

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 631**

51 Int. Cl.:

A61K 39/118 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029000**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14770692 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 2968510**

54 Título: **Composiciones a base de nanopartículas**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361783439 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2020

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (33.3%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US;
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (33.3%) y
THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**STARY, GEORG;
RADOVIC-MORENO, ALEKSANDAR, FILIP;
BASTO, PAMELA, A.;
STARNBACH, MICHAEL, N.;
LANGER, ROBERT;
FAROKHZAD, OMID, C. y
ANDRIAN, ULRICH, VON**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 762 631 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones a base de nanopartículas

5 **CAMPO TÉCNICO**

[0001] Esta invención se refiere a composiciones y composiciones adyuvantes que comprenden nanopartículas.

10 **ANTECEDENTES**

10 [0002] Las membranas mucosas son uno de los órganos más grandes del cuerpo y comprenden los revestimientos de los tractos gastrointestinal, urogenital y respiratorio. Estas membranas mucosas, si bien se encuentran en el cuerpo, en realidad son barreras físicas entre el entorno externo y la cavidad interna estéril del cuerpo conocida como el entorno sistémico. Por lo tanto, una función importante de las membranas mucosas es mantener a los patógenos invasores fuera de la cavidad estéril del cuerpo. De hecho, una gran mayoría de patógenos humanos, incluidas bacterias, virus, parásitos y hongos, inician infecciones en las superficies mucosas (Ogra et al., Clin Microbiol Rev. 14 (2): 430-45, 2001). La inmunidad de la mucosa es importante porque la estimulación de la respuesta inmune de la mucosa puede dar como resultado la producción de células protectoras B y células T tanto en ambientes mucosos como sistémicos, de modo que las infecciones se detengan antes de que los patógenos entren en la cavidad interior del cuerpo (véase, p. ej., McCluskie et al., Microbes Infect. 1 (9): 685-98; 1999; Rosenthal et al., Semin Immunol. 9 (5): 303-14, 1997). A pesar de su importante papel, muy pocas vacunas se dirigen específicamente al sistema inmunitario de la mucosa.

25 [0004] Las vacunas pueden ser pasivas o activas. Canonicamente, las vacunas activas implican la exposición del sistema inmune de un individuo a una o más moléculas extrañas que provocan una respuesta inmune endógena que resulta en la activación de linfocitos ingenuos específicos de antígeno que posteriormente conducen a células B secretoras de anticuerpos o células T efectoras y de memoria específicas de antígeno. Este enfoque puede dar como resultado una inmunidad protectora de larga duración que se puede aumentar de vez en cuando mediante una exposición renovada al mismo material antigénico. La posibilidad de una longevidad de una respuesta inmune exitosa a la vacunación activa hace que esta estrategia sea más deseable en la mayoría de los entornos clínicos que la vacunación pasiva mediante la cual se inyecta al receptor anticuerpos preformados o linfocitos efectores específicos de antígeno, que pueden conferir protección rápida, pero generalmente no establecer inmunidad persistente.

35 [0005] US 2010/0129439 A1 describe composiciones y sistemas para la entrega de nanotransportadores a las células del sistema inmune para estimular una respuesta inmune en las células T y/o en las células B. Los nanoportadores descritos allí comprenden una superficie con características inmunes y un adyuvante como un resto inmunoestimulador.

40 [0006] Radovic-Moreno, AF et al. describen en ACS Nano, vol. 6, nº 5, 22 de mayo de 2012 en las páginas 4279-4287 nanopartículas poliméricas de conmutación de carga superficial para la administración de antibióticos a la pared celular bacteriana.

SUMARIO

45 [0007] La presente invención se define por la reivindicación independiente 1. La reivindicación dependiente representa una realización adicional de la invención.

50 [0008] En general, en un aspecto, la divulgación presenta composiciones para uso en la estimulación de una respuesta inmune de la mucosa contra chlamydia trachomatis en un sujeto en necesidad del mismo. Las composiciones para su uso incluyen administrar al sujeto una composición que incluye una forma inactivada de chlamydia trachomatis, y una o más nanopartículas poliméricas cargadas con adyuvante, en donde la una o más nanopartículas poliméricas cargadas con adyuvante están unidas a la chlamydia trachomatis inactivada.

55 [0009] Las composiciones para uso se administran al sujeto a través de una ruta de tracto vaginal o urinaria.

[0010] En algunas implementaciones de estas composiciones para su uso, las nanopartículas poliméricas cargadas con adyuvantes pueden incluir un agonista receptor de tipo Toll, p. ej., R848, monofosforilo lípido A, o un oligodesoxinucleótido CpG no metilado.

60 [0011] Una o más nanopartículas poliméricas cargadas con adyuvantes están hechas de polímeros biodegradables, tales como poli (láctico-co-ácido glicólico)-bloque-poli(L-histidina)-bloque-poli(etilenglicol) (PLGA-PLH-PEG) copolímeros tribloque. La una o más nanopartículas poliméricas cargadas de adyuvante se unen al patógeno inactivado mediante atracción electrostática.

65 [0012] Un "patógeno" como se usa en el presente documento es un agente infeccioso que causa enfermedades en su huésped. Un patógeno puede ser una bacteria, virus, parásito, hongo u otro agente infeccioso microbiano.

[0013] Como se usa en este documento, una "nanopartícula" es una partícula en el intervalo de entre 500 nm a menos de 0,5 nm, p. ej., que tiene un diámetro que está entre 50 y 500 nm.

5 **[0014]** Como se usa en este documento, el término "adyuvante" se refiere a un adyuvante inmunológico. Por esto se entiende un compuesto o composición que puede mejorar o facilitar la respuesta del sistema inmune a un patógeno, induciendo así una respuesta inmune o una serie de respuestas inmunes en el sujeto. El adyuvante puede facilitar el efecto de las composiciones, p. ej., formando depósitos (prolongando la vida media de la composición), proporcionando ayuda adicional de células T y/o estimulando la producción de citocinas.

10 **[0015]** Como se usa en este documento, un "sujeto" es un animal, p. ej., un mamífero, p. ej., un ser humano, mono, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, cabra, conejo o ratón.

15 **[0016]** Como se usa en el presente documento, "tratamiento" puede ser profiláctico o terapéutico. El tratamiento profiláctico se puede utilizar para tratar a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad por un patógeno infeccioso. Se puede considerar que un individuo que viaja o vive en un área de enfermedad infecciosa endémica está en riesgo y es un candidato para la vacunación profiláctica contra el patógeno infeccioso particular. El tratamiento terapéutico con vacunas se puede usar para iniciar o mejorar la respuesta inmune de un sujeto a un patógeno contraído.

20 **[0017]** Como se usa generalmente aquí, una "cantidad efectiva" es la cantidad que es suficiente para inducir una respuesta inmune protectora en el sujeto tratado. Las cantidades efectivas reales de vacuna pueden variar de acuerdo con el patógeno específico y el adyuvante que se utiliza, la composición de vacuna particular formulada, el modo de administración y la edad, el peso, la condición del sujeto que se está vacunando, así como la ruta de administración y La enfermedad o trastorno.

25 **[0018]** Como se usa en el presente documento, "inmunoestimulante" significa que una sustancia tiene un efecto estimulante sobre el sistema inmune. Dichas sustancias pueden identificarse fácilmente mediante ensayos estándar que indican diversos aspectos de la respuesta inmune, como la secreción de citocinas, la producción de anticuerpos, la activación de células NK y la proliferación de células T. Ver, p. ej., WO 97/28259; WO 98/16247; WO 99/11275; Krieg y col. (1995) Nature 374: 546-549; Yamamoto y col. (1992) J. Immunol. 148: 4072-76; Ballas y col. (1996) J. Immunol. 157: 1840-45; Klinman y col. (1997) J. Immunol. 158: 3635-39; Sato y col. (1996) Science 273: 352-354; Pisetsky (1996) J. Immunol. 156: 421-423; Shimada y col. (1986) Jpn. J. Cancer Res. 77: 808-816; Cowdery y col. (1996) J. Immunol. 156: 4570-75; Roman y col. (1997) Nat. Med. 3: 849-854; Lipford y col. (1997a) Eur. J. Immunol. 27: 2340-44; WO 98/55495 y WO 00/61151. Por consiguiente, estos y otros métodos pueden usarse para identificar, probar y/o confirmar sustancias inmunoestimuladoras, tales como nucleótidos inmunoestimuladores, y ácidos nucleicos aislados inmunoestimuladores.

30 **[0019]** Como se usa en este documento, "pareja" o "emparejado" o "parejas" (y similar) significa asociar químicamente una entidad (por ejemplo un resto) con otra. En algunas implementaciones, el acoplamiento es covalente, lo que significa que el acoplamiento se produce en el contexto de la presencia de un enlace covalente entre las dos entidades. En implementaciones no covalentes, el acoplamiento no covalente está mediado por interacciones no covalentes que incluyen, entre otras, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones huésped-huésped, interacciones hidrofóbicas, interacciones de apilamiento TT, interacciones de enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolopolares y/o combinaciones de las mismas. En ciertas implementaciones, la encapsulación es una forma de acoplamiento.

35 **[0020]** Como se usa en el presente documento significa "encapsular" para encerrar dentro de una nanopartícula sintética, preferiblemente encerrar completamente dentro de una nanopartícula sintética. La mayoría o la totalidad de una sustancia que está encapsulada no está expuesta al entorno local externo a la nanopartícula sintética. La encapsulación es distinta de la absorción, que coloca la mayor parte o la totalidad de una sustancia en la superficie de una nanopartícula sintética y deja la sustancia expuesta al entorno local externo a la nanopartícula sintética.

40 **[0021]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto entre las referencias mencionadas aquí y la presente especificación, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

45 **[0022]** Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

50 **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0023]

5 La FIG. 1A es un gráfico de puntos que muestra que la inmunización intrauterina con Ct inactivado con UV (UV-Ct) dio como resultado una mayor susceptibilidad a la posterior *exposición* a *clamidia* viva, lo que indica que la tolerancia inmune es inducida por UV-Ct.

FIG. 1B es un diagrama de puntos que muestra que la administración conjunta de adyuvantes no supera la tolerancia inmune inducida por UV-Ct.

10 FIGS. 1C-1D son gráficos de barras que muestran que la tolerancia inmune inducida por UV-Ct está mediada por células FoxP3 + Treg.

FIG. 1E es un diagrama de puntos que muestra que el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CD25 supera la tolerancia inmune inducida por UV-Ct, lo que indica que las células CD4+ FoxP3 + Treg juegan un papel crítico en la mediación de la tolerancia inmune inducida por UV-Ct.

15 FIG. 1F es un gráfico de puntos que muestra la deficiencia de IL-10 derogada la tolerancia inmune inducida por *clamidia* inactivada, lo que confirma que la IL-10 secretada por Treg juega un papel crítico en la tolerancia inmune inducida por *clamidia* inactivada.

FIG. 2A es un dibujo esquemático que ilustra que las partículas adyuvantes sintéticas de cambio de carga superficial (cSAP) se unen a *chlamydia trachomatis* inactivada.

20 FIG. 2B es una imagen cryo-TEM (microscopio electrónico de transmisión criogénica) que muestra la unión de nanopartículas cargadas con R848 a la superficie de *chlamydia trachomatis* inactivada.

FIG. 2C es un gráfico dinámico de dispersión de luz que confirma la unión de las nanopartículas a *chlamydia trachomatis* inactivada.

FIGS. 2D-2E son un conjunto de gráficos de citometría de flujo y sus histogramas correspondientes que muestran la unión de UV-Ct tenido con BacLight con cSAP marcado con Alexa Fluor 488 o partículas de control que carecen del grupo PLH (SAP) a un pH de 7,4 y 6,0.

25 FIG. 2F es un diagrama de puntos que muestra la inmunización con una composición de vacuna que incluye UV-Ct-cSAPs protege a los ratones contra los posteriores desafíos de *clamidia* vivos.

FIG. 2G es un gráfico de puntos que muestra la titulación o neutralización del cSAP cargado con R848 antes de que la unión a UV-Ct no cambie la propiedad protectora inmune de la composición de la vacuna.

30 FIG. 2H es un diagrama de puntos que muestra la inducción de IgG por una composición de vacuna que incluye UV-Ct-cSAP. Los datos se agruparon a partir de dos experimentos independientes. nd = no detectado.

FIGS. 3A-3D son un conjunto de gráficos de puntos que muestran que la inmunidad protectora estimulada por la nueva composición de la vacuna *chlamydia trachomatis* está mediada por células T CD4+.

35 FIG. 4A es un gráfico de barras que muestra significativamente más células T CD4+ transgénicas *específicas de clamidia* en los ganglios linfáticos de los ratones expuestos a la nueva composición de la vacuna (UV-Ct-cSAP) o *clamidia* infecciosa (Ct) en comparación con los ratones inmunizados con *clamidia* (UV-Ct) inactivado por UV o los ratones de control no infectadas (Naive).

FIG. 4B es un conjunto de gráficos de citometría de flujo que muestra que el número de células T CD90.1+ CD4+ específicas de *Clamidia* en ratones inmunizados con Ct o UV-Ct-cSAP superó en gran medida a los de los ratones no infectados o ratones inmunizados con UV-Ct, indicando Ct y UV-Ct-cSAP, pero no UV-Ct induce la proliferación de células T CD4+ específicas de *clamidia*.

40 FIG. 4C es un conjunto de gráficos circulares que muestran que el número de células T CD90.1+ CD4+ que producen las tres citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-2) fue significativamente mayor en ratones inmunizados con Ct o UV-Ct-cSAPs en comparación con ratones inmunizados con UV-Ct o los ratones de control no infectados.

45 FIG. 5A es un conjunto de gráficos de citometría de flujo que muestran que F4/80 + CD103⁻ macrófagos expresan alto nivel de CD11b y CX3CR1 pero bajo nivel de CD11c; las células dendríticas F4/80⁻ CD103⁻ expresan un alto nivel de CD11c, CD11b y CX3CR1; las células dendríticas F4/80⁻ CD103⁺ expresan un bajo nivel de CD11b y CX3CR1, pero un alto nivel de CD11c.

