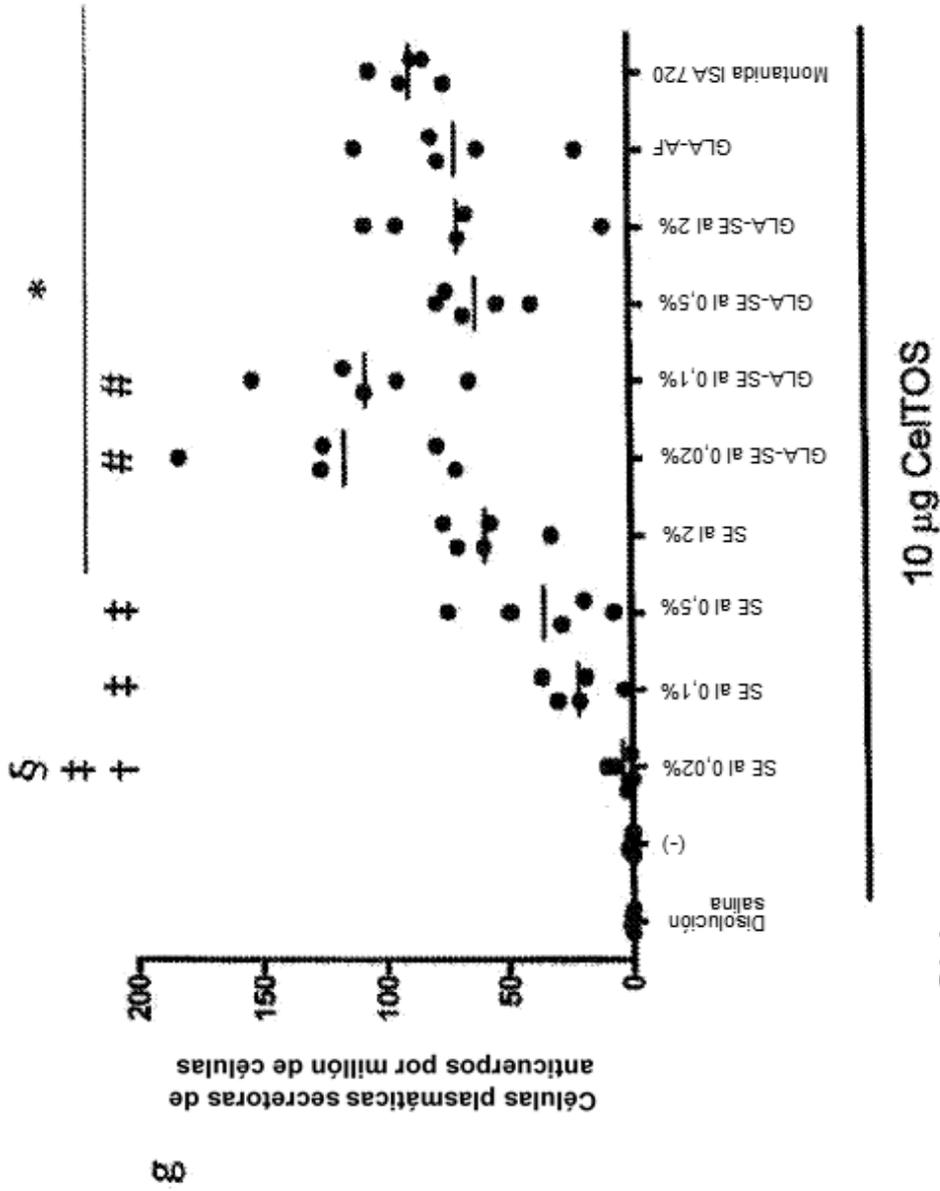


Figura 2g

\*p <0,05 frente a Ag

#p <0,05 frente a Mismo % de aceite +/- GLA

\$p <0,05 frente a SE al 2%

†p <0,05 frente a GLA-AF

‡p <0,05 frente a Montanida

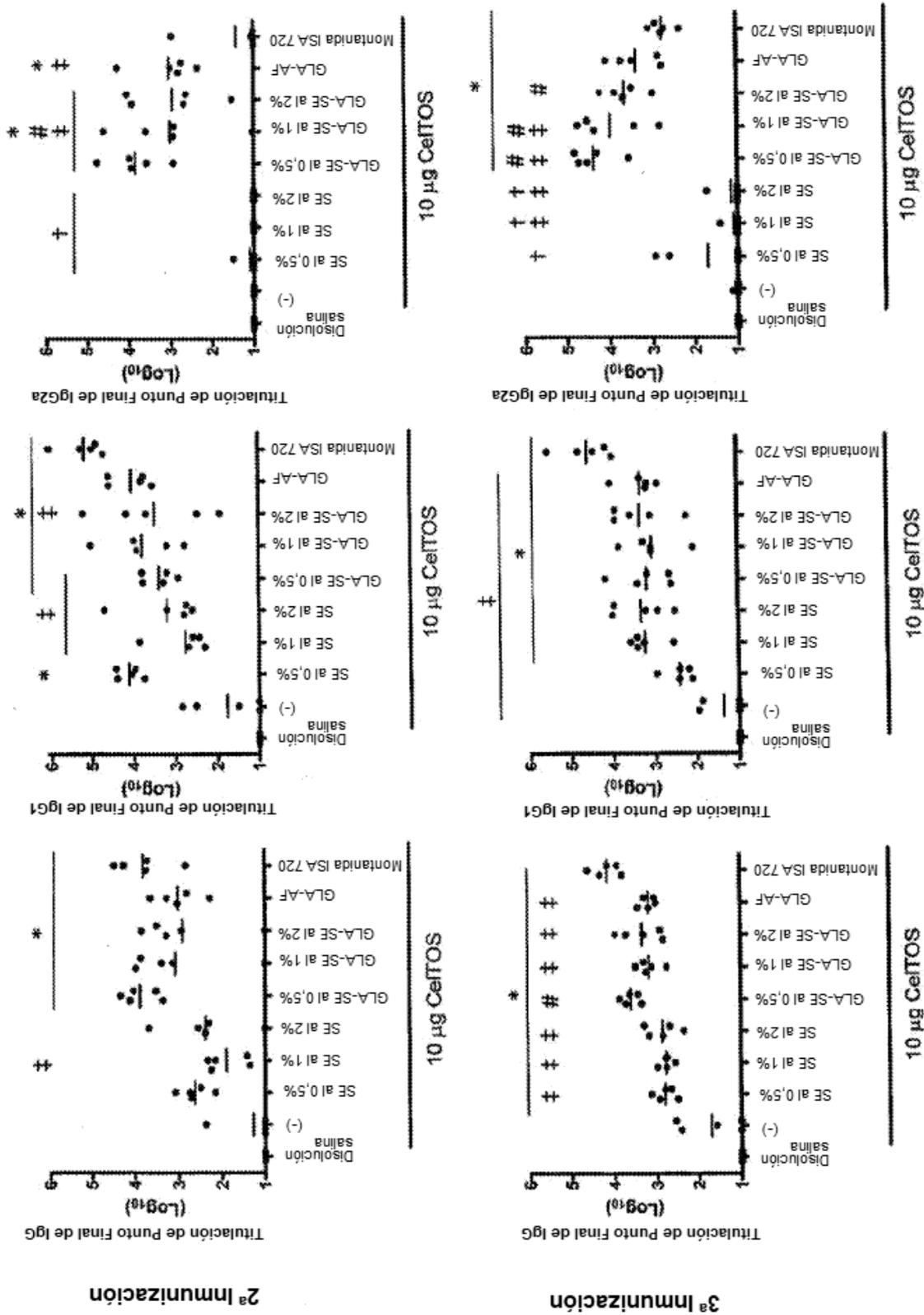


Figura 3(a-f)

\*p <0,05 frente a Ag, #p <0,05 frente a Mismo % de aceite +/- GLA, †p <0,05 frente a SE al 2%, †p <0,05 frente a GLA-AF, †p <0,05 frente a Montanide

