

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 465**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7008** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014** **PCT/IB2014/059731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14141127**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 14712786 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 2968376**

54 Título: **Composición que contiene derivados fosfato de aminoalquil glucosaminida tamponados y su uso para potenciar una respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361791165 P**

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

**19.02.2020**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)**  
**Rue de l'Institut, 89**  
**1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, DAVID;**  
**BURKHART, DAVID y**  
**DUTTA, NUPUR**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 743 465 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**

Composición que contiene derivados fosfato de aminoalquil glucosaminida tamponados y su uso para potenciar una respuesta inmunitaria

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a una composición que comprende compuestos fosfato de aminoalquil glucosaminida (AGP) y al uso de la composición como adyuvante de vacuna o en un adyuvante de vacuna o en tratamientos profilácticos o terapéuticos. Se desvelan también procedimientos para el uso de las composiciones.

Declaración relativa a la investigación patrocinada por el gobierno federal

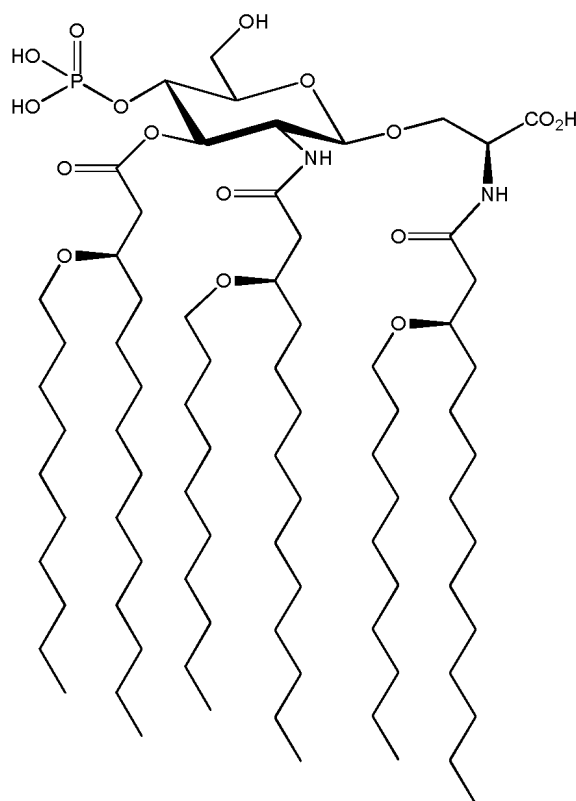
- 10 Aspectos de esta invención se realizaron con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos según el contrato # HHSN272200900008C del Instituto Nacional de Salud (*National Health Institute* o NIH), por ello el gobierno de los Estados Unidos puede tener determinados derechos sobre la invención.

**Antecedentes de la invención**

- 15 Los fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGP) son ligandos sintéticos del receptor 4 de tipo Toll (TLR4). Los AGP y sus efectos inmunomoduladores a través del TLR4 se desvelan en publicaciones de patente tales como WO 2006/016997, WO 2001/090129 y/o la patente de Estados Unidos con n.º 6 113 918 y se ha informado sobre los mismos en la bibliografía. Se han desvelado derivados AGP adicionales en la patente de Estados Unidos con n.º 7 129 219, la patente de Estados Unidos con n.º 6 525 028 y la patente de Estados Unidos con n.º 6 911 434. Determinados AGP actúan como agonistas del TLR4 mientras que otros son reconocidos como antagonistas del TLR4. Los AGP son conocidos por ser útiles como adyuvantes de vacuna y como inmunomoduladores para
- 20 estimular la producción de citocinas, activar macrófagos, promover la respuesta inmunitaria innata y aumentar la producción de anticuerpos en animales inmunizados. Los AGP se han usado con anterioridad principalmente como adyuvantes y/o inmunomoduladores en forma de una emulsión de aceite en agua, empleando normalmente agua y glicerol (aproximadamente un 2 %). Sigue existiendo la necesidad de identificar tampones que se puedan emplear con estos AGP en composiciones farmacéuticas y/o adyuvantes.

**Sumario de la invención**

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona una composición que tiene un pH de 7 y que comprende (i) un fosfato de aminoalquil glucosaminida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) una cantidad eficaz de tampón HEPES suficiente para proporcionar un pH de 7, en la que dicho fosfato de aminoalquil glucosaminida tiene la estructura



CRX601.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra la estructura del CRX-601 y del producto de degradación del CRX-601 de los ejemplos.

La Figura 2 muestra la tasa acelerada de degradación para tampones formulados con CRX-601 a un pH neutro o próximo al fisiológico.

5 La Figura 3 muestra la tasa acelerada de degradación para tres tampones formulados con CRX-601 a un pH próximo al óptimo para cada tampón.

La Figura 4 muestra la estructura del CRX-527 y del producto de degradación del CRX-527 de los ejemplos.

La Figura 5 muestra la tasa acelerada de degradación usando tampones fosfato y HEPES en CRX-527 y CRX-601, respectivamente.

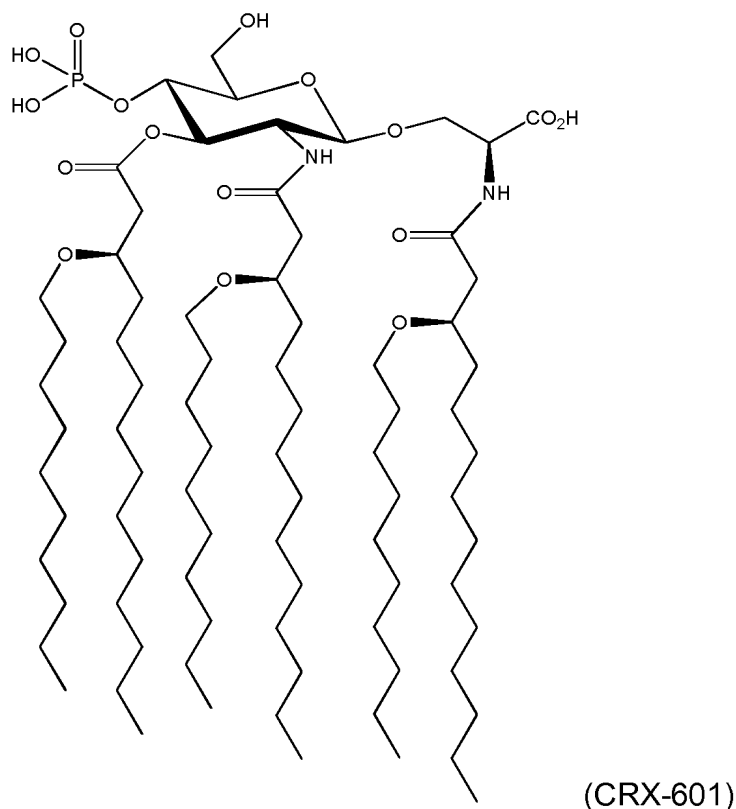
10 La Figura 6 muestra la estabilidad a largo plazo del CRX-601 formulado en tres tampones.