FIGS. 5B y 5C son un conjunto de gráficos de puntos que muestra células dendríticas CD103⁻ tenían una carga significativamente mayor de *clamidia* que F4/80⁺ macrófagos y células dendríticas CD103⁺ tanto en úteros (5b) como ganglios linfáticos (5C), indicando células dendríticas CD103⁻ juegan papeles importantes en el reconocimiento y presentación de *clamidia*.

50 FIGS. 5D y 5E son un conjunto de gráficos de barras que muestran células dendríticas CD103⁻ aisladas del útero de ratones inmunizados con *clamidia* infecciosa (Ct), o la nueva composición de la vacuna (UV-Ct-cSAPs), pero no las otras células presentadoras de antígeno, proliferación inducida de células T transgénicas CD90.1+ CD4+ específicas de *clamidia* (células NR1) tanto *in vitro* (5D) como *in vivo* (5E).

FIG. 5F es un gráfico de barras que muestra que las células dendríticas CD103⁺ aumentaron el número de células FoxP3+CD25+NR1 después de la inmunización con UV-Ct.

60 FIG. 6A es un diagrama de puntos que muestra la inmunización intrauterina con la nueva composición de la vacuna o la *Clamidia* infecciosa, pero no la *Clamidia* inactivada, que dio lugar a la protección contra la posterior infección por *Clamidia* genital durante seis meses después de la inmunización.

FIG. 6B es un gráfico de puntos que muestra la inmunización intranasal, pero no subcutánea, con la nueva composición de vacuna dio como resultado una inmunidad protectora contra la posterior infección por *clamidia* genital, lo que indica que la nueva composición de vacuna indujo inmunidad protectora contra la mucosa cruzada.

65

FIG. 6C es un conjunto de gráficos de citometría de flujo que muestran que el tejido que se dirige al útero de las células T CD4+ transgénicas específicas para *clamidia* fue inducido por inmunización intrauterina o intranasal, pero no subcutánea.

FIG. 6D es un conjunto de gráficos de barras que muestran que la inmunización con UV-Ct-cSAP por vía intrauterina (iu) o intranasal (in), pero no por vía subcutánea (sc), indujo el reclutamiento y retención de células protectoras NR1 en la mucosa genital y en los pulmones. El número de células NR1 en el hígado, los ganglios linfáticos, el bazo o la sangre son comparables entre las diferentes vías de inmunización.

FIG. 7A es un dibujo esquemático que muestra el protocolo del experimento para el Ejemplo 5.

FIGS. 7B-7C son gráficos de barras que muestran que el bloqueo de la integrina alfa 4 evitó eficazmente la acumulación de células T en el útero (7C), pero no tuvo ningún efecto sobre el número de células NR1 en el bazo (7B).

FIG. 7D es un gráfico de barras que muestra que las células NR1 sistémicas presentes en el bazo no se vieron afectadas por las inyecciones de anticuerpos $\alpha 4$.

FIG. 7E es un gráfico de barras que muestra que se observó acumulación de células NR1 en ratones Gr,1 que fueron tratados con IgG y Gr. 3 ratones que fueron tratados con mAb anti- $\alpha 4$ solo después del desafío con *clamidia*, pero no en Gr. 2 ratones que fueron tratados con mAb anti- $\alpha 4$ después de la vacunación y el desafío.

FIG. 7F es un diagrama de puntos que muestra que los ratones Gr. 3 tratados con mAb anti- $\alpha 4$ solo después del desafío de *clamidia* (el grupo que contiene células T de memoria residentes en el útero pero sin células de memoria circulatoria reclutadas adicionalmente) estaban protegidos contra el desafío de *clamidia* genital, en comparación con los ingenuos ratones de control y los Gr. 2 ratones tratados con mAb anti- $\alpha 4$ después de la inmunización y el desafío.

FIG. 8A es un dibujo esquemático que muestra el protocolo del experimento de parabiosis para el Ejemplo 6.

FIGS. 8B-8C son gráficos de puntos que muestran que ambas parejas de los ratones del Grupo A estaban protegidas contra el posterior desafío de clamidia genital (8B); pero solo el par inmunizado (CD45.2), no el otro par (CD45.1) de los ratones del Grupo B estaba protegido contra la subsiguiente exposición a clamidia genital (8C).

FIGS. 8D-8E son gráficos de barras que muestran que más células NR-1 estaban presentes en ratones que estaban protegidos contra el desafío de *clamidia* genital posterior en comparación con los ratones que no estaban protegidos.

FIGS. 8F-8G son gráficos de puntos que muestran que la inmunización con tolerancia inmune inducida por UV-Ct es independiente del momento de la parabiosis.

FIG. 9A es un gráfico lineal que muestra que los ratones inmunizados con UV-LVS-cSAP estaban completamente protegidos contra la exposición posterior con una cepa atenuada de LVS de *Francisella tularensis*.

FIG. 9B es un gráfico lineal que muestra que los ratones inmunizados con UV-LVS-cSAP estaban parcialmente protegidos contra el desafío posterior con una cepa SchuS4 completamente virulenta de *Francisella tularensis*.

FIGS. 9C-9D son gráficos de líneas que muestran que se obtuvo protección completa contra el desafío posterior con una cepa LVS atenuada de *Francisella tularensis* después de la inmunización con UV-LVS-cSAP por vía intraperitoneal (9C), pero no por vía subcutánea (9D).

FIGS. 9E-9F son gráficos de líneas que muestran que los niveles de anticuerpos IgG inducidos (9E) e IgM (9F) fueron mayores en ratones inmunizados con UVLVS-cSAP que en ratones vivos infectados con LVS.

[0024] Para todas las Figuras, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0025] La presente descripción se basa, al menos en parte, en el desarrollo de nuevas composiciones de vacuna que comprende una o más nanopartículas poliméricas cargadas con adyuvantes unidas a un patógeno inactivado. Por ejemplo, las nuevas composiciones de vacuna comprenden un patógeno inactivado, p. ej., una bacteria, tal como *chlamydia trachomatis*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholera*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, o *Salmonella typhimurium*, o un virus, como el virus de la influenza, un virus respiratorio sincitial humano (VRS), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C y una o más nanopartículas poliméricas que están cargadas de adyuvantes, como un agonista del receptor tipo Toll, p. ej., el imidazoquinolina resiquimod (R-848), monofosforilo lípido A, o un oligodesoxinucleótido CpG no metilado, o un agente de direccionamiento de la membrana endosomal, p. ej., el péptido Endo-Porter. Una o más de las nanopartículas cargadas con adyuvante están unidas a cada uno de los patógenos inactivados. Estas composiciones de vacunas son útiles para prevenir y/o tratar enfermedades causadas por patógenos específicos, especialmente cuando se administran a las membranas mucosas de un sujeto.

[0026] Las composiciones de vacuna descritas en este documento incluyen una o más nanopartículas cargadas con adyuvantes unidos a cada uno de los patógenos enteros inactivados, p. ej., a través de un mecanismo de fijación. Este mecanismo de unión puede ser una atracción electrostática, un acoplamiento covalente o una interacción hidrofóbica. Los adyuvantes pueden ser una molécula dirigida a células dendríticas, p. ej., un agonista del receptor de tipo Toll, p. ej., R-848, que se reconoce como un potente agonista sintético de TLR7/TLR8, o un oligodesoxinucleótido CpG no

metilado, que es un agonista inmunoestimulador de TLR-9, o monofosforilo lípido A, que es un agonista inmunoestimulador de TLR-4, o un agente de direccionamiento de la membrana endosomal, p. ej., el péptido Endo-Porter.

5 [0027] Una gran mayoría de las vacunas disponibles en la actualidad se dirigen al sistema inmune sistémico y progresión de la enfermedad en bloque después de que los patógenos han cruzado la barrera de la mucosa y entró en el medio ambiente sistémico normalmente estéril. Las composiciones de vacuna descritas en el presente documento pueden dirigirse a las membranas mucosas y estimular la inmunidad de la mucosa en un sujeto inmunizado que protege al sujeto de la infección por una forma activa de los patógenos inactivados incluidos en la vacuna. Estas composiciones de vacunas logran protección inmunológica ya sea evitando la colonización inicial y la replicación de los patógenos o bloqueando la progresión de la infección. Por lo tanto, estas composiciones de vacunas son tanto profilácticas como terapéuticas.

15 Patógenos inactivados

[0028] Un "patógeno" como se usa en el presente documento es un agente infeccioso que causa enfermedades en su huésped. Un patógeno puede ser una bacteria, virus, parásito, hongo u otro agente infeccioso microbiano. Muchas vacunas contra patógenos comprenden microorganismos vivos o atenuados. Sin embargo, las vacunas vivas o atenuadas a veces pueden causar patologías infecciosas, especialmente cuando se administran a receptores inmunocomprometidos. Otras vacunas utilizan uno o más componentes purificados de lisados de patógenos, como uno o más carbohidratos de superficie o proteínas recombinantes derivadas de patógenos. Sin embargo, se puede ver una protección incompleta en este tipo de vacunas debido a la presentación parcial de antígenos patógenos. Esos antígenos patógenos no incluidos en las vacunas aún pueden causar patologías infecciosas en un individuo inmunizado.

25 [0029] Las composiciones de vacuna descritas en este documento incluyen uno o más patógenos enteros inactivados, p. ej., bacterias inactivadas, virus inactivados, parásitos inactivados, u hongos inactivados. Los receptores de las composiciones de vacuna descritas en el presente documento se presentan con un espectro completo de antígenos patógenos de un patógeno particular, y de este modo obtienen una protección inmune completa contra ese patógeno.

30 [0030] Los agentes patógenos completos se pueden inactivar mediante un tratamiento físico o químico conocido en la técnica, p. ej., mediante exposición a luz ultravioleta, temperatura elevada, fijación, radiación ionizante, paraformaldehído, formalina, hidroxilamina, fenol, polisorbato y similares. El tipo de método de inactivación se puede elegir con el fin de retener la inmunogenicidad de todo el patógeno.

35 [0031] Los patógenos bacterianos causantes de enfermedades bacterianas tales como ántrax, meningitis bacteriana, botulismo, brucelosis, enfermedad por arañazo de gato, cólera, difteria, tífus epidémico, gonorrea, impétigo, lepra (enfermedad de Hansen), Listeriosis, fiebre reumática; nocardiosis, tos ferina, peste, neumonía neumocócica, psitacosis, fiebre Q, fiebre manchada de las montañas rocosas (RMSF), salmonelosis, escarlatina, shigelosis, sífilis, tétanos, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoidea y fiebre tifoidea, fiebre tifoidea e infecciones de fiebre tifoidea.

40 [0032] Una o más bacterias enteras más inactivadas se pueden utilizar como agentes patógenos en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento y se pueden derivar de cualquiera de los siguientes géneros bacterianos: *Actinomyces*, *Anabaena*, *Bacillus* (p. ej., *Bacillus anthracis*), *Bacteroides*, *Bdellovibrio*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Caulobacter*, *clamidia*, *Clorobium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *deinococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella* (p. ej., *Francisella tularensis*), *Halobacterium*, *Helicobacter*, *Haemophilus* (p. ej., *Hemophilus influenza* tipo B), *Hyphomicrobium*, *Legionella*, *Leptspirosis*, *Listeria*, *Meningococcus* A, B, y C, *Metanobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*), *Mycoplasma*, *Myxococcus*, *Neisseria*, *Nitrobacter*, *Oscillatoria*, *Procloron*, *Proteus*, *Pseudomonas* (p. ej., *Pseudomonas neumonia*), *Phodospirillum*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Spirillum*, *Spirochaeta*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* (p. ej., *Neumonía por Streptococcus*), *Streptomyces*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Tiobacillus*, *Treponema*, *Vibrio* (p. ej., *Vibrio cholera*) y *Yersinia*.

45 [0033] Los patógenos virales causan enfermedades virales como el SIDA, complejo relacionado con el SIDA, varicela, gripe común-influenza (gripe), la fiebre del dengue, la fiebre aftosa, la hepatitis, el herpes simplex, HPY, la fiebre de Lassa, sarampión, paperas, poliomielitis, rabia, SARS, viruela, encefalitis viral, gastroenteritis viral, meningitis viral, neumonía viral, enfermedad del Nilo Occidental y fiebre amarilla.

50 [0034] Uno o más virus inactivados se pueden utilizar como agentes patógenos en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento y se pueden derivar de cualquiera de las siguientes familias virales: Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Astroviridae, Baculoviridae, Badnavirus, Bamaviridae, Bimaviridae, Bromoviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Capillovirus, Carlavirus, Caulimovirus, Circoviridae, Closterovirus, Comoviridae, Coronaviridae (p. ej., Coronavirus, como el virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS)), Corticoviridae, Cystoviridae, Deltavirus, Dianthovirus, Enamovirus, Flaviviridae, Filoviridae (p. ej., virus de Marburgo y virus del Ébola (p. ej., cepa Zaire, Reston, Costa de Marfil o Sudán), Flaviviridae (p. ej., virus de la hepatitis C, virus del dengue 1, virus del dengue 2, virus del dengue 3 y virus del dengue 4), Hepadnaviridae, Herpesviridae (p. ej., virus del herpes

humano I, 3, 4, S y 6, y citomegalovirus), Hypoviridae, Iridoviridae, Leviviridae, Lipothrixviridae, Microviridae, Orthomyxoviridae (p. ej., virus de la influenza A y B y C), Papillomaviridae, Papovaviridae, Paramyxoviridae (p. ej., Sarampión, paperas y virus respiratorio sincitial humano), Parvoviridae, Picornaviridae (p. ej., Poliovirus, rinovirus, hepatovirus y aftovirus), Poliornaviridae, Poxviridae (p. ej., Vaccinia y virus de la viruela), Rev, rotavirus), Retroviridae (p. ej., lentivirus, como el virus de inmunodeficiencia humana VIH 1 y VIH 2), Rhabdoviridae (p. ej., virus de la rabia, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, etc.), Togaviridae (p. ej., virus de la rubéola, dengue virus, etc.) y Totiviridae.

[0035] Las vacunas a base de virus también se pueden hacer usando partículas de tipo virus o virus pseudotipados que contienen proteínas virales antigénicas, p. ej., VRS, VIH, o norovirus.