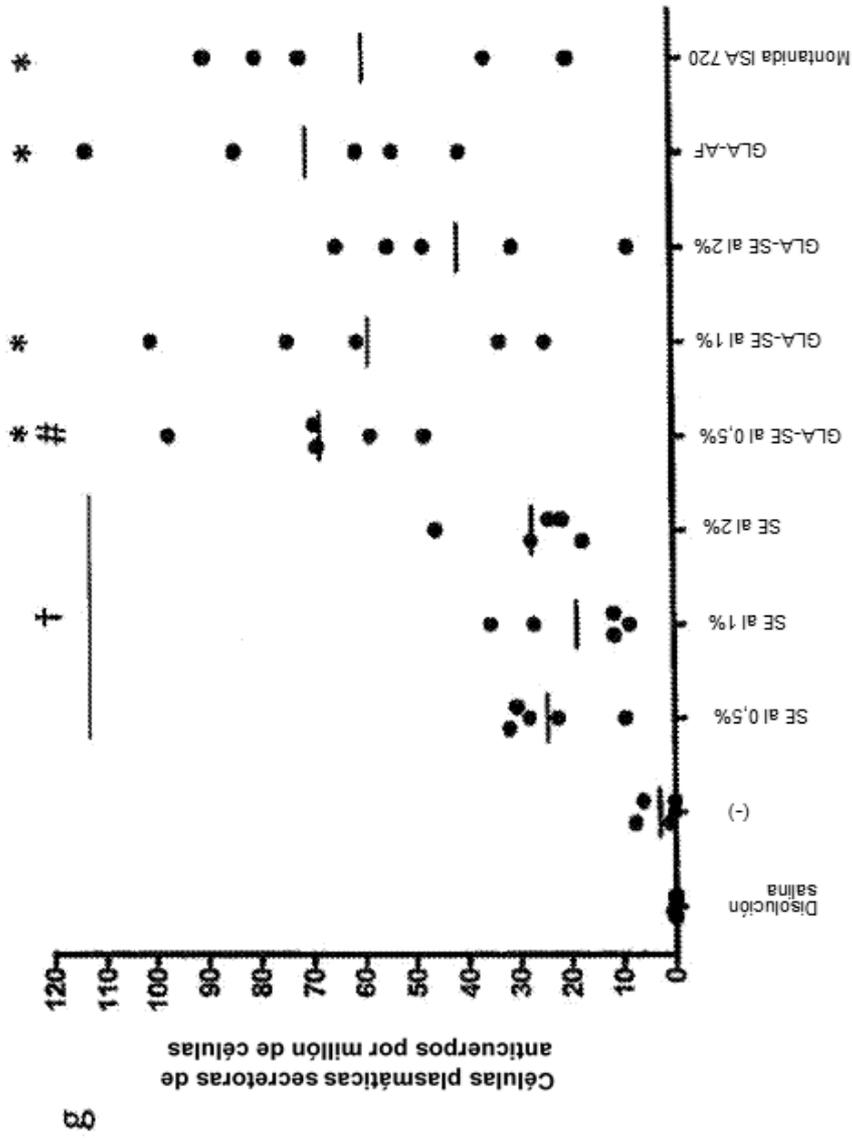


Figura 3g

\*p <0,05 frente a Ag

#p <0,05 frente a Mismo % de aceite +/- GLA

§p <0,05 frente a SE al 2%

†p <0,05 frente a GLA-AF