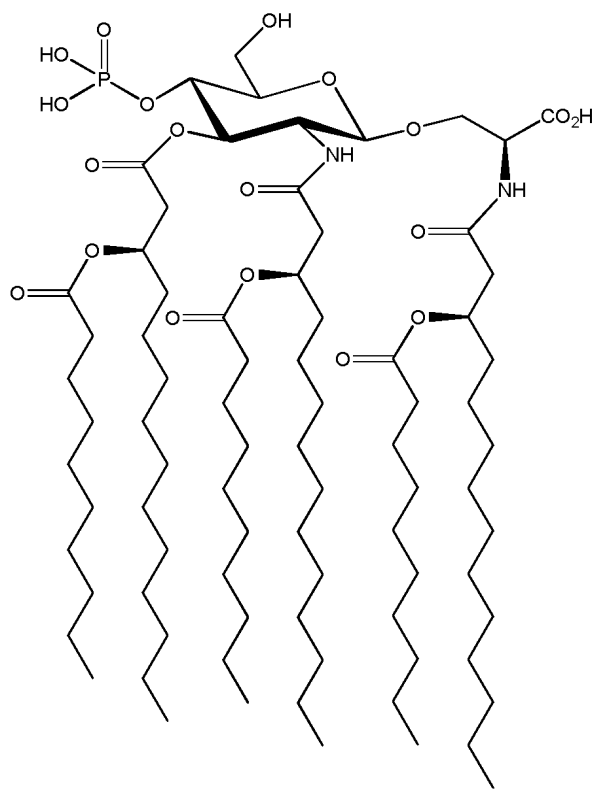
Las Figuras 7 a 9 muestran la potencia relativa entre los tres tampones (HEPES, acetato, citrato) formulados con CRX-601 a un pH próximo al óptimo para cada tampón.

**Descripción detallada de la invención**

15 Compuestos fosfato de aminoalquil glucosaminida Los AGP son moduladores del receptor 4 de tipo Toll (TLR4). El receptor 4 de tipo Toll reconoce a los LPS (lipopolisacáridos) bacterianos y cuando se activa inicia una respuesta inmunitaria innata. Los AGP son un monosacárido imitador de la lipoproteína A de los LPS bacterianos y se han desarrollado con enlaces éter y éster en las "cadenas acilo" del compuesto. Son conocidos procedimientos para preparar estos compuestos y se desvelan, por ejemplo, en el documento WO 2006/016997, las patentes de Estados Unidos con n.ºs 7 288 640 y 6 113 918, y en el documento WO 01/90129. Se han desvelado otros AGP y procesos relacionados en la patente de Estados Unidos con n.º 7 129 219, la patente de Estados Unidos con n.º 6 525 028 y la patente de Estados Unidos con n.º 6 911 434. Los AGP con enlaces éter en las cadenas acilo empleados en la composición de la invención son conocidos y se desvelan en el documento WO 2006/016997. Son de particular interés los compuestos fosfato de aminoalquil glucosaminida expuestos y descritos de acuerdo con la fórmula (III) en los párrafos [0019] a [0021] del documento WO 2006/016997.

25 Ejemplos de los AGP incluyen los desvelados en el presente documento denominados CRX-601 y CRX-527. Las estructuras de los mismos se exponen a continuación:



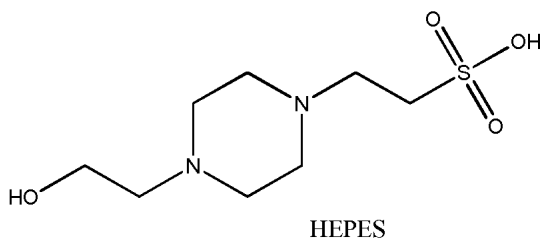


Tampones La composición que comprende un AGP se tampona usando el tampón zwitteriónico HEPES, adecuado para uso humano, tal como para su uso en un producto comercial para inyección.

El tampón se puede usar con una cantidad adecuada de solución salina u otro excipiente para conseguir la isotonicidad deseada. En una realización preferente, se usa solución salina al 0,9 %.

HEPES: Número de registro CAS: 7365-45-9  $C_8H_{18}N_2O_4S$

El ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico, HEPES, es un tampón zwitteriónico diseñado para tamponar en el intervalo del pH fisiológico de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 (por ejemplo, 6,15 - 8,35). El HEPES es normalmente un polvo cristalino blanco y tiene la fórmula molecular:  $C_8H_{18}N_2O_4S$  con la siguiente estructura:



El HEPES es bien conocido y está disponible en el mercado (véase, por ejemplo, Good y col. *Biochemistry* 1966).

Mezcla/solución de nanopartículas Cuando se forma, la composición de la invención puede ser una dispersión o una solución. De forma adecuada, la composición es una solución de nanopartículas con tamaños de partícula de  $\leq 200$  nm. En una realización adecuada, la composición es una solución de nanopartículas con tamaños de partícula de  $\leq 200$  nm que muestra características micelares o liposomales. En una realización, la solución o dispersión es adecuada para uso farmacéutico como inmunomodulador. El tamaño de las partículas en solución se determina en parte por la longitud del tiempo durante la cual la composición de la solución o dispersión está sometida a tratamiento con ultrasonidos.

Las composiciones de la presente invención se pueden usar para proteger o tratar un mamífero mediante administración por vía sistémica o vía mucosa. Estas administraciones pueden incluir la inyección por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o la administración por vía mucosa a los tractos oral/digestivo, respiratorio, genitourinario. La composición de la invención se puede administrar en forma de dosis única o de dosis múltiples. Además, las composiciones de la invención se pueden administrar por diferentes vías para el cebado y el refuerzo, por ejemplo, dosis de cebado IM y dosis de refuerzo IN.

