

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 361**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2010 PCT/JP2010/053055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10098432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010 E 10746311 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2402032**

54 Título: **Composición inmunogénica**

30 Prioridad:

**27.02.2009 JP 2009045555**

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

**22.04.2020**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)  
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku  
Tokyo, 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**NISHIO, REIJI y  
IDA, NOBUO**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 755 361 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 inmunogénica

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende como un ingrediente eficaz un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante que contiene un antígeno encapsulado en una micropartícula adyuvante compuesta por uno o varios polímeros anfifílicos.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Para mejorar la capacidad de activación inmunitaria de un antígeno, se utiliza un adyuvante junto con el antígeno. Aunque se sabe que el adyuvante completo de Freund (CFA ("Complete Freund Adjuvant")) tiene un excelente efecto como adyuvante, el CFA está compuesto por bacterias muertas y una emulsión de aceite y, por lo tanto, tiene fuertes efectos secundarios, tales como una fuerte reacción inflamatoria y formación de hinchazón ulcerosa (granuloma) en el sitio de administración. Por lo tanto, no está permitida la utilización de CFA para humanos en vista de la seguridad. Los adyuvantes cuya administración a humanos está permitida son limitados. Entre los ejemplos de adyuvantes cuya administración a humanos está permitida se incluyen adyuvantes de hidróxido de aluminio, pero sus capacidades de activación inmunológica no son necesariamente suficientes y, por lo tanto, deben administrarse repetidamente para permitir la adquisición de inmunidad. Por lo tanto, se ha exigido el desarrollo de una composición inmunogénica utilizando un adyuvante eficaz y fuerte, composición que pueda utilizarse para humanos.

15

20

25

30

Para el desarrollo de un nuevo adyuvante destinado a conseguir una capacidad elevada de activación inmunológica, se ha intentado un procedimiento en el que se encapsula un antígeno en una micropartícula. Se ha informado que la administración de un antígeno en micropartículas mejora las reacciones inmunológicas, tales como la producción de anticuerpos, en comparación con el caso de la administración de un antígeno solo, pero el efecto de su administración no es necesariamente elevado, y solo se ha informado de un efecto casi al mismo nivel que en el caso del adyuvante de hidróxido de aluminio mencionado anteriormente. Se considera que esto se debe a la dificultad en la encapsulación eficaz de las moléculas de antígeno hidrófilas, tales como las proteínas, en las micropartículas estudiadas hasta ahora, tales como micropartículas que comprenden copolímeros de ácido poliláctico-ácido poliglicólico hidrófobos, a la vez que se mantienen las estructuras de las moléculas de antígeno (Documento no de patente 1)

35

40

45

En los últimos años, se ha informado de una nueva tecnología de micropartículas (documentos de patente 1 y 2), que utiliza un polímero anfifílico y permite la encapsulación altamente eficaz de una proteína de alto peso molecular. Aunque esta nueva micropartícula se ha estudiado por su rendimiento sostenido de liberación de fármacos, no se ha estudiado en absoluto su función adyuvante en los casos en los que un antígeno está encapsulado en ella. Además, en términos del mecanismo por el cual una micropartícula que contiene un antígeno funciona como un adyuvante, se cree que son importantes la función para la liberación sostenida de la molécula de antígeno, así como el mecanismo por el cual la micropartícula que contiene un antígeno se incorpora en su totalidad en un inmunocito y libera el antígeno en la célula, y se cree además que la función de liberación del fármaco desde la partícula y el rendimiento como adyuvante no están necesariamente correlacionados entre sí. Por lo tanto, es difícil inferir la función adyuvante a partir del rendimiento de liberación sostenida de la partícula, y no se ha conseguido hasta ahora un adyuvante eficaz que tenga un rendimiento mucho mejor que los adyuvantes de aluminio, mediante las tecnologías convencionales que utilizan micropartículas, a pesar de la demanda de su desarrollo.

**DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

50

Documentos de patente

[Documento de patente 1] WO2006/095668

[Documento de patente 2] JP 2008-088158 A

55

Documentos no de patente

[Documento no de patente 1] Advanced drug delivery reviews, 2005, vol. 57, págs. 391-410

60

La publicación de Yang, Ya-Wun et al.: "The effect of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles with polyelectrolyte self-assembled multilayer surfaces on the cross-presentation of exogenous antigens", Biomaterials, vol. 29, n.º 16, junio de 2008, páginas 2516-2526 se refiere a un sistema de administración de partículas con superficie manipulada para antígenos exógenos que utilizan micropartículas de poli(D,L-lactida-co-glicólido) (PLGA) encapsuladas por fisiorción de capas múltiples de polielectrolitos de carga opuesta, que incluyen polietilenimina (PEI) y sulfato de dextrano.

65

La publicación de Wischke et al.: "Poly(l:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation",

International Journal of Pharmaceutics, vol. 365, núm. 1-2, 5 de enero de 2009, páginas 61-68 se refiere a micropartículas de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) [PLGA] que adicionalmente portan una señal específica de maduración con recubrimiento de superficie frente a células dendríticas humanas. Por lo tanto, un ligando del receptor de tipo Toll (TLR) 3 se unió eficazmente en un intento de una sola capa o en múltiples capas a la superficie de micropartículas de PLGA modificadas con dietilaminoetil dextrano.

La publicación de Garinot et al.: "PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination", Journal of Controlled Release, vol. 120, n.º 3, 31 de julio de 2007, páginas 195-204 se refiere a nanopartículas basadas en PLGA PEGiladas que muestran moléculas RGD en su superficie diseñadas para atacar células M humanas.

## CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

### PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCION

La presente invención tiene como objetivo el dar a conocer una composición inmunogénica que muestre una capacidad elevada de activación inmunológica incluso con una pequeña cantidad de antígeno y/o un pequeño número de dosis.

### MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente, los presentes inventores estudiaron un procedimiento mediante el cual se puede inducir un elevado nivel de activación inmune utilizando una pequeña cantidad de antígeno y con un pequeño número de dosis del mismo y, como resultado, descubrieron que un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante que contiene un antígeno encapsulado en una micropartícula adyuvante tiene una capacidad elevada de activación inmune in vivo. Es decir, la presente invención tiene la siguiente constitución.

(1) Una composición inmunogénica que comprende como ingrediente efectivo un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante que contiene un antígeno encapsulado en una micropartícula adyuvante compuesta por uno o varios polímeros anfifílicos cuyo segmento hidrófobo es un ácido poli(láctico-co-glicólico), y el segmento hidrófilo del polímero anfifílico es un polisacárido refractario.

(2) La composición inmunogénica, según el punto (1), que comprende como ingrediente eficaz una partícula compuesta por el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante asociadas entre sí.

(3) La composición inmunogénica, según los puntos (1) o (2), en la que la micropartícula adyuvante tiene una parte hidrófila en el interior de la misma, estando compuesta la parte hidrófila por un segmento hidrófilo del polímero anfifílico, y tiene una capa externa compuesta por una parte hidrófoba constituida por el segmento hidrófobo del polímero anfifílico.

(4) La composición inmunogénica, según el punto (1), en la que el polisacárido refractario es dextrano.

(5) La composición inmunogénica, según cualquiera de los puntos (1) a (4), que comprende además un modificador de superficie unido al ácido poli(láctico-co-glicólico) de la micropartícula adyuvante.

(6) La composición inmunogénica, según cualquiera de los puntos (1) a (5), en la que el tamaño promedio de partícula del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante o la partícula compuesta por el complejo de micropartículas de antígeno-adyuvante asociado entre sí es de 0,1 a 50 µm.

(7) La composición inmunogénica, según cualquiera de los puntos (1) a (6), que comprende además una sustancia activadora inmunológica.

(8) La composición inmunogénica, según el punto (7), en la que la sustancia inmunoactivadora es un ácido nucleico.

(9) La composición inmunogénica, según los puntos (7) u (8), en la que la sustancia inmunoactivadora es CpG.

### EFFECTO DE LA INVENCION

Mediante la presente invención, se da a conocer una composición inmunogénica con la que es posible una activación inmune in vivo más fuerte que antes.

### DESCRIPCION BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la evaluación inmunológica 1 de composiciones inmunogénicas que contienen OVA.

La figura 2 muestra la evaluación inmunológica (IgG total) de composiciones inmunogénicas que contienen CEA.

La figura 3 muestra la evaluación inmunológica (IgG2a) de composiciones inmunogénicas que contienen CEA.

La figura 4 muestra la evaluación inmunológica 2 de composiciones inmunogénicas que contienen OVA.

La figura 5 muestra la evaluación inmunológica 3 de composiciones inmunogénicas que contienen OVA.

La figura 6 muestra la evaluación inmunológica de composiciones inmunogénicas que contienen proteínas estructurales de VHC.

La figura 7 muestra la evaluación inmunológica 2 de composiciones inmunogénicas que contienen CEA.

La figura 8 muestra la evaluación inmunológica 3 de composiciones inmunogénicas que contienen CEA.

La figura 9 muestra la evaluación inmunológica 4 de composiciones inmunogénicas que contienen OVA.

La figura 10 muestra la evaluación inmunológica 4 de composiciones inmunogénicas que contienen CEA.

La figura 11 muestra la evaluación inmunológica (proporción IgG2a/IgG1) de composiciones inmunogénicas que contienen CEA.

#### MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante que contiene un antígeno encapsulado en una micropartícula adyuvante compuesta por uno o varios polímeros anfífilicos cuyo segmento hidrófobo es un ácido poli(láctico-co-glicólico), y el segmento hidrófilo del polímero anfífilico es un polisacárido refractario, según la reivindicación 1.

En primer lugar, se describe el polímero anfífilico que constituye la micropartícula adyuvante. Ser "anfífilico" significa que se conservan las propiedades tanto de hidrofiliidad como de hidrofobicidad. Cuando la solubilidad de una determinada parte en agua es mayor que la de otras partes, se dice que la parte es hidrófila. Preferentemente, la parte hidrófila es soluble en agua, pero incluso en los casos en los que la parte tiene poca solubilidad en agua, es suficiente si la solubilidad en agua es mayor que la de otras partes. Cuando la solubilidad de una determinada parte en agua es menor que la de otras partes, se dice que el segmento es hidrófobo. Preferentemente, la parte hidrófoba es insoluble en agua, pero incluso en los casos en que la parte es soluble en agua, es suficiente si la solubilidad en agua es menor que la de otras partes.

El polímero anfífilico significa un polímero que tiene, como molécula completa, la anfifilicidad mencionada anteriormente. El polímero significa que la molécula tiene una estructura molecular en la que el segmento hidrófilo o el segmento hidrófobo del polímero anfífilico, o ambos, están constituidos por una estructura o estructuras en las que se repiten unidades mínimas (monómeros). El polímero anfífilico de la presente invención puede tener una estructura que tenga un segmento o segmentos hidrófilos y un segmento o segmentos hidrófobos, y puede ser un polímero de bloques lineal que tenga un segmento o segmentos hidrófilos y un segmento o segmentos hidrófobos unidos entre sí; un polímero ramificado que tenga una ramificación o ramificaciones en las que existen uno o ambos de un segmento o segmentos hidrófilos y un segmento o segmentos hidrófobos; o un polímero de injerto en el que se injertan múltiples segmentos hidrófobos en un segmento hidrófilo o se injertan varios segmentos hidrófilos en un segmento hidrófobo. Preferentemente, el polímero anfífilico de la presente invención es un polímero que tiene un segmento hidrófilo, de la manera más preferente, un polímero de bloques lineal que tiene uno de cada de un segmento hidrófilo y un segmento hidrófobo, o un polímero de injerto que tiene múltiples segmentos hidrófobos injertados en un segmento de cadena principal hidrófilo.

El polímero anfífilico que constituye la composición inmunogénica puede ser un conjunto de diferentes tipos de polímeros anfífilicos compuestos de polímeros constituyentes que tienen diferentes partes hidrofílicas y/o partes hidrofóbicas, o un conjunto de polímeros anfífilicos que tienen los mismos polímeros constituyentes pero que tienen varios tipos de patrones de unión, siempre que el polímero anfífilico tenga propiedades como micropartícula adyuvante. En vistas de conseguir un rendimiento estable y una mejora de la productividad, preferentemente, el polímero anfífilico es un conjunto de un pequeño número de tipos de polímeros anfífilicos, más preferentemente, un conjunto principalmente de no más de 2 tipos de polímeros anfífilicos y, aún más preferentemente, está constituido principalmente por un solo tipo de polímero anfífilico.

En la presente invención, el segmento hidrófobo del polímero anfífilico es un ácido poli(láctico-co-glicólico) que es un polímero biocompatible que no tiene un efecto severamente adverso tras la administración a un cuerpo vivo. En la presente memoria descriptiva, la biocompatibilidad significa que la LD50 en el caso de la administración oral del polímero a ratas no es inferior a 2.000 mg/kg. Además, la proporción de composición de (ácido láctico/ácido glicólico) del ácido poli(láctico-co-glicólico) (% molar/mol) no está restringida, siempre que se alcance el propósito de la presente invención y, preferentemente, la proporción es de 100/0 a 30/70, más preferentemente, de 60/40-40/60.

El segmento hidrófilo del polímero anfífilico es un polisacárido refractario que es un polímero biocompatible, tal como en el caso del segmento hidrófobo. Además, para dar una capacidad adyuvante persistente a la micropartícula adyuvante compuesta por un polímero anfífilico, preferentemente, el segmento es un polisacárido refractario que no se descomponga fácilmente en un cuerpo o célula viva de un mamífero o ave. Ejemplos particulares de los polisacáridos biocompatibles y refractarios son celulosa, quitina, quitosano, goma gelana, ácido alginico, ácido hialurónico, pululano y dextrano. Preferentemente, el polímero anfífilico es un polímero de injerto que tiene múltiples segmentos hidrófobos injertados en una cadena principal de segmento hidrófilo. Además, el segmento hidrófilo del polímero anfífilico es un polisacárido refractario y, más preferentemente, el polisacárido refractario es dextrano.

Preferentemente, el polímero anfífilico tiene inmiscibilidad con el agua como polímero completo, en vista de la capacidad de encapsulación de antígenos y la persistencia tras la administración a un cuerpo vivo.

El peso molecular promedio del segmento hidrófilo del polímero anfífilico no está restringido y, en el caso de un polímero de bloques en el que un segmento o segmentos hidrófilos y un segmento o segmentos hidrófilos están unidos linealmente entre sí, preferentemente, el peso molecular promedio es de 1.000 a 50.000, más preferentemente, de 2.000 a 15.000. En la presente memoria descriptiva, el término "bloque" significa una parte en una molécula de polímero, parte que está compuesta por no menos de 5 unidades de monómero y diferente de la

otra u otras partes adyacentes, en términos de la estructura química o la configuración. Un polímero constituido por, como mínimo, dos bloques unidos linealmente entre sí se denomina polímero de bloques. Cada bloque que constituye el polímero de bloques puede ser un polímero aleatorio, alternante o en gradiente compuesto por no menos de 2 tipos de unidades de monómero. En la presente invención, preferentemente, el polímero de bloques está constituido por uno de cada polímero que forma un segmento hidrófilo y un polihidroxiácido.

En el caso de un polímero de injerto que tiene un segmento o segmentos hidrófobos injertados en una cadena principal del segmento hidrófilo, el peso molecular promedio del segmento hidrófilo es, preferentemente, de 1.000 a 100.000, más preferentemente, de 2.000 a 50.000, aún más preferentemente, de 10.000 a 40.000. Preferentemente, el número de cadenas de injerto es de 2 a 50. El número de cadenas de injerto se puede calcular basándose en la proporción entre la cadena principal del segmento hidrófilo y la cadena principal del segmento hidrófobo; el peso molecular promedio del segmento hidrófobo; y el peso molecular promedio de la cadena principal del segmento hidrófilo utilizado; que se obtienen por medición de RMN de <sup>1</sup>H.

La proporción preferente de pesos moleculares promedio entre el segmento hidrófobo y el segmento hidrófilo varía dependiendo del polímero anfífilico y, en el caso de un polímero de bloques en el que un segmento o segmentos hidrófobos y un segmento o segmentos hidrófilos están unidos linealmente entre sí, la proporción de pesos moleculares promedio entre el o los segmentos hidrófilos y el o los segmentos hidrófobos es, preferentemente, no menor que 1:1, más preferentemente, no menor que 1:2, aún más preferentemente, no menor que 1:4, de manera especialmente preferente, no menor que 1:4 y no mayor que 1:25.