‡p <0,05 frente a Montanida

10 µg CelTOS

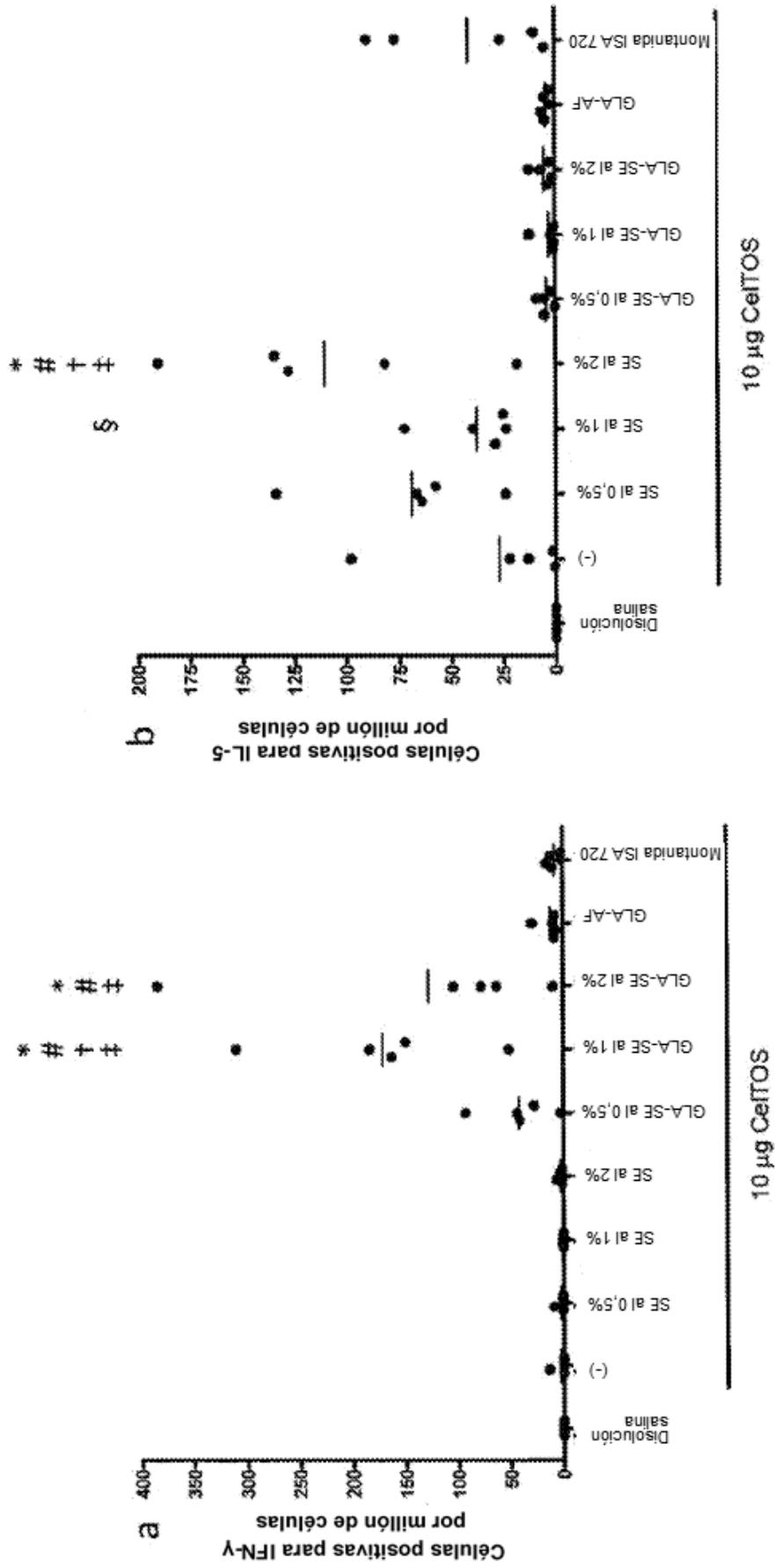
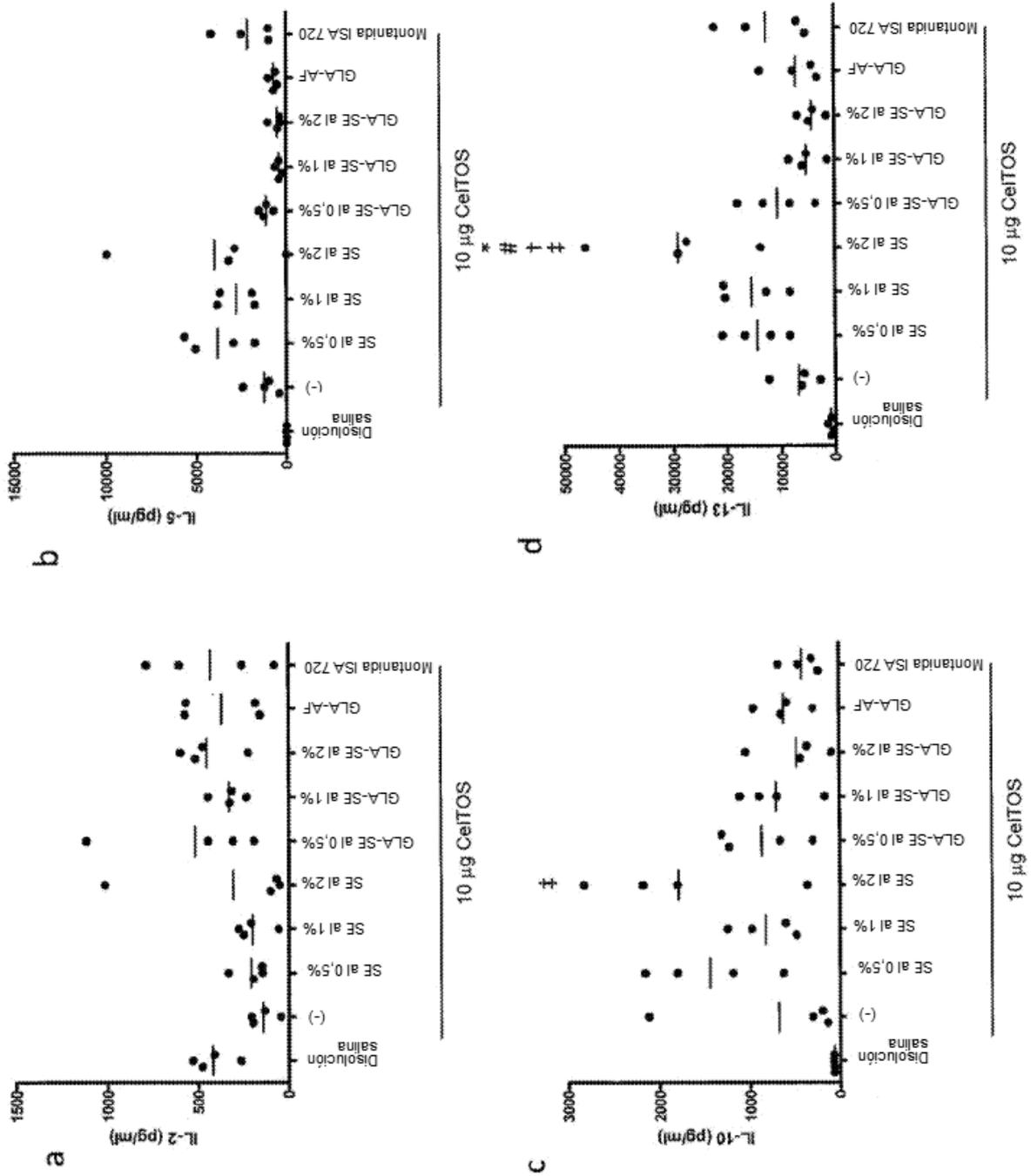
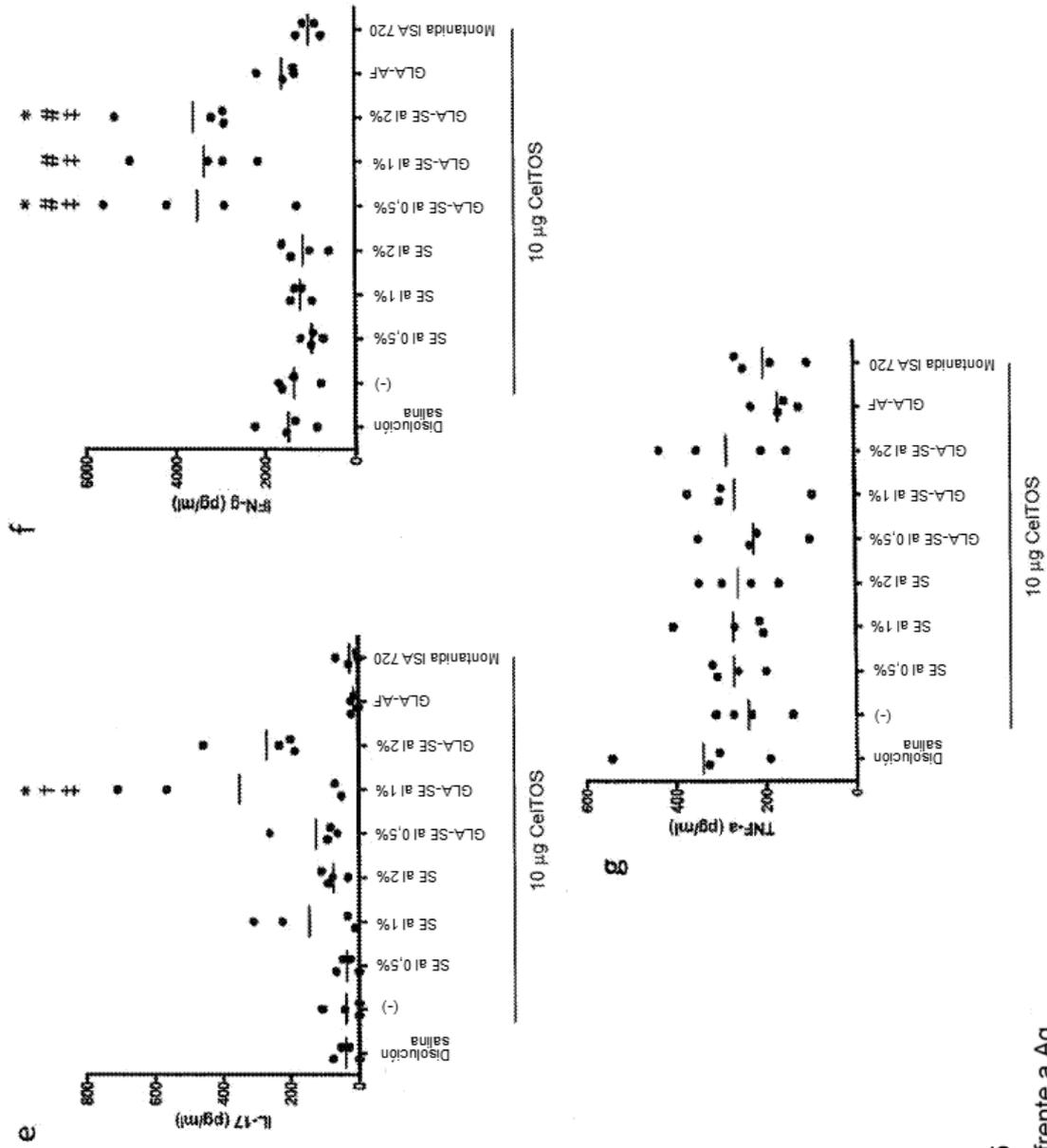