La composición de la presente invención se puede administrar sola o con vehículos farmacéuticos adecuados, y se puede usar en la fabricación de una forma sólida o líquida, tal como comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. La composición se puede formular en una "vacuna" y se puede administrar en solución libre, o se puede formular con un adyuvante o excipiente. La preparación de la vacuna se describe de manera general en *Vaccine Design* ("The subunit and adjuvant approach" (Eds. Powell M. F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). Fullerton, en la patente de Estados Unidos n.º 4 235 877, describe la encapsulación dentro de liposomas. Las vacunas se pueden almacenar en solución o liofilizadas.

Las dosis eficaces de los tratamientos que incorporan las composiciones de la presente invención para el tratamiento de un sujeto varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen el medio de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, otras medicaciones administradas, el estado físico del paciente con relación a otras complicaciones médicas, y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. La posología de tratamiento deberá valorarse para optimizar la seguridad y la eficacia. Las dosis al paciente descritas en el presente documento varían normalmente de aproximadamente 0,1 µg a 50 mg por administración que, dependiendo de la aplicación, se podrían administrar diariamente, semanalmente o mensualmente y en cualquier otro periodo de tiempo entre ellos. Más normalmente, las dosis mucosas o locales varían de aproximadamente 10 µg a 10 mg por administración y, opcionalmente, de aproximadamente 100 µg a 1 mg, con 2-4 administraciones con un espacio de días o semanas entre ellas. Más normalmente, las dosis inmunoestimulantes varían de 1 µg a 10 mg por administración y, más normalmente, de 10 µg a 1 mg, con administraciones diarias o semanales. Las dosis que incorpora la invención descritas en el presente documento para administración parenteral, por ejemplo, para inducir una respuesta inmunitaria innata, o en vehículos de administración especializados varían normalmente de aproximadamente 0,1 µg a 10 mg por administración que, dependiendo de la aplicación, se podrían administrar diariamente, semanalmente o mensualmente y en cualquier otro periodo de tiempo entre ellos. Más normalmente, las dosis parenterales para estos fines varían de aproximadamente 10 µg a 5 mg por administración y, más normalmente, de aproximadamente 100 µg a 1 mg, con 2-4 administraciones con un espacio de días o semanas entre ellas. En algunas realizaciones, sin embargo, las dosis parenterales para estos fines se pueden usar en un intervalo de 5 a 10 000 veces más que las dosis normales descritas anteriormente.

En el presente documento se desvela un procedimiento para mejorar o prevenir esencialmente una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno neurológico o una afección alérgica o inflamatoria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición farmacéutica. En algunos casos, se puede administrar un antígeno exógeno al sujeto junto con la composición farmacéutica. En composiciones para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria, las composiciones de la invención objeto se administran a un animal de sangre caliente, tal como un ser humano u otro mamífero, con un antígeno tal como un antígeno de proteína o polipéptido o un polinucleótido que expresa un antígeno de proteína o polipéptido. La cantidad de antígeno administrado para inducir una respuesta deseada puede ser determinada fácilmente por el experto en la técnica y variará en función del tipo de antígeno administrado, la vía de administración y el programa de inmunización. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar también sin un antígeno exógeno, a fin de inducir una protección inmediata mediante un efecto de resistencia no específico. Las composiciones que tienen la capacidad de estimular un efecto de resistencia no específico y/o inducir un efecto adyuvante se pueden usar en formulaciones de vacuna de acción rápida.

Términos/Definiciones Tal como se discute en el presente documento, el término "alifático" como tal o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada, o una combinación de los mismos, que puede ser totalmente saturado o mono- o poliinsaturado y que puede incluir radicales di- y multivalentes, con el número de átomos de carbono designado (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o C<sub>1-10</sub> significa de uno a diez átomos de carbono). Ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, por ejemplo, y similares. Un grupo alifático insaturado es un grupo que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alifáticos insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. Normalmente, un grupo alifático tendrá de 1 a 24 átomos de carbono. Un grupo "alifático inferior" es un grupo alifático de cadena más corta, que tiene por lo general ocho o menos átomos de carbono.

El término "acilo" se refiere a un grupo derivado de un ácido orgánico por eliminación del grupo hidroxilo. Ejemplos de grupos acilo incluyen acetilo, propionilo, dodecanoilo, tetradecanoilo, isobutirilo y similares. De acuerdo con lo anterior, el término "acilo", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir un grupo definido también como -C(O)-alifático, en el que el grupo alifático es preferentemente un grupo alifático saturado.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funciones relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. En una realización, la sal es una sal de etanolamina,

tal como monoetanolamina (MEA) o trietanolamina (TEA). Cuando los compuestos usados en la composición de la presente invención contienen funciones relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivados de ácidos inorgánicos como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogeno-  
 5 sulfúrico, yodhídrico o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como los ácidos acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También  
 10 se incluyen sales de aminoácidos tales como el arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge, S.M., y col., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19, 1977). Determinados compuestos específicos usados en la composición de la presente invención contienen funciones tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o sales de adición de ácido.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un medio que no interfiere en la actividad inmunomoduladora del principio activo y que no es tóxico para el paciente al que se le administra.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, emulsiones múltiples (por ejemplo de agua en aceite en agua) microemulsiones, liposomas, microperlas, microesferas, microsomas y similares. Por ejemplo, el vehículo puede ser una microesfera, o preferentemente una  
 20 nanoesfera, o puede ser una micropartícula, o preferentemente una nanopartícula, que tiene un compuesto de la presente invención dentro de la matriz de la esfera o partícula o adsorbido sobre la superficie de la esfera o partícula. El vehículo puede ser también una solución acuosa o una dispersión micelar que contiene trietilamina, trietanolamina u otro agente que hace que la formulación sea de naturaleza alcalina, o una suspensión que contenga  
 25 hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, fosfato de calcio o adsorbato de tirosina. Los vehículos pueden incluir también todos los disolventes, medios de dispersión, portadores, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, soluciones vehículo, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente sea incompatible con el principio activo, se  
 30 contempla su uso en las composiciones terapéuticas.

En determinadas realizaciones, se usan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en organismos/células huésped adecuados. En particular, las composiciones de la presente invención se pueden formular para su administración encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanosfera, o una nanopartícula o similares.