Preferentemente, en el caso de un polímero de injerto que tiene varios segmentos hidrófobos injertados en una cadena principal de segmento hidrófilo, la proporción de pesos moleculares promedio entre la parte de cadena principal del segmento hidrófilo y todas las cadenas de injerto de segmento hidrófobo no es inferior a 1:3 y el peso molecular promedio de cada cadena de injerto es de 2.500 a 40.000. Más preferentemente, la proporción de pesos moleculares promedio general no es inferior a 1:5 y el peso molecular promedio de cada cadena de injerto es de 5.000 a 40.000.

Debe observarse que el peso molecular promedio mencionado anteriormente es un peso molecular promedio en número, a menos que se especifique lo contrario. El peso molecular promedio en número es un peso molecular promedio calculado sin ponderar por el tamaño molecular, y los pesos moleculares promedio en número del polímero anfífilico y los polímeros que constituyen los segmentos hidrófilos del polímero anfífilico se pueden calcular como pesos moleculares en términos de poliestireno y pululano medidos por cromatografía de permeación en gel (GPC ("Gel Permeation Chromatography")). Además, el peso molecular promedio del poli(hidroxiácido) se puede calcular mediante medición por resonancia magnética nuclear (RMN), basándose en la proporción entre el valor de integración de pico de los residuos terminales y el valor de integración de los demás picos.

El polímero anfífilico utilizado en la presente invención se puede sintetizar mediante un procedimiento conocido, y entre los ejemplos del procedimiento se incluyen un procedimiento en el que se añade un polímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) a un polisacárido refractario para utilizarse como un segmento hidrófilo y se lleva a cabo la reacción de condensación con la mezcla resultante para producir un polímero anfífilico; un procedimiento en el que los monómeros activados de ácido láctico y glicólico se añaden a un polisacárido refractario para utilizarse como segmento hidrófilo y se lleva a cabo la reacción de polimerización con la mezcla resultante para producir un polímero anfífilico; y un procedimiento en el que, por el contrario, los monómeros para constituir un segmento hidrófilo se añaden a un segmento hidrófobo que es un polímero de ácido poli(láctico-co-glicólico) y se lleva a cabo la reacción de polimerización con la mezcla resultante para producir un polímero anfífilico.

Por ejemplo, un polímero anfífilico constituido por polietilenglicol y poli(hidroxiácido), que no está dentro del alcance de las reivindicaciones, se puede producir mediante un procedimiento en el que se añaden monómeros de hidroxiácido activados al polietilenglicol en presencia de un catalizador de estaño, y la reacción de polimerización se lleva a cabo con la mezcla resultante para la introducción del poli(hidroxiácido), produciendo de este modo un polímero de bloques anfífilico [Journal of Controlled Release, 71, págs. 203-211 (2001)].

Por ejemplo, un polímero anfífilico de tipo injerto constituido por un polisacárido refractario y una cadena o cadenas de injerto de ácido poli(láctico-co-glicólico) se pueden producir tal como se describe en (1), (2) o (3) a continuación:

(1) un procedimiento en el que, en presencia de un catalizador de estaño, se añaden monómeros hidroxiácido activados a un polisacárido refractario y se lleva a cabo una reacción de polimerización, introduciendo de este modo poli(hidroxiácido), para producir un polímero anfífilico de tipo injerto [Macromolecules, 31, págs. 1032-1039 (1998)];

(2) un procedimiento en el que los grupos hidroxilo desprotegidos en una parte de un polisacárido refractario en el que la mayoría de sus grupos hidroxilo están protegidos por sustituyentes son activados por una base, y se añaden monómeros hidroxiácido activados para introducir una cadena o cadenas de injerto compuestas por poli(hidroxiácido), seguido de la eliminación final de los grupos protectores, produciendo de este modo un polímero anfífilico de tipo injerto [Polymer, 44, págs. 3927-3933, (2003)]; y

(3) un procedimiento en el que se lleva a cabo la reacción de condensación de un copolímero de poli(hidroxiácido) con un polisacárido refractario utilizando un agente deshidratante y/o un agente activador de grupos funcionales,

produciendo de este modo un polímero anfífilico de tipo injerto [Macromolecules 33, págs. 3680-3685 (2000)].

Se describe a continuación la micropartícula adyuvante. La micropartícula adyuvante es una micropartícula que tiene una capacidad adyuvante, y la capacidad adyuvante significa una capacidad con la que se puede provocar una respuesta inmune tras la administración de un antígeno a un cuerpo vivo a un nivel más elevado que en el caso de la administración del antígeno solo. Además, en la presente invención, la micropartícula adyuvante es una micropartícula compuesta por un polímero anfífilico, y un antígeno se encapsula en la micropartícula adyuvante para formar un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante, que es un ingrediente eficaz de la composición inmunogénica de la presente invención.

La estructura de la micropartícula adyuvante no está restringida, y es preferente una estructura en la que el segmento hidrófilo del polímero anfífilico está incluido en la micropartícula adyuvante y el segmento hidrófobo del polímero anfífilico está contenido como una capa externa, en vista del mantenimiento estable del antígeno encapsulado. El procedimiento de producción de una micropartícula adyuvante que tiene dicha estructura no está restringido, y entre los ejemplos del procedimiento de producción se incluyen un procedimiento que comprende: (a) la etapa de mezclar un disolvente acuoso A con un disolvente orgánico B inmiscible en agua en el que se disuelve un polímero anfífilico para formar una emulsión de fase inversa; y (b) la etapa de eliminar el disolvente de la emulsión de fase inversa para obtener una micropartícula adyuvante. En este proceso, mediante la inclusión de un antígeno en el disolvente acuoso A, se puede constituir un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante en el que el antígeno está encapsulado. Las etapas (a) y (b) se describen a continuación.

Como el disolvente acuoso A en la etapa (a), se utiliza agua o una solución acuosa que contiene un componente soluble en agua. Entre los ejemplos del componente soluble en agua se incluyen sales inorgánicas, azúcares, sales orgánicas y aminoácidos.

Preferentemente, el disolvente orgánico B inmiscible en agua en la etapa (a) es un disolvente en el que el ácido poli(láctico-co-glicólico) del polímero anfífilico es soluble y el polisacárido refractario que constituye el segmento hidrófilo es poco soluble o insoluble y, preferentemente, el disolvente se puede eliminar por vaporización mediante liofilización. La solubilidad en agua del disolvente orgánico B inmiscible en agua es, preferentemente, no más de 30 g (disolvente orgánico inmiscible en agua B)/100 ml (agua). Entre los ejemplos particulares del disolvente orgánico B inmiscible en agua se incluyen acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, carbonato de dimetilo, carbonato de dietilo, cloruro de metileno y cloroformo.

La proporción entre el disolvente orgánico inmiscible en agua B y el disolvente acuoso A es de 1.000:1 a 1:1, preferentemente, de 100:1 a 1:1. La concentración del polímero anfífilico en el disolvente orgánico B inmiscible en agua varía dependiendo de los tipos del disolvente orgánico B inmiscible en agua y el polímero anfífilico, y la concentración es del 0,01 al 90 % (p/p), preferentemente, del 0,1 al 50 % (p/p), más preferentemente, del 1 al 20 % (p/p).

En la etapa (a), en el proceso de formación de una emulsión de fase inversa con un disolvente acuoso A y un disolvente orgánico B inmiscible en agua en el que se disuelve un polímero anfífilico, se puede formar la emulsión de fase inversa utilizando, dependiendo del propósito farmacéutico, un disolvente orgánico inmiscible en agua B en el que se disuelven dos o más tipos de polímeros anfífilicos.

En la etapa (a), para ayudar a la formación de una emulsión de fase inversa y para formar una emulsión uniforme y fina de fase inversa, se puede añadir un aditivo. Preferentemente, el aditivo es un compuesto seleccionado entre alcoholes alquílicos C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquilaminas C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y ácidos alquilcarboxílicos C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. La estructura de cada cadena de alquilo en estos aditivos no está restringida, y la cadena de alquilo puede tener una estructura lineal o una estructura ramificada, y puede ser un alquilo saturado o un alquilo insaturado. En la presente invención, de manera especialmente preferente, el aditivo es terc-butanol, iso-propanol o pentanol.

En la etapa (b), el procedimiento de eliminación del disolvente de la emulsión de fase inversa no está restringido, y entre los ejemplos del mismo se incluyen calentamiento, secado a presión reducida, diálisis, liofilización, centrifugación, filtración y reprecipitación y combinaciones de los mismos. Entre los procedimientos de eliminación del disolvente de la emulsión de fase inversa, es preferente la liofilización, dado que provoca menos cambio estructural debido a la fusión de partículas en la emulsión de fase inversa, o similares. Las condiciones y el aparato para la liofilización son aquellos que permiten la inclusión de un proceso de congelación y una etapa de secado a presión reducida, y el proceso de liofilización comprende, de manera especialmente preferente, congelación previa, secado primario a presión reducida a baja temperatura y secado secundario a presión reducida, que se llevan a cabo convencionalmente en la liofilización. Por ejemplo, en los casos en los que se va a obtener una dispersión de un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante en un disolvente inmiscible en agua, la emulsión de fase inversa se enfría/congela hasta no más de los puntos de fusión del disolvente acuoso A y el disolvente orgánico B inmiscible en agua, y posteriormente se seca a presión reducida, para obtener micropartículas adyuvantes liofilizadas. La temperatura para la congelación previa se puede determinar experimentalmente, según sea apropiado, dependiendo de la composición del disolvente y, preferentemente, no es más de -20 °C. El grado de reducción de la presión durante el proceso de secado se puede determinar también, según sea apropiado, dependiendo de la composición

del disolvente y, preferentemente, no es más de 3.000 Pa, más preferentemente no más de 500 Pa, en vistas del acortamiento del tiempo de secado. La liofilización se lleva a cabo preferentemente utilizando un liofilizador para su utilización en laboratorio que tiene una trampa fría y se puede conectar a una bomba de vacío, o un liofilizador de tipo bandejas utilizado para la producción de productos farmacéuticos o similares. Después de la congelación previa con nitrógeno líquido, un medio de enfriamiento o similar, el secado a presión reducida se puede llevar a cabo con enfriamiento o a temperatura ambiente utilizando un dispositivo de vacío tal como una bomba de vacío.

El tipo de antígeno encapsulado en la micropartícula adyuvante no está restringido, y puede ser un péptido, proteína, glucoproteína, glucolípido, lípido, carbohidrato, ácido nucleico o polisacárido; o un virus, célula bacteriana, sustancia alergénica, tejido o célula que los comprende. Entre los ejemplos particulares de los mismos se incluyen antígenos derivados de polen, antígenos derivados del virus de la hepatitis A, antígenos derivados del virus de la hepatitis B, antígenos derivados del virus de la hepatitis C, antígenos derivados del virus de la hepatitis D, antígenos derivados del virus de la hepatitis E, antígenos derivados del virus de la hepatitis F, antígenos derivados del virus VIH, antígenos derivados del virus de la gripe, antígenos derivados del virus del herpes (HSV-1, HSV-2), antígenos derivados del ántrax, antígenos derivados de la clamidia, antígenos derivados del neumococo, antígenos derivados del virus de la encefalitis japonesa, antígenos derivados del virus del sarampión, antígenos derivados del virus de la rubéola, antígenos derivados del *Clostridium tetani*, antígenos derivados del virus de la varicela, antígenos derivados del virus del SARS, antígenos derivados del virus EB, antígenos derivados del virus del papiloma, antígenos derivados del virus *Helicobacter pylori*, antígenos derivados del virus de la rabia, antígenos derivados del virus del Nilo Occidental, antígenos derivados de hantavirus, antígenos derivados de *Streptococcus*, antígenos derivados de *Staphylococcus*, antígenos derivados de *Bordetella pertussis*, antígenos derivados de *Mycobacterium tuberculosis*, antígenos derivados de *Plasmodium*, antígenos derivados de poliovirus, antígenos derivados de diversas infecciones zoonóticas, antígenos cancerosos y antígenos derivados de diversas alergias alimentarias.

No es necesario que el antígeno encapsulado sea un solo antígeno. En vistas de la aplicación de la presente invención, se puede inducir una respuesta inmune contra células cancerosas, bacterias, virus o similares que estén constituidos por diversos constituyentes. En estos casos, el antígeno puede ser varios tipos de proteínas o similares que pueden provocar respuestas inmunes, o una mezcla de sustancias cuyos tipos no se pueden especificar. Además, la inclusión de varios tipos de antígenos para inducir positivamente respuestas inmunes contra los diversos tipos de antígenos es uno de los modos de utilización de la composición inmunogénica de la presente invención. Preferentemente, se encapsula en la micropartícula adyuvante no menos de 3 tipos, más preferentemente, un tipo único de uno o varios antígenos.

El complejo de micropartículas antígeno-adyuvante en la presente invención puede cambiar la capacidad de retención del antígeno dependiendo del tipo o tipos de polímeros que constituyen la micropartícula adyuvante y el procedimiento de preparación. El mecanismo por el cual el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante proporciona la inmunogenicidad en la presente invención puede incluir diversos procesos, tales como un proceso en el que el antígeno liberado de la micropartícula adyuvante se reconoce por las células inmunocompetentes, y un proceso en el que la misma micropartícula adyuvante se reconoce por las células inmunocompetentes. Se puede obtener también un efecto excelente por el efecto sinérgico de estos procesos.

El tipo de respuesta inmune inducida por el proceso en el cual el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante hace que las células inmunocompetentes reconozcan al antígeno, varía dependiendo del tipo de proceso, y se puede seleccionar un proceso preferente dependiendo del tipo de respuesta inmune a inducir y el sitio de administración. Es decir, el antígeno no necesita necesariamente ser liberado del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante, y el modo con el que se consigue la inmunogenicidad óptima de interés, se lleva a cabo mediante la optimización dependiendo del antígeno y el tipo de respuesta inmune a activar en un procedimiento preferente de utilización de los mismos. Sin embargo, en los casos en los que el antígeno se libera extremadamente rápido del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante, no se puede obtener una acción de activación inmunológica continua a largo plazo, que es una propiedad excelente de la presente invención, de modo que, preferentemente, no menos del 10 % del antígeno en el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante se retiene todavía en el cuerpo vivo como el complejo una semana después de la administración y, más preferentemente, no menos del 50 % del antígeno todavía está encapsulado una semana después de la administración. Estos comportamientos de liberación se pueden confirmar, tal como se muestra en los ejemplos, mediante una evaluación *in vitro* que imita el entorno *in vivo*.

El complejo de micropartículas antígeno-adyuvante consigue un buen efecto como un componente eficaz de la composición inmunogénica de la presente invención incluso en un estado de partículas en el que el complejo está asociado. En la presente memoria descriptiva, el término "asociación" significa que dos o más partículas están unidas por una fuerza entre partículas o por medio de otra sustancia, para formar un agregado. La fuerza entre partículas no está restringida, y entre sus ejemplos se incluyen la interacción hidrófoba, el enlace de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y similares. La asociación no está restringida al estado en el que las micropartículas están en contacto entre sí, y una sustancia que tiene afinidad por las micropartículas puede existir entre las micropartículas, o las micropartículas se pueden dispersar en una matriz. Como la sustancia que tiene afinidad por las micropartículas, o la matriz, es preferente un polímero, y es más preferente un polímero anfifílico cuya parte hidrófoba sea poli(hidroxiácido) y que tenga el mismo constituyente que el de la micropartícula adyuvante. Entre los

ejemplos particulares de los mismos se incluyen polímeros anfífilicos, cada uno compuesto por un esqueleto de polisacárido y una cadena o cadenas de injerto de poli(hidroxiácido), polímeros de bloque cada uno compuesto por polietilenglicol y poli(hidroxiácido) y poli(hidroxiácido).

5 La asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante puede estar en un estado en el que los complejos se vuelven a aislar en su utilización, o puede estar en un estado en el que no se vuelven a aislar en su utilización. Cabe señalar que, incluso en los casos en los que la forma de la partícula formada por asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante se encuentra en un estado en el que no se puede conocer la asociación del complejo, se considera que la partícula se ha formado por asociación del complejo siempre que el proceso de producción de la partícula comprenda una etapa de asociar el complejo.

10 La etapa de asociar los complejos no está restringida, y entre los ejemplos particulares de la misma se incluyen una etapa de introducir el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante o una dispersión de complejo de micropartículas antígeno-adyuvante en una fase líquida C que contiene un modificador de superficie para eliminar el medio disperso, provocando de este modo la asociación. Esta etapa se describe a continuación.