[0036] Los patógenos parasitarios causan enfermedades parasitarias tales como enfermedades parasitarias tales como tripanosomiasis africana, amebiasis, ascariasis, babesiosis, enfermedad de Chagas, clonorquiasis, criptosporidiosis, cisticercosis, diphyllorhynchiasis, dracunculiasis, equinococosis, enterobiasis, fascioliasis, fasciolopsiasis, filariasis, infección amébrica de vida silvestre, Giardiasis, Gnathostomiasis, Hymenolepiasis, Isosporiasis, kalaazar, leishmaniasis, malaria, metagonimiasis, myiasis, oncocerciasis, pediculosis, infección por oxiuros, la sarna, la esquistosomiasis, teniasis, toxocariasis, toxoplasmosis, triquinosis, triquinosis, tricuriasis, tricomoniasis y la tripanosomiasis.

[0037] Uno o más parásitos inactivados se pueden utilizar como agentes patógenos en composiciones de vacuna descritas en el presente documento y se pueden derivar a partir de: p. ej., *Ascaris lumbricoides*, *Babesia microti*, *Babesia duncani*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Clonorchis sinensis*, *Cryptosporidium*, *Diphyllorhynchium*, *Dracunculus medinensis*, *Echinococcus granulosus*, *Entamoeba histolytica*, *Enterobius vermicularis*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis buski*, *Gardia lamblia*, *Gnathostoma*, *Hymenolepis*, *Isospora belli*, *Leishmania*, *Mansonella*, *Metagonimus*, *Naegleria fowleri*, *Onchocerca volvulus*, *Plasmodium falciparum*, *Sarcoptes scabiei*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia solium*, *Toxocara*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris trichiura*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* o *Wuchereria bancrofti*.

[0038] Los hongos patógenos causan enfermedades fúngicas tales como aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidioidomycosis, criptococosis, histoplasmosis y Tinea pedis, en un huésped. Uno o más hongos inactivados pueden usarse como patógenos en las composiciones de vacunas descritas en el presente documento y pueden derivarse de los géneros fúngicos, p. ej., *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis*, *Stachybotrys*, *Trichophyton*.

35 Nanopartículas poliméricas

[0039] La vacuna y composiciones adyuvantes descritas en este documento incluyen una o más nanopartículas o nanotransportadores cargados por adyuvantes. El polímero que forma las nanopartículas puede ser cualquier polímero sintético o natural biodegradable o no biodegradable. Preferiblemente, el polímero es un polímero biodegradable. Los ejemplos de polímeros biodegradables útiles incluyen ácido poliláctico (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) o poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Estos polímeros tienen un historial de seguridad establecido y pueden usarse en sujetos humanos (Jiang, et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 57 (3): 391-410, 2005; Aguado y Lambert, Immunobiology, 184 (2-3): 113-25, 1992; Bramwell, et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 57 (9): 1247-65, 2005). Se pueden usar otras nanopartículas de poli (aminoácidos) anfifílicas, nanopartículas de polisacáridos anfifílicas o nanopartículas de poliiones en la composición de vacuna descrita en este documento (véase, Akagi et al., Adv Polim Sci. 247: 31-64, 2012).

[0040] Los polímeros anteriores pueden utilizarse solos, como mezclas físicas, o mediante la formación de copolímeros. Las nanopartículas están formadas por un copolímero tribloque de poli (ácido láctico-co-glicólico)-bloque-poli(L-histidina)-bloque-poli(etilenglicol) (PLGA-PLH-PEG). Estos copolímeros se pueden sintetizar utilizando técnicas estándar. Por ejemplo, el copolímero PLGA-PLHPEG se puede sintetizar usando una estrategia de injerto final de bloque.

[0041] Una estructura lineal PLGA-PLH-PEG puede proporcionar las nanopartículas varias características compatibles con la circulación extendida y la orientación de carga mediada. Primero, el segmento PLH se carga positivamente en condiciones ácidas, produciendo un potencial positivo general en la superficie de nanopartículas, facilitando las interacciones con patógenos cargados negativamente y produciendo una fuerte unión mediada electrostática multivalente. En segundo lugar, el segmento PLGA puede formar una matriz de núcleo sólido sin tener la fuerza desestabilizadora de la PLH a pH ácido. En tercer lugar, el segmento PLH se eleva hasta cerca de la superficie de las nanopartículas durante el autoensamblaje del polímero, debido a su hidrofilia intrínseca en condiciones de formulación típicas, así como a su estrecha asociación con el PEG, que se elevaría preferentemente a la superficie debido a su hidrofilia relativa. Esto es significativo porque aumenta las cargas catiónicas en la superficie de las nanopartículas. Tercero, tener la porción de PEG en el extremo distal del polímero facilita la estabilidad coloidal de las nanopartículas y el tiempo de circulación a nivel fisiológico. pH (Radovic-Moreno, et al., ACS Nano: 4279-4287, 2012; Gref et al., Science 263: 1600-1603, 1994).

[0042] En algunas realizaciones, los polímeros naturales se pueden utilizar. Los ejemplos de polímeros naturales

incluyen alginato y otros polisacáridos, colágeno, albúmina y otras proteínas hidrofílicas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan ya sea por hidrólisis enzimática o por exposición al agua *in vivo*, por erosión superficial o por volumen.

5 **[0043]** Otros polímeros biodegradables adecuados incluyen, pero no se limitan a, poli (hidroxiácidos), tales como polímeros y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli (orto) ésteres, poliésteres, poliuretanos, poli (ácido bórico), poli (ácido valérico), poli (caprolactona), poli (hidroxialcanoatos) y poli (lactida-co-caprolactona).

10 **[0044]** El polímero puede ser un polímero bioadhesivo que es hidrófilo o hidrófobo. Los polímeros hidrofílicos incluyen CARBOPOL™ (un polímero de alto peso molecular, reticulado, a base de ácido acrílico fabricado por Noveon), policarbofilo, ésteres de celulosa y dextrano.

15 **[0045]** Estos polímeros pueden ser obtenidos de fuentes tales como Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.; Polisciencences, Warrenton, Pa.; Aldrich, Milwaukee, Wis.; Fluka, Ronkonkoma, Nueva York; y BioRad, Richmond, California, o se pueden sintetizar a partir de monómeros obtenidos de estos u otros proveedores utilizando técnicas estándar.

20 **[0046]** Una amplia variedad de polímeros y métodos para formar matrices poliméricas de los mismos son conocidos convencionalmente. En general, una matriz polimérica comprende uno o más polímeros. Los polímeros pueden ser polímeros naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, bloquear o comprender una combinación de secuencias aleatorias y de bloque. Típicamente, los polímeros de acuerdo con la presente invención son polímeros orgánicos.

25 **[0047]** Los ejemplos de polímeros adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a polietilenos, policarbonatos (p. ej., poli (1,3-dioxan-2-ona)), polianhídridos (p. ej., poli (anhídrido sebácico)), polipropilfumaratos, poliamidas (p. ej., policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (p. ej., polilactida, poliglicólido, polilactida-co-glicólido, policaprolactona, polihidroxiácido (p. ej., poli (β-hidroxialcanoato))), poli (ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes de polivinilo, poliuretanos, polifosfacenos, poliácridatos, polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos y poliaminas, polilisina, polilisina-copolímeros de PEG y poli (etilenimina), poli (etilenimina)-copolímeros de PEG.

30 **[0048]** En algunas implementaciones, los polímeros de acuerdo con la presente invención incluyen polímeros que han sido aprobados para uso en humanos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) bajo 21 CFR § 177.2600, incluyendo pero no limitados a poliésteres (p. ej., ácido poliláctico, poli (ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli (1,3-dioxan-2ona)); polianhídridos (p. ej., poli (anhídrido sebácico)); poliéteres (p. ej., polietilenglicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poliácridatos; y policianoacrilatos.

35 **[0049]** En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser hidrófilos. Por ejemplo, los polímeros pueden comprender grupos aniónicos (p. ej., grupo fosfato, grupo sulfato, grupo carboxilato); grupos catiónicos (p. ej., grupo amina cuaternaria); o grupos polares (p. ej., grupo hidroxilo, grupo tiol, grupo amina). En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser hidrófobos. La selección de la hidrofilia o hidrofobicidad del polímero puede tener un impacto en la naturaleza de los materiales que se incorporan (p. ej., se acoplan) dentro de la nanopartícula sintética.

40 **[0050]** En algunas implementaciones, los polímeros se pueden modificar con uno o más restos y/o grupos funcionales. Se puede usar una variedad de restos o grupos funcionales de acuerdo con la presente invención. En algunas implementaciones, los polímeros pueden modificarse con polietilenglicol (PEG), con un carbohidrato, y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786: 301). Se pueden realizar ciertas implementaciones utilizando las enseñanzas generales de la patente de los Estados Unidos N° 5,543,158 de Gref et al., o la publicación WO WO2009/051837 de Von Andrian et al.

45 **[0051]** En algunas implementaciones, los polímeros se pueden modificar con un lípido o grupo de ácido graso. En algunas implementaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico o lignocérico. En algunas implementaciones, un grupo de ácido graso puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linoleico, gamma-linoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico o erucico.

50 **[0052]** En algunas implementaciones, polímeros pueden ser poliésteres, incluyendo copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, tales como poli (ácido láctico-ácido co-glicólico) y poli (lactida-co-glicolida), denominados colectivamente en este documento como "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominadas en este documento "PGA", y unidades de ácido láctico, tales como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida y poli-D,L-lactida, a los que se hace referencia en el presente documento colectivamente como "PLA". En algunas implementaciones, los poliésteres ejemplares incluyen, p. ej., polihidroxiácidos; copolímeros de PEG y copolímeros de lactida y glicólido (p. ej., copolímeros de PLA-PEG, copolímeros de PGA-PEG, copolímeros de PLGA-PEG y derivados de los mismos. En algunas implementaciones, los poliésteres incluyen, p. ej., copolímeros de poli (caprolactona), poli (caprolactona)-PEG, poli (L-lactida-co-L-lisina), poli (éster de serina), poli (éster de 4-hidroxi-L-prolina), poli[ácido α-(4-aminobutilo)-L-glicólico] y derivados de los mismos.

La tasa de degradación de PLGA se puede ajustar alterando la relación ácido láctico: ácido glicólico. En algunas implementaciones, el PLGA que se utilizará de acuerdo con la presente invención se caracteriza por una relación ácido láctico: ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75, o aproximadamente 15:85.

[0053] En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En ciertas implementaciones, los polímeros acrílicos incluyen, p. ej., copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli (ácido acrílico), poli (ácido metacrílico), copolímero de alquilamida de ácido metacrílico, poli (metacrilato de metilo), poli (anhídrido de ácido metacrílico), metacrilato de metilo, polimetacrilato, copolímero de poli (metacrilato de metilo), poli(acrilamida, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, copolímeros de metacrilato de glicidilo, policianoacrilatos y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros anteriores. El polímero acrílico puede comprender copolímeros completamente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos de amonio cuaternario.

[0054] En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos pueden condensar y/o proteger cadenas de ácidos nucleicos con carga negativa (p. ej., ADN o derivados de los mismos). Polímeros que contienen amina tales como poli (lisina) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; y Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6: 7), poli (etilenimina) (PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 1995, 92: 7297), y dendrímeros de poli (amidoamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 93: 4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7: 703; y Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4: 372) tienen carga positiva a pH fisiológico, forman pares de iones con ácidos nucleicos y median la transfección en una variedad de líneas celulares.

[0055] En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que portan cadenas laterales catiónicas (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32: 3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115: 11,010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22: 3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121: 5633; y Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23: 3399). Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli (L-lactida-co-L-lisina) (Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115: 11010), poli (serina éster) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23: 3399), poli (4-hidroxi-L-prolina éster) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32: 3658; y Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121: 5633) y poli (éster de 4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32: 3658; y Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121: 5633).

[0056] Las propiedades de estos y otros polímeros y métodos para su preparación son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., las patentes estadounidenses 6,123,727; 5,804,178; 5,770,417; 5,736,372; 5,716,404; 6,095,148; 5,837,752; 5,902,599; 5,696,175; 5,514,378; 5,512,600; 5,399,665; 5,019,379; 5,010,167; 4,806,621; 4,638,045; y 4,946,929; Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123: 9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123: 2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62: 7; y Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99: 3181). De manera más general, se describen una variedad de métodos para sintetizar ciertos polímeros adecuados en la Concise Enciclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ed. por Goethals, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization by Odian, John Wiley & Sons, 4ª Edición, 2004; Contemporary Polymer Chemistry por Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386; y en las patentes estadounidenses 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446 y 6,818,732.

[0057] En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. En algunas implementaciones, los polímeros pueden ser dendrímeros. En algunas implementaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente reticulados entre sí. En algunas implementaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente libres de enlaces cruzados. En algunas implementaciones, los polímeros pueden usarse de acuerdo con la presente invención sin experimentar una etapa de reticulación. Debe entenderse además que las nanopartículas sintéticas de la invención pueden comprender copolímeros de bloque, copolímeros de injerto, mezclas, mezclas y/o aductos de cualquiera de los polímeros anteriores y otros. Los expertos en la materia reconocerán que los polímeros enumerados en el presente documento representan una lista ejemplar, no exhaustiva de polímeros que pueden usarse de acuerdo con la presente invención.