35 La formación y el uso de preparaciones de liposomas y de tipo liposomas como potenciales vehículos de fármacos son conocidos generalmente por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Lasic, *Trends Biotechnol* 1998 Jul; 16(7):307-21; Takakura, *Nippon Rinsho* 1998 Mar;56(3): 691-5; Chandran y col., *Indian J Exp Biol*. 1997 Aug; 35(8): 801-9; Margalit, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1995; 12(2-3): 233-61; patente de Estados Unidos n.º 5 567 434; patente de Estados Unidos n.º 5 552 157; patente de Estados Unidos n.º 5 565 213; patente de Estados Unidos n.º  
 40 5 738 868 y patente de Estados Unidos n.º 5 795 587).

Los liposomas se han usado con éxito con un número de tipos de células que son normalmente difíciles de transfectar mediante otros procedimientos, incluyendo suspensiones de células T, cultivos de hepatocitos primarios y células PC 12 (Renneisen y col., *J Biol Chem*. 1990 Sep 25; 265(27): 16337-42; Muller y col., *DNA Cell Biol*. 1990  
 45 Abr; 9(3): 221-9). Además, los liposomas no tienen las restricciones de longitud del ADN que son características de los sistemas de administración basados en virus. Los liposomas se han usado eficazmente para introducir genes, diversos fármacos, agentes radioterapéuticos, enzimas, virus, factores de transcripción, efectores alostéricos y similares, en una variedad de líneas celulares cultivadas y animales. Asimismo, el uso de liposomas no parece estar asociado a respuestas autoinmunitarias o a una toxicidad inaceptable tras su administración sistémica.

En determinadas realizaciones, los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de doble capa concéntricas multilamelares (denominadas también  
 50 vesículas multilamelares (MLV)).

Como alternativa, en otras realizaciones, la invención proporciona formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de una manera estable y reproducible (véase, por ejemplo, Quintanar-Guerrero y col.  
 55 *Drug Dev Ind Pharm*. 1998 Dic; 24(12): 1113-28). Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (con tamaños de aproximadamente 0,1 µm) se pueden diseñar usando polímeros que son capaces de ser degradados *in vivo*. Tales partículas se pueden preparar tal como describen, por ejemplo, Couvreur y col., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1988; 5(1): 1-20; Muhlen y col., *Eur J Pharm Biopharm*. 1998 Mar; 45(2): 149-55; Zambaux y col. *J Controlled Release*. 1998 Enero; 2; 50(1-3): 31-40; y la  
 60 patente de Estados Unidos con n.º 5 145 684.

El término "inmunomodulador", tal como se usa en el presente documento, significa una sustancia que altera la respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como aumentando, reduciendo, modificando o afectando de otro modo la respuesta inmunitaria del sujeto.

#### VIAS DE ADMINISTRACIÓN

- 5 Las composiciones de la invención objeto que se pueden administrar por vía parenteral, es decir, por vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular incluyen los siguientes vehículos preferentes. Ejemplos de vehículos adecuados para uso subcutáneo incluyen, si bien no se limitan a los mismos, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cloruro sódico al 0,9 % en agua USP para inyección, y trietanolamina al 0,01-0,1 % en agua USP para inyección. Vehículos adecuados para inyección intramuscular incluyen, si bien no se limitan a los mismos, etanol USP al 10 %, propilenglicol al 40 % y el resto una solución isotónica aceptable tal como dextrosa al 5 %, o cloruro sódico al 0,9 % en agua USP para inyección. Ejemplos de vehículos adecuados para uso intravenoso incluyen, si bien no se limitan a los mismos, etanol USP al 10 %, propilenglicol USP al 40 % y el resto agua USP para inyección, o cloruro sódico al 0,9 % en agua USP para inyección. En una realización, el vehículo incluye etanol USP al 10 % y agua USP para inyección; otro vehículo aceptable adicional es trietanolamina al 0,01-0,1 % en agua USP para inyección. Los disolventes parenterales farmacéuticamente aceptables son tales que proporcionan una solución o dispersión que se puede filtrar a través de un filtro de 5 micrómetros, preferentemente un filtro de 0,2 micrómetros, sin eliminar el principio activo.

- 20 Otra vía de administración de las composiciones de la presente invención es la administración por vía mucosa, particularmente la administración intranasal o, en algunos casos, la administración por inhalación (administración pulmonar). La administración pulmonar de fármacos se puede conseguir según varios enfoques diferentes, incluyendo nebulizadores líquidos, inhaladores dosificadores (MDI) basados en aerosoles, y dispositivos de dispersión de polvo seco. Las composiciones para su uso en administraciones de este tipo son por lo general polvos secos o aerosoles.

- 25 Los polvos secos contienen, además de la composición de la invención, un vehículo, un potenciador de la absorción y, opcionalmente, otros ingredientes. El vehículo es, por ejemplo, un mono-, di- o polisacárido, un alcohol de azúcar u otro poliol. Los vehículos adecuados incluyen lactosa, glucosa, rafinosa, melecitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol; y almidón. Particularmente preferente es la lactosa, especialmente en forma de su monohidrato. También se incluyen agentes potenciadores de la absorción tales como polipéptidos, tensioactivos, alquil glucósidos, sales de amina de ácidos grasos o fosfolípidos. Los ingredientes de la formulación normalmente deben estar en una forma finamente dividida, es decir, su diámetro medio en volumen debe ser por lo general de aproximadamente 30 a 30 aproximadamente 200 micrómetros, tal como se mide mediante un instrumento de difracción de láser o un contador Coulter. El tamaño de partícula deseado se puede producir usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, molienda, micronización o precipitación directa.

- 35 La vía de administración intranasal proporciona numerosas ventajas con respecto a muchas otras formas de administración para los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, una ventaja de la administración intranasal es su conveniencia. Un sistema inyectable requiere la esterilización de la jeringa hipodérmica y en el entorno institucional, conlleva la preocupación, entre el personal médico, del riesgo de contraer enfermedades por pincharse accidentalmente con una aguja contaminada. En el entorno institucional se deben imponer también requisitos estrictos para la eliminación segura de la aguja y la jeringa usadas. Por el contrario, la administración intranasal requiere poco tiempo por parte del paciente y del personal médico responsable, y es mucho menos onerosa para las instituciones que los inyectables.