15 En los casos en los que el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante se dispersa en un medio disperso para preparar una dispersión del complejo, el medio disperso no está restringido, y en los casos en los que la micropartícula adyuvante tiene una parte hidrófila en el interior del mismo, la parte hidrófila está compuesta por un segmento hidrófilo de un polímero anfífilico, y tiene una capa externa que comprende una parte hidrófoba compuesta por un segmento hidrófobo de un polímero anfífilico, preferentemente, el medio disperso es un disolvente en el que es soluble el ácido poli(láctico-co-glicólico) del polímero anfífilico y el polisacárido refractario que constituye el segmento hidrófilo es sustancialmente insoluble, con el fin de proteger la estructura de la micropartícula adyuvante. En este caso, el disolvente puede ser un disolvente orgánico inmiscible en agua o un disolvente orgánico miscible en agua. Entre los ejemplos particulares del disolvente en el que es soluble el ácido poli(láctico-co-glicólico) del polímero anfífilico y el polisacárido refractario que constituye el segmento hidrófilo es sustancialmente insoluble se incluyen acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, carbonato de dimetilo, carbonato de dietilo, cloruro de metileno, cloroformo, dioxano, tolueno y xileno.

20 Preferentemente, la fase líquida C es aquella en la que es soluble un modificador de superficie y tiene un punto de ebullición más elevado que el medio disperso. La fase líquida C puede ser cualquiera entre un disolvente acuoso, un disolvente orgánico inmiscible en agua y disolvente orgánico miscible en agua. Como disolvente acuoso, es preferente agua o una solución acuosa que contenga un componente soluble en agua, y entre los ejemplos del componente soluble en agua se incluyen sales inorgánicas, azúcares, sales orgánicas y aminoácidos. Entre los ejemplos del disolvente orgánico inmiscible en agua se incluyen aceite de silicona, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de linaza, aceite mineral, aceite de ricino, aceite de ricino hidrogenado, parafina líquida, n-hexano, n-heptano, glicerol y ácido oleico. Entre los ejemplos del disolvente orgánico miscible en agua se incluyen glicerina, acetona, etanol, ácido acético, dipropilenglicol, trietanolamina y trietilenglicol. Entre estos, en la presente invención, la fase líquida C es, preferentemente, un disolvente acuoso o un disolvente orgánico miscible en agua. En los casos en los que la fase líquida C sea un disolvente acuoso y el medio disperso sea un disolvente orgánico inmiscible en agua, la suspensión obtenida de un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante está en la forma de la denominada emulsión sólido en aceite en agua (S/O/W) y, en los casos en que la fase líquida C es un disolvente orgánico inmiscible en agua o un disolvente orgánico miscible en agua, e inmiscible en el medio disperso, la suspensión está en forma de una emulsión sólido en aceite en aceite (S/O1/O2).

25 Preferentemente, el modificador de superficie es un compuesto que estabiliza la interfase agua-aceite de la emulsión S/O/W o la interfase aceite-aceite de la emulsión S/O1/O2, compuesto que tiene una propiedad para mejorar la estabilidad coloidal de la partícula formada por asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante. En la presente memoria descriptiva, la mejora de la estabilidad coloidal significa la prevención o el retraso de la agregación, en el disolvente, de las partículas formadas por asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante. El modificador de superficie puede ser un agente único o una mezcla de diversos agentes.

30 Preferentemente, el modificador de superficie utilizado en la presente invención es un polímero hidrófilo o un compuesto anfífilico.

35 Preferentemente, el polímero hidrófilo como modificador de superficie es polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polietilenimina, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poli-1,3-dioxolano, polímero de 2-metacrililoiloxietilfosforilcolina, poli-1,3,6-trioxano, poliaminoácido, péptido, proteína o polisacárido de azúcares, o un análogo de cualquiera de estos. Entre los ejemplos del análogo del polímero hidrófilo se incluyen, pero no están limitados a, surfactantes preparados a partir de polímeros hidrófilos mediante, por ejemplo, modificación parcial de grupos hidrófobos, tales como alquilos de cadena larga.

40 Preferentemente, el análogo de polietilenglicol como modificador de superficie es "Pluronic" (marca registrada de BASF) comercialmente disponible de BASF, o equivalentes del mismo.

Preferentemente, el poliaminoácido como modificador de la superficie es ácido poliaspártico o ácido poliglútamico, o análogos de los mismos. Son más preferentes los análogos preparados introduciendo alquilo de cadena larga a una parte de ácido poliaspártico o ácido poliglútamico.

- 5 Entre los ejemplos del péptido como modificador de superficie se incluyen péptidos básicos, y la proteína como modificador de superficie es preferentemente gelatina, caseína o albúmina en vista del aumento de la capacidad de dispersión. Entre los ejemplos preferentes de la proteína también se incluyen anticuerpos.

10 El azúcar como modificador de superficie es preferentemente un monosacárido, oligosacárido o polisacárido. El polisacárido es, preferentemente, celulosa, quitina, quitosano, goma gelana, ácido alginico, ácido hialurónico, pululano o dextrano y, de manera especialmente preferente, es pululano portador de colesterol, en vistas de la mejora de la capacidad de dispersión de la partícula. Es preferente un análogo cualquiera de celulosa, quitina, quitosano, goma gelana, ácido alginico, ácido hialurónico, pululano y dextrano.

- 15 De manera especialmente preferente, el péptido, proteína o azúcar como modificador de la superficie es un análogo preparado mediante, por ejemplo, modificación parcial de grupos hidrófobos tales como alquilos de cadena larga, o un análogo preparado modificando el polímero hidrófilo o compuesto anfifílico mencionado anteriormente.

20 Entre los ejemplos del compuesto anfifílico como modificador de superficie se incluyen lípidos y surfactantes. Entre los ejemplos preferentes de surfactantes se incluyen surfactantes no iónicos tales como copolímeros de polioxietileno polipropilenglicol, ésteres de ácido graso de sacarosa, ésteres de ácido graso de polietilenglicol, monoéster de ácido graso de polioxietileno sorbitano, diéster de ácido graso de polioxietileno sorbitano, monoéster de ácido graso de polioxietileno glicerol, diéster de ácido graso de polioxietileno glicerol, éster de ácido graso de poliglicerol, ricinoleato de polioxietileno y ricinoleato hidrogenado de polioxietileno; sulfatos de alquilo tales como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de amonio y estearil sulfato de sodio; y lecitina

30 La proporción de volumen entre el medio disperso en el que se dispersa el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante y la fase líquida C es 1.000:1 a 1:1.000, preferentemente, de 100:1 a 1:100. El número de asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante obtenido varía dependiendo de esta proporción de volumen y, a medida que aumenta la proporción de la fase lipídica C, se obtiene una dispersión en agua de partículas producidas por asociación de un mayor número de complejos de micropartículas antígeno-adyuvante, mientras que, a medida que disminuye la proporción de la fase lipídica C, disminuye el número de asociación. En los casos en los que la proporción de la fase líquida C es menor que una proporción de solución de 1: 4, la mayoría de las partículas en la dispersión en agua están constituidas por un único complejo de micropartículas antígeno-adyuvante. De este modo, controlando la proporción de volumen de la fase líquida C en la serie de procesos para la producción de la partícula formada por asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante, se pueden preparar selectivamente el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante y la partícula formada por asociación del complejo.

- 40 Cuando el medio disperso que contiene el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante se mezcla con la fase líquida C, se puede utilizar, según sea necesario, un dispositivo de agitación, tal como un agitador magnético, agitador de turbina, homogeneizador, un aparato de emulsión de membrana equipado con una membrana porosa, o similares.

45 La fase líquida C puede contener, además del modificador de superficie, diversos aditivos tales como un tampón, antioxidante, sal, polímero y/o azúcar dependiendo del propósito farmacéutico. Además, el medio disperso en el que se dispersará el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante puede contener varios aditivos solubles en el medio disperso, tales como un compuesto ácido, compuesto básico, polímero anfifílico y/o polímero biodegradable, con el fin de controlar la velocidad de liberación del antígeno encapsulado mediante degradación o desintegración del complejo.

50 Además, se puede llevar a cabo una operación de emulsificación de la emulsión de sólido en aceite en agua (S/O/W) o emulsión de sólido en aceite en aceite (S/O1/O2) formadas con el fin de producir una partícula más fina formada por asociación de los complejos de micropartículas antígeno-adyuvante. El procedimiento de emulsificación no está restringido, siempre que se pueda preparar una emulsión estable de este modo, y entre sus ejemplos se incluyen procedimientos por agitación y procedimientos que utilizan un homogeneizador de presión elevada, un homomezclador de alta velocidad o similares.

60 En los casos en los que el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante se dispersa una vez en el medio disperso, y la dispersión obtenida se añade a la fase líquida C que contiene el modificador de superficie, una suspensión de la partícula formada por asociación de la micropartícula adyuvante deseada se puede obtener mediante la eliminación del medio disperso. El procedimiento de eliminación del medio disperso no está restringido, y entre sus ejemplos se incluyen evaporación de disolvente, diálisis, liofilización, centrifugación, filtración y reprecipitación, entre los cuales es especialmente preferente la evaporación del disolvente y la liofilización. En los casos en los que se utilizó un disolvente acuoso como la fase líquida C, en esta etapa se puede obtener una dispersión acuosa de la partícula formada por asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante.

En una realización preferente, el modificador de superficie está unido al complejo de micropartículas antígeno-adyuvante o la partícula formada por asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante. En la presente memoria descriptiva, la unión puede ser un enlace no covalente o un enlace covalente. El enlace no covalente es preferentemente una interacción hidrófoba, y también puede ser una interacción electrostática, enlace de hidrógeno o fuerza de van der Waals, o una combinación de estos enlaces. En el enlace no covalente, el poli(hidroxiácido) de la micropartícula que contiene un polímero anfífilo se une preferentemente a la parte hidrófoba del modificador de superficie mediante una interacción hidrófoba y, en este caso, el medio disperso para el complejo de micropartícula antígeno-adyuvante en la dispersión de micropartículas es, preferentemente, agua, tampón, solución salina fisiológica, solución modificadora de superficie acuosa o disolvente hidrófilo.

El tamaño promedio de partícula del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante o las partículas formadas por asociación del complejo es preferentemente de 0,1 a 50  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$ . En particular, el tamaño de partícula promedio del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante es, preferentemente, de 0,1 a 1  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de 0,1 a 0,5  $\mu\text{m}$ , y el tamaño de partícula promedio del complejo de micropartículas de antígeno-adyuvante es, preferentemente, de 0,1 a 50  $\mu\text{m}$ , más preferentemente, de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$ , aún más preferentemente, de 1 a 10  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula promedio del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante o la partícula formada por asociación del complejo se puede medir directamente utilizando análisis de imagen con un microscopio electrónico de barrido (SEM ("Scanning Electron Microscope"): por ejemplo, S-4800 fabricado por Hitachi, Ltd.).

La composición inmunogénica en la presente invención es una composición que puede inducir una respuesta inmune en un cuerpo vivo, y contiene el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante como una sustancia inmunogénica. El tipo de respuesta inmune inducida por la composición inmunogénica no está restringido. Entre los ejemplos del tipo de respuesta inmune a inducir se incluyen la respuesta inmune Th1 y la respuesta inmune Th2, y se sabe que una de estas respuestas inmunes se induce predominantemente dependiendo del antígeno, el sitio de administración y el tipo de procedimiento de administración. La presente invención puede inducir ambas respuestas inmunes Th1 y Th2. La respuesta inmune Th1 se puede inducir efectivamente por el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante de la presente invención que tiene un tamaño de partícula pequeño, o la partícula formada por asociación de los complejos, tal como se muestra en los ejemplos. Los grados de la respuesta inmune Th1 y la respuesta inmune Th2 se pueden evaluar mediante varios procedimientos conocidos. Por ejemplo, en el caso del ratón, se sabe que la cantidad de producción del anticuerpo IgG2a es un índice para la respuesta inmune Th1. Además, como índices para la respuesta inmune Th2, se conocen el anticuerpo IgG1 y la cantidad total de anticuerpos IgG.

La composición inmunogénica de la presente invención contiene, como ingrediente eficaz, el complejo de micropartículas antígeno-adyuvante o la partícula formada por asociación del complejo y, por lo tanto, tiene una capacidad adyuvante, pero mediante la inclusión adicional de una sustancia inmunoactivadora, se puede conseguir una mayor capacidad de activación inmunológica. La sustancia activadora del sistema inmunitario puede estar contenida en el exterior de la micropartícula adyuvante o encapsulada en la misma y, preferentemente, la sustancia está encapsulada en la micropartícula adyuvante. La sustancia activadora del sistema inmunitario no está restringida siempre que pueda funcionar como una sustancia activadora del sistema inmunitario, y entre sus ejemplos se incluyen aceites, sales de aluminio, sales de calcio, polímeros formadores de gel, citocinas activadoras del sistema inmunitario y ligandos del receptor TLR, entre los cuales son preferentes las citocinas activadoras del sistema inmunitario y los ligandos del receptor TLR.

Entre los ejemplos de las citocinas que activan el sistema inmunitario se incluyen interleucina 12, interferón  $\alpha$ , interleucina 18, TNF $\alpha$ , interleucina 6, NO, interferón  $\gamma$  e interferón  $\beta$ .

Entre los ejemplos de los ligandos del receptor TLR se incluyen lipoproteínas; ARN de doble cadena tales como poli I:C y poli I:CLC; flagelina; ARN monocatenarios; CpG; profilina MPL; QS21; y TDM, entre los cuales son preferentes los ácidos nucleicos, tales como los ARN bicatenarios, los ARN monocatenarios y CpG y, es más preferente el CpG. En la presente memoria descriptiva, el CpG significa ADN de motivo CpG (citosina-guanina) no metilado que existen en virus, bacterias y similares (ver la Solicitud de Patente PCT traducida japonesa abierta al público n.º 2001-503254). Se informan varias secuencias efectivas como motivos CpG, y el tipo de secuencia no está restringido siempre que tenga una capacidad de activación inmunológica, y la secuencia se puede preparar utilizando un análogo de base o se puede seleccionar de diversos tipos de productos modificados.

En los casos en los que la composición inmunogénica de la presente invención se utiliza como una composición farmacéutica o una vacuna, pueden estar contenidos diversos aditivos farmacéuticamente útiles además del polímero anfífilo, la sustancia activa hidrófila, el modificador de superficie y el medio disperso. Entre los ejemplos de los aditivos que se pueden añadir se incluyen tampones, antioxidantes, sales, polímeros y azúcares.

El procedimiento de inducción de una respuesta inmune utilizando la composición inmunogénica de la presente invención no está restringido, y la composición inmunogénica se puede administrar a un cuerpo vivo o ponerse en

contacto con células inmunocompetentes eliminadas al exterior de un cuerpo vivo. El procedimiento de administración de la composición inmunogénica a un cuerpo vivo no está restringido, y entre sus ejemplos se incluyen administración subcutánea, administración intradérmica, administración intramuscular, administración transnasal, administración pulmonar, administración oral, administración sublingual, administración intravaginal, administración intraperitoneal y administración a los ganglios linfáticos, entre las cuales son preferentes la administración intradérmica y la administración subcutánea.

En términos de la cantidad de la composición inmunogénica de la presente invención que se utilizará tras la inducción de la respuesta inmune, la cantidad necesaria del antígeno requerida para la inducción de la reacción inmune de interés se establece apropiadamente dependiendo del tipo de antígeno, procedimiento de administración y número de dosis. Por ejemplo, en los casos en los que la composición inmunogénica de la presente invención se administra por vía subcutánea al ser humano para inducir la respuesta inmune, se administran de 0,01 a 1.000  $\mu\text{g}$  por dosis del antígeno, antígeno que está contenido en la composición inmunogénica. El número de dosis también se puede establecer de manera apropiada de manera similar a la dosis, y la respuesta inmune se puede inducir de 1 a 10 veces de administración, dado que la composición inmunogénica de la presente invención tiene la acción de inducir una respuesta inmune de manera continua.

El cuerpo vivo al que se administra la composición inmunogénica puede ser un ser humano o un animal no humano, y el cuerpo vivo es preferentemente ser humano; o cerdo, vaca, ave, oveja, caballo, burro, cabra o camello, perro, gato, hurón, conejo, mono, rata, ratón o conejillo de indias, que se cría como ganado, animal de compañía o animal de experimentación.

## EJEMPLOS

Se describen ejemplos a continuación, pero la presente invención no queda limitada por estos ejemplos.