[0058] En algunas implementaciones, las nanopartículas sintéticas pueden comprender opcionalmente una o más entidades anfífilas. En algunas implementaciones, una entidad anfífila puede promover la producción de nanopartículas sintéticas con mayor estabilidad, uniformidad mejorada o viscosidad incrementada. En algunas implementaciones, las entidades anfífilas pueden asociarse con la superficie interior de una membrana lipídica (p. ej., bicapa lipídica, monocapa lipídica, etc.). Muchas entidades anfífilas conocidas en la técnica son adecuadas para su uso en la fabricación de nanopartículas sintéticas de acuerdo con la presente invención. Dichas entidades anfífilas incluyen, pero no se limitan a, fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoilo fosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidilo etanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltriethylamonio (DOTMA); dioleilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidilo glicerol (DPPG); hexanodecanol; alcoholes grasos tales como polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9-laurilo éter; un ácido graso tensioactivo, tal como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; trioleato de sorbitán (Span®85) glicocolato; monolaurato de sorbitán (Span®20); polisorbato 20 (Tween®20); polisorbato 60

(Tween®60); polisorbato 65 (Tween®65); polisorbato 80 (Tween®80); polisorbato 85 (Tween®85); monoestearato de polioxi-etileno; surfactina; un poloxómero; un éster de ácido graso de sorbitán tal como trioleato de sorbitán; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol, esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrósidos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecilo-amina; palmitato de acetilo; ricinoleato de glicerol; esterato de hexadecilo; miristato de isopropilo; tiloxapol; poli (etilenglicol) 5000-fosfatidiletanolamina; poli (etilenglicol) 400 monoestearato; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen altas propiedades tensioactivas; desoxicolatos; ciclodextrinas; sales caotrópicas; agentes de apareamiento de iones; y combinaciones de los mismos. Un componente de entidad anfifílica puede ser una mezcla de diferentes entidades anfifílicas. Los expertos en la materia reconocerán que esta es una lista ejemplar, no exhaustiva, de sustancias con actividad tensioactiva. Cualquier entidad anfifílica puede usarse en la producción de nanopartículas sintéticas para usarse de acuerdo con la presente invención.

[0059] En algunas implementaciones, las nanopartículas sintéticas pueden comprender opcionalmente uno o más hidratos de carbono. Los carbohidratos pueden ser naturales o sintéticos. Un carbohidrato puede ser un carbohidrato natural derivado. En ciertas implementaciones, un carbohidrato comprende monosacárido o disacárido, que incluye pero no se limita a glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, lactosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, celulosa, manosa, xilosa, arabinosa, ácido glucorónico, ácido galactorónico, ácido manurónico, glucosamina, galatosamina y ácido neurálmico. En ciertas implementaciones, un carbohidrato es un polisacárido, que incluye, entre otros, pululano, celulosa, microcristalina celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxicelulosa (HC), metilcelulosa (MC), dextrano, ciclodextrano, glucógeno, hidroxietilo-almidón, carageenan, glicerina, amilosa, quitosano, N,O-carboxilmetilquitosano, algina y ácido alginico, almidón, quitina, inulina, konjac, glucommanano, pustulano, heparina, ácido hialurónico, curdlán y xantano. En implementaciones, las nanopartículas sintéticas de la invención no comprenden (o excluyen específicamente) carbohidratos, tales como un polisacárido. En ciertas implementaciones, el carbohidrato puede comprender un derivado de carbohidrato tal como un alcohol de azúcar, que incluye pero no se limita a manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol y lactitol.

Adyuvantes

[0060] Las composiciones de vacuna y adyuvantes descritas en este documento incluyen nanopartículas cargadas por adyuvante. Uno o más adyuvantes pueden encapsularse o quedar atrapados en las nanopartículas, o pueden asociarse con la superficie de las nanopartículas.

[0061] Como se usa en este documento, el término "adyuvante" se refiere a un adyuvante inmunológico. Por esto se entiende un compuesto o composición que puede mejorar o facilitar la respuesta del sistema inmune a un patógeno, induciendo así una respuesta inmune o una serie de respuestas inmunes en el sujeto. El adyuvante puede facilitar el efecto de las composiciones de la vacuna, p. ej., formando depósitos (prolongando la vida media de la vacuna), proporcionando ayuda adicional de células T y/o estimulando la producción de citocinas.

[0062] Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más potentes en el cuerpo y son responsables de iniciar todas las respuestas inmunes específicas de patógenos mediante la unión a los antígenos patógenos. Las células dendríticas también se comunican con las células T sobre la naturaleza del patógeno encontrado a través de señales quimiotácticas e inducen una respuesta adecuada de las células T. Por lo tanto, dirigirse a las células dendríticas puede mejorar el suministro y la presentación de antígenos patógenos y controlar la naturaleza de las respuestas inmunes inducidas por la vacunación.

[0063] En respuesta a los diferentes tipos de patógenos encontrados, células dendríticas utilizan diferentes receptores de la superficie para unirse a los antígenos patógenos expuestos. Durante la migración, las células dendríticas se someten a un proceso de maduración en donde pierden capacidad fagocítica y desarrollan una mayor capacidad para comunicarse con las células T en los ganglios linfáticos. Este proceso de maduración depende de la señalización de las moléculas del patrón molecular asociado al patógeno (PAMP) a través de receptores de reconocimiento de patrones, como los miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR). Los PAMP se dirigen al TLR en la superficie de la célula dendrítica y señalizan internamente, lo que aumenta potencialmente la captación, la maduración y la capacidad de estimulación de las células T de las células dendríticas. Por lo tanto, los agonistas de TLR son potentes activadores de células dendríticas y pueden incluirse en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento, p. ej., oligodesoxinucleótidos CpG (bacterianos), ARN bicatenarios (virales), lipopolisacáridos (bacterianos), peptidoglucanos (bacterianos), lipoarabinomaninos (bacterianos), zimosanos (levadura), lipoproteínas micoplasmáticas como MALP-2 (bacteriana), flagelinas (bacteriana), ácidos poli (inosínico-citidílico) (bacteriano), ácidos lipoteicoicos (bacteriano) o imidazoquinolinas (sintéticas).

[0064] El R848 (Resiquimod) es un derivado de la guanosina de la imidazoquinolina y es un agonista para TLR7 y TLR8. R848 es un adyuvante eficaz que activa las células dendríticas y las células B para producir citocinas óptimas para la inmunidad de células T auxiliar 1 (Th1) y la producción de anticuerpos. Por lo tanto, R848 puede incluirse como adyuvante en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento para aumentar las respuestas inmunes tanto humorales como celulares. Los métodos para usar este adyuvante se describen en detalle en los ejemplos a continuación.

[0065] El TLR9 reconoce específicamente motivos CpG no metilados, sello distintivo del ADN microbiano, que pueden ser imitados por oligodesoxinucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG. La estimulación de TLR9 por el ADN CpG u oligodesoxinucleótidos CpG desencadena la señalización intracelular que conduce a la activación de macrófagos, células dendríticas y células B, y a la producción de citocinas, quimiocinas e inmunoglobulinas. Posteriormente, las citocinas producidas por las células dendríticas, como la IL-12, inducen la diferenciación de las células T ingenuas en células T Th1 y citotóxicas (CTL). Los estudios han demostrado que los oligodesoxinucleótidos CpG como adyuvantes de vacunas pueden potenciar la protección inmune contra una variedad de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, p. ej., hepatitis B (Krieg et al., Proc Am Thorac Soc. 4 (3): 289-94, 2007; Schmidt et al., Nat. Biotechnol. 25 (8): 825-6, 2007). Por lo tanto, los oligodesoxinucleótidos CpG no metilados pueden incluirse como adyuvantes en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento para aumentar las respuestas inmunes tanto humorales como mediadas por células.

[0066] El lípido A, la porción biológicamente activa del lipopolisacárido constituyente de la pared celular bacteriana gramnegativa (LPS), se sabe que posee fuertes propiedades inmunoestimuladoras y se ha evaluado como un adyuvante para promover respuestas inmunes. TLR4 se identificó como el receptor de señalización para el lípido A. El monofosforilo lípido A (MPLA) comprende la porción de lípido A de *Salmonella minnesota* LPS. LPS y MPLA inducen perfiles de citocinas similares, pero MPLA es menos tóxico. La combinación de MPLA con otros inmunoestimulantes puede facilitar la obtención de una respuesta inmune efectiva.

[0067] En implementaciones específicas, las composiciones de la invención incorporan un ligando para el receptor de tipo Toll (TLR)-9, tales como moléculas de ADN inmunoestimuladoras que comprenden los CpG, que inducen secreción de interferón de tipo I, y estimulan la activación de células T y B que conducen a un aumento de producción de anticuerpo y respuestas de células T citotóxicas (Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. Nature. 1995. 374:546-549; Chu et al. Los oligodesoxinucleótidos CpG actúan como adyuvantes que activan inmunidad de auxiliar T 1 (Th1). J. Exp. Med. 1997. 186: 1623-1631; Los oligonucleótidos sintéticos que contienen CpG de Lipford et al. promueven las respuestas de células T y B citotóxicas al antígeno proteico: una nueva clase de adyuvantes de vacunas. Eur. J. Immunol. 1997. 27: 2340-2344; Roman et al. "Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants", Nat. Med. 1997. 3: 849-854; Davis et al. El ADN CpG es un potente potenciador de inmunidad específica en ratones inmunizados con antígeno de superficie recombinante de hepatitis B. J. Immunol. 1998. 160: 870-876; Lipford et al., "Bacterial DNA as immune cell activator", Trends Microbiol. 1998. 6: 496-500; Patente de Estados Unidos 6,207,646 de Krieg et al.; Patente de Estados Unidos 7,223,398 de Tuck et al.; Patente de Estados Unidos 7,250,403 de Van Nest et al.; o la Patente de Estados Unidos 7,566,703 de Krieg et al.

[0068] Moléculas orientadas a células dendríticas también pueden incluir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales o policlonales de los mismos que reconocen y se unen a epítomos que aparecen en la superficie de las células dendríticas. Por ejemplo, la lectina DEC-205, un epítomo de la superficie de la célula dendrítica, ha sido atacada por un anticuerpo recombinante anti-DEC205 en ratones, y ha impulsado las respuestas humorales y celulares a un antígeno unido a la cadena pesada del anticuerpo (Hawiger, et al., J. Exp. Med., 194 (6): 769-79, 2001; Bonifaz, et al., J. Exp. Med., 196 (12): 1627-38, 2002; Bonifaz, et al., J. Exp. Med., 199 (6): 815-24, 2004). Una variedad de otros receptores endocíticos, que incluyen una lectina específica de manosa (receptor de manosa) y receptores de IgG Fc, también se han dirigido de esta manera con una mejora similar de la eficacia de presentación de antígeno. Otros receptores adecuados que pueden ser dirigidos incluyen, entre otros, DC-SIGN, 33D1, SIGLEC-H, DCIR, CD11c, receptores de proteínas de choque térmico y receptores captadores.

[0069] Muchos receptores utilizados para la orientación vacunas a las células dendríticas, tales como lectina DEC-205, tienen la propiedad de entrega de antígenos a los endosomas tardíos donde se forman péptidos inmunogénicos y se cargan en moléculas MHC de clase II (que son necesarios para respuestas CD4 de células T y anticuerpos) (Mellman, Adv. Exp. Med. Biol. 560: 63-7, 2005; Mellman y Steinman, Cell 106 (3): 255-8, 2001). Sin embargo, la vacunación efectiva a menudo requiere la producción de respuesta de células T citotóxicas CD8, que ocurre solo cuando el antígeno está presente en el citoplasma. Las células dendríticas efectúan esta función mediante la presentación cruzada, donde los antígenos exógenos escapan de las vesículas endocíticas y entran al citoplasma, donde el proteosoma los divide en péptidos, los importa al retículo endoplásmico y los carga en moléculas de MHC de clase I recién sintetizadas (que son necesarias para la estimulación de células T CD8). La eficacia de la presentación cruzada se puede mejorar artificialmente mediante la interrupción limitada de las membranas del endosoma-lisosoma durante la captación de antígeno. Los agentes disruptores de la membrana endosómica, por lo tanto, pueden servir como adyuvantes efectivos y pueden incluir, p. ej., fármacos de molécula pequeña, péptidos, polipéptidos, incluida la elastina, y agentes sintéticos que alteran el pH intracelular o las membranas vesiculares. En ciertos ejemplos, el agente disruptor del endosoma es un péptido formador de poros, anfipático, de bajo pH activado, p. ej., el péptido Endo-Porter (Endo-Porter; GeneTools, Philomath, Oreg.) (Summerton, Ann. NY Acad. Sci., 1058: 1-14, 2005). Así, el péptido Endo-Porter puede incluirse como adyuvantes en las composiciones de vacuna descritas en el presente documento para aumentar la presentación cruzada de antígenos patógenos.

[0070] Se describen varios adyuvantes, p. ej., en el documento PCT WO2012/068295. Dichos adyuvantes pueden incluir, entre otros, estimuladores de receptores de reconocimiento de patrones, como RIG-1 y receptores similares a NOD (NLR), sales minerales, como alumbre, alumbre combinado con lípido de monofosforilo (MPL) A de enterobacterias, como *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri* o

específicamente con MPL® (AS04), MPL A de las bacterias mencionadas anteriormente por separado, saponinas, como QS-21, Quil-A, ISCOMs, ISCOMATRIX™, emulsiones tales como MF59™, Montanide® ISA 51 y ISA 720, AS02 (QS21 + escualeno + MPL®), liposomas y formulaciones liposomales tales como AS01, sintetizados o específicamente micropartículas preparadas y microportadores tales como bacterias derivadas de vesículas de membrana externa (OMV) de *N gonorrhoeae*, *chlamydia trachomatis* y otros, o partículas de quitosano, agentes formadores de depósitos, como los copolímeros de bloques Pluronic®, péptidos específicamente modificados o preparados, como el dipéptido muramilo, 4-fosfatos de aminoalquilo glucosaminida, como RC529, o proteínas, como toxoides bacterianos o fragmentos de toxinas.

[0071] Además de receptores de tipo Toll indicados anteriormente, los adyuvantes pueden incluir agonistas para reconocimiento de patrones receptores (PRR), incluyendo, pero no limitado a receptores de tipo Toll (TLRs), específicamente TLRs 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y/o combinaciones de los mismos. En otras implementaciones, los adyuvantes comprenden agonistas para los receptores de tipo Toll 3, agonistas para los receptores de tipo Toll 7 y 8, o agonistas para el receptor de tipo Toll 9; derivados de adenina tales como los descritos en la patente de EE.UU. 6,329,381 (Sumitomo Pharmaceutical Company); ADN inmunoestimulador; o ARN inmunoestimulador. En implementaciones específicas, las composiciones de la invención incorporan como adyuvantes compuestos que son agonistas para receptores de tipo toll (TLR) 7 y 8 ("agonistas TLR 7/8"). Son útiles los compuestos agonistas TLR 7/8 descritos en la Patente de Estados Unidos 6,696,076 de Tomai et al., que incluyen, pero no se limitan a, imidazoquinolina aminas, imidazopiridina aminas, 6,7 cicloalquilimidazopiridina aminas y 1,2 puentes de imidazoquinolina aminas.