- 45 Una segunda ventaja importante de la administración intranasal es la aceptación por parte del paciente del sistema de administración del fármaco. La administración intranasal se percibe como no invasiva, no viene acompañada de dolor, no tiene efectos secundarios significativos y produce la gratificación de un alivio inmediato en el paciente que presenta el síntoma. Esto es particularmente ventajoso cuando el paciente es un niño. Otra consideración importante es que el paciente puede ser capaz de autoadministrarse la dosis o las dosis prescritas de pulverización nasal.

- 50 Para administración intranasal, las composiciones de la presente invención se pueden formular en forma de líquidos o de sólidos. Dichas composiciones pueden contener uno o más adyuvantes adicionales, agentes para potenciar la absorción de los ingredientes activos por permeación a través de la membrana nasal y, para composiciones líquidas, un tampón acuoso adicional u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición puede incluir además, opcionalmente, uno o más alcoholes polihídricos y uno o más agentes conservantes. Los conservantes adecuados incluyen, por ejemplo, gentamicina, bacitracina (0,005 %) o cresol. Las composiciones se pueden administrar a la cavidad nasal en forma de pulverización usando un atomizador, nebulizador, pulverizador, cuentagotas u otro dispositivo que asegure el contacto de la solución con la membrana mucosa nasal. El dispositivo puede ser uno sencillo, tal como un pulverizador nasal simple que puede ser usado por el paciente, o puede ser un instrumento más complejo para una dispensación más precisa de las composiciones, que se puede usar en un consultorio de un médico o en un centro médico.

Las composiciones de polvo nasal se pueden preparar mediante liofilización de la composición de la presente invención o mediante adsorción de la composición sobre polvos nasales adecuados (por ejemplo lactosa) y

moliendo, si es necesario, hasta el tamaño de partícula deseado. Como alternativa, se puede preparar una solución de la composición y excipientes de ciclodextrina, seguido de precipitación, filtración y pulverización. También es posible eliminar el disolvente mediante liofilización, seguida de la pulverización del polvo al tamaño de partícula deseado usando técnicas convencionales, conocidas en la literatura farmacéutica. La etapa final es la clasificación por tamaños, por ejemplo, mediante tamizado, a fin de obtener partículas que tienen preferentemente un diámetro de entre 30 y 200 micrómetros. Los polvos se pueden administrar usando un insuflador nasal, o se pueden colocar en una cápsula fijada en un dispositivo de inhalación o de insuflación. Una aguja penetra la cápsula para crear poros en la parte superior y en la parte inferior de la cápsula y se envía aire para que esta se rompa y salgan las partículas de polvo. La formulación en polvo también se puede administrar en un pulverizador de chorro de un gas inerte o suspendido en fluidos orgánicos líquidos.

Las composiciones de la invención objeto se administran a un individuo en una cantidad eficaz o una cantidad farmacéuticamente eficaz, a fin de inducir o potenciar la respuesta inmunitaria del individuo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" es aquella cantidad que muestra una respuesta superior a la del vehículo o de los controles negativos. Una "cantidad eficaz de adyuvante" es la cantidad del compuesto en cuestión que, cuando se administra junto con un antígeno, muestra una respuesta superior a la producida por el antígeno solo. La dosificación precisa de la composición de la invención objeto que se va a administrar a un paciente dependerá del compuesto particular usado, de la vía de administración, de la composición farmacéutica y del paciente.

#### Ensayo de potencia en MM6

El ensayo de potencia en MonoMac 6 se usa para medir cuantitativamente la potencia relativa entre dos lotes diferentes de un producto biológico. Se incuban conjuntamente una serie de dosis de los compuestos de ensayo y de referencia con células MonoMac 6, una línea celular monocítica humana, y se recogen los sobrenadantes de las células para un ensayo posterior. Un marcador quimocina (MIP-1 $\beta$ ), medido en los sobrenadantes de las células mediante un ensayo ELISA anidado, sirve como lectura. Se construyó una plantilla de análisis de la potencia en la que se incluyeron las densidades ópticas brutas y el análisis se efectuó automáticamente. En base a la pendiente y al paralelismo entre las curvas de respuesta del compuesto de ensayo y de la referencia, los criterios establecidos en las medidas definidas determina si se puede producir o no una determinación de la potencia con éxito. Si se cumplen satisfactoriamente estos criterios, el análisis proporcionará un valor de la potencia relativa del producto de ensayo frente al producto de referencia.

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes Ejemplos y Ejemplos de ensayo no limitantes que se dan exclusivamente con fines ilustrativos.

#### PARTE EXPERIMENTAL

**Ejemplo 1:** Formulación de HEPES a pH = 7,0. El peso molecular del HEPES es de 238,3 g/mol. Por tanto, se pesaron 6,044 g de HEPES y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 5,2. Se añadió después gota a gota NaOH 5 N hasta conseguir un pH final de 7,0. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón HEPES 100 mM a pH = 7,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón HEPES 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón HEPES 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón HEPES 10 mM resultante a pH = 7,0 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601 que se obtuvo en GSK Vaccines Hamilton, Montana.

**Ejemplo 2 (Comparativo):** Formulación de HEPES a pH = 8,0. El peso molecular del HEPES es de 238,3 g/mol. Por tanto, se pesaron 6,044 g de HEPES y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 5,2. Se añadió después gota a gota NaOH 5 N hasta conseguir un pH final de 8,0. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón HEPES 100 mM a pH = 8,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón HEPES 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón HEPES 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón HEPES 10 mM resultante a pH = 8,0 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

**Ejemplo 3:** Formulación de los AGP y HEPES a pH = 7,0. Se formuló el CRX-601 en HEPES 10 mM tamponado a pH = 7,0 con una concentración deseada de 2 mg/ml pesando 3,99 mg de CRX-601 y añadiendo 1,877 ml de HEPES 10 mM seguido de tratamiento con ultrasonidos en un baño de ultrasonidos en agua. Al cabo de 25 minutos la solución era visiblemente transparente, aunque se continuó el tratamiento con ultrasonidos ya que las otras formulaciones del CRX-601 con los otros tampones empleados en el presente documento no habían conseguido aún un aspecto visual similar. Esto se efectuó ya que el fin era someter a cada formulación de CRX-601 tamponada a la misma cantidad de energía de procesamiento.