Figura 4

\*p <0,05 frente a Ag  
 #p <0,05 frente a Mismo % de aceite +/- GLA  
 \$p <0,05 frente a SE al 2%  
 †p <0,05 frente a GLA-AF  
 ‡p <0,05 frente a Montanida



**Figura 5**  
Leyenda de las estadísticas en la siguiente diapositiva



**Figura 5**

\*p <0,05 frente a Ag  
 #p <0,05 frente a Mismo % de aceite +/- GLA  
 †p <0,05 frente a GLA-AF  
 ‡p <0,05 frente a Montanida

**Tabla 1. Tamaño de las partículas y polidispersidad de formulaciones de adyuvante.**

<b>Formulación</b>	<b>No. de lote</b>	<b>Tamaño (Z-prom, nm)</b>	<b>Pdl</b>
<b>GLA-AF</b>	<b>1</b>	<b>87,9 ± 1,6</b>	<b>0,248 ± 0,005</b>
<b>GLA-AF</b>	<b>2</b>	<b>91,8 ± 1,7</b>	<b>0,233 ± 0,009</b>
<b>SE</b>	<b>1</b>	<b>95,3 ± 1,9</b>	<b>0,039 ± 0,015</b>
<b>SE</b>	<b>2</b>	<b>97,7 ± 1,9</b>	<b>0,067 ± 0,013</b>