[0072] En implementaciones específicas, un adyuvante puede ser un agonista para la molécula de superficie CD40. En ciertas implementaciones, para estimular la inmunidad en lugar de la tolerancia, una composición inventiva incorpora un adyuvante que promueve la maduración de DC (necesaria para la preparación de las células T ingenuas) y la producción de citocinas, como los interferones tipo I, que promueven las respuestas inmunitarias de los anticuerpos. En las implementaciones, los adyuvantes también pueden incluir moléculas de ARN inmunoestimulantes, tales como, entre otros, ARNs o poli I:C (un estimulante TLR3), y/o los descritos en F. Heil et al., "Species Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8" *Science* 303 (5663), 1526-1529 (2004); J. Vollmer et al., "Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides" WO 2008033432 A2; A. Forsbach et al., "Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway" WO 2007062107 A2; E. Uhlmann et al., "Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity" U.S. Pat. Appl. Publ. US 2006/0241076; G. Lipford et al., "Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections" WO 2005097993 A2; G. Lipford et al., "Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods" WO 2003086280 A2. En algunas implementaciones, un adyuvante puede ser un agonista de TLR-4, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), VSV-G y/o HMGB-1. En algunas implementaciones, los adyuvantes pueden comprender agonistas de TLR-5, tales como flagelina, o porciones o derivados de los mismos, que incluyen pero no se limitan a los descritos en las patentes de los Estados Unidos 6,130,082, 6,585,980 y 7,192,725.

[0073] En algunas implementaciones, los adyuvantes pueden ser estímulos proinflamatorios liberados de las células necróticas (p. ej., urato cristales). En algunas implementaciones, los adyuvantes pueden ser componentes activados de la cascada del complemento (p. ej., CD21, CD35, etc.). En algunas implementaciones, los adyuvantes pueden ser componentes activados de complejos inmunes. Los adyuvantes también pueden incluir agonistas del receptor del complemento, como una molécula que se une a CD21 o CD35. En algunas implementaciones, el agonista del receptor del complemento induce la opsonización del complemento endógeno de la nanopartícula sintética. En algunas implementaciones, los adyuvantes son citocinas, que son pequeñas proteínas o factores biológicos (en el rango de 5 kD - 20 kD) que son liberados por las células y tienen efectos específicos sobre la interacción célula-célula, la comunicación y el comportamiento de otras células. En algunas implementaciones, el agonista del receptor de citocina es una molécula pequeña, anticuerpo, proteína de fusión o aptámero.

[0074] En diversas implementaciones, al menos una parte de la dosis de adyuvante se puede acoplar a las nanopartículas sintéticas, p. ej., toda la dosis de adyuvante puede ser acoplada a nanopartículas sintéticas. En otras implementaciones, al menos una parte de la dosis del adyuvante no está acoplada a las nanopartículas sintéticas. En ciertas implementaciones, la dosis de adyuvante comprende dos o más tipos de adyuvantes. Por ejemplo, y sin limitación, se pueden combinar adyuvantes que actúan sobre diferentes receptores TLR. Como ejemplo, en una implementación, un agonista TLR 7/8 se puede combinar con un agonista TLR 9. En otra implementación, un agonista TLR 7/8 se puede combinar con un agonista TLR 4. En otra implementación más, un agonista TLR 9 se puede combinar con un agonista TLR 3.

[0075] En algunos otros ejemplos, el adyuvante puede incluir uno o más de los siguientes: glicolípido alfa-galactosilceramida; emulsiones de aceite (p. ej., adyuvante de Freund); formulaciones de saponina; virosomas y partículas virales; derivados bacterianos y microbianos que incluyen, pero no se limitan a carbohidratos tales como lipopolisacárido (LPS); oligonucleótidos inmunoestimuladores; toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados; alumbre; BCG; composiciones que contienen minerales (p. ej., sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio, hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc.); bioadhesivos y/o mucoadhesivos; micropartículas; liposomas; formulaciones de polioxietiléneter y éster de polioxietileno; polifosfenceno; péptidos de muramilo; compuestos de

imidazoquinolona; y sustancias tensioactivas (p. ej., lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol).

5 **[0076]** Los adyuvantes también pueden incluir inmunomoduladores tales como citocinas, interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (p. ej., interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral; y moléculas coestimuladoras, como las de la familia B7.

Métodos **para** el montaje de nanopartículas cargadas con adyuvante

10 **[0077]** Muchos de los procesos conocidos se pueden utilizar para formar las nanopartículas cargadas con adyuvantes. Por ejemplo, las nanopartículas cargadas con adyuvante pueden formarse mediante técnicas de evaporación de solventes (como se describe en Matiwitz, et al., *J. Scanning Microscopy* 4: 329, 1990; Beck et al., *Fertil. Steril.* 31: 545, 1979; Benita y col., *J. Pharm. Sci.*, 73: 1721, 1984 y la patente de los Estados Unidos N° 3,960,757). El uno o más polímeros se disuelven en un disolvente orgánico volátil, como el cloruro de metileno. Se pueden agregar adyuvantes a la solución, y la mezcla se suspende en una solución acuosa que contiene un agente tensioactivo como el poli (alcohol vinílico). La emulsión resultante se agita hasta que se evapora la mayor parte del disolvente orgánico, dejando nanopartículas sólidas.

20 **[0078]** En otros ejemplos, las nanopartículas cargadas por adyuvante se pueden formar mediante el uso de inversión de fase en donde un polímero se disuelve en un disolvente, las partículas finas del adyuvante se mezclan o disuelven en la solución de polímero, y la mezcla se vierte en un fuerte no solvente para el polímero, para producir espontáneamente, en condiciones favorables, microesferas poliméricas, en donde el polímero está recubierto con las partículas o las partículas se dispersan en el polímero.

25 **[0079]** Ciertos adyuvantes se pueden acoplar de forma no covalente a las nanopartículas, tal como por adsorción. Por ejemplo, la adsorción de ácidos nucleicos a la superficie de una nanopartícula se puede lograr mediante la formación de sal. Cuando se usa este método, la nanopartícula se prepara de tal manera que la nanopartícula comprende un material que introduce una carga en la nanopartícula. A menudo, el uso de un tensioactivo cargado, p. ej., un tensioactivo catiónico que se usa para adsorber los ácidos nucleicos cargados negativamente durante la preparación de nanopartículas, es suficiente para proporcionar carga superficial a la nanopartícula. El contacto de las nanopartículas cargadas con una solución de ácidos nucleicos provoca la adsorción de los ácidos nucleicos. Este método se describe en la solicitud de patente en la solicitud de patente internacional publicada WO 00/06123 de O'Hagen et al.

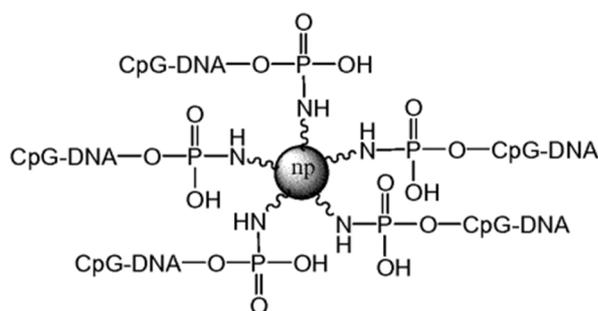
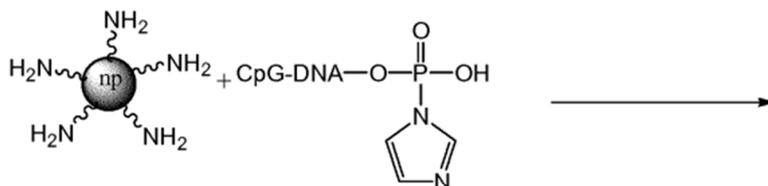
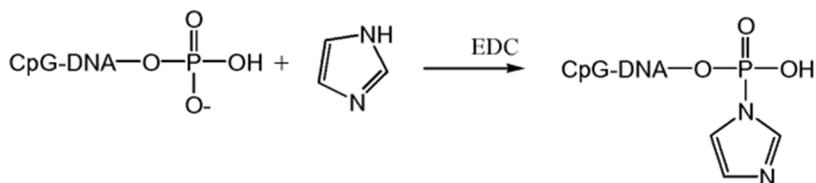
35 **[0080]** Algunos adyuvantes se pueden encapsular por las nanopartículas. Por ejemplo, la encapsulación de ácidos nucleicos, como los oligodesoxinucleótidos CpG no metilados, se puede lograr disolviendo los ácidos nucleicos en un tampón acuoso y luego usando esta solución en el proceso de emulsión simple o doble para formar nanopartículas por autoensamblaje. Este proceso se describe en Tse, et al *International Journal of Pharmaceutics*, 370 (1-2), 33 (2009). Además, varios materiales pueden encapsularse en nanopartículas sintéticas usando una variedad de métodos que incluyen pero no se limitan a C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" *J. Biomater. Sci. Polimer Edn*, vol. 17, núm. 3, págs. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" *Current Drug Delivery* 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" *Nanomedicine* 2: 8-21 (2006).

45 **[0081]** Otros métodos apropiados para los materiales de encapsulación, tales como ácidos nucleicos, en nanopartículas sintéticas pueden ser usados, incluyendo sin limitación los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos 6,632,671 de Unger expedida el 14 de octubre de, 2003; H. Martimprey et al., "Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71:490-504 (2009); or P. Malyala, et al., "Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles" *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 218-225 (2009).

50 **[0082]** El acoplamiento covalente se puede lograr mediante una variedad de métodos, p. ej., como se describe en *Bioconjugate Techniques*, 2ª edición, Elsevier (2008) de Hermanson. Un método que es útil para acoplar ácidos nucleicos a polímeros o nanopartículas que llevan grupos funcionales amina es activar el fosfato 5' del ácido nucleico con metioduro de 1-(3-dimetilamino)propilo-3-etilcarbodiimida (EDC) e imidazol y luego reaccionar el ácido nucleico activado con el polímero o nanopartícula sustituida con amina (Shabarova et al, *FEBS Letters*, 154 288, (1983)). A continuación se muestra un esquema de este proceso para las nanopartículas funcionalizadas con amina de superficie.

60

65



[0083] En determinados ejemplos, el acoplamiento covalente se puede hacer a través de un enlazador covalente. Por ejemplo, el enlazador covalente puede ser o comprender un enlazador de amida, un enlazador de disulfuro, un enlazador de tioéter, un enlazador de hidrazona, un enlazador de hidrazida, un enlazador de imina u oxima, un enlazador de urea o tiourea, un enlazador de amidina, un enlazador de amina, y un conector de sulfonamida.

[0084] Un enlazador de amida se forma a través de un enlace amida entre una amina en un elemento con el grupo ácido carboxílico de un segundo elemento tal como la nanopartícula. El enlace amida en el conector se puede hacer usando cualquiera de las reacciones de formación de enlace amida convencionales con aminoácidos o antígenos o adyuvantes adecuadamente protegidos y ácido carboxílico activado, como el éster activado con N-hidroxisuccinimida.

[0085] Un enlazador disulfuro se realiza mediante la formación de un enlace disulfuro (S-S) entre dos átomos de azufre de la forma, p. ej., de $R_1\text{-S-S-}R_2$. Se puede formar un enlace disulfuro por intercambio de tiol de un antígeno o adyuvante que contiene un grupo tiol/mercaptano (-SH) con otro grupo tiol activado en un elemento que contiene grupos tiol/mercaptano con un elemento que contiene un grupo tiol activado.

[0086] Un enlazador de triazol, p. ej., un 1,2,3-triazol de la forma



en donde R_1 y R_2 pueden ser cualesquiera entidades químicas, se pueden hacer por la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de una azida unida a un primer elemento con un alquino terminal unido a un segundo elemento. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar se realiza con o sin catalizador, preferiblemente con catalizador Cu (I), que une los dos elementos a través de una función 1,2,3-triazol. Esta química se describe en Sharpless et al., *Angew. Chem Int. Ed.* 41 (14), 2596, (2002) y Meldal, et al, *Chem. Rev.*, 2008, 108 (8), 2952-3015 y a menudo se conoce como "reacción de clic" o CuAAC.

[0087] Un enlazador de tioéter se hace por la formación de un enlace de azufre-carbono (tioéter) en la forma, p. ej., de $R_1\text{-S-}R_2$. El tioéter puede prepararse por alquilación de un grupo tiol/mercaptano (-SH) en un componente tal como el elemento con un grupo alquilante tal como haluro o epóxido en un segundo elemento. Los enlazadores de tioéter también pueden formarse mediante la adición de Michael de un grupo tiol/mercaptano en un elemento a un grupo alqueno deficiente en electrones en un segundo elemento tal como un polímero que contiene un grupo maleimida

como el aceptor de Michael. De otra manera, los enlazadores de tioéter pueden prepararse mediante la reacción radical tiol-eno de un grupo tiol/mercaptano en un elemento con un grupo alqueno en un segundo elemento tal como un polímero o de nanopartículas.

5 **[0088]** Un enlazador hidrazona se hace por la reacción de un grupo hidrazida en un elemento con un grupo aldehído/cetona en el segundo elemento.

10 **[0089]** Un enlazador hidrazida está formado por la reacción de un grupo hidrazina en un elemento con un grupo ácido carboxílico en el segundo elemento. Dicha reacción se realiza generalmente usando una química similar a la formación de un enlace amida en donde el ácido carboxílico se activa con un reactivo activador.

[0090] Se forma un conector de imina u oxima por la reacción de un grupo amina o N-alcoxiamina (o aminooxi) en un elemento con un grupo aldehído o cetona en un segundo elemento.

15 **[0091]** Un enlazador de urea o tiourea se prepara mediante la reacción de un grupo amina en un elemento con un grupo isocianato o tioisocianato en un segundo elemento.

20 **[0092]** Un enlazador amidina se prepara por la reacción de un grupo amina en un elemento con un grupo imidoéster en un segundo elemento.

25 **[0093]** Un enlazador de amina se realiza por la reacción de alquilación de un grupo amina en un elemento con un grupo alquilante tal como haluro, epóxido, o grupo éster de sulfonato en el segundo elemento. Alternativamente, también se puede hacer un enlazador de amina por aminación reductora de un grupo amina en un elemento con un grupo aldehído o cetona en el segundo elemento con un reactivo reductor adecuado tal como cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio.