**Ejemplo 4 (Comparativo):** Formulación de los AGP y HEPES a pH = 8.

Se formuló el CRX-601 en HEPES 10 mM tamponado a pH = 8,0 con una concentración deseada de 2 mg/ml pesando 3,99 mg de CRX-601 y añadiendo 1,877 ml de HEPES 10 mM seguido de tratamiento con ultrasonidos en un baño de ultrasonidos en agua. Al cabo de 25 minutos la solución era visiblemente transparente, aunque se



continuó el tratamiento con ultrasonidos ya que las otras formulaciones de CRX-601 con los otros tampones empleados en el presente documento no habían conseguido aún un aspecto visual similar. Esto se efectuó ya que el fin era someter a cada formulación de CRX-601 tamponada a la misma cantidad de energía de procesamiento.

- 5 Formulación de tampones distintos al HEPES. El pH de cada tampón estaba dentro de la capacidad de tamponamiento para el tampón respectivo. El modo de preparación de cada tampón se describe a continuación.

10 **Ejemplo 5 (Comparativo): Tampón acetato a pH = 5,0.** El peso molecular del acetato de amonio es de 77,08 g/mol. Por tanto, se pesaron 1,927 g de acetato de amonio y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 6,6. Se añadió gota a gota ácido acético hasta conseguir un pH final de 5,0. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón acetato 100 mM a pH = 5,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón acetato 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón acetato 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón acetato 10 mM resultante a pH = 5,0 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

15 **Ejemplo 6 (Comparativo): tampón acetato a pH = 5,5.** El peso molecular del acetato de amonio es de 77,08 g/mol. Por tanto, se pesaron 1,927 g de acetato de amonio y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 6,6. Se añadió gota a gota ácido acético hasta conseguir un pH final de 5,5. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón acetato 100 mM a pH = 5,5. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón acetato 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón acetato 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón acetato 10 mM resultante a pH = 5,5 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

20 **Ejemplo 7 (Comparativo): Tampón citrato a pH = 5,0.** El peso molecular del citrato trisódico (deshidratado) es de 294,1 g/mol y el del ácido cítrico (monohidrato) de 210,14 g/mol. Por tanto, se pesaron 3,670 g de citrato trisódico y 2,627 g de ácido cítrico y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 4,1. Se añadió después gota a gota NaOH 5 N hasta conseguir un pH final de 5,0. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón citrato 100 mM a pH = 5,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón citrato 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón citrato 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón citrato 10 mM resultante a pH = 5,0 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

30 **Ejemplo 8 (Comparativo): Tampón citrato a pH = 6,0.** El peso molecular del citrato trisódico (deshidratado) es de 294,1 g/mol y el del ácido cítrico (monohidrato) de 210,14 g/mol. Por tanto, se pesaron 3,670 g de citrato trisódico y 2,627 g de ácido cítrico y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 4,1. Se añadió después gota a gota NaOH 5 N hasta conseguir un pH final de 6,0. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón citrato 100 mM a pH = 6,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón citrato 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón citrato 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón citrato 10 mM resultante a pH = 6,0 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

40 **Ejemplo 9 (Comparativo): Tampón citrato a pH = 6,1.** El peso molecular del citrato trisódico (deshidratado) es de 294,1 g/mol y el del ácido cítrico (monohidrato) de 210,14 g/mol. Por tanto, se pesaron 3,670 g de citrato trisódico y 2,627 g de ácido cítrico y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 4,1. Se añadió después gota a gota NaOH 5 N hasta conseguir un pH final de 6,1. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón citrato 100 mM a pH = 6,1. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón citrato 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón citrato 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón citrato 10 mM resultante a pH = 6,1 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

45 **Ejemplo 10 (Comparativo): Tampón citrato a pH = 7,0.** El peso molecular del citrato trisódico (deshidratado) es de 294,1 g/mol y el del ácido cítrico (monohidrato) de 210,14 g/mol. Por tanto, se pesaron 3,670 g de citrato trisódico y 2,627 g de ácido cítrico y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 4,1. Se añadió después gota a gota NaOH 5 N hasta conseguir un pH final de 7,0. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón citrato 100 mM a pH = 7,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón citrato 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón citrato 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón citrato 10 mM resultante a pH = 7,0 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

55 **Ejemplo 11 (Comparativo): Tampón TRIS a pH = 7,0.** El peso molecular del TRIS es de 121,14 g/mol. Por tanto, se pesaron 3,029 g de TRIS y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 10,5. Se añadió después gota a gota HCl 6 N hasta conseguir un pH final de 7,0. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón TRIS 100 mM a pH = 7,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón TRIS 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón citrato 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón TRIS 10 mM resultante a pH = 7,0 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

**Ejemplo 12 (Comparativo): Tampón succinato a pH = 7,0.** El peso molecular del anhídrido succínico es de 100,07 g/mol. Por tanto, se pesaron 2,502 g de anhídrido succínico y se añadieron 200 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 2,5. Se añadió después gota a gota NaOH 5 N hasta conseguir un pH final de 7,0. El volumen de la solución se llevó hasta 250 ml dando como resultado un tampón succinato 100 mM a pH = 7,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso. Para preparar tampón succinato 10 mM, se diluyeron 10 ml de tampón succinato 100 mM en 90 ml de agua estéril (volumen total = 100 ml). El tampón succinato 10 mM resultante a pH = 7,0 se filtró también de forma estéril para ser usado con CRX-601.

**Ejemplo 13 (Comparativo): Tampón fosfato a pH = 7,0.** El peso molecular del fosfato de sodio (monobásico) es de 137,99 g/mol y el del fosfato de sodio (dibásico) es de 141,96 g/mol. Por tanto, se pesaron 0,059 g de fosfato de sodio (monobásico) y 0,082 g de fosfato de sodio (dibásico) y se añadieron 80 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 7,0. El volumen de la solución se llevó hasta 100 ml dando como resultado un tampón fosfato 10 mM a pH = 7,0. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso con CRX-601.