Ejemplo 1. Síntesis de Dextrano-ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)

(1-1) Síntesis de TMS-Dextrano

Se añadió dextrano (Nacalai Tesque; grado especial según los estándares de Nacalai; peso molecular promedio en número, 13.000; 5,0 g) a formamida (100 ml), y la mezcla resultante se calentó a 80 °C. A esta solución, se le añadió gota a gota 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (100 ml) durante 20 minutos. Posteriormente, la mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 2 horas. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se separaron dos capas entre sí con un embudo separador. La capa superior se concentró a presión reducida, y se añadió metanol (300 ml) a la misma, seguido de filtración y secado de los sólidos obtenidos, para obtener TMS-dextrano (compuesto (1)) (11,4 g) como sólidos blancos.

Mediante el mismo procedimiento, se prepararon los compuestos (2) y (3) utilizando dextrano (fabricado por Sigma; peso molecular promedio, no más de 1.500); se prepararon los compuestos (4) y (5) utilizando dextrano (fabricado por SERVA; peso molecular promedio, no más de 5.000); se preparó el compuesto (6) utilizando dextrano (el mismo reactivo que el utilizado para la preparación del compuesto (1)); y se prepararon los compuestos (7), (8) y (9) utilizando dextrano (fabricado por Nacalai Tesque; peso molecular promedio, 40.000).

(1-2) Síntesis de Dextrano-PLGA (compuestos (12)-(23))

Se secaron el compuesto (1) (0,5 g) y terc-butóxido de potasio (35 mg) con calor a presión reducida durante 2 horas, y se añadió tetrahidrofurano (10 ml) a los mismos, seguido de agitación de la mezcla resultante durante 1,5 horas a temperatura ambiente. A esta solución, se añadió gota a gota una solución de (DL)-lactida (0,56 g) y glicólido (0,45 g) en tetrahidrofurano (15 ml), y la mezcla resultante se agitó durante 5 minutos, seguido de la adición de 2 gotas de ácido acético para detener la reacción. Una vez completada la reacción, el disolvente se concentró a presión reducida, y se llevó a cabo una purificación por reprecipitación con el sistema cloroformo-metanol y el sistema cloroformo-éter dietílico, para obtener sólidos blancos, que posteriormente se disolvieron en cloroformo (9 ml). A la solución resultante, se añadió ácido trifluoroacético (1,0 ml), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió en cloroformo (10 ml), seguido de la adición de la solución resultante a éter dietílico que se había enfriado preliminarmente a 0 °C y se filtró el producto obtenido, para obtener dextrano-PLGA como sólidos blancos (compuesto (12)). Mediante el mismo procedimiento, se sintetizó el compuesto (13) con (DL)-lactida (0,78 g) y glicólido (0,63 g); se sintetizó el compuesto (14) con (DL)-lactida (1,12 g) y glicólido (0,9 g); se sintetizó el compuesto (15) con (DL)-lactida (1,67 g) y glicólido (1,35 g).

Además, se sintetizó el compuesto (16) utilizando el compuesto (2) con (DL)-lactida (0,56 g) y glicólido (0,45 g); se sintetizó el compuesto (17) utilizando el compuesto (3) con (DL)-lactida (0,67 g) y glicólido (0,54 g); se sintetizó el compuesto (18) utilizando el compuesto (4) con (DL)-lactida (0,78 g) y glicólido (0,63 g); se sintetizó el compuesto (19) utilizando el compuesto (5) con (DL)-lactida (0,89 g) y glicólido (0,72 g); se sintetizó el compuesto (20) utilizando el compuesto (6) con (DL)-lactida (0,78 g) y glicólido (0,63 g); se sintetizó el compuesto (21) utilizando el compuesto

(7) con (DL)-lactida (0,78 g) y glicólido (0,63 g); se sintetizó el compuesto (22) utilizando el compuesto (8) con (DL)-lactida (1,12 g) y glicólido (0,9 g); y se sintetizó el compuesto (23) utilizando el compuesto (9) con (DL)-lactida (1,12 g) y glicólido (0,9 g).

- 5 Se determinaron el peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número de cada uno de los polímeros de los compuestos (12) a (15) mediante medición GPC (columna: fabricada por Tosoh Corporation, TSK-gel  $\alpha$ -5000  $\times$  2, disolvente DMF; detector: RI; estándar: pululano). El peso molecular promedio en número y el número de cadenas de injerto de los compuestos (12) a (23) se determinaron por medición de RMN de  $^1\text{H}$  (tabla 1).

10 [Tabla 1]

Tabla 1: Resultados de evaluación de polímeros Dex-g-PLGA preparados

ID del compuesto	Peso molecular promedio en peso	Peso molecular promedio en número	Peso molecular de las cadenas injertadas	Número de cadenas injertadas	ID del compuesto TMS-Dex
(12)	99462	85101	2167	31-41	(1)
(13)	116570	101126	3000	23-31	(1)
(14)	144878	122151	4864	20-22	(1)
(15)	172500	154008	5792	18-24	(1)
(16)	-	-	2786	2	(2)
(17)	-	-	4070	2,2	(3)
(18)	-	-	3120	8,3	(4)
(19)	-	-	4275	10,9	(5)
(20)	-	-	3250	17	(6)
(21)	-	-	4333	41	(7)
(22)	-	-	5571	15	(8)
(23)	-	-	4333	21	(9)

Ejemplo de referencia 2. Síntesis de PEG-PLGA (compuestos (10), (11))

- 15 Se mezclaron éter monometílico de polietilenglicol (NIPPON OIL & FATS CO., LTD.; SUNBRIGHT MEH-20H; peso molecular promedio en número, 5.128; Mw/Mn = 1,02), (DL)-lactida y glicólido en las cantidades de alimentación que se muestran en la tabla 2, y la mezcla resultante se calentó a 140 °C. Después de agitar la mezcla durante 20 minutos, se añadió octilato de estaño (II) (al 0,05 % en peso con respecto al éter monometílico de polietilenglicol) a la mezcla, y la mezcla resultante se agitó a 180 °C durante 3 horas. El líquido de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se disolvió en cloroformo (de modo que la concentración pasó a ser, aproximadamente, 100 mg/ml), seguido de una purificación mediante reprecipitación con éter dietílico que se había enfriado con anterioridad a 0 °C. Los sólidos obtenidos se filtraron y se secaron a presión reducida, para obtener un polímero PEG-PLGA como sólidos blancos o marrón claro. El peso molecular promedio en número del polímero se determinó mediante RMN de  $^1\text{H}$  (tabla 2).

[Tabla 2]

Tabla 2: Resultados de la evaluación de los polímeros PEG-PLGA preparados

ID del compuesto	Cantidad alimentada de PEG	Cantidad alimentada de DL-lactida	Cantidad alimentada de glicólido	Peso molecular promedio en número
(10)	300 mg	2,16 g	1,74 g	60.000
(11)	100 mg	1,15 g	0,93 g	110.000

- 30 Ejemplo 3. Preparación de complejos de micropartículas antígeno-adyuvante utilizando polímeros Dex-g-PLGA (Partículas Dex-g-PLGA (1)-(28))

35 Se disolvieron en 100  $\mu\text{l}$  de carbonato de dimetilo, 5 mg de dextrano-ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (compuestos (12)-(23)) en el ejemplo 1, para preparar una solución de polímero de 50 mg/ml. A esta solución de polímero, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de terc-butanol y 50  $\mu\text{l}$  del antígeno encapsulado ((OVA (ovoalbúmina) (Sigma) o CEA (antígeno carcinoembrionario) (COSMO BIO Co., Ltd.)) y/o la sustancia inmunoactivadora (CpG) que se muestra en la tabla 3 se añadió a la concentración o concentraciones descritas, y la mezcla resultante se agitó con un mezclador vórtex, para producir una emulsión de fase inversa. Como el CpG, se utilizó 5'-gggggggCGACGATCGTCAGG-3' (letras minúsculas representan bases modificadas con fosforotioato) (síntesis por contrato de Sigma-Genosys).

40 La emulsión de fase inversa se sometió a congelación previa con nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un liofilizador (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000) a una temperatura de enfriamiento de la trampa de -45 °C a un nivel de vacío de 20 Pa durante 24 horas. Los sólidos obtenidos se dispersaron en el medio de dispersión en la cantidad mostrada en la tabla 3, para preparar una suspensión S/O. La suspensión S/O se añadió gota a gota a 2 ml de una solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10 %, y la mezcla resultante se agitó/emulsionó mediante el

45

procedimiento de agitación descrito en la tabla 3, para preparar una emulsión S/O/W. A partir de la emulsión S/O/W, el disolvente orgánico inmiscible en agua se eliminó por evaporación del disolvente, para proporcionar una dispersión de complejo de micropartículas antígeno-adyuvante. La dispersión se sometió a congelación previa con nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un liofilizador (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000) a una temperatura de enfriamiento de la trampa de -45 °C a un nivel de vacío de 20 Pa durante 24 horas, para obtener polvo seco de un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante (tamaño de partícula promedio, 0,4 µm) y una partícula (tamaño de partícula promedio, 5 a 40 µm) formada por asociación del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante. El resultado del cálculo del tamaño promedio de partícula de la partícula obtenida por observación con un microscopio electrónico de barrido (SEM: S-4800 fabricado por Hitachi, Ltd.) se muestra en la tabla 3.

[Tabla 3]

Tabla 3: Recetas y tamaños de partícula promedio de partículas Dex-g-PLGA

ID de partícula	Polímero utilizado	Composición de la solución en la partícula	Volumen de solución/solución de dispersión	Procedimiento de agitación	Tamaño promedio de partícula (µm)
(1)	Compuesto (12)	OVA (5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(2)	Compuesto (13)	OVA (5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(3)	Compuesto (14)	OVA (5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(4)	Compuesto (15)	OVA (5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(5)	Compuesto (14)	OVA (5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Agitador (1000 rpm)	40 (Partícula asociada)
(6)	Compuesto (14)	OVA (5 mg/ml)	Acetato de etilo 500 µl	Mezclador vórtex	0,4
(7)	Compuesto (12)	CEA (0,5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(8)	Compuesto (13)	CEA (0,5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(9)	Compuesto (14)	CEA (0,5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(10)	Compuesto (15)	CEA (0,5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(11)	Compuesto (14)	CEA (0,5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Agitador (1000 rpm)	40 (Partícula asociada)
(12)	Compuesto (14)	CEA (0,5 mg/ml)	Acetato de etilo 500 µl	Mezclador vórtex	0,4
(13)	Compuesto (14)	CEA (0,5 mg/ml) + CpG (2,5 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(14)	Compuesto (16)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(15)	Compuesto (17)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(16)	Compuesto (18)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(17)	Compuesto (19)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(18)	Compuesto (20)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(19)	Compuesto (21)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(20)	Compuesto (22)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	0,4
(21)	Compuesto (22)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(22)	Compuesto (22)	CEA (0,25 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Agitador (1000 rpm)	40 (Partícula asociada)
(23)	Compuesto (23)	OVA (5 mg/ml)	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(24)	Compuesto (23)	Ninguno	Carbonato de dimetilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)

ID de partícula	Polímero utilizado	Composición de la solución en la partícula	Volumen de solución/solución de dispersión	Procedimiento de agitación	Tamaño promedio de partícula (µm)
(25)	Compuesto (23)	CEA (0,25 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	0,4
(26)	Compuesto (23)	CEA (0,25 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(27)	Compuesto (23)	CEA (0,25 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Agitador (1000 rpm)	40 (Partícula asociada)
(28)	Compuesto (23)	CEA (0,025 mg/ml)	Acetato de etilo 200 µl	Mezclador vórtex	0,4

Ejemplo de referencia 4. Preparación de complejos de micropartículas antígeno-adyuvante utilizando polímeros PEG-PLGA (partículas PEG-PLGA (1) a (4))

5 Se disolvieron en 100 µl de carbonato de dimetilo, 5 mg del polímero PEG-PLGA preparado en el ejemplo 2 (compuesto (10) u (11)), para preparar 50 mg/ml de solución de polímero. A esta solución de polímero, se añadieron 20 µl de terc-butanol, y se añadieron a la mezcla resultante 50 µl de la solución que contenía antígeno mostrada en la tabla 4, seguido de agitación de la mezcla, para producir una solución de emulsión de fase inversa. La solución de emulsión de fase inversa se sometió a congelación previa con nitrógeno líquido y se liofilizó utilizando un liofilizador (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000) a una temperatura de enfriamiento de la trampa de -45 °C a un nivel de vacío de 20 Pa durante 24 horas. Los sólidos obtenidos se dispersaron en acetato de etilo en la cantidad mostrada en la tabla 4, para preparar una suspensión de S/O. La suspensión de S/O se añadió gota a gota a 2 ml de una solución acuosa que contenía Pluronic F-68 al 10 %, y la mezcla resultante se agitó/emulsionó con un mezclador vórtex, para preparar una emulsión de S/O/W. A partir de la emulsión S/O/W, se eliminó el disolvente orgánico inmiscible en agua mediante evaporación del disolvente, para proporcionar una dispersión de complejo de micropartículas antígeno-adyuvante. La dispersión se sometió a congelación previa con nitrógeno líquido, y se liofilizó utilizando un liofilizador (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000) a una temperatura de enfriamiento de la trampa de -45 °C a un nivel de vacío de 20 Pa durante 24 horas, para obtener polvo seco de un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante. Se muestra en la tabla 4 el resultado del cálculo del tamaño de partícula promedio del complejo de micropartículas antígeno-adyuvante mediante observación con un microscopio electrónico de barrido (SEM: S-4800 fabricado por Hitachi, Ltd.).

[Tabla 4]

25 Tabla 4: Recetas y tamaños de partícula promedio de las partículas PEG-PLGA

ID de partícula	Polímero utilizado	Composición de la solución en la partícula	Cantidad de solución de acetato de etilo	Procedimiento de agitación	Tamaño promedio de partícula (µm)
(1)	Compuesto (10)	OVA (5 mg/ml)	200	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(2)	Compuesto (11)	OVA (5 mg/ml)	200	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(3)	Compuesto (10)	OVA (5 mg/ml)	200	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)
(4)	Compuesto (10)	CEA (5 mg/ml)	200	Mezclador vórtex	5 (Partícula asociada)

Ejemplo comparativo 1. Preparación de partículas de homopolímero PLGA que contienen antígeno (partículas de PLGA (1) y (2))

30 Se prepararon partículas de PLGA que contenían un antígeno utilizando una tecnología conocida (International Journal of Pharmaceutics, 2007, vol. 334, págs. 137-148). En 15 ml de cloruro de metileno, se disolvieron 200 mg de PLGA (fabricado por SIGMA; peso molecular promedio, 40.000-75.000), para preparar una solución de PLGA de 13,3 mg/ml. A 2 ml de la solución de polímero, se añadieron 100 µl de solución acuosa de OVA de 5 mg/ml con agitación a 19.000 rpm (con un homogeneizador fabricado por Polytron), y la agitación se llevó a cabo de la misma manera durante 5 minutos, para producir una solución W/O. La solución W/O se añadió a 20 ml de solución acuosa de alcohol polivinílico al 1 % con agitación a 19.000 rpm, y se llevó a cabo la agitación de la misma manera durante 5 minutos, para producir una solución W/O/W. La solución W/O/W se agitó a 200 rpm durante 12 horas y, posteriormente, se sometió a congelación previa con nitrógeno líquido, seguido de liofilización utilizando un liofilizador (EYELA, FREEZE DRYER FD-1000) a una temperatura de enfriamiento de la trampa de -45 °C a un nivel de vacío de 20 Pa durante 12 horas, para obtener una partícula de PLGA que contenía un antígeno. La partícula obtenida se observó con un microscopio electrónico de barrido (SEM: S-4800 fabricado por Hitachi, Ltd.) para calcular el tamaño promedio de partícula, y se reveló que el tamaño promedio de partícula era de 2 µm. Además, la partícula de PLGA (2) se preparó utilizando una solución acuosa de CEA (0,25 mg/ml) y el tamaño promedio de

partícula se calculó de la misma manera con SEM. Se reveló que el tamaño promedio de partícula era de 2 µm.

Ejemplo 5. Medición de las tasas de encapsulación de antígeno y capacidades de retención de antígeno de complejos de micropartículas CEA-adyuvante y partículas asociadas de los mismos

5 <Procedimiento>

10 Se dispusieron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, 20 mg de cada uno de los complejos de micropartículas adyuvantes y sus partículas asociadas (denominadas en lo sucesivo partículas encapsuladoras de CEA) preparadas mediante los procedimientos de los ejemplos 3 y 4, y se disolvieron en 1 ml de tampón A (PBS suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1 %, Pluronic F-68 al 0,1 % y azida de sodio al 0,02 %), seguido de separación en partículas (precipitado) y sobrenadante por centrifugación a 18.000 × g durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió en otro tubo, y las partículas se resuspendieron en 1 ml de un tampón, seguido de llevar a cabo la separación nuevamente en partículas y sobrenadante por centrifugación en las condiciones anteriores. Esta operación de lavado se repitió una vez más (un total de tres veces de centrifugación), y la concentración de CEA del sobrenadante recogido por cada vez de centrifugación se midió utilizando un kit ELISA (fabricado por Hope Laboratories, TM-201).