**Figura 6**

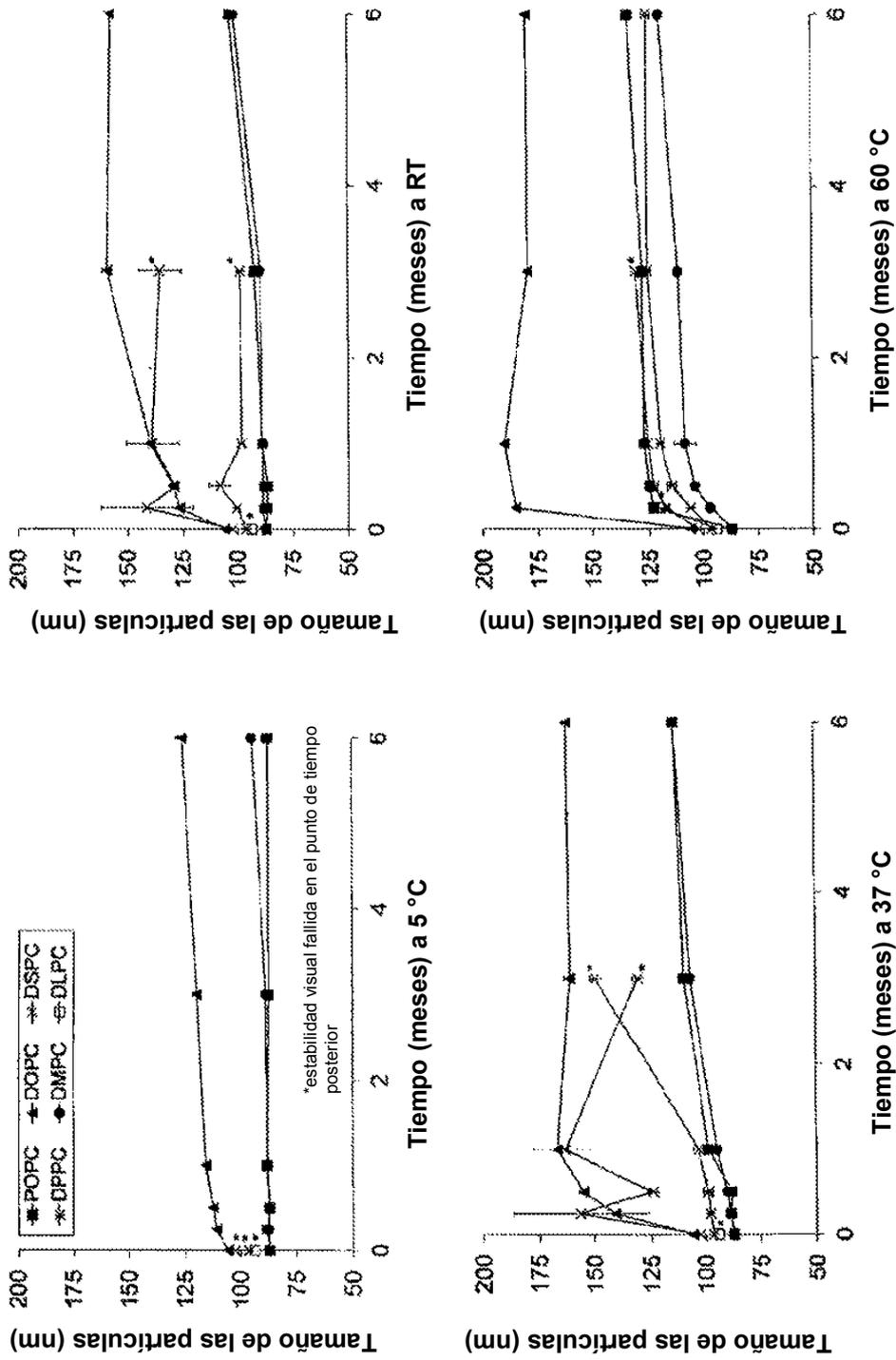


Figura 7

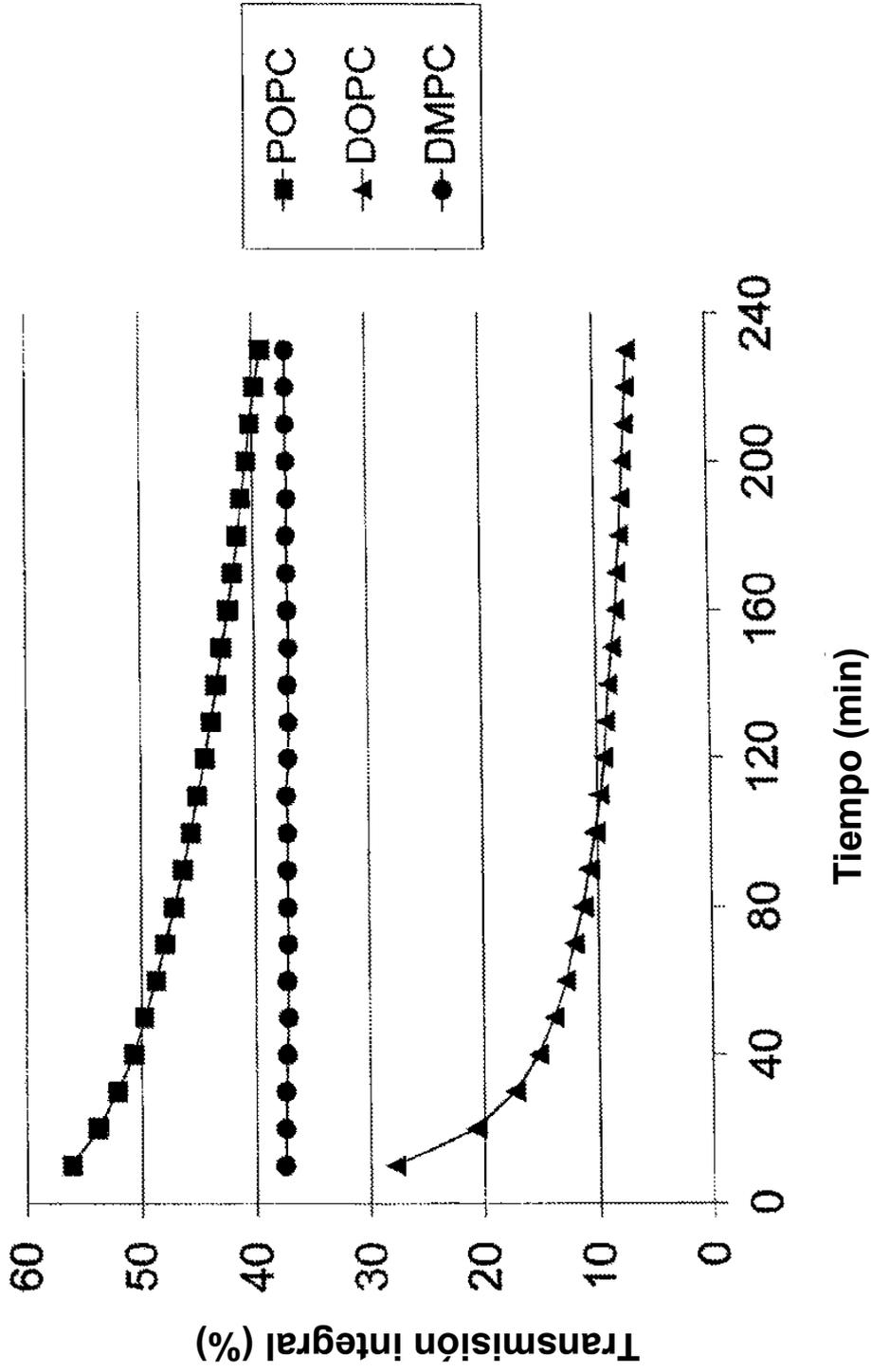


Figura 8

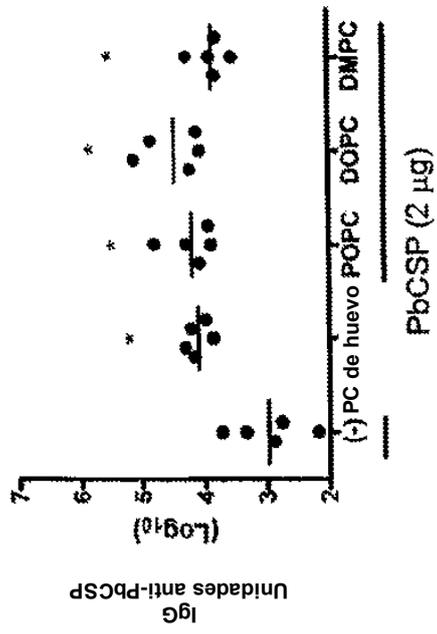