**Ejemplo 14 (Comparativo): Tampón fosfato de sodio a pH = 6,1.** El peso molecular del fosfato de sodio (dibásico) es de 141,96 g/mol y el del cloruro de sodio es de 58,5 g/mol. Por tanto, se pesaron 7,098 g de fosfato de sodio (dibásico) y 5,844 g de cloruro de sodio y se añadieron 900 ml de agua estéril y la mezcla se agitó usando un agitador magnético. Se midió el pH de la solución y era de 9,0. Se añadió después gota a gota HCl 6 N hasta conseguir un pH final de 6,1. El volumen de la solución se llevó hasta 1000 ml dando como resultado un tampón NaCl 100 mM y fosfato de sodio (dibásico) 50 mM a pH = 6,1. Este tampón se filtró de forma estéril para su futuro uso con CRX-601.

#### **Ejemplo 15**

**Formulación de los AGP y los tampones.** La Tabla 1 enumera siete tampones comunes considerados útiles en las técnicas farmacéuticas. El CRX-601 se formuló en cada uno de los tampones recogidos en la Tabla 1 con una concentración deseada de 2 mg/ml. Los tampones se formularon al pH óptimo, o un pH próximo al mismo, comunicado y que se muestra en la Tabla 1.

Todas las muestras se procesaron en las mismas condiciones a fin de cuantificar la degradación del CRX-601 debida al tampón específico y no debida al procesamiento a excepción del CRX-601 en tampón acetato que necesitó un tiempo más largo de procesamiento.

Tabla 1

|   | Tampón               | componentes                                        | pH  | Conc.<br>(mM) | pKa               | Referencia al<br>texto |
|---|----------------------|----------------------------------------------------|-----|---------------|-------------------|------------------------|
| 1 | HEPES                | ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico | 7,0 | 10            | 3, 7,6            | Ejemplo 1              |
| 2 | Citrato              | Citrato sódico (Ácido cítrico)                     | 6,1 | 10            | 3,1, 4,8,<br>6,3  | Ejemplo 9              |
| 3 | Fosfato              | Fosfato de sodio monobásico y dibásico             | 7,0 | 10            | 2,1, 7,0,<br>12,3 | Ejemplo 13             |
| 4 | Succinato            | Anhídrido succínico                                | 7,0 | 10            | 4,2, 5,6          | Ejemplo 12             |
| 5 | TRIS                 | Amino-2-hidroximetil-metano (HCl)                  | 7,1 | 10            | 8,3               | Ejemplo 11             |
| 6 | Acetato<br>de amonio | Acetato de amonio (Ácido acético)                  | 5,5 | 10            | 4,7, 9,2          | Ejemplo 6              |
| 7 | Fosfato              | Fosfato de sodio, NaCl                             | 6,1 | 50            | 7,2               | Ejemplo 14             |

Cada una de las soluciones tampón se sometió después a tratamiento con ultrasonidos para reducir el tamaño de partícula y permitir la filtración estéril. La Tabla 2 muestra el tiempo de procesamiento para conseguir una solución parcialmente transparente (es decir, para conseguir un tamaño de partícula de aproximadamente 200 nm) mediante tratamiento con ultrasonidos de cada una de las formulaciones de CRX-601 tamponadas.

Tabla 2

|   | Tampones                                              | pH del tampón | Aspecto visual de la solución transparente (minutos) |
|---|-------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------|
| 1 | HEPES 10 mM                                           | 7,00          | 25                                                   |
| 2 | Citrato sódico 10 mM                                  | 6,10          | 60                                                   |
| 3 | Fosfato de sodio 10 mM                                | 7,15          | 15                                                   |
| 4 | Succinato de sodio 10m M                              | 7,00          | 35                                                   |
| 5 | Cloruro de TRIS 10 mM                                 | 7,10          | 60                                                   |
| 6 | Acetato de amonio 10 mM                               | 5,50          | 160                                                  |
| 7 | Fosfato de sodio 0,1 M en solución salina 0,5 M (LBH) | 6,10          | 80                                                   |

**Degradación.** Se estudiaron colectivamente los tampones 1-7 de la Tabla 1 a fin de determinar la estabilidad a las concentraciones mostradas en la tabla usando un ensayo de estabilidad acelerada. Las composiciones tampón se mantuvieron durante 14 días a 40 °C. Se determinó la estabilidad del CRX-601 en cada composición midiendo el porcentaje de CRX-601 en la composición con respecto al producto de degradación común del CRX-601 (estructuras mostradas en la Figura 1). El gráfico de la Figura 2 muestra los datos del primer conjunto de tampones que fueron estudiados colectivamente con el CRX-601. La pendiente de las líneas de ajuste adaptadas a cada serie de datos es una medición de la tasa de degradación del CRX-601. De modo interesante se encontró que el HEPES (pH = 7,00), el acetato (pH = 5,50) y el citrato (pH = 6,10) causaban una degeneración menor del CRX-601 en solución tras 14 días a 40 °C. El fosfato de sodio (pH = 7,15), el succinato (pH = 7,00), el TRIS (pH = 7,10) y el fosfato de sodio (pH = 6,10) mostraron una estabilidad reducida y, sorprendentemente, una estabilidad menor en comparación con el HEPES (pH = 7). No se observaron cambios significativos en el pH durante el estudio. El tamaño de partícula para todas las formulaciones permaneció estable excepto para el CRX-601 en tampón de hidratación de liposomas (LHB o *Liposome Hydration Buffer*) y tampón acetato que mostraron agregación.

### Ejemplo 16

**Estabilidad/Pureza** Los tampones se evaluaron para identificar el efecto del pH sobre la tasa de degradación del CRX-601; Específicamente, se ensayó la estabilidad del CRX-601 formulado en acetato a pH = 5,0, en HEPES a pH = 7,0 y 8,0, y en citrato a pH = 5,0, 6,0 y 7,0. Para tal fin se prepararon los siguientes tampones: HEPES a pH = 7,0 y 8,0, citrato a pH = 5,0, 6,0 y 7,0, y acetato a pH = 5,0, de acuerdo con los Ejemplos 1, 2, 5, 7, 8 y 10, y el CRX-601 se formuló en cada uno de ellos y se sometió a degradación forzada durante 14 días a 40 °C.

Se determinó la pureza para cada solución tamponada midiendo el porcentaje de CRX-601 en la composición con respecto al producto de degradación común del CRX-601. Los datos de la pureza se representan en la Figura 3 e indican que el HEPES a pH = 7,0 lleva a una degradación mínima, mientras que a pH diferente, (pH = 5), tanto el citrato como el acetato llevan a una degradación mínima del CRX-601.