[0094] Un enlazador sulfonamida se hace mediante la reacción de un grupo amina en un elemento con un grupo de haluro de sulfonilo (tal como cloruro de sulfonilo) en un segundo elemento.

30 **[0095]** Varios adyuvantes también pueden ser acoplados a través de métodos de acoplamiento no covalentes. Por ejemplo, un adyuvante con carga negativa se puede acoplar a un portador con carga positiva mediante adsorción electrostática. Un adyuvante que contiene un ligando metálico también se puede acoplar a un vehículo que contiene un complejo metálico a través de un complejo metal-ligando.

35 **[0096]** En ciertos ejemplos, los adyuvantes pueden estar unidos a un polímero, por ejemplo ácido poliláctico-bloque-polietilenglicol, antes del montaje de una nanopartícula sintética o una nanopartícula sintética se pueden formar con reactivos o grupos disponibles en su superficie. En el último caso, el adyuvante puede prepararse con un grupo que sea compatible con la química de unión que presenta la superficie de las nanopartículas sintéticas. En otras implementaciones, un adyuvante peptídico puede unirse a partículas similares a virus (VLP) o liposomas usando un enlazador adecuado.

40 **[0097]** En determinados ejemplos, el engarce puede ser un reactivo homobifuncional o heterobifuncional como se describe en Hermanson 2008. Por ejemplo, una VLP o nanopartícula sintética de liposoma que contiene un grupo carboxílico en la superficie pueden ser tratados con un enlazador homobifuncional, dihidrazida de ácido adípico (ADH), en presencia de EDC para formar la nanopartícula sintética correspondiente con el enlazador ADH. La nanopartícula sintética unida por ADH resultante se conjuga luego con un antígeno peptídico que contiene un grupo ácido a través del otro extremo del conector ADH en NC para producir el VLP o conjugado de péptido de liposoma correspondiente.

50 **Mecanismos de unión**

[0098] Una o más nanopartículas cargadas con adyuvantes se pueden unir a cada patógeno inactivado mediante una variedad de mecanismos de unión, incluyendo, pero no limitado a, atracciones electrostáticas, acoplamiento covalente directamente o a través de un enlazador, o interacciones hidrofóbicas.

55 **[0099]** Los patógenos inactivados están unidos a nanopartículas cargadas por adyuvante a través de atracciones electrostáticas. La mayoría de los protozoos, bacterias y virus tienen una carga superficial negativa a pH fisiológico (Robert A. Freitas Jr., Nanomedicine, Volume IIA: Biocompatibility, Landes Bioscience, Georgetown, TX, 2003). Por ejemplo, las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos, que imparten una carga fuertemente negativa a su superficie. Casi todas las paredes celulares de bacterias Gram-positivas están formadas por una capa gruesa de peptidoglucano, que es rica en ácidos teicoicos cargados negativamente (Knox, et al., Bacteriol. Rev. 37 (2): 215, 1973). Las nanopartículas catiónicas se pueden utilizar para atacar eficazmente a los patógenos con carga negativa a través de atracciones electrostáticas (Liu et al., Nature Nanotechnology 4, 457-463, 2009).

65

[0100] En algunas realizaciones, las nanopartículas formadas por PLGA-PLH-PEG tienen cargas catiónicas suficientemente fuertes en su superficie que pueden unirse a patógeno inactivo cargado negativamente a través de atracciones electrostáticas.

5 [0101] En algunos ejemplos, los patógenos inactivados pueden unirse a nanopartículas cargadas con adyuvante a través de un conector conjugado en la superficie de las nanopartículas. El conector puede ser un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un antígeno de superficie del patógeno inactivado, p. ej., anticuerpo monoclonal que se dirige al antígeno de superficie *E. coli* O157 (Zhao et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 101 (42): 15027-32, 2004). El conector puede ser un aptámero que se une específicamente a un objetivo de superficie del patógeno inactivado, p. ej., un aptámero NK2 que se une a la cepa virulenta *M. tuberculosis* (H37Rv) con alta afinidad y especificidad (Chen et al., Biochem Biophys Res Commun. 8; 357 (3): 743-8, 2007). El enlazador puede ser un antibiótico, p. ej., vancomicina, que se une específicamente a un objetivo de superficie del patógeno inactivado (Kell et al., ACS Nano: 1777-1788, 2008). El conector puede ser una lectina que se une específicamente a un polisacárido de superficie del patógeno inactivado, p. ej., Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA I) o Concanavalin A (Con A) lectinas que se unen a los receptores de carbohidratos de las cepas de *H. pylori* (Umamaheshwari et al., J. Drug Target. 11 (7): 415-23, 2003). El conector también puede ser un péptido antimicrobiano, p. ej., Sushi 1, que se une específicamente a un objetivo de superficie del patógeno inactivado (Leptihn et al., BMC Biol 7: 22, 2009). También se pueden usar otros enlazadores descritos aquí.

20 [0102] En algunos ejemplos, los patógenos inactivados se unen a nanopartículas cargadas de adyuvante a través de un par de parejas de unión que forman interacciones no covalentes altamente específicas entre sí. Los pares de unión adecuados son bien conocidos en la técnica, p. ej., biotina y avidina, biotina y estreptavidina, biotina y neutravidina, glutatión-S-transferasa y glutatión, proteína de unión a maltosa y amilasa, y proteína de unión a maltosa y maltosa.

25 Métodos de uso de las composiciones de vacuna

[0103] Las composiciones de vacuna descritas en este documento son útiles como vacunas profilácticas, que confieren protección inmune en un sujeto contra la infección posterior por los patógenos específicos contenidos en la vacuna. Por ejemplo, el patógeno puede ser una bacteria, como *Chlamydia trachomatis*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholera*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* o *Salmonella typhimurium*; o un virus, como el virus de la influenza, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C. Los sujetos con riesgo de desarrollar enfermedad a partir de un patógeno infeccioso pueden tratarse profilácticamente con las composiciones de vacuna descritas en el presente documento. Se puede considerar que un individuo que viaja o vive en un área de enfermedad infecciosa endémica está en riesgo y es un candidato para la vacunación profiláctica contra el patógeno infeccioso particular. El tratamiento preventivo se puede aplicar a cualquier número de enfermedades relacionadas con patógenos donde existe una relación conocida entre la enfermedad particular y un factor de riesgo particular, como la ubicación geográfica o el entorno laboral.

40 [0104] Las composiciones de vacuna también son útiles como vacunas terapéuticas, que pueden ser utilizadas para iniciar o mejorar una respuesta inmune del sujeto a un patógeno contratado. Los sujetos que han contraído un patógeno infeccioso pueden ser tratados terapéuticamente con las composiciones de vacuna descritas en este documento.

45 [0105] La capacidad de estas composiciones de vacunas para provocar respuestas inmunitarias de la mucosa mediadas por células T hace que estas composiciones sean especialmente útiles para prevenir y tratar enfermedades infecciosas causadas por bacterias, virus, parásitos, hongos u otros patógenos microbianos que ingresan a un sujeto a través de las membranas mucosas.

50 [0106] El resultado deseado de una respuesta inmune profiláctica o terapéutica puede variar de acuerdo a la enfermedad, de acuerdo con principios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una respuesta inmune contra un patógeno puede inhibir o prevenir la colonización y la replicación del patógeno, efectuando la inmunidad protectora y la ausencia o reducción de cualquier síntoma de la enfermedad. Sin embargo, una vacuna contra los patógenos puede considerarse efectiva si reduce el número, la gravedad o la duración de los síntomas; si reduce el número de individuos en una población con síntomas; o incluso si simplemente reduce la transmisión de un patógeno infeccioso. El tratamiento puede realizarse en una dosis única o repetirse a intervalos. La dosificación apropiada depende de varios parámetros entendidos por los artesanos expertos, tales como la composición de la vacuna en sí, la vía de administración o la condición del sujeto a vacunar (peso, edad y similares).

60 Administración

[0107] En general, las vacunas pueden administrarse por una variedad de rutas que incluyen, pero no se limitan a: oral, inhalación (nasal, bronquial o pulmonar), intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, transdérmica, subcutánea, tópica, sublingual, vaginal, o medios rectales.

65 [0108] Las composiciones de vacuna y composiciones para uso en métodos de prevención o tratamiento de infecciones dados a conocer en el presente documento son particularmente eficaces a través de la administración

mucosa a los tractos orales/alimentarios, respiratorios, o genitourinarios. Por ejemplo, las composiciones de vacuna se pueden administrar a través de una ruta ocular, intranasal, oral, bucal, sublingual, amigdalina, bronquial, pulmonar, gástrica, intestinal, rectal, vaginal o urinaria. En algunos ejemplos, las composiciones de vacuna pueden administrarse por vacunación intranasal. Los métodos de vacunación intranasal incluyen la administración de una gotita, aerosol o forma de polvo seco de la vacuna, p. ej., composición de vacuna nebulizada o en aerosol, en la nasofaringe del individuo a inmunizar. Las rutas de administración alternativas incluyen la administración intravaginal e intrarrectal, y se pueden utilizar supositorios para la administración rectal o vaginal. Las composiciones de vacuna pueden administrarse por vía vaginal, y pueden usarse excipientes farmacéuticamente aceptables para administración vaginal, que incluyen emulsionantes, polímeros tales como CARBOPOL® y otros estabilizadores conocidos de cremas y supositorios vaginales. Las composiciones de vacuna pueden administrarse por vía rectal, y pueden incluirse ceras y polímeros conocidos en la técnica para formar supositorios rectales. En algunos ejemplos, la composición de la vacuna puede administrarse por vía oral o por otra vía gastrointestinal. Las formulaciones entéricas tales como cápsulas gastrorresistentes y gránulos para administración oral son adecuadas para dicha administración.

[0109] Dirigir las composiciones de vacuna directamente a las membranas mucosas facilita en gran medida la capacidad de las composiciones de vacuna para inducir inmunidad de la mucosa. La inmunidad de la mucosa es esencial para la protección contra las infecciones por patógenos antes de que crucen la barrera de la mucosa. Además, la vacunación de la mucosa a través de una ruta, como la vacunación intranasal, puede inducir inmunidad de la mucosa no solo en ese sitio de la mucosa, sino también en sitios distantes de la mucosa como la mucosa genital (Mestecky, Journal of Clinical Immunology, 7: 265-276, 1987) Además de su superioridad en la inducción de respuestas inmunodeficientes de la mucosa, otra ventaja atractiva de la vacunación de la mucosa se basa en su capacidad para inducir también una buena inmunidad sistémica. La administración de la mucosa también evita las inyecciones dolorosas y el efecto negativo asociado en los pacientes, especialmente cuando se requieren refuerzos para mantener una inmunidad vigorosa. La administración de las composiciones de vacuna puede lograrse mediante cualquier método aceptable que permita que una cantidad efectiva de la vacuna alcance su objetivo. Los penetrantes apropiados para la administración de la mucosa pueden incluirse en las composiciones de vacuna, p. ej., detergentes, sales biliares o derivados de ácido fusídico. El modo particular seleccionado dependerá de factores tales como la composición particular, la gravedad del estado del sujeto a tratar y la dosis requerida para inducir una respuesta inmune efectiva en el sujeto. Como se usa generalmente aquí, una "cantidad efectiva" es la cantidad que es suficiente para inducir una respuesta inmune en el sujeto tratado. Las cantidades efectivas reales de vacuna pueden variar de acuerdo con el patógeno específico y el adyuvante que se utiliza, la composición de la vacuna en particular formulada, el modo de administración y la edad, peso, estado del individuo que se está vacunando, así como la ruta de administración y la enfermedad o trastorno.

EJEMPLOS

[0111] La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. La inmunización con *chlamydia trachomatis* inactivada induce tolerancia inmunitaria regulada por células T reguladoras

[0112] Las bacterias del género clamidia causan una gran cantidad de enfermedades oculares, genitales y respiratorias, tales como conjuntivitis y tracoma cegador, uretritis no gonocócica, cervicitis, enfermedad pélvica inflamatoria, embarazo ectópico, infertilidad por factor tubárico y neumonía intersticial (Igietseme et al., Expert Review of Vaccines 10: 1585-1596, 2011). *chlamydia trachomatis* (en adelante "*Chlamydia*" o "Ct") es un patógeno intracelular obligado que alterna en su ciclo de vida entre un cuerpo elemental infeccioso (EB) y un cuerpo reticulado (RB) metabólicamente activo. Actualmente no hay vacunas disponibles para su uso en humanos contra la infección por *chlamydia trachomatis* (Igietseme et al., Expert Review of Vaccines 10: 1585-1596, 2011).

[0113] Primero se examinó una vacuna basada en *clamidia* inactivada por su efecto protector inmunitario. Los cuerpos elementales patógenos vivos de clamidia se inactivaron por exposición a la luz UV durante 30 minutos. La bacteria clamidia inactivada se aisló infectando las células McCoy para excluir la clamidia que prolifera activamente.

[0114] Los ratones se inmunizaron intrauterinamente con clamidia infecciosa o inactivada con UV. La inoculación intrauterina se realizó utilizando el dispositivo de transferencia de embriones no quirúrgico (NSET, ParaTechs) siguiendo las instrucciones adjuntas. Los ratones se sujetaron brevemente mientras se insertaba un pequeño "espejo" de plástico pequeño en la vagina. Esto permitió colocar una punta de micropipeta especial (en una pipeta normal) para el suministro preciso de 10-20 ml de la bacteria clamidia a través del cuello uterino.

[0115] Cuatro semanas después de la inmunización, los ratones inmunizados y de los ratones de control no tratados fueron desafiados intrauterinamente con 10^6 unidad infecciosa (IFU) de *clamidia* viva. Seis días después, se recogieron los úteros de todos los ratones expuestos y se prepararon muestras de ARN a partir de los úteros. Se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) para detectar y determinar la cantidad de ARN de clamidia 16s en relación con la cantidad de deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato de ratón (GAPDH). Se calculó la cantidad normalizada de ARN de clamidia 16s para cada ratón de cuatro experimentos independientes y se presentó como carga de clamidia en la FIG.