Figura 9a

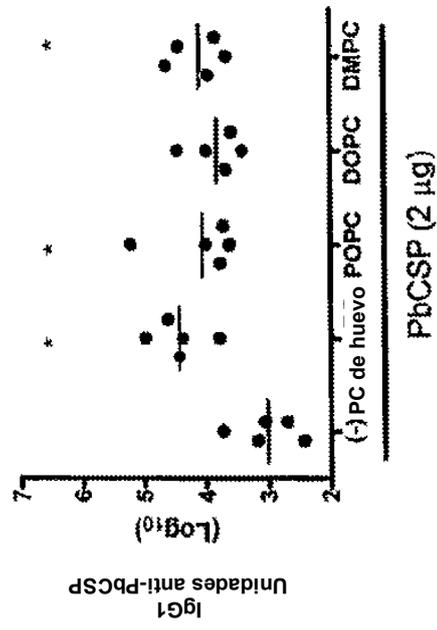


Figura 9b

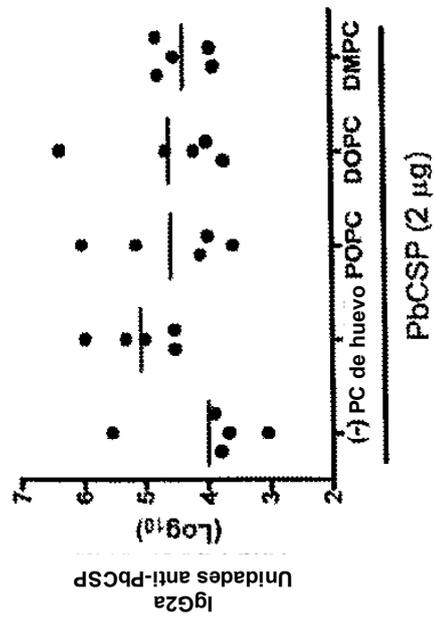


Figura 9c

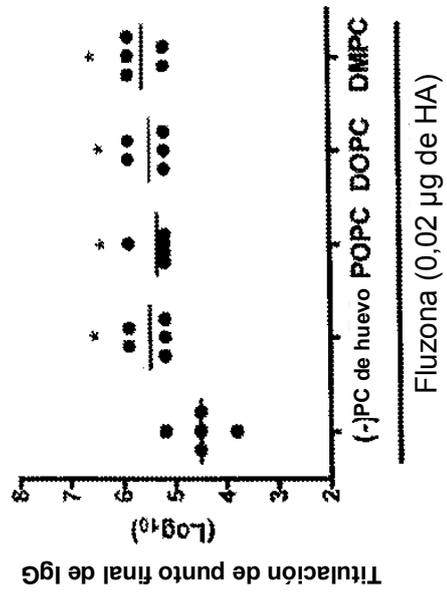


Figura 10a