No se observaron cambios significativos en el tamaño de partícula excepto para el CRX-601 en tampón citrato a pH = 5,0, que mostraba un aumento del tamaño de partícula. No se observó ningún cambio significativo del pH para ninguna de las formulaciones en este estudio.

### Ejemplo 17

**Ensayo de los tampones con otro AGP.** Se estudió colectivamente otro AGP, el CRX-527 (obtenido en GSK Vaccines, Hamilton, Montana) en el estudio de estabilidad acelerada durante 14 días a 40 °C con el tampón fosfato y el HEPES a pH = 7,0. Se determinó la estabilidad del CRX-527 en cada composición midiendo el porcentaje de CRX-527 en la composición con respecto al producto de degradación común del CRX-527 (estructuras mostradas en la Figura 4). Análogamente, se determinó la pureza para la solución tamponada midiendo el porcentaje de CRX-601 en la composición con respecto al producto de degradación común del CRX-601, tal como se ha expuesto previamente. El gráfico de la Figura 5 muestra el perfil de degradación del CRX-527 en los dos tampones junto con el del CRX-601. El HEPES proporcionaba a los AGP una estabilidad potenciada cuando se comparaba frente al tampón fosfato al mismo pH (pH = 7,0).

### Ejemplo 18

**Estabilidad a largo plazo/Pureza del CRX-601.** Los tampones se evaluaron para identificar el efecto del pH sobre la estabilidad a largo plazo del CRX-601; específicamente, se ensayó la estabilidad del CRX-601 formulado en acetato

5 a pH = 5,0, en HEPES a pH = 7,0, y en citrato a pH =5,0. Para tal fin se prepararon los siguientes tampones: HEPES a pH = 7,0, citrato a pH =5,0 y acetato a pH = 5,0, de acuerdo con los Ejemplos 1, 5 y 7, y el CRX-601 se formuló en cada uno de ellos y se almacenó durante > 1 año a 2-8 °C. Se determinó la pureza para cada solución tamponada midiendo el porcentaje de CRX-601 en la composición con respecto al producto de degradación común del CRX-601. Los datos de pureza se representan en la Figura 6 e indican que no hay una degradación significativa en ninguno de los tampones ensayados durante un periodo de ~ 1 año. Así, el tampón HEPES proporciona a los compuestos de AGP la estabilidad deseada a valores de pH notablemente diferentes que los tampones acetato y citrato.

#### **Ejemplo 19**

10 Ensayo de potencia del CRX-601 Se usó un ensayo de potencia en células MonoMac 6 para medir la potencia relativa del CRX 527 en diferentes tampones a un pH óptimo y la potencia relativa del CRX 601 en diferentes tampones a un pH óptimo. Los experimentos iniciales que comparaban la potencia del CRX-527 en HEPES y la del CRX-527 IN no mostraron diferencias significativas de potencia (datos no mostrados). No obstante, se observaron diferencias considerables en cuanto a la potencia cuando se efectuó el estudio colectivo del CRX-601 en HEPES a

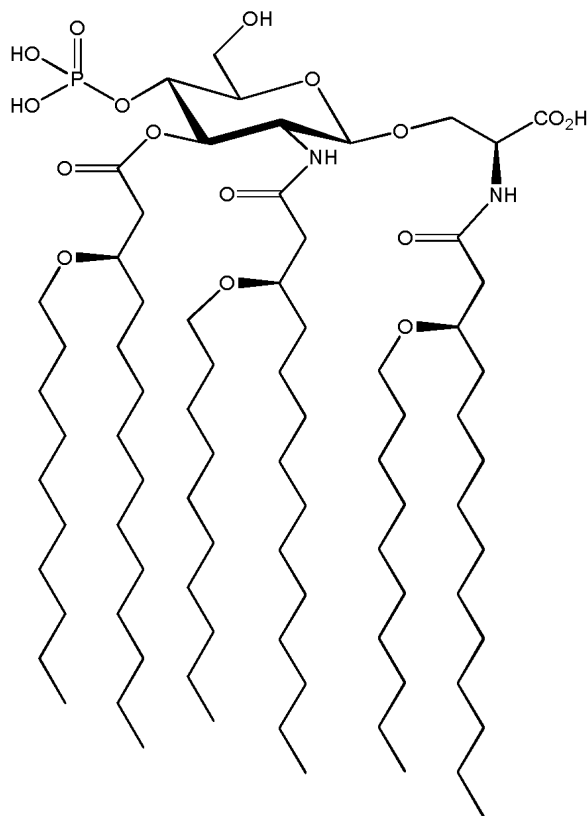
15 pH = 7,0, en citrato a pH =5,0, y en acetato a pH = 5,0 en el ensayo de potencia en células MM6 frente a formulaciones de referencia de CRX-601 IN (glicerol acuoso al 2 %). Los resultados de potencia dados en las Figuras 7 a 9 muestran que el CRX-601 en acetato y el CRX-601 en citrato tenían menos de un 50 % de potencia en comparación con el CRX-601 IN. No se observó una muerte celular significativa en las formulaciones tamponadas con citrato o con acetato cuando se tiñeron con azul de tripano. En comparación, el CRX-601 en HEPES mostraba

20 un aumento del doble de la potencia del CRX-601 comparado con el CRX-601 IN.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que tiene un pH de 7 y que comprende (i) un fosfato de aminoalquil glucosaminida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) una cantidad eficaz de tampón HEPES suficiente para proporcionar un pH de 7, en la que dicho fosfato de aminoalquil glucosaminida tiene la estructura

5



CRX601.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición tiene un tamaño de partícula de filtración estéril, medido mediante dispersión dinámica de luz (DDL) durante un periodo de 14 días a 40 grados centígrados, de  $\leq 200$  nanómetros.

10 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición presenta una pérdida de pureza en porcentaje después de 14 días a 40 grados centígrados, medida mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC), del 4,46 % al 5,93 %.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como inmunomodulador.

15 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha solución se usa como adyuvante de vacuna.

6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, adecuada para administración por vía mucosa.

7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, adecuada para administración por vía intranasal.

8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, administrada a un sujeto en ausencia de un antígeno exógeno.

20 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la potenciación de una respuesta inmunitaria de un sujeto.

10. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la mejora o la prevención sustancial de una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria o una afección alérgica en un sujeto.