1A. La inmunización intrauterina con *clamidia* infecciosa dio como resultado una carga reducida de *clamidia* y protección inmune contra la posterior exposición intrauterina por *clamidia* viva (FIG. 1A). Sin embargo, la inmunización intrauterina con *clamidia* inactivada por UV (UV-Ct) dio como resultado una mayor susceptibilidad a la posterior exposición a *clamidia* viva, lo que indica que la *clamidia* inactivada por UV indujo tolerancia inmunitaria (FIG. 1A). Esto sugiere que las bacterias inactivadas por sí solas no inducen protección, sino más bien tolerancia inmune.

[0116] A continuación, los diferentes tipos de adyuvantes se administraron conjuntamente con *Clamidia* inactivada por UV para ver si pueden superar la tolerancia inmune inducida por la *clamidia* inactivada. Los ratones se inmunizaron intrauterinamente con *clamidia* infecciosa, *clamidia* inactivada con UV o *clamidia* inactivada con UV con uno de los siguientes adyuvantes: hidróxido de aluminio (alumbre); imiquimod (IMQ); o oligodesoxinucleótido CpG tipo C (CpG). Cuatro semanas después de la inmunización, los ratones inmunizados y los ratones controles ingenuos se expusieron por vía intrauterina o subcutánea con *clamidia* viva como se describió anteriormente. Las cargas de *clamidia* se midieron por qPCR el día 6 después del desafío, y los datos de un experimento representativo se mostraron en la FIG. 1B. La inmunización intrauterina con *clamidia* inactivada por UV volvió a producir tolerancia inmune y la administración conjunta de adyuvantes no supera el efecto de tolerancia inmune (FIG. 1B). La inmunización subcutánea con *clamidia* inactivada por UV no proporcionó protección o tolerancia para el desafío de *clamidia* genital posterior incluso cuando se administró conjuntamente con Alum, IMQ o CpG (Figura 1B).

[0117] El tipo de célula T específica que media la tolerancia inmune se investigó mediante el uso de *clamidia* TCR específico de ratones transgénicos. Células T CD4⁺ de tipo silvestre CD90.1⁺ transgénicas (células NR1) se transfirieron a ratones huesped CD90.2⁺. Un día después, los ratones receptores se inocularon intrauterinamente con 10⁶ IFU de *clamidia* infecciosa o inactivada con UV. En el día 4 después de la infección, se recogieron los ganglios linfáticos de drenaje y se prepararon las células para citometría de flujo. Las células T CD90.1⁺ CD4⁺ transferidas se analizaron para determinar la expresión intracelular de FoxP3, que es un marcador para las células T reguladoras (Treg). Se observó un aumento significativo de células CD25 con alto contenido de NR1 de FoxP3 en el útero y el drenaje de LN después de la inmunización con UV-Ct (Figuras 1C-1D). Estas células FoxP3⁺ se generaron por conversión en lugar de proliferación porque la transferencia de células eGFP⁻ NR1, aisladas por FACS, produjo números similares de Tregs (Figuras 1C-1D). Estos datos sugieren que la inmunización con UV-Ct conduce a la inducción de FoxP3⁺ Tregs y puede explicar por qué este enfoque de vacuna es ineficaz e induce tolerancia inmune.

[0118] CD25 es un marcador establecido para las células CD4⁺ FoxP3⁺ Treg en ratones. Para determinar si los Tregs eran responsables de la tolerancia, las células Treg se agotaron mediante tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-CD25 tres días antes y después de la exposición a *clamidia* en ratones previamente vacunados con UV-Ct. La carga de *clamidia* se examinó como se describió anteriormente. Específicamente, los ratones se inmunizaron intrauterinamente con 10⁶ IFU de *clamidia* inactivada con UV. Cuatro semanas más tarde, los ratones inmunizados y los controles ingenuos fueron desafiados con 10⁶ IFU de *clamidia* infecciosa. Tres días antes del desafío y tres días después del desafío, los ratones inmunizados fueron tratados con un anticuerpo monoclonal anti-CD25 (PC61,5) o IgG control (500 mg). Las cargas de *clamidia* se midieron por qPCR el día 6 después del desafío. El agotamiento de Tregs redujo los niveles de *clamidia* en el tracto genital en relación con el control de ratones tratados con IgG (Figura 1E), lo que indica que las células CD4⁺ FoxP3⁺ Treg juegan un papel crítico en la mediación de la tolerancia inmune inactivada inducida por *clamidia*.

[0119] Cuando se activan, las células Treg secretan grandes cantidades de interleucina-10 (IL-10). Por lo tanto, se examinó el papel de IL-10 en la tolerancia inmunitaria inducida por *clamidia* inactivada. Los ratones de tipo silvestre o IL-10^{-/-} se inmunizaron intrauterinamente con *clamidia* infecciosa o inactivada con UV. Desafiados con *clamidia* viva y la determinación de las cargas de *clamidia* se realizaron como se describió anteriormente. La deficiencia de IL-10 anuló la tolerancia inmune inducida por *clamidia* inactivada (Figura 1F), confirmando que la IL-10 secretada por Treg juega un papel crítico en la tolerancia inmune inducida por *clamidia* inactivada.

[0120] Estos resultados indican que la vacunación con UV-Ct estimula la tolerancia mediante la inducción de Tregs CD4⁺ específicos de *clamidia* de una manera dependiente de IL-10.

Ejemplo 2. Generación y evaluación de composiciones de vacunas de *Chlamydia trachomatis*

[0121] Se prepararon y evaluaron composiciones de vacunas que incluyen *clamidia* inactivada por UV unida a nanopartículas poliméricas cargadas de adyuvante. El agonista TLR7 R848 se usó como un ejemplo de los adyuvantes adecuados que se pueden incluir en la composición de la vacuna. R848 se unió covalentemente a PLA y se ensambló en nanopartículas que estaban ligeramente cargadas negativamente y PEGiladas en la superficie a pH fisiológico 7,4. Disminuir el pH a 6 activa el mecanismo de cambio de superficie, lo que resulta en cargas superficiales positivas de las nanopartículas y posterior unión a *clamidia* cargada negativamente (Figura 2A).

Síntesis de polímeros

[0122] La poli (L-histidina) (PLH) fue sintetizada a medida por GenScript (Piscataway, NJ) para contener una lisina N-terminal y una cisteína C-terminal con 20 residuos de histidina entre (secuencia N- a C-terminal): KH₂₀C). Este péptido KH₂₀C (0,01 mmol) se mezcló con 0,01 mmol de metoxi poli (etilenglicol) modificado con ortopiridilo (mPEG-OPSS,

adquirido de Laysan Bio, Arab, AL) en agua para generar el copolímero dibloque PLH-PEG, que se purificó por diálisis utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer de 2,000 MWCO (Thermo Scientific) y producto liofilizado a seco.

[0123] Por separado, 5 μ Mol de poli (ácido láctico-co-glicólico)-COOH (PLGA-COOH) con una viscosidad inherente de 0,67 (comprado en LACTEL Absorbables) se activó por 0,246 mmol de 1-etilo-3-(3- dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC) y 0,295 mmol de N-hidroxisuccinimida (NHS) en 2 ml de diclorometano. El PLGA-NHS se precipitó con metanol a -20°C y se secó al vacío a 50°C. El PLGA-NHS seco (104,9 mg) se acopló luego a un copolímero dibloque PLH-PEG de 24,8 mg (sintetizado como se describe anteriormente) mediante reacción durante al menos 24 horas en DMSO para generar un copolímero tribloque PLGA-PLH-PEG. El copolímero dibloque PLGA-PEG se adquirió de Boehringer Ingelheim GmbH.

[0124] El R848-PLA (ácido poliláctico) se sintetizó por polimerización de apertura de anillo. R-848, (100 mg, 3,18 X 10⁻⁴ moles, de InVivogen), D/L lactida (5,6 gm, 3,89 X 10⁻² moles, de Sigma Aldrich) y sulfato de sodio anhidro (4,0 gm) se secaron al vacío a 50°C durante 8 horas y posteriormente se añadió tolueno (100 ml). La reacción se agitó en un baño de aceite ajustado a 120°C y luego se añadió etilhexanoato de estaño (75 mg, 60 ml). Luego se continuó el calentamiento bajo argón durante 16 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de agua y posteriormente con tolueno adicional (200 ml). La solución de tolueno se lavó a su vez con solución de cloruro de sodio al 10% que contenía ácido clorhídrico al 5% (200 ml) seguido de bicarbonato de sodio saturado (200 ml). La solución se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó al vacío para dar 3,59 gramos de conjugado de ácido poliláctico-R-848. Una porción del polímero se hidrolizó en la base y se examinó por HPLC para determinar el contenido de R-848. En comparación con una curva estándar de concentración de R-848 con la respuesta de HPLC, se determinó que el polímero contenía 5,6 mg de R-848 por gramo de polímero. El peso molecular del polímero se determinó mediante GPC en alrededor de 27,000 (véase la solicitud de patente de EE.UU. N° 20110268805).

Preparación de nanopartículas poliméricas cargadas con R848

[0125] Nanopartículas cargadas con R848 se prepararon mediante la emulsión de una fase orgánica que contiene el polímero en una solución acuosa de fase, como se ha descrito previamente (Kamaly et al, Chem Soc Rev., 41: 2971 - 3010, 2012). La fase orgánica se preparó mezclando los siguientes tres polímeros: (1) poli (ácido láctico-co-glicólico)-bloque-poli(L-histidina)-bloque-poli(etilenglicol) (PLGA-PLH-PEG) co-polímeros de tribloque (40% en peso), (2) copolímeros dibloque PLGA-PEG (20% en peso) y (3) conjugados de poli (ácido láctico)-R848 (PLA-R848) (40% en peso). Los copolímeros PLGA-PEG se añadieron para mejorar la estabilidad de la fase orgánica. La formación de conjugados de ingredientes activos con polímeros biodegradables mejora la encapsulación y controla la liberación de ingredientes activos de nanopartículas basadas en PLGA o PLA (Kolishetti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 107: 17939-17944, 2010).

Formulación de la vacuna

[0126] En una formulación típica, las nanopartículas diseñadas para unirse a la bacteria clamidia se prepararon mezclando 5,33 mg de polímero que contiene PLH con 2,66 mg de PLGA-PEG y 5,33 mg de conjugado R848-PLA juntos en 400 μ l de una solución 15/85 DMSO/acetato de etilo. Las nanopartículas de control que no estaban cargadas positivamente se formularon de manera similar, solo usando 8,0 mg de PLGA-PEG y 5,33 mg de R848-PLA. Para las nanopartículas que no contenían R848-PLA, se usó una cantidad igual de PLGA (viscosidad inherente de 0,67, absorbibles LACTEL). La solución orgánica que contiene el polímero se sonicó en 2 ml de agua pura utilizando un sonicador de punta de sonda (Misonix Sonicator S-4000, Farmingdale, NY) durante 30 segundos en modo continuo con una amplitud del 40%, y luego se diluyó en 8 ml de agua pura bajo agitación magnética en una campana extractora. El disolvente se dejó evaporar durante al menos 2 horas, momento en donde las nanopartículas se recogieron y purificaron mediante ultrafiltración repetida usando filtros de corte Amicon Ultra-4 100,000 NMWL (Millipore, Billerica, MA).

[0127] Las nanopartículas poliméricas (40% en peso de PLGA-PLH-PEG, 40% en peso de PLA-R848, 20% en peso de PLGA-PEG) (0,67 mg/dosis) se incubaron con 107 IFU por dosis de clamidia inactivada por UV en una solución salina diluida a pH 6,0. A este pH, las nanopartículas producen una carga superficial positiva (potencial zeta 20,7 \pm 1,0 mV) y pueden unirse a la superficie de las bacterias inactivadas por UV cargadas negativamente (potencial zeta - 12,9 \pm 0,6 mV), formando los conjugados deseados de nanopartículas de *clamidia* (Figura 2A). Como formulación de control, se preparó y procesó una formulación que contenía: (1) PLGA-PEG (60% en peso) y (2) conjugado PLA-R848 (40 % en peso) con los mismos pasos que anteriormente.

[0128] La unión de nanopartículas cargadas con R848 (también llamadas "partículas adyuvantes sintéticas de carga de conmutación" (cSAPs)) a clamidia inactivada se examinó por microscopía de fuerza atómica. FIG. 2B es una imagen crio-TEM (microscopio electrónico de transmisión criogénica) que muestra la unión de nanopartículas cargadas con R848 a la superficie de *chlamydia trachomatis* inactivada en condiciones de pH bajo, p. ej., a pH 6. La dispersión dinámica de la luz confirma la unión de las nanopartículas cargadas con R848 a bacterias de *clamidia* inactivadas al revelar diferencias de tamaño de construcciones UV-Ct-cSAP en comparación con UV-Ct o cSAPs solas (FIG. 2C).

[0129] La *clamidia* inactivada por UV (UV-Ct) se tiñó con un kit de tinción BacLight y luego se incubó con cSAP

marcado con Alexa Fluor 488 o partículas de control que carecen del grupo PLH (SAP) a un pH de 7,4 y 6,0. La citometría de flujo se usó para examinar la unión entre UV-Ct y cSAP o SAP. UV-Ct se une a cSAP solo a pH 6, no a pH 7,4 (FIGS. 2D-2E).

5 Evaluación de las composiciones de vacuna

10 **[0130]** Se examinó el efecto protector inmunitario de una composición de vacuna que incluye *Chlamydia* inactivada por UV unida a nanopartículas cargadas con R848. Los ratones se inmunizaron por vía intrauterina con 10^6 IFU de *Chlamydia* infecciosa, o una composición de vacuna que incluye *Chlamydia* inactivada con UV (UV-Ct), UV-Ct unida a nanopartículas cargadas con R848, UV-Ct unida a nanopartículas vacías o UV-Ct mezclada con R848. Cuatro semanas después de la inmunización, los ratones inmunizados y los ratones de control sin tratamiento fueron desafiados con 10^6 IFU de *Chlamydia* viva. Las cargas de *Chlamydia* se midieron por qPCR el día 6 después del desafío. La inmunización con una composición de vacuna que incluye *Chlamydia* inactivada por UV unida a nanopartículas cargadas con R848, pero no las otras composiciones, protege a los ratones contra los posteriores desafíos de *Chlamydia* vivos (FIG. 2F). En ciertas condiciones, las nanopartículas cargadas con R848 se neutralizaron con hidróxido de sodio (NaOH) antes de unirse a la *Chlamydia* inactivada por UV. En algunas otras condiciones, las nanopartículas cargadas con R848 se diluyeron 1:10 o 1:100 veces antes de unirse a la *Chlamydia* inactivada por UV. Una titulación o neutralización de 1:10 de las nanopartículas cargadas con R848 antes de la unión a la *Chlamydia* inactivada con UV no cambia la propiedad protectora inmune de la composición de la vacuna (FIG. 2G).