20 A partir de la cantidad de CEA alimentada tras la preparación de la partícula (respecto a un peso de la partícula encapsuladora de CEA de 20 mg), se restó el total de las cantidades de CEA en los sobrenadantes obtenidos durante las tres veces de centrifugación, y se calculó la tasa de encapsulación según la siguiente ecuación.

[Ecuación 1]

25 
$$\text{Tasa de encapsulación (\%)} = \frac{\text{Cantidad alimentada de CEA (ng)} - \text{Cantidad total de CEA en los sobrenadantes (ng)}}{\text{Cantidad alimentada de CEA (ng)}} \times 100$$

30 En términos de medición de la capacidad de liberación del antígeno, las partículas después de las tres veces de lavado se suspendieron/dispersaron en 1,2 ml de tampón A. Una parte de este líquido (40 µl) se transfirió a otro tubo, y la centrifugación se llevó a cabo a 18.000 × g durante 10 minutos para precipitar las partículas, seguido de la recolección de 30 µl del sobrenadante en otro tubo (muestra de 0 horas). La suspensión de partículas restante se mezcló suavemente por inversión en un tubo Eppendorf de 1,5 ml colocado en una incubadora a 37 °C utilizando un rotador a una velocidad de 6 rpm. A partir de este líquido, se recogieron alícuotas de una pequeña cantidad (40 µl) con el tiempo, y el sobrenadante se separó por centrifugación de la misma manera que se ha descrito anteriormente. La concentración de CEA en la muestra de sobrenadante recogida en cada punto temporal se midió mediante el procedimiento ELISA descrito anteriormente, y la tasa de liberación (%) se calculó según la siguiente ecuación.

35 [Ecuación 2]

40 
$$\text{Velocidad de liberación (\%)} = \frac{\text{concentración de CEA en sobrenadante } \left(\frac{\text{ng}}{\text{ml}}\right) \times 1,2 \text{ (ml)} \times 100}{\text{Cantidad de CEA encapsulada en 20 mg de partículas de CEA ng}}$$

<Resultados>

45 Las tasas de encapsulación de antígeno de las partículas encapsuladoras de CEA fueron tal como se muestran en la tabla 5, y se reveló que el antígeno estaba encapsulado en cualquiera de las partículas encapsuladoras de CEA a una tasa elevada. La capacidad de retención para el antígeno fue baja en la partícula Dex-g-PLGA (7) que tenía cadenas de injerto hidrófobas cortas, en la que el 67,3 % del antígeno encapsulado se liberó en una semana. Por otro lado, a medida que aumentaba la longitud de la cadena de injerto hidrófoba, aumentaba la capacidad de retención para el antígeno. En las partículas de Dex-g-PLGA que tenían cadenas de injerto hidrófobas largas, aproximadamente, el 90 % del antígeno alimentado todavía estaba encapsulado incluso después de una semana. También en la partícula PEG-PLGA, solo se liberó aproximadamente el 4 % del antígeno en una semana, lo que muestra una elevada capacidad de retención de antígeno.

[Tabla 5]

Tabla 5: Tasas de encapsulación y capacidades de retención antígeno de partículas encapsuladoras de CEA

Partículas encapsuladoras de CEA	Tasa de encapsulación (%)	Liberación de antígeno (%) (1 semana)	Liberación de antígeno (%) (2 semanas)
Partícula Dex-g-PLGA (7)	90,71	67,3	65,8
Partícula Dex-g-PLGA (8)	91,94	37,9	53,8
Partícula Dex-g-PLGA (9)	88,24	4,1	18,3
Partícula Dex-g-PLGA (10)	91,26	1,7	2,8
Partícula Dex-g-PLGA (11)	93,5	6,3	12,0
Partícula Dex-g-PLGA (12)	95	2,0	11,3

Partículas encapsuladoras de CEA	Tasa de encapsulación (%)	Liberación de antígeno (%) (1 semana)	Liberación de antígeno (%) (2 semanas)
Partícula PEG-PLGA (4)	92,62	6,8	7,3
Partícula Dex-g-PLGA (13)	98,17	4,1	3,9

Ejemplo 6. Administración subcutánea de composición inmunogénica que contiene OVA a ratones (1)

<Procedimiento>

5 Entre las partículas asociadas con el complejo de micropartículas OVA-adyuvante (denominadas en lo sucesivo partículas asociadas encapsuladoras de OVA) y de los complejos de micropartículas OVA-adyuvante (denominadas en lo sucesivo partículas encapsuladoras de OVA) preparadas en los ejemplos 3 y 4, se suspendieron/dispersaron en 3 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 40 mg (50 µg en términos de la cantidad alimentada de antígeno) de cada una de

10 partículas asociadas encapsuladoras de OVA que tenían cadenas hidrófobas de diferentes longitudes (partículas Dex-g-PLGA (2), (3) y (4)); una partícula asociada encapsuladora de OVA y una partícula encapsuladora de OVA que tenía tamaños de partícula diferentes de los de la partícula Dex-g-PLGA (3) (partículas Dex-g-PLGA (5) y (6)); y

15 una partícula PEG-PLGA (3); seguido de centrifugación a 80 × g durante 5 minutos para precipitar la partícula y transferir el sobrenadante a otro tubo. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 80 × g durante 5 minutos para precipitar la partícula restante, y el sobrenadante resultante se eliminó. Los precipitados obtenidos en la primera centrifugación y la segunda centrifugación se combinaron y redispersaron en 1 ml de PBS, seguido de la repetición 3 veces de la misma

20 operación de centrifugación, eliminando de este modo el antígeno que no estaba encapsulado en la partícula. El precipitado se redispersó finalmente en 150 µl de PBS, para proporcionar un líquido para la administración. Este líquido se administró por vía subcutánea mediante inyección única en la espalda de ratones Balb/C machos (Japan SLC, Inc.) con 9 semanas de edad. Se llevó a cabo la administración, por inyección única, de la partícula de PLGA producida en el ejemplo comparativo 1 o la solución de antígeno (50 µl) sola, como un ejemplo comparativo; o una solución preparada mezclando 50 µl de la solución de antígeno con 50 µl del adyuvante “ Alumbre Imject “ (fabricado por Thermo Scientific, denominado también en lo sucesivo alumbre), como un ejemplo de referencia. En cada

25 condición, la administración se llevó a cabo a 4 ratones individuales, y se muestran en la figura 1 los valores promedio de los títulos de anticuerpos.

30 Después de la administración, los ratones se mantuvieron en un entorno en el que los ratones pueden tomar libremente comida y agua, mientras se recolecta sangre de la vena de la cola con el tiempo. A la sangre recolectada, se añadió heparina a una concentración final de 3,3 UI/ml, y se llevó a cabo centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos para recolectar plasma sanguíneo, seguido de medición del título de anticuerpos contra OVA en el plasma sanguíneo.

35 El título de anticuerpos se midió por el siguiente procedimiento. En una microplaca de 96 pocillos (MaxiSorp, fabricada por Nunc), se colocaron 100 µl de una solución de PBS que contenía 1 µg/ml de OVA, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante toda la noche. La solución se desechó, y se colocaron 400 µl de PBS suplementado con BSA (“Bovine Serum Albumin”, Albúmina de Suero Bovino) al 0,5 % en la placa, seguido de llevar a cabo bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron una vez con 400 µl de un líquido de lavado (PBS suplementado con Tween 20 al 0,05 %) y se colocaron 100 µl de una muestra de plasma sanguíneo que se había diluido de 1.000 a 100.000 veces con un líquido de dilución (PBS suplementado con BSA al 0,25 % y Tween 20 al 0,05 %) en cada pocillo, seguido de permitir que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 40 minutos con agitación. Los pocillos se lavaron tres veces con el líquido de lavado, y se colocaron en cada pocillo 100 µl de anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP (“Horse Radish Peroxidase”, peroxidasa de rábano) (Zymed) (diluido 10.000 veces con el líquido de dilución) en cada pocillo, seguido de permitir que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación. Los pocillos se lavaron tres veces con el líquido de lavado, y se colocaron 100 µl de un líquido colorante (tampón de acetato/citrato de sodio 0,1 M (pH 4,5) que contenía peróxido de hidrógeno al 0,006 % y 0,2 mg/ml de tetrametilbencidina) en cada pocillo, seguido de permitir que la

50 reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 N, y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas. Como muestra estándar, se midió al mismo tiempo un anticuerpo monoclonal anti-OVA diluido en serie (HYB 094-05, fabricado por Antibody Shop) para proporcionar una curva de calibración, y se calculó la cantidad de anticuerpo en cada muestra como una concentración en peso (ng/ml).

<Resultados>

60 El cambio en el valor promedio del título de anticuerpos anti-OVA en plasma sanguíneo con el tiempo se muestra en la figura 1. La partícula encapsuladora de OVA y las partículas asociadas encapsuladoras de OVA que utilizan Dex-g-PLGA (partículas Dex-g-PLGA (2), (3), (4), (5) y (6)), y la partícula encapsuladora de OVA que utiliza PEG-PLGA (partícula PEG-PLGA (3)) mostraron un efecto continuo de aumento del título de anticuerpos durante no

menos de 6 semanas, mostrando valores mucho más elevados que los casos de administración de la partícula PLGA o el antígeno solo en los ejemplos comparativos y el caso de administración del antígeno + alumbre en el ejemplo de referencia. La partícula Dex-g-PLGA (6), que tiene un tamaño de partícula pequeño, mostró una

5

Ejemplo 7. Administración subcutánea de composición inmunogénica que contiene CEA a ratones

<Procedimiento>

10 Se evaluaron los complejos de micropartículas de CEA-adyuvante (denominados en lo sucesivo partículas encapsuladoras de CEA) y partículas asociadas de los mismos (denominadas en lo sucesivo partículas asociadas encapsuladoras de CEA) preparados mediante los procedimientos de los ejemplos 3 y 4 mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 6. La dosis por individuo fue de 1 mg (5 µg en términos del antígeno), y esta dosis se administró mediante inyección única. Como las partículas encapsuladoras de CEA y las partículas asociadas

15 encapsuladoras de CEA, se evaluaron las partículas de Dex-g-PLGA (8), (9) y (10), que tenían cadenas de injerto hidrófobas de diferentes longitudes; las partículas Dex-g-PLGA (11) y (12), que se prepararon utilizando el compuesto (4) como en el caso de la partícula Dex-g-PLGA (9) y tenían diferentes tamaños de partícula; la partícula Dex-g-PLGA (13), que se preparó incorporando el antígeno y 25 µg de CpG en la partícula Dex-g-PLGA (9); y la partícula PEG-PLGA (4). Además, se administraron mediante inyección única 50 µl de una solución acuosa que

20 contenía 5 µg del antígeno, como ejemplo comparativo; y una mezcla de 50 µl de una solución acuosa que contenía 5 µg del antígeno y 50 µl de alumbre, como un ejemplo de referencia. En cada condición, la administración se llevó a cabo a 4 ratones individuales, y se muestran en la figura 2 y la figura 3 los valores promedio para los respectivos grupos.

25 El título de anticuerpos contra CEA se midió mediante el siguiente procedimiento. En una microplaca de 96 pocillos (MaxiSorp, fabricada por Nunc), se colocaron 100 µl de una solución de PBS que contenía 1 µg/ml de proteína CEA, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante la noche. La solución se desechó, y se colocaron 400 µl de PBS suplementado con BSA al 0,5 % en la placa, seguido de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron una vez con 400 µl de un líquido de lavado (PBS suplementado con Tween 20 al 0,05 %) y se

30 colocaron 100 µl de una muestra de plasma sanguíneo que se había diluido de 1.000 a 100.000 veces con un líquido de dilución (PBS suplementado con BSA al 0,25 % y Tween 20 al 0,05 %) en cada pocillo, seguido de permitir que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 40 minutos con agitación. Los pocillos se lavaron tres veces con el líquido de lavado, y se colocaron en cada pocillo 100 µl de anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP (peroxidasa de rábano) (Zymed) (diluido 10.000 veces con el líquido de dilución) en cada pocillo, seguido de permitir

35 que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación. Los pocillos se lavaron tres veces con el líquido de lavado, y se colocaron 100 µl de un líquido colorante (tampón de acetato/citrato de sodio 0,1 M (pH 4,5) que contenía peróxido de hidrógeno al 0,006 % y 0,2 mg/ml de tetrametilbencidina) en cada pocillo, seguido de permitir que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación. La

40 reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 N, y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas. Como muestra patrón, se midió al mismo tiempo un anticuerpo monoclonal anti-CEA diluido en serie (MA1-5308, fabricado por Affinity Bioreagents) para proporcionar una curva de calibración, y la cantidad de anticuerpo en cada muestra se calculó como una concentración por peso (ng/ml). Para la medición del título de anticuerpos IgG2a, se utilizó un anticuerpo anti-IgG2a de ratón marcado con HRP (A90-107P, fabricado por Bethyl) en lugar del anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP, y se utilizó como muestra de referencia una

45 muestra de plasma sanguíneo de un solo ratón individual cuyo título de anticuerpos había aumentado. Las muestras preparadas mediante dilución en serie de esta muestra se utilizaron como patrones para preparar una curva de calibración. El título de anticuerpos correspondiente a la muestra diluida 64.000 veces se representó como 1 U.

<Resultados>

50 Las partículas encapsuladoras de CEA y las partículas asociadas encapsuladoras CEA utilizando Dex-g-PLGA (las partículas Dex-g-PLGA (8), (9), (10), (11) y (12), y la partícula PEG-PLGA (4)) mostraron un aumento continuo en el título de anticuerpos durante, aproximadamente, 6 semanas. Entre estas, la partícula encapsuladora de CEA que tenía un tamaño de partícula pequeño (partícula Dex-g-PLGA (12)) mostró el mayor efecto de aumento del título de

55 anticuerpos. Además, la partícula Dex-g-PLGA (13) que contenía CpG junto con el antígeno mostró un mayor efecto de aumento del título de anticuerpos que la partícula Dex-g-PLGA (9) (figura 2).

Se confirmó un aumento continuo en el título de anticuerpos anti-IgG2a para las partículas Dex-g-PLGA (8), (9), (10), (11) y (12), y la partícula PEG-PLGA (4). La partícula Dex-g-PLGA (13) preparada incorporando el antígeno y CpG en la partícula Dex-g-PLGA (9) mostró un mayor efecto de aumento del título de anticuerpos que la partícula

60 Dex-g-PLGA (9). Por otro lado, en el ejemplo de referencia en el que se administró la mezcla del antígeno y el alumbre, se observó un aumento continuo en el título de anticuerpos, pero el efecto fue más débil que en el caso de las otras partículas de Dex-g-PLGA. Se confirmó que la composición inmunogénica de la presente invención activó la inmunidad mediada por células, para la cual se sabe que el aumento en el título de IgG2a de ratón es un índice,

65 de manera continua durante un tiempo prolongado (figura 3).

## Ejemplo 8. Administración subcutánea de composición inmunogénica que contiene OVA a ratones (2)

## &lt;Procedimiento&gt;

Utilizando un polímero Dex-g-PLGA preparado mediante el mismo procedimiento que en el caso del compuesto (4) en el ejemplo 1, se evaluó una partícula preparada mediante el mismo procedimiento que en el caso de la partícula Dex-g-PLGA (3) en el ejemplo 3 (la partícula Dex-g-PLGA (A)) mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 6. La dosis por individuo fue de 16 mg (20 µg en términos de la cantidad de OVA encapsulado), y esta dosis se administró por inyección única. Además, como ejemplo de referencia, una solución preparada mezclando 50 µl de una solución acuosa que contenía 20 µg del antígeno OVA y 50 µl de alumbre se administró mediante inyección, una vez o tres veces a intervalos de 1 semana. En cada condición, la administración se llevó a cabo a 2 ratones individuales, y los valores promedio de los títulos de anticuerpos se representan en la figura 4 como valores medidos de la absorbancia a 450 nm.