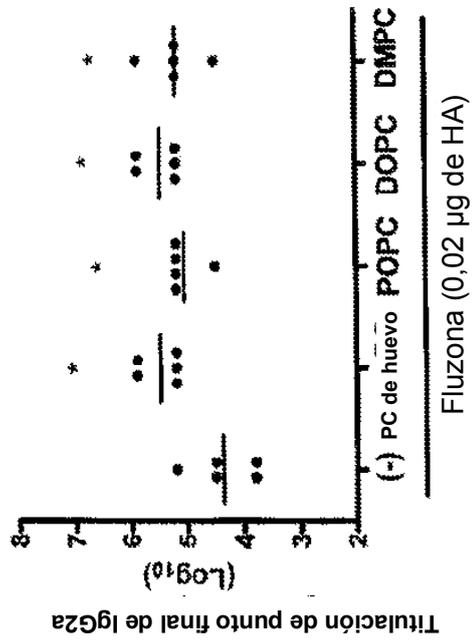


Figura 10c

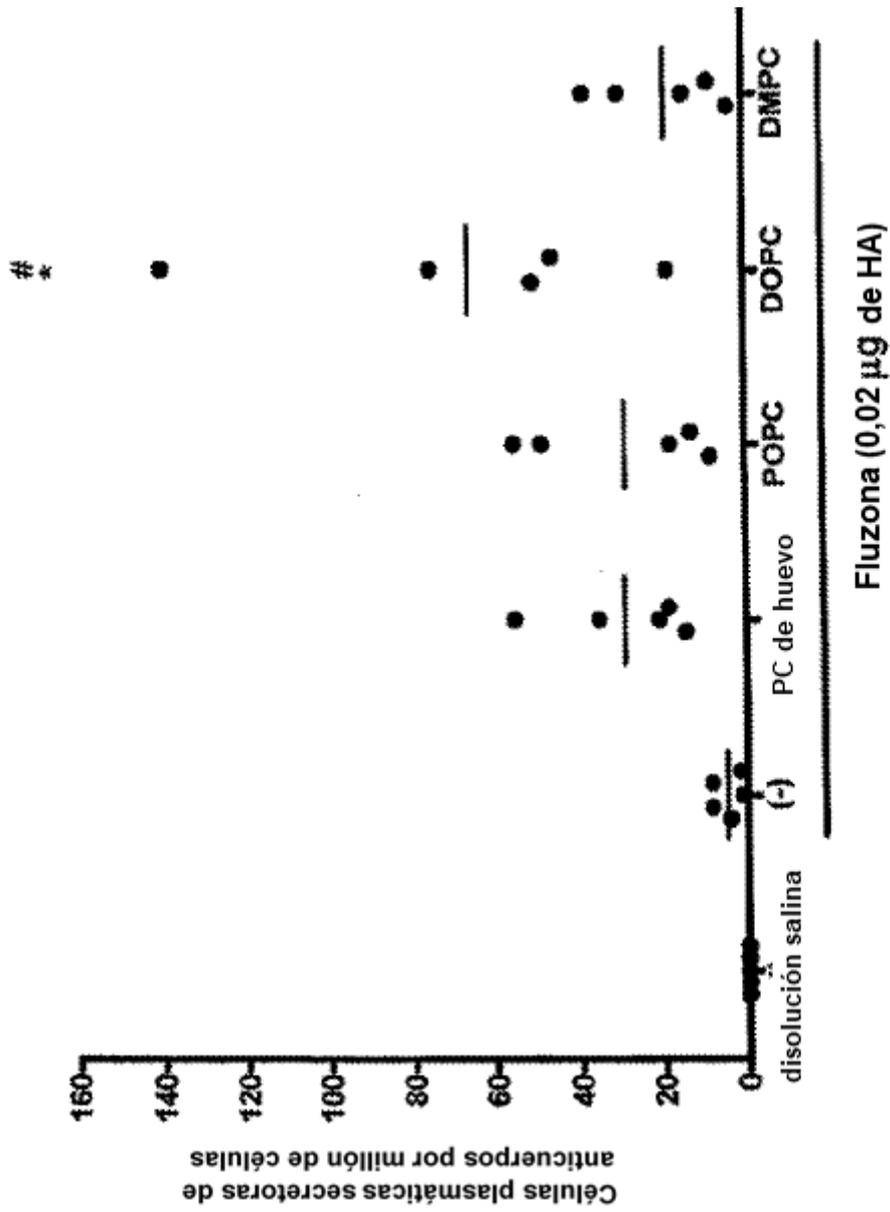


Figura 10d

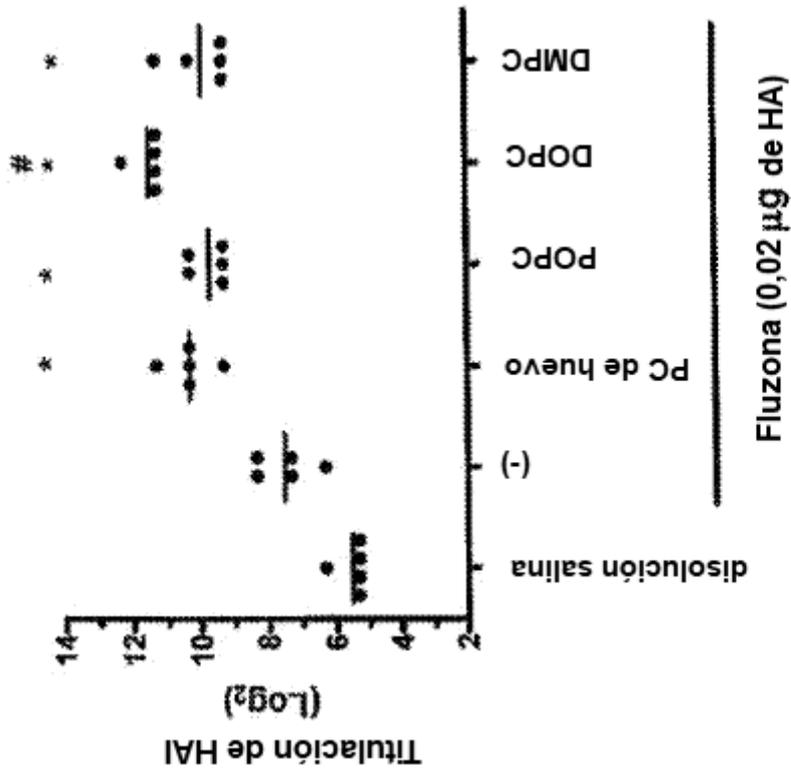


Figura 11a