## &lt;Resultados&gt;

Se muestra en la figura 4 el cambio en el anticuerpo anti-OVA en plasma sanguíneo con el tiempo. En el ejemplo de referencia en el que se administró una vez la mezcla de alumbre y el antígeno, apenas se observó un aumento en el título de anticuerpos. En el ejemplo de referencia en el que alumbre y el antígeno se administraron tres veces, se observó un fuerte aumento en el título de anticuerpos después de la tercera administración, pero el aumento fue transitorio y no se observó ningún aumento el día 35 y más tarde. En los ratones a los que se administró la composición inmunogénica de la presente invención (partícula Dex-g-PLGA (A)) mediante inyección única, se observó un aumento continuo a partir de dos semanas después de la administración, y se confirmó el aumento continuo en el título de anticuerpos hasta el día 56.

## Ejemplo 9. Administración subcutánea de la composición inmunogénica que contiene OVA a ratones (3)

## &lt;Procedimiento&gt;

La evaluación se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 6. La dosis de la partícula asociada encapsuladora de OVA por individuo fue 10 mg (12,5 µg en términos de la cantidad alimentada de antígeno). Se administraron mediante inyección única una partícula preparada utilizando un polímero Dex-g-PLGA preparado mediante el mismo procedimiento que en el caso del compuesto (4) en el ejemplo 1, partícula que se preparó mediante el mismo procedimiento que en el caso de la partícula Dex-g-PLGA (3) en el ejemplo 3 (partícula Dex-g-PLGA (B)); una partícula preparada utilizando un polímero Dex-g-PLGA preparado mediante el mismo procedimiento que en el caso del compuesto (4) en el ejemplo 1, partícula que se preparó mediante la incorporación de CpG junto con OVA durante la preparación de la partícula Dex-g-PLGA (3) en el ejemplo 3, de modo que la dosis de CpG por individuo fue 6,25 µg (partícula Dex-g-PLGA (C)); o la partícula PEG-PLGA (1) o (2). Como ejemplo comparativo, se administraron 12,5 µg del antígeno y, como un ejemplo de referencia, se administró una mezcla de 12,5 µg del antígeno y 6,25 µg de CpG, mediante inyección única. Se recogió sangre 4 semanas después de la administración a intervalos de 1 semana, y el título de anticuerpos se midió mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 6. En cada condición, la administración se llevó a cabo para 2 ratones individuales, y se muestran en la figura 5 los valores promedio de los títulos de anticuerpos.

## &lt;Resultados&gt;

Cualquiera de las partículas asociadas encapsuladoras de OVA (las partículas PEG-PLGA (1) y (2), y las partículas Dex-g-PLGA (B) y (C)) provocaron un aumento en el título de anticuerpos del animal al que se administró la partícula, durante no menos de 6 semanas después de la administración. Las partículas Dex-g-PLGA mostraron mayores capacidades de activación inmunológica que las partículas PEG-PLGA. Además, la partícula encapsuladora de OVA en la que se encapsuló CpG (partícula Dex-g-PLGA (C)) mostró un mayor efecto de aumento del título de anticuerpos que la partícula encapsuladora de OVA que no contenía CpG (partícula Dex-g-PLGA (B)).

## Ejemplo 10. Administración subcutánea de la composición inmunogénica que contiene proteínas estructurales de VHC a ratones

## &lt;Procedimiento&gt;

Utilizando un polímero Dex-g-PLGA preparado mediante el mismo procedimiento que en el caso del compuesto (4) en el ejemplo 1, y utilizando el mismo procedimiento de preparación que en el caso de la partícula Dex-g-PLGA (3) en el ejemplo 3, se preparó una partícula Dex-g-PLGA (D) (denominada en lo sucesivo partícula asociada encapsuladora de VHC-E2), la partícula Dex-g-PLGA (D) que se formó mediante asociación de un complejo de micropartículas de proteína estructural de VHC-adyuvante que contenía una proteína estructural de VHC. Esta

partícula se administró mediante inyección única mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 6. Como la proteína estructural del VHC, se utilizó una proteína quimérica compuesta por la proteína E2 derivada de la cepa J6CF y la proteína Fc de IgG humana, proteína quimérica que se había preparado según el procedimiento descrito en la solicitud de patente japonesa número 2008-254338. La dosis por individuo fue de 80 mg (1,5 µg en términos del antígeno). Además, se administraron mediante inyección única una mezcla de 25 µg de CpG y la partícula Dex-g-PLGA (D), y una mezcla de 25 µg de CpG, 50 µl de alumbre y la partícula Dex-g-PLGA (D), respectivamente. Como ejemplo comparativo, se administraron 1,5 µg del antígeno solo y, como ejemplos de referencia, se administraron 100 µl de una solución acuosa que contenía 1,5 µg del antígeno y 25 µg de CpG, 100 µl de una solución acuosa que contenía 1,5 µg del antígeno y 50 µl de alumbre, y 100 µl de una solución acuosa que contenía 1,5 µg del antígeno, 50 µl de alumbre y 25 µg de CpG mediante inyección única, respectivamente. En cada condición, la administración se llevó a cabo a 2 ratones individuales.

El título de anticuerpos contra la proteína estructural del VHC se midió mediante el siguiente procedimiento. En una microplaca de 96 pocillos (MaxiSorp, fabricada por Nunc), se colocaron 100 µl de una solución de PBS que contenía 0,5 µg/ml de proteína estructural de VHC, y la placa se dejó reposar a 4 °C durante la noche. La solución se desechó y se colocaron 400 µl de PBS suplementado con BSA al 0,5 % en cada pocillo, seguido de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron una vez con 400 µl de un líquido de lavado (PBS suplementado con Tween 20 al 0,05 %) y se colocaron 100 µl de una muestra de plasma sanguíneo que se había diluido de 1.000 a 100.000 veces con un líquido de dilución (PBS suplementado con BSA al 0,25 % y Tween 20 al 0,05 %) en cada pocillo, seguido de permitir que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 40 minutos con agitación. Los pocillos se lavaron tres veces con el líquido de lavado, y se colocaron en cada pocillo 100 µl de anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP (peroxidasa de rábano) (Zymed) (diluido 10.000 veces con el líquido de dilución) en cada pocillo, seguido de permitir que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación. Los pocillos se lavaron tres veces con el líquido de lavado, y se colocaron 100 µl de un líquido colorante (tampón de acetato/citrato de sodio 0,1 M (pH 4,5) que contenía peróxido de hidrógeno al 0,006 % y 0,2 mg/ml de tetrametilbencidina) en cada pocillo, seguido de permitir que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 N, y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas. En la figura 6, los valores promedio de los títulos de anticuerpos se representan como valores medidos de la absorbancia a 450 nm.

#### <Resultados>

La partícula asociada encapsuladora de VHC-E2 (partícula Dex-g-PLGA (D)) mostró un efecto continuo de aumento del título de anticuerpos durante 7 semanas. Además, en el caso en el que la partícula asociada encapsuladora de VHC-E2 se mezcló con CpG, y en el caso en el que la partícula asociada encapsuladora de VHC-E2 se mezcló con CpG y alumbre, se obtuvo un mayor efecto de aumento del título de anticuerpos en comparación con el caso en el que se administró la partícula asociada encapsuladora de VHC-E2 sola. En el ejemplo comparativo en el que se administró el antígeno solo, apenas se observó un aumento en el título de anticuerpos. En los ejemplos de referencia en los que se administró la mezcla del antígeno y el alumbre; mezcla del antígeno y CpG; o mezcla del antígeno, CpG y alumbre, el efecto de aumento del título de anticuerpos fue mayor que en el caso de la administración del antígeno solo, pero el efecto de aumento del título fue mucho menor que en el caso de la administración de la partícula asociada encapsuladora de VHC-E2.

#### Ejemplo 11. Administración subcutánea de composición inmunogénica que contiene CEA a ratones (2)

##### <Procedimiento>

Se evaluaron partículas asociadas con el complejo de micropartículas CEA-adyuvante preparadas mediante los procedimientos de los ejemplos 3 y 4 (denominadas en lo sucesivo partículas asociadas encapsuladoras de CEA) mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 7. La dosis por individuo fue de 400 µg (1 µg en términos del antígeno), y esta dosis se administró en la semana 0 y la semana 4. Como las partículas asociadas encapsuladoras de CEA, se evaluaron las partículas Dex-g-PLGA (14) y (15) que tenían cadenas hidrófilas de dextrano con un peso molecular de 1.500, las partículas Dex-g-PLGA (16) y (17) que tenían cadenas hidrófilas de dextrano con un peso molecular de 5.000, la partícula Dex-g-PLGA (18) que tenía cadenas hidrófilas de dextrano con un peso molecular de 175.000, y la partícula Dex-g-PLGA (19) que tenía cadenas hidrófilas de dextrano con un peso molecular de 40.000. En cada condición, se llevó a cabo la administración a 5 ratones individuales, y el valor promedio en cada grupo se muestra en la figura 7. El título de anticuerpos contra CEA se midió mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 7.

##### <Resultados>

Las partículas asociadas encapsuladoras de CEA que utilizan Dex-g-PLGA (partículas Dex-g-PLGA (14), (15), (16), (17), (18) y (19)) mostraron un aumento continuo en el título de anticuerpos. Entre estas, las partículas asociadas encapsuladoras de CEA constituidas por dextrano que tenían un peso molecular de 175.000 y un peso molecular de 40.000 (partículas Dex-g-PLGA (18) y (19)) mostraron mayores efectos de aumento del título de anticuerpos que las

partículas asociadas encapsuladoras de CEA constituidas por cadenas hidrófilas de dextrano que tenían un peso molecular de 1.500 y un peso molecular de 5.000 (partículas Dex-g-PLGA (14), (15), (16) y (17)) (figura 7).

Ejemplo 12. Administración subcutánea de composición inmunogénica que contiene CEA a ratones (3)

<Procedimiento>

Se evaluaron las partículas asociadas con el complejo de micropartículas CEA-adyuvante (denominadas en lo sucesivo partículas asociadas encapsuladoras de CEA) preparadas mediante los procedimientos de los ejemplos 3 y 4 mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 7. La dosis por individuo fue de 400 µg (1 µg en términos del antígeno), y esta dosis se administró en la semana 0 y la semana 4. Como las partículas asociadas encapsuladoras de CEA, se evaluaron 3 tipos de partículas que se prepararon utilizando el mismo polímero pero que tenían diferentes tamaños de partícula (partícula Dex-g-PLGA (20) (tamaño de partícula, 0,4 µm), partícula Dex-g-PLGA (21) (tamaño de partícula, 5 µm) y partícula Dex-g-PLGA (tamaño de partícula, 40 µm)). En cada condición, la administración se llevó a cabo a 5 ratones individuales, y se muestra en la figura 8 el valor promedio en cada grupo. El título de anticuerpos contra CEA se midió mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 7.

<Resultados>

La partícula encapsuladora CEA y las partículas asociadas encapsuladoras CEA utilizando Dex-g-PLGA (partículas Dex-g-PLGA (20), (21) y (22)) mostraron un aumento continuo en el título de anticuerpos. Entre estas, la partícula Dex-g-PLGA (20) que tenía un tamaño de partícula promedio de 0,4 µm mostró el mayor efecto de aumento del título de anticuerpos; la partícula Dex-g-PLGA (21) que tenía un tamaño promedio de partícula de 5 µm mostró el segundo mayor efecto de aumento del título de anticuerpos; y la partícula Dex-g-PLGA (22) que tenía un tamaño de partícula promedio de 40 µm mostró el efecto de aumento del título de anticuerpos más bajo (figura 8).

Ejemplo 13. Administración subcutánea de composición inmunogénica que contiene OVA a ratones (4)

<Procedimiento>

La evaluación se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 9. La dosis por administración fue de 20 µg en términos de la cantidad de antígeno en todos los casos, y el antígeno se administró un total de 3 veces en la semana 0, semana 2 y semana 4. La evaluación se llevó a cabo por comparación entre el caso en el que se administró una mezcla de 20 µg de OVA y la partícula Dex-g-PLGA (24) que no contenía antígeno (16 mg en términos de la cantidad de polímero), el caso en el que se administró la partícula Dex-g-PLGA (23) que contenía 20 µg de OVA (16 mg en términos de la cantidad de polímero), el caso en el que se administró una mezcla de 20 µg de OVA y 50 µl de alumbre, y el caso en el que se administraron 20 µg de OVA y la partícula Dex-g-PLGA (24) que no contenía antígeno en diferentes sitios. El título de anticuerpos en sangre se midió mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 9. En cada condición, la administración se llevó a cabo a 2 ratones individuales. La figura 9 muestra el valor promedio del título de anticuerpos.

<Resultados>

Todas las partículas mostraron el efecto de aumento del título de anticuerpos. La partícula asociada encapsuladora de OVA (partícula Dex-g-PLGA (23)) mostró un mayor efecto de aumento del título de anticuerpos en comparación con el caso en el que se administró la mezcla de OVA y la partícula (partícula Dex-g-PLGA (24)) que no contenía el antígeno, y el caso en el que el OVA y la partícula Dex-g-PLGA (24) se administraron en diferentes sitios.

Ejemplo 14. Administración subcutánea de composición inmunogénica que contiene CEA a ratones (4)

<Procedimiento>

La evaluación se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 7. Solo en el caso en el que se administró una mezcla de CEA y alumbre, se llevó a cabo un total de 3 veces de administración en la semana 0, semana 2 y semana 4, y en los otros casos en los que se administraron las partículas encapsuladoras de CEA y las partículas asociadas encapsuladoras de CEA, se llevó a cabo una administración única en la semana 0. La evaluación se llevó a cabo por comparación entre partículas que se prepararon utilizando el mismo polímero pero que tenían diferentes tamaños de partícula: partícula Dex-g-PLGA (25) (tamaño de partícula, 0,4 µm; contenido de polímero, 4 mg; cantidad de administración de antígeno, 10 µg), partícula Dex-g-PLGA (26) (tamaño de partícula, 5 µm; contenido de polímero, 4 mg; cantidad de administración de antígeno, 10 µg), partícula Dex-g-PLGA (27) (tamaño de partícula, 40 µm; contenido de polímero, 4 mg; cantidad de administración de antígeno, 10 µg), y partícula Dex-g-PLGA (28) (tamaño de partícula, 0,4 µm; contenido de polímero, 4 mg; cantidad de administración de antígeno n, 1 µg). Además, en términos de la partícula Dex-g-PLGA (25), se hicieron comparaciones con los casos en los que se redujo la cantidad de administración a 1/10 (contenido de polímero, 400 µg; cantidad de administración de antígeno, 1 µg) o 1/100 (contenido de polímero, 40 µg; cantidad de administración de antígeno,

0,1 µg). Como ejemplo comparativo, se evaluó la partícula PLGA (2) preparada por encapsulación de CEA. En cada condición, la administración se llevó a cabo a 6 ratones individuales, y se midió el título de anticuerpos, IgG1 e IgG2a en sangre mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 7. La figura 10 y la figura 11 muestran los valores promedio.

5 <Resultados>

10 Las partículas encapsuladoras de CEA (partículas Dex-g-PLGA (25) y (26)) que tenían un tamaño de partícula promedio de 0,4 µm y un tamaño de partícula promedio de 5 µm mostraron un mayor efecto de aumento del título de anticuerpos en comparación con la partícula encapsuladora de CEA (partícula Dex-g-PLGA (27)) que tenía un tamaño promedio de partícula de 40 µm. Aunque la partícula Dex-g-PLGA (25) mostró un elevado efecto de aumento del título de anticuerpos, la reducción de la cantidad de administración a 1/10 o 1/100 dio como resultado una disminución del efecto de aumento del título de anticuerpos, y en el caso en el que la cantidad de administración de la partícula fue 1/100, solo se pudo obtener un bajo efecto de aumento del título de anticuerpos. La comparación

15 entre la administración de la partícula Dex-g-PLGA (25) en una cantidad de 1/10 y la administración de la partícula Dex-g-PLGA (28), en ambas de las cuales la cantidad del antígeno administrado fue de 1 µg, mostró que la administración de una mayor cantidad de polímero da como resultado un mayor efecto de aumento del título de anticuerpos (figura 10).

20 Además, a la sangre en la semana 6, se midió el título de anticuerpos IgG2a mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 7, y se midió el título de anticuerpos IgG1 mediante el mismo procedimiento que en la medición del título de anticuerpos IgG2a utilizando un anticuerpo IgG1. Según la medición de la proporción entre estos, la administración de una mezcla de alumbre y el anticuerpo dio como resultado un valor bajo de IgG2a/IgG1, mientras que la administración de la partícula Dex-g-PLGA (25), (26) o (27) dio como resultado un valor elevado de

25 IgG2a/IgG1, lo que muestra una tendencia a que un tamaño de partícula más pequeño dé como resultado un valor de IgG2a/IgG1 más elevado (figura 11).

#### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

30 La composición inmunogénica de la presente invención se puede utilizar como una vacuna para terapia y/o profilaxis de enfermedades infecciosas, cáncer y similares.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición inmunogénica que comprende como ingrediente eficaz un complejo de micropartículas antígeno-adyuvante que contiene un antígeno encapsulado en una micropartícula adyuvante compuesta por un polímero anfifílico cuyo segmento hidrófobo es un ácido poli(láctico-co-glicólico), y el segmento hidrófilo del polímero anfifílico es un polisacárido refractario.
- 10 2. Composición inmunogénica, según la reivindicación 1, que comprende como ingrediente eficaz una partícula compuesta por dicho complejo de micropartículas antígeno-adyuvante asociadas entre sí.
- 15 3. Composición inmunogénica, según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha micropartícula adyuvante tiene una parte hidrófila en el interior de la misma, dicha parte hidrófila está compuesta por un segmento hidrófilo de dicho polímero anfifílico, y tiene una capa externa compuesta por una parte hidrófoba constituida por dicho segmento hidrófobo de dicho polímero anfifílico.
- 20 4. Composición inmunogénica, según la reivindicación 1, en la que dicho polisacárido refractario es dextrano.
- 25 5. Composición inmunogénica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un modificador de superficie unido a dicho ácido poli(láctico-co-glicólico) de dicha micropartícula adyuvante.
- 30 6. Composición inmunogénica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el tamaño promedio de partícula de dicho complejo de micropartículas antígeno-adyuvante o dicha partícula compuesta de dicho complejo de micropartículas antígeno-adyuvante asociadas entre sí es de 0,1 a 50  $\mu\text{m}$ .
7. Composición inmunogénica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una sustancia inmunoactivadora como ingrediente eficaz.
8. Composición inmunogénica, según la reivindicación 7, en la que dicha sustancia inmunoactivadora es un ácido nucleico.
9. Composición inmunogénica, según la reivindicación 7 u 8, en la que dicha sustancia activadora inmunitaria es CpG.