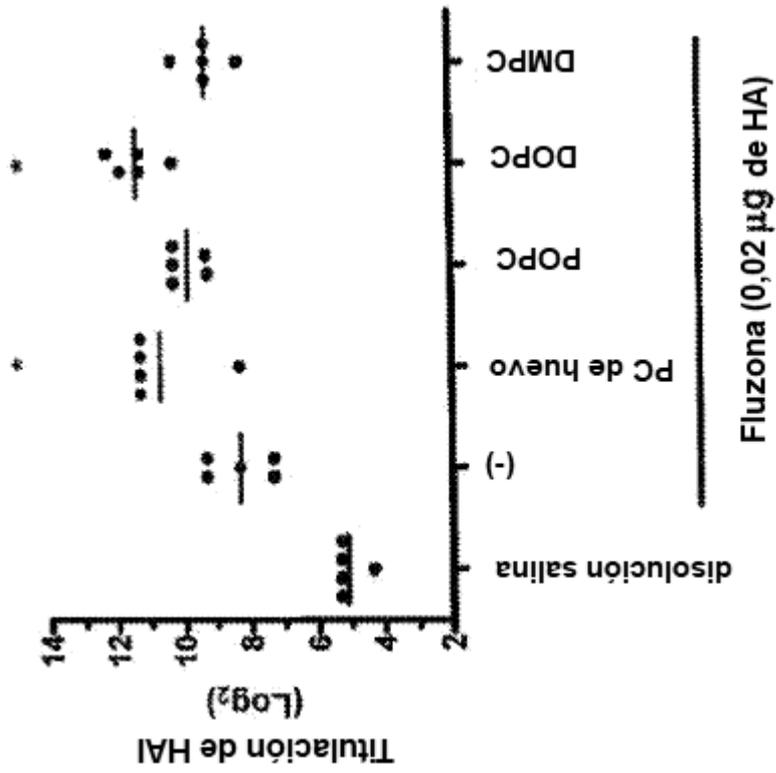


Figura 11b

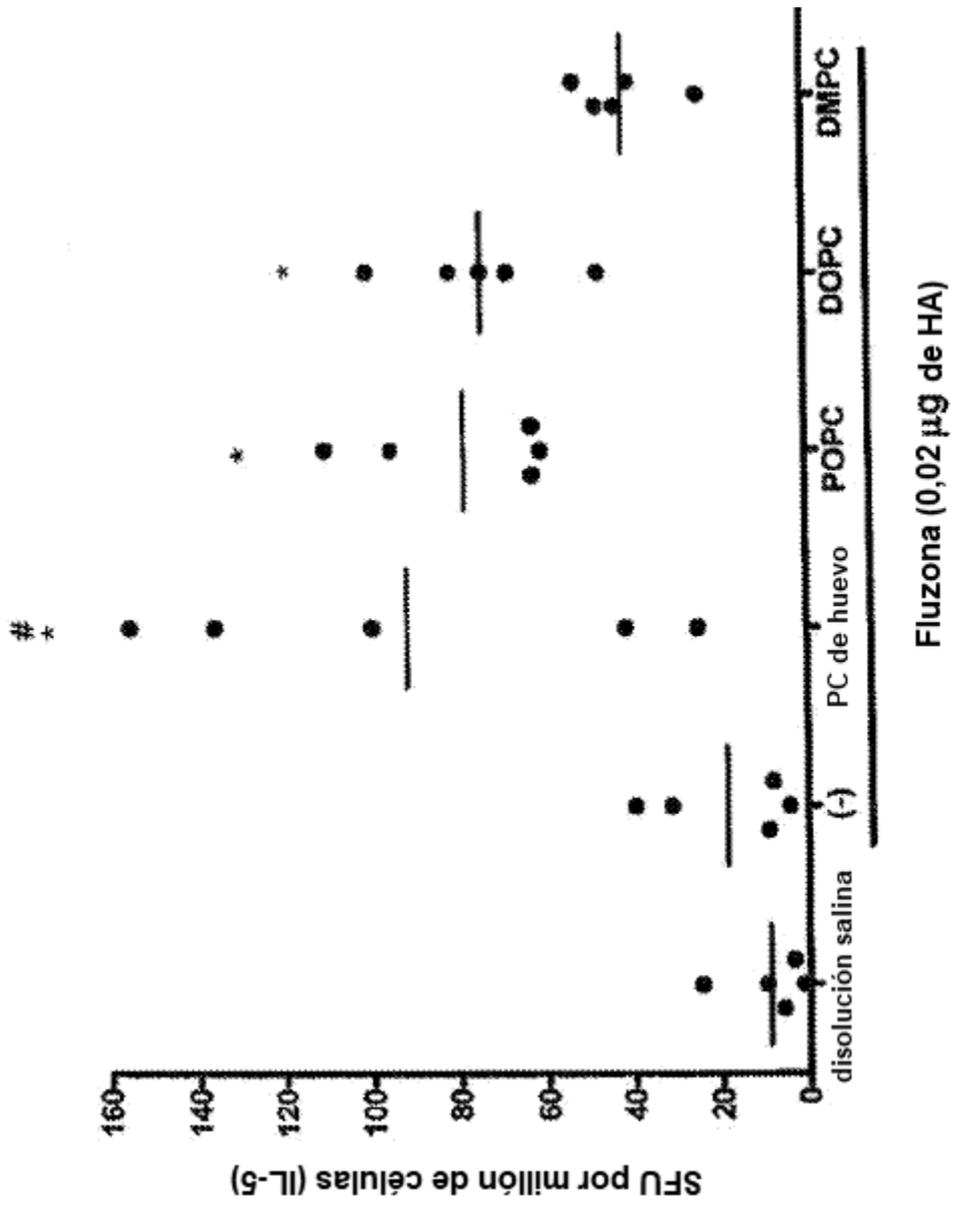


Figura 12a

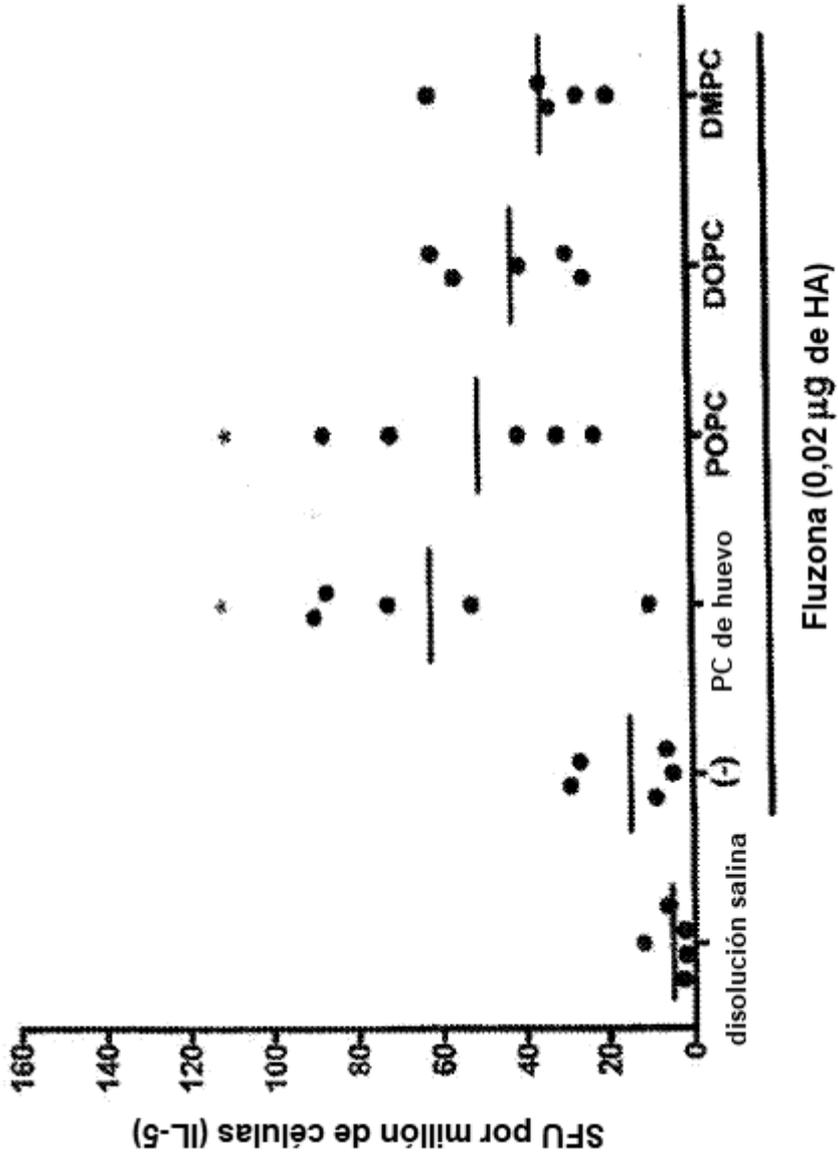


Figura 12b