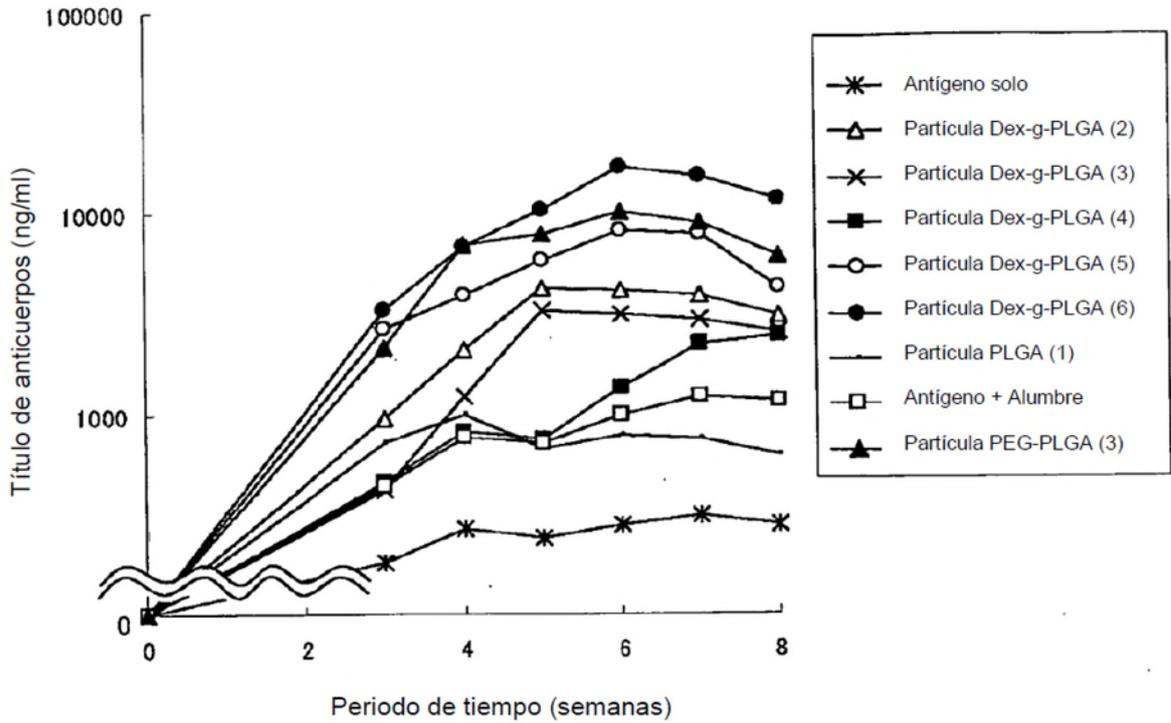


Figura 1

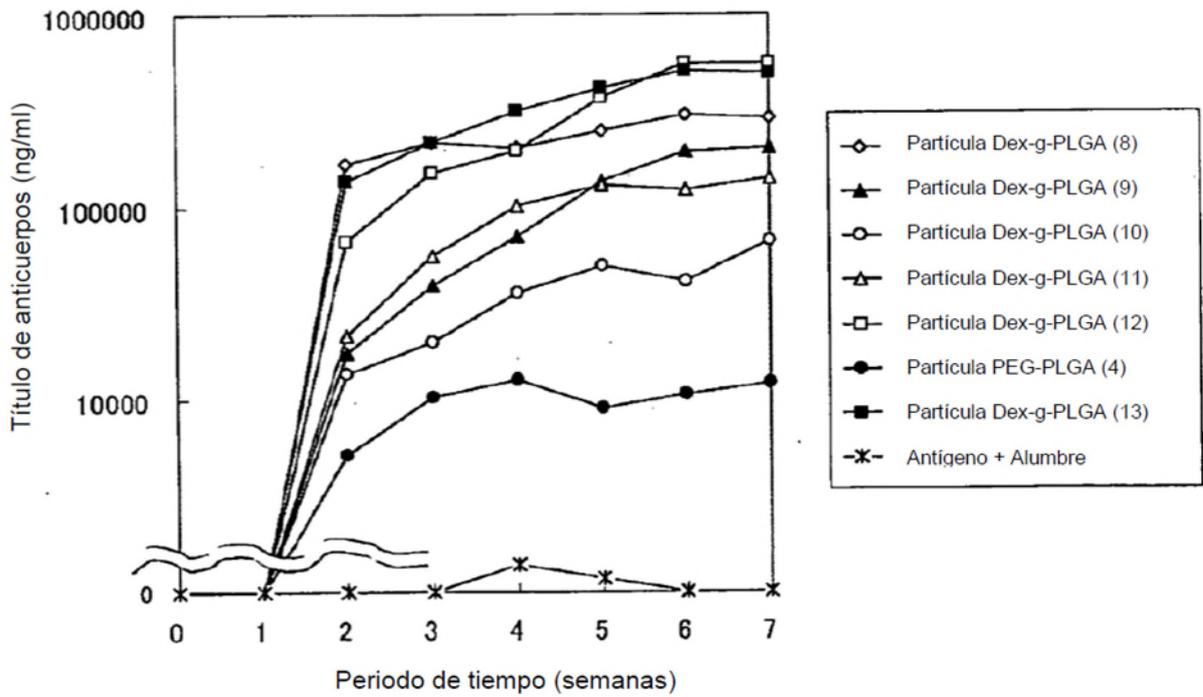


Figura 2

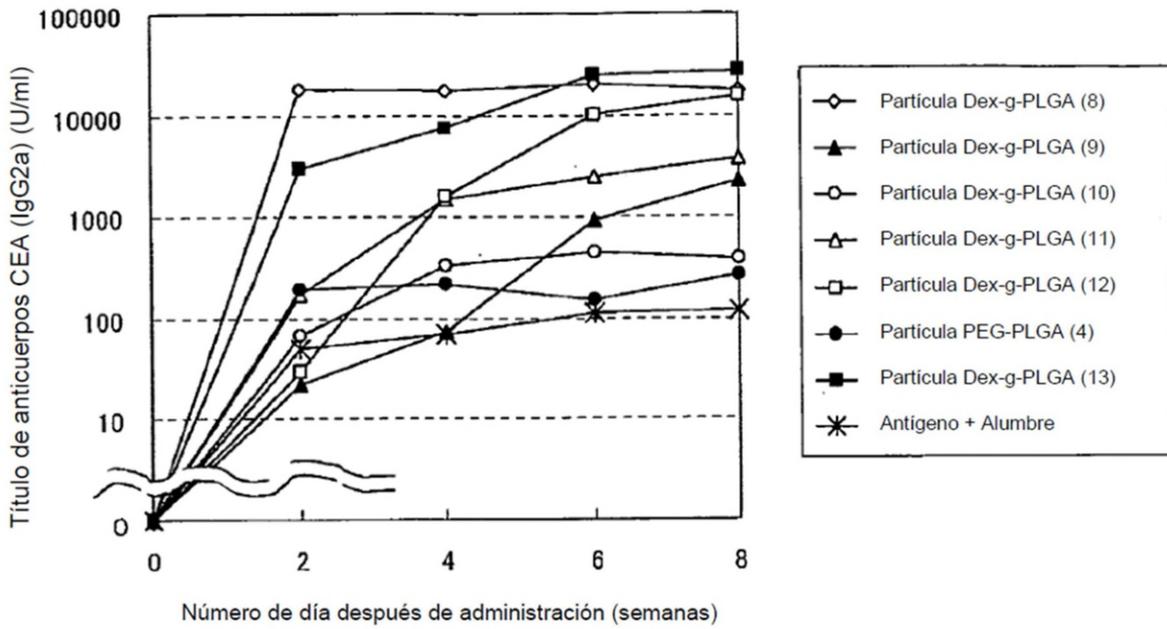


Figura 3

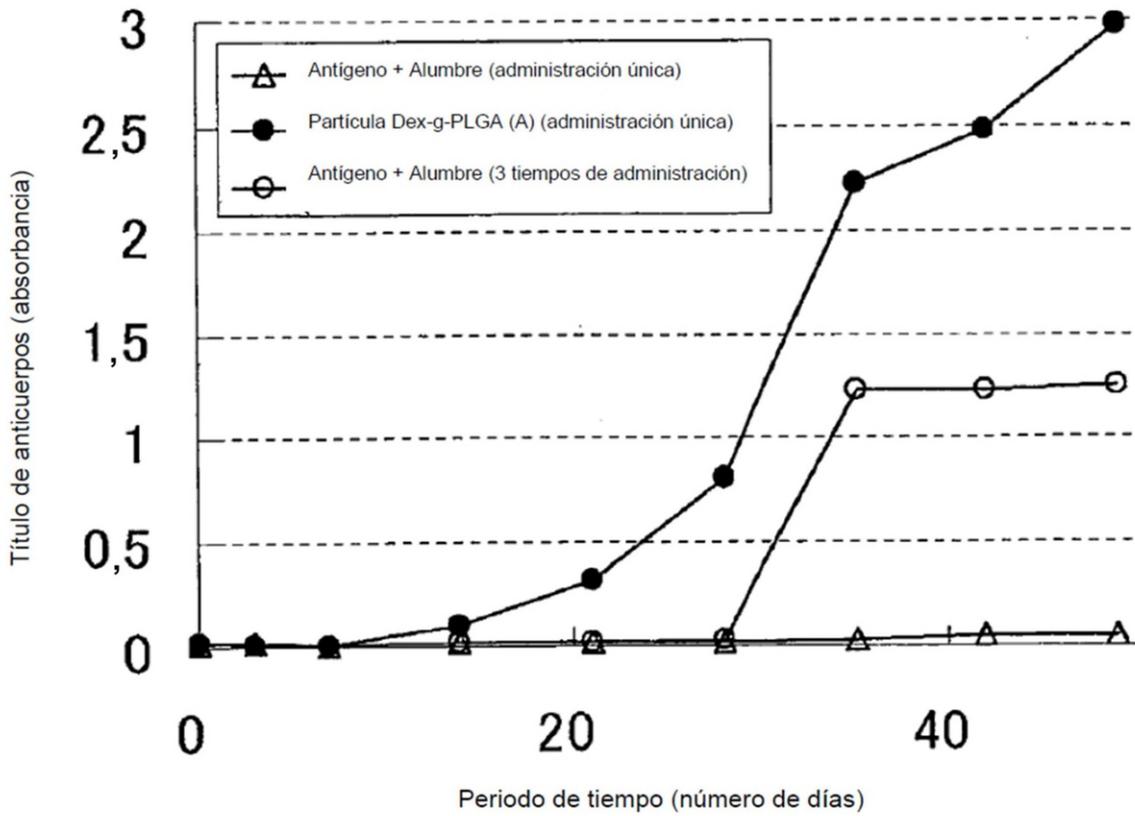


Figura 4

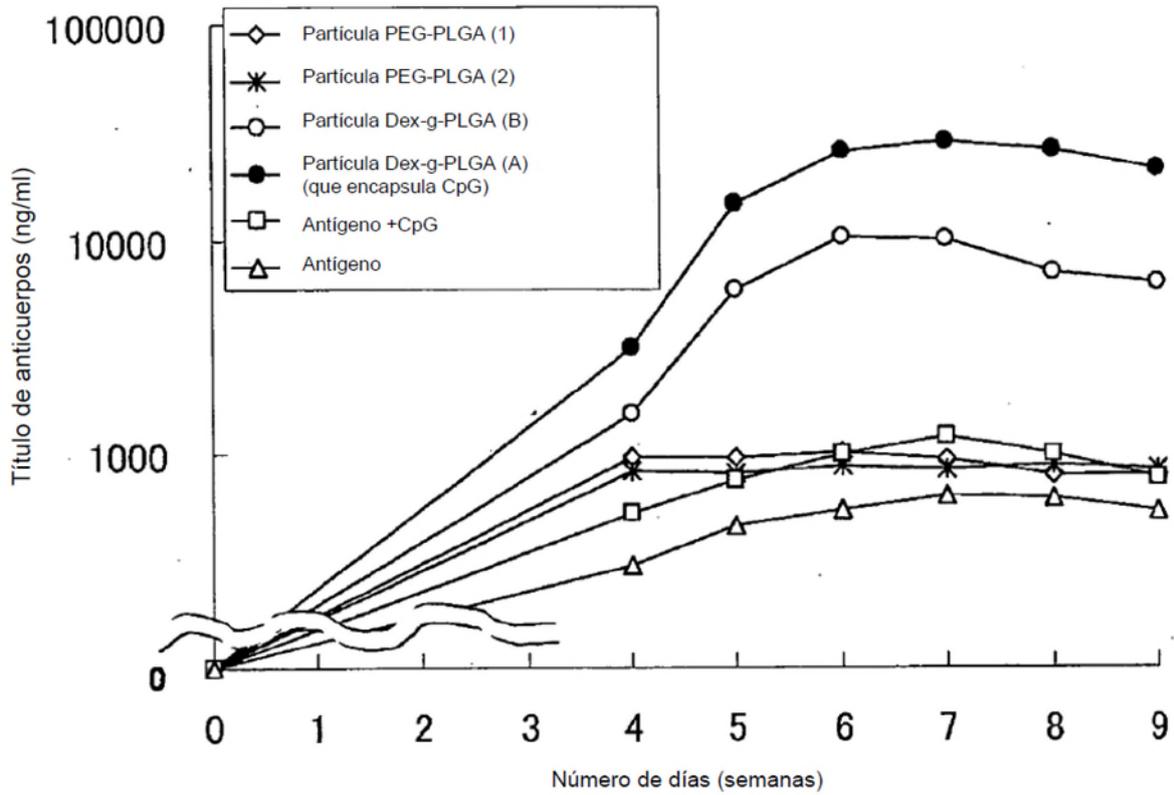


Figura 5

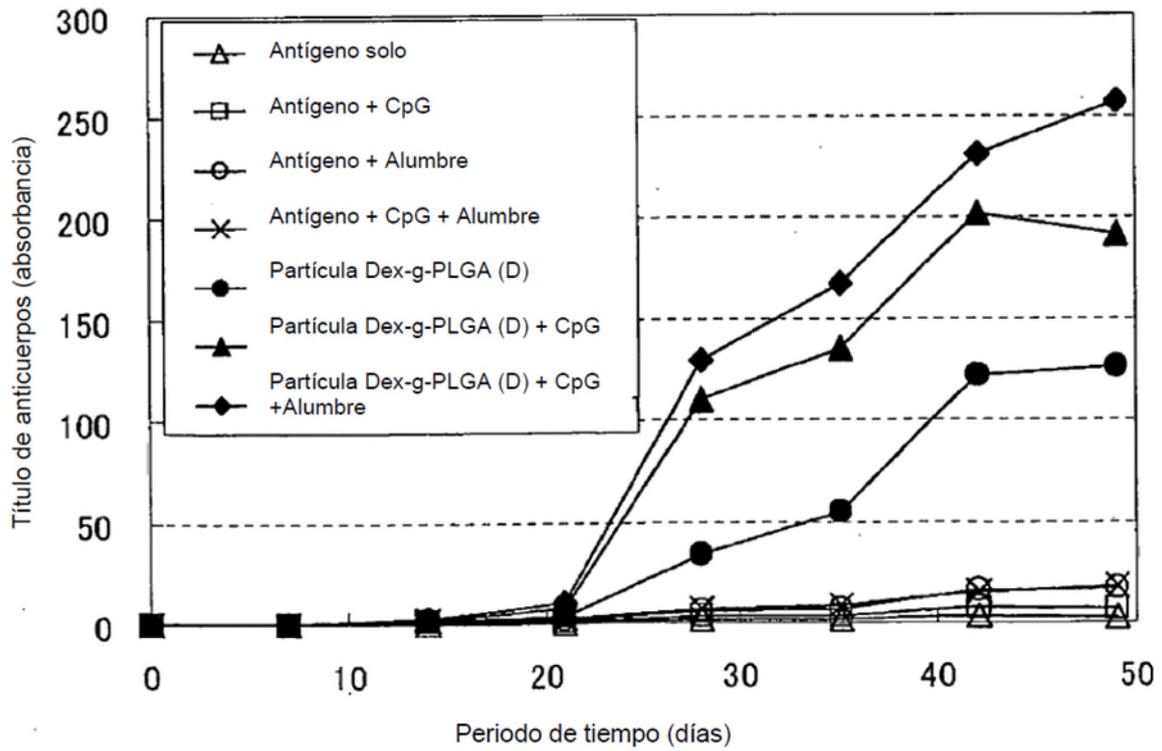


Figura 6

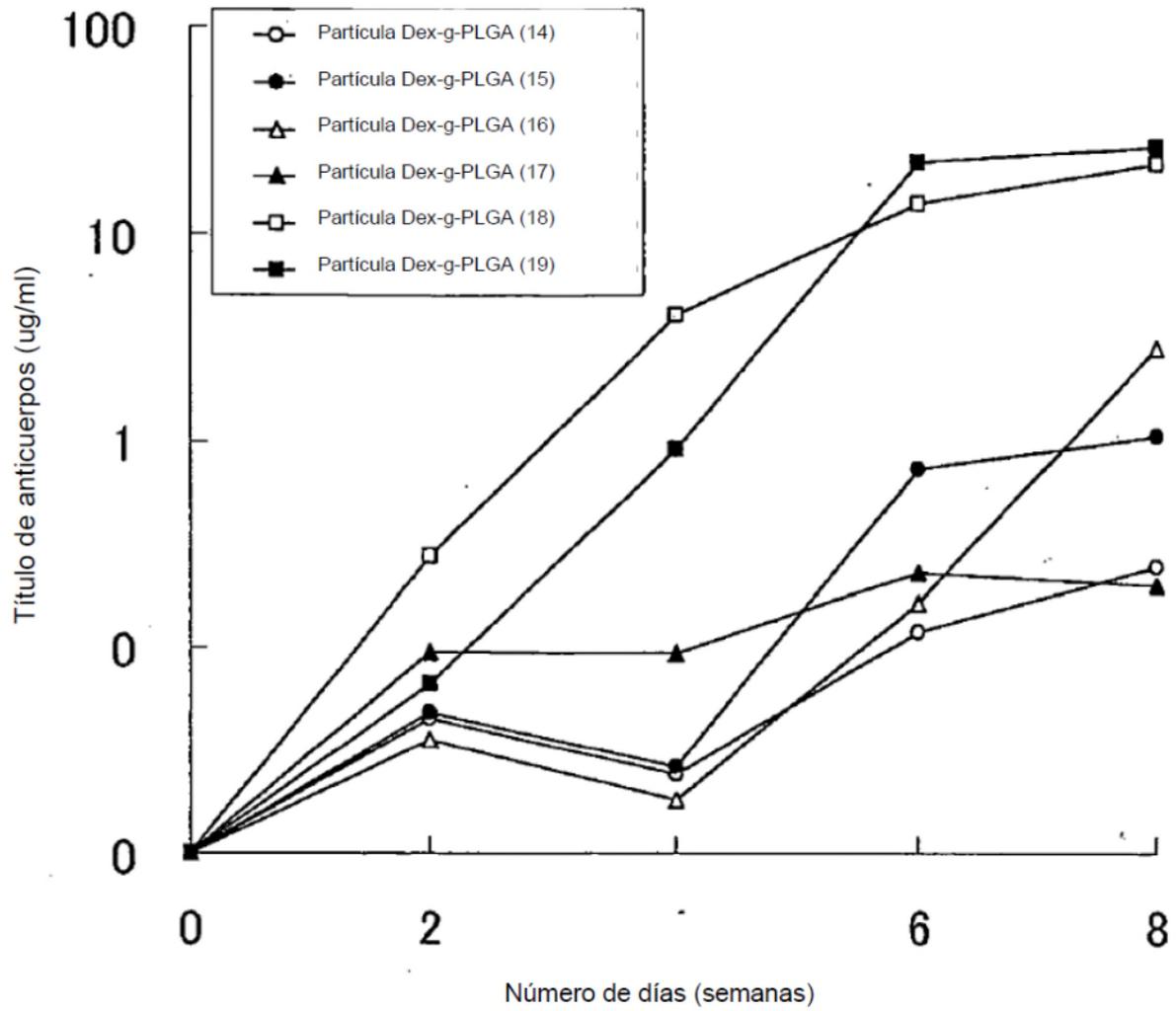


Figura 7

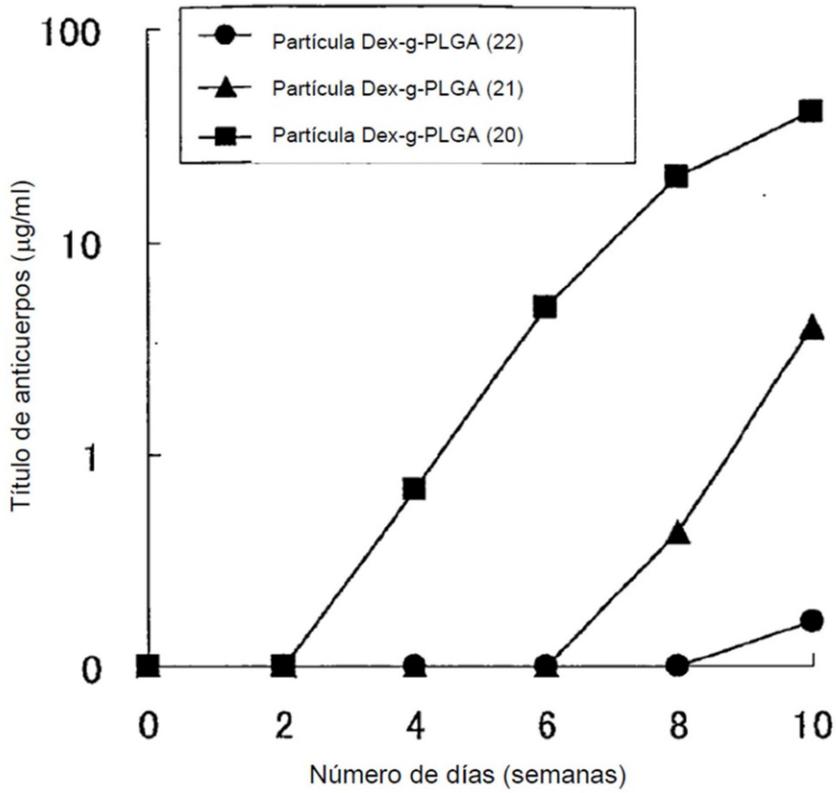


Figura 8

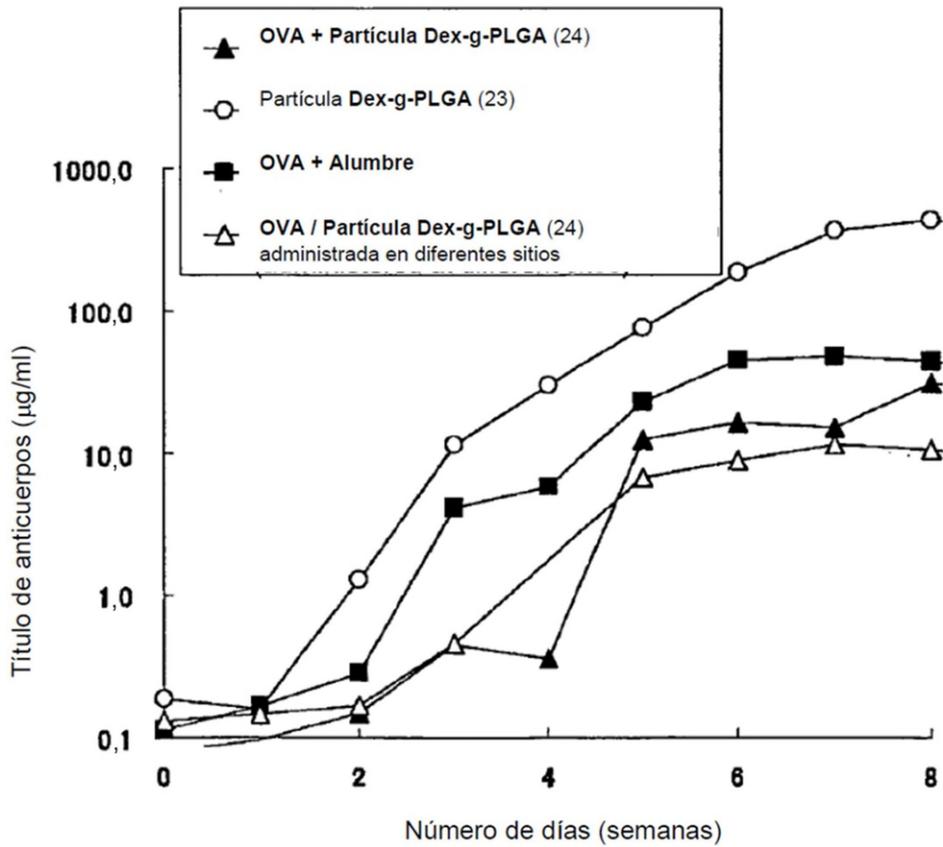


Figura 9

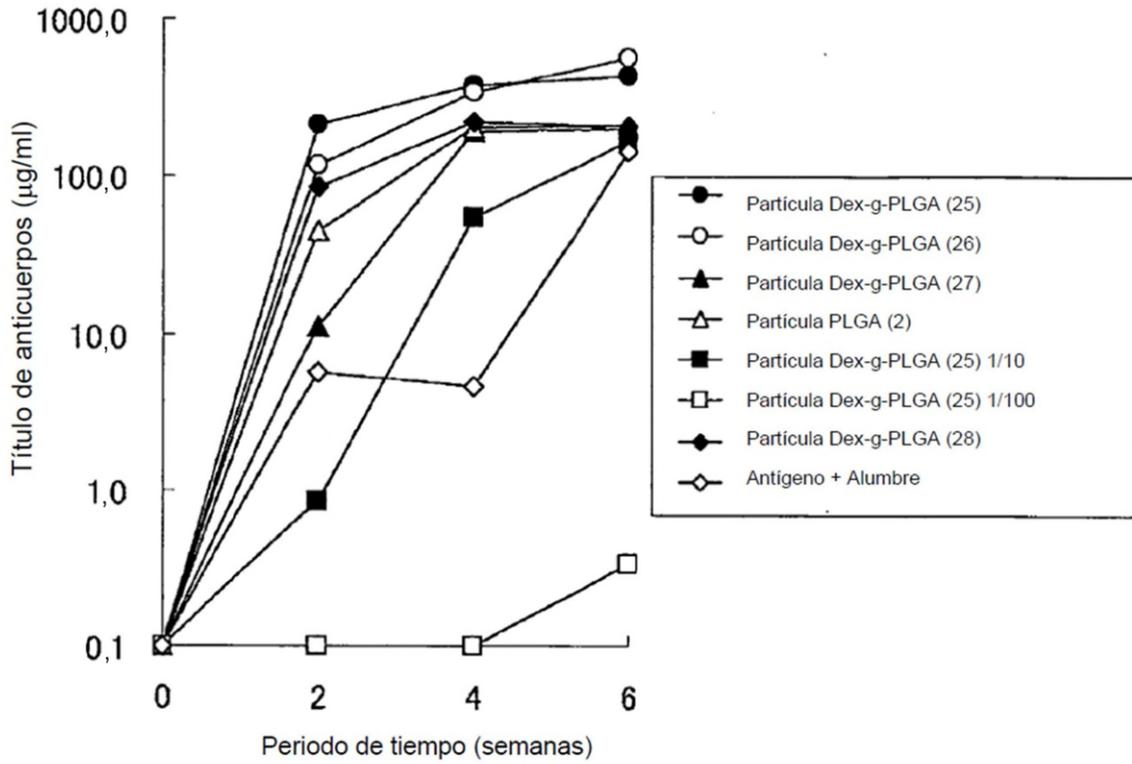


Figura 10

IgG2a/IgG1

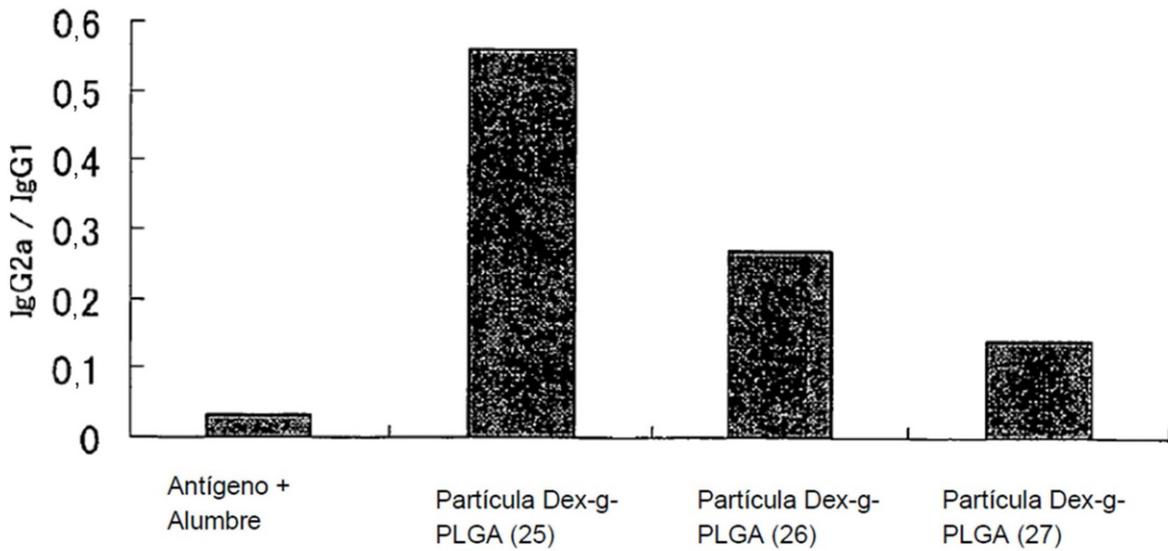


Figura 11

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- 10
- WO 2006095668 A
  - JP 2008088158 A
  - JP 2001503254 W
  - JP 2008254338 A

**Literatura no patente citada en la descripción**

- *Advanced drug delivery reviews*, 2005, vol. 57, 391-410
- **YANG, YA-WUN et al.** The effect of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles with polyelectrolyte self-assembled multilayer surfaces on the cross-presentation of exogenous antigens. *Biomaterials*, June 2008, vol. 29 (16), 2516-2526
- **WISCHKE et al.** Poly(l:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *International Journal of Pharmaceutics*, 05 January 2009, vol. 365 (1-2), 61-68
- **GARINOT et al.** PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *Journal of Controlled Release*, 31 July 2007, vol. 120 (3), 195-204
- *Journal of Controlled Release*, 2001, vol. 71, 203-211
- *Macromolecules*, 1998, vol. 31, 1032-1039
- *Polymer*, 2003, vol. 44, 3927-3933
- *Macromolecules*, 2000, vol. 33, 3680-3685
- *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, vol. 334, 137-148