20 **[0131]** La inducción de IgG anti-*Chlamydia* en el suero mediante *Chlamydia* viva, *Chlamydia* inactivada con UV y UV-Ct-cSAP se determinó mediante ELISA. Los datos se presentaron en la FIG. 2H como densidades ópticas (OD) para suero de ratones individuales. UV-Ct-cSAP fue capaz de inducir IgG en ratones al nivel similar a la *Chlamydia* viva (FIG. 2H).

25 **Ejemplo 3. Inmunidad protectora inducida por composiciones de vacuna de *Chlamydia trachomatis* está mediada por células T CD4⁺**

30 **[0132]** Para examinar las células efectoras que median la inmunidad protectora, ratones C57BL/6 tipo silvestre, DHLMP2a^{-/-} (deficiente en anticuerpos), μ Mt (deficiente en células B), CD8^{-/-}, MHC clase II^{-/-} (falta reconocimiento de antígeno por las células T CD4⁺) y ratones RAG-2^{-/-} (carecen de linfocitos T y B) se inmunizaron con la nueva composición de vacuna que incluye nanopartículas cargadas con R848 unidas a *Chlamydia* inactivada por UV, y se expusieron un mes después en el tracto genital con *Chlamydia* infecciosa. La inmunidad protectora contra la posterior infección por *Chlamydia* se conservó en los ratones DHLMP2a^{-/-} (deficiente en anticuerpos), μ Mt (deficiente en células B) y CD8^{-/-}; pero perdido en MHC clase II^{-/-} (falta reconocimiento de antígeno por las células T CD4⁺) y ratones RAG-2^{-/-} (falta linfocitos T y B) (Figuras 3A-3C). Estos hallazgos indican que las células T CD4⁺ pueden desempeñar un papel importante en la mediación de la inmunidad protectora estimulada por la nueva composición de la vacuna, incluidas las nanopartículas cargadas con R848 unidas a la *Chlamydia* inactivada por UV.

40 **[0133]** Para confirmar que las células T CD4⁺ median la inmunidad protectora estimulada por la nueva composición de vacuna, los ratones fueron inmunizados con *Chlamydia* infecciosa (Ct), *Chlamydia* inactivada por UV (UV-Ct), o la nueva composición de vacuna (UV-Ct-cSAPs). Cuatro semanas después, se aislaron células T CD4⁺ o CD8⁺, o linfocitos empobrecidos en células T de los ratones inmunizados o ratones de control y se transfirieron a ratones ingenuos. Un día después de la transferencia, los ratones receptores fueron desafiados con 10^6 IFU de *Chlamydia* viva y el útero de esos ratones se cosecharon 6 días después del desafío. Las cargas de *Chlamydia* se determinaron como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

50 **[0134]** Se observó inmunidad protectora contra la posterior exposición a *Chlamydia* en ratones receptores que se transfirieron con células T CD4⁺ obtenidas de ratones inmunizados con *Chlamydia* infecciosa o la nueva composición de vacuna, pero no en otros ratones receptores (FIG. 3D). La transferencia de células T CD4⁺ de ratones que habían sido inmunizados solo con *Chlamydia* inactivada, confirió una mayor susceptibilidad a la posterior exposición a *Chlamydia*, lo que confirma que la tolerancia inmune también depende de las células T CD4⁺ (FIG. 3D). Así, la FIG. 3D muestra que la inmunidad protectora estuvo mediada por las células T CD4⁺, no por las células T CD8⁺ u otros linfocitos.

55 **[0135]** La inducción de células T CD4⁺ específicas de *Chlamydia* por la nueva composición de vacuna se examinó usando ratones transgénicos de receptor de células T (TCR) específicas de *Chlamydia*. Células T CD4⁺ CD90.1⁺ transgénicas de tipo silvestre (células NR1) se marcaron con un colorante fluorescente carboxifluoresceína diacetato succinimidilo éster (CFSE) y se transfirieron a ratones anfitrión CD90.2 un día antes de la inmunización. Los ratones receptores se expusieron intrauterinamente con 10^6 IFU de *Chlamydia* infecciosa (Ct), *Chlamydia* inactivada por UV (UV-Ct), o la nueva composición de vacuna (UV-Ct-cSAPs). En el día 4 después del desafío, se recogieron los ganglios linfáticos de drenaje y el útero de los ratones receptores y se analizaron por citometría de flujo. Se enumeró el número absoluto de células T CD4⁺ transgénicas específicas de *Chlamydia* en el ganglio linfático y el útero. Significativamente, se acumularon más células NR1 en el útero y el drenaje de LN de los ratones expuestos a *Chlamydia* infecciosa o la nueva composición de la vacuna en comparación con los ratones expuestos a *Chlamydia* inactivada por UV (FIG. 4A).

65

[0136] La proliferación de células T CD90.1⁺ CD4⁺ transgénicas específicas de *clamidia* de los ganglios linfáticos se analizó para determinar la dilución de CFSE por citometría de flujo. Las células T CD90.1⁺ CD4⁺ retuvieron altos niveles de CFSE después de la transferencia a ratones no infectados, lo que demuestra que esas células T CD90.1⁺ CD4⁺ no proliferaron en ausencia de infección (FIG. 4B). Los ratones infectados con *clamidia* inactivada por UV (UV-Ct) tienen niveles comparables de células T CD4⁺ específicas de *clamidia* como los ratones de control, lo que indica que no hay estimulación de T CD4⁺ específica de *clamidia* en esos ratones tampoco (FIG. 4B). Por otro lado, el número de células T CD90.1⁺ CD4⁺ en ratones expuestos a *Clamidia* infecciosa (Ct) o la nueva composición de la vacuna (UV-Ct-cSAP) superó en gran medida a las de los ratones de control no infectados o ratones expuestos a UV-Ct (FIG. 4B). Estos hallazgos indican que la nueva composición de la vacuna indujo la proliferación de células T CD4⁺ específicas de *clamidia* de una manera similar a la *clamidia* viva.

[0137] Se aislaron células T CD90.1⁺ transgénicas CD4⁺ de ganglios linfáticos en el día 4 después de la inmunización, re-estimuladas *in vitro* por estimuladores de células T de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina, y se tiñeron para producción de TNF- α intracelular, IFN- γ e IL-2. El número de células T CD90.1⁺ CD4⁺ que producen las tres citocinas fue significativamente mayor en ratones inmunizados con la nueva composición de vacuna o *Clamidia* infecciosa en comparación con ratones inmunizados con *Clamidia* inactivada por UV o los ratones de control (FIG. 4C), lo que indica la nueva composición de la vacuna indujo una respuesta activa de células T específicas de *clamidia* de manera similar a la *clamidia* viva.

[0138] Estos datos muestran que la vacunación con UV-Ct-cSAP dio como resultado la proliferación de células NR1 (FIG. 4B) y la acumulación en el útero y el drenaje de LN (FIG. 4A), que produjeron las citocinas TNF- α , IFN- γ , e IL-2 indistinguibles de ratones infectados con *clamidia* viva (FIG. 4C). Por lo tanto, el enlace directo de los adyuvantes a las bacterias inactivadas promueve una respuesta inmune celular específica de antígeno multifuncional que protege la mucosa contra la posterior infección bacteriana.

Ejemplo 4. Células dendríticas CD103⁻ del útero inducen células T específicas de *clamidia*

[0139] Las células presentadoras de antígeno CD45⁺ MHC-II⁺ se clasificaron en tres subconjuntos de acuerdo con F4/80 y expresión de CD103: macrófagos F4/80⁺ CD103⁻, células dendríticas F4/80⁻ CD103⁻ y células dendríticas F4/80⁻ CD103⁺, y se analizaron para CD11c, CD11b y expresión CX3CR1. Los macrófagos F4/80⁺ CD103⁻ mostraron una alta expresión de CD11b y CX3CR1, pero una baja expresión de CD11c; las células dendríticas F4/80⁻ CD103⁻ mostraron una alta expresión de CD11c, CD11b y CX3CR1; las células dendríticas F4/80⁻ CD103⁺ mostraron baja CD11b y CX3CR1, pero alta expresión de CD11c (FIG. 5A).

[0140] Los ratones se expusieron intrauterinamente con *clamidia* infecciosa (Ct), inactivada por UV (UV-Ct), o la nueva composición de vacuna (UV-Ct-cSAP). 18 o 24 horas después de la infección, se aislaron células CD45⁺ MHC-II⁺ de útero o ganglios linfáticos, y se clasificaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) según su expresión de CD103 y F4/80. Las cargas de *clamidia* se midieron por qPCR por 1000 células presentadoras de antígeno clasificadas. Las células epiteliales (CE) CD326⁺ aisladas del útero sirvieron como controles positivos. Células dendríticas CD103⁻ tienen cargas significativamente más altas de *clamidia* que F4/80⁺ macrófagos y células dendríticas CD103⁺ tanto en úteros (FIG. 5B.) como ganglios linfáticos (FIG. 5C.), indicando que células dendríticas CD103⁻ juegan un papel importante en el reconocimiento y la presentación de *Clamidia*.

[0141] Células T transgénicas CD4⁺ específicas a *clamidia* (células NR1) se marcaron con CFSE y co-cultivaron durante tres días con macrófagos F4/80⁺, células dendríticas CD103⁻, o células dendríticas CD103⁺ aisladas de los úteros de ratones intrauterinamente desafiados con infecciones por *clamidia* (Ct), inactivados por *clamidia* UV (UV-Ct), o la nueva composición de la vacuna (UV-Ct-cSAPs). La proliferación de células T transgénicas CD4⁺ específicas de *clamidia* se midió por dilución CFSE. CD103⁻: las células dendríticas aisladas del útero de ratones inmunizados con *clamidia* infecciosa, pero no las otras células presentadoras de antígeno, inducen la proliferación de células T transgénicas CD4⁺ específicas de *clamidia in vitro* (FIG. 5D). El efecto de las células dendríticas CD103⁻ sobre las células T transgénicas CD4⁺ específicas de *clamidia* se examinó luego *in vivo*. Las células T CD4⁺ transgénicas CD90.1⁺ de tipo silvestre se marcaron con CFSE y se transfirieron a ratones huésped CD90.2. Un día después, se inyectó a los ratones receptores en la almohadilla del pie derecho con macrófagos F4/80⁺ + aislados, células dendríticas CD103⁻ o células dendríticas CD103⁺ aisladas del útero de ratones inmunizados con *clamidia* infecciosa (Ct), inactivados por *Clamidia* UV (UV-Ct), o la nueva composición de la vacuna (UV-Ct-cSAPs). Los ganglios linfáticos poplíteos izquierdos y derechos se analizaron para células T CD4⁺ transgénicas diluidas con CFSE CD90.1⁺ 3 días después de la inyección de células. Una vez más, células dendríticas CD103⁻ aisladas de los úteros de ratones inmunizados con Ct vivo o UV-CT-CSAPs, pero no otras células presentadoras de antígeno, inducir la proliferación de *clamidia* específicos de células T transgénicas CD4⁺ en ganglios linfáticos poplíteos derechos (FIG. 5E). Por lo tanto, células dendríticas CD103⁻ del útero inducen la proliferación de células T específicas a *clamidia* tanto *in vitro* como *in vivo*.

[0142] Estos datos muestran que células dendríticas CD103⁻ ordenadas desde ratones infectados por *clamidia* viva o inmunizados por UV-Ct-CSAP estimularon proliferación de células NR1 *in vitro* y *in vivo* como se mide mediante dilución CFSE (FIG. 5D-5E.). Las células dendríticas CD103⁺ fueron capaces de promover una proliferación de NR1 significativa después de la inmunización con UV-Ct solamente (FIG. 5D) aumentando el número de células

FoxP3⁺CD25⁺NR1 (FIG. 5F). En conjunto, estos resultados demuestran que después de infección con clamidia o inmunización de UV-Ct-CSAP, las células dendríticas CD103⁻ de la mucosa genital trafican antígenos de clamidia y directamente activan células T CD4⁺ específicas a clamidia para promover la inmunidad protectora. Por el contrario, la radiación UV-Ct no es eficiente tomada por la población de células dendríticas CD103⁻, más bien, que se encuentra en células dendríticas CD103⁺, que conduce a la inducción de células T reguladoras que podrían influir en el equilibrio entre la protección y la tolerancia en la mucosa genital.

Ejemplo 5. La inmunidad protectora de mucosa cruzada inducida por composiciones de vacuna *chlamydia trachomatis*

[0143] Se evaluó la duración de la inmunidad protectora inducida por las nuevas composiciones de vacuna. Los ratones fueron desafiados intrauterinamente con *chlamydia* viva seis meses después de la inmunización intrauterina sin nada, *chlamydia* infecciosa o inactivada, o la nueva composición de la vacuna (UV-Ct-cSAPs). Las cargas de *chlamydia* se determinaron como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. La inmunización intrauterina con la nueva composición de vacuna o la *Chlamydia* infecciosa, pero no la *Chlamydia* inactivada, dio como resultado la protección contra la posterior infección genital por *Chlamydia* durante al menos seis meses después de la inmunización (Figuras 6A), indicando la presencia de inmunidad a largo plazo.

[0144] También se probaron diferentes rutas de administración de vacunas. Las nuevas composiciones de vacunas se administraron a través de otra interfaz de la mucosa: membrana mucosa intranasal, o por la ruta tradicional: por vía subcutánea. Para el desafío intranasal, se anestesió a los ratones y se colocó una gota de las composiciones de la vacuna en su fosa nasal hasta que se inhaló. Para la inoculación subcutánea, las composiciones de vacuna se administraron debajo de la piel en la base de la cola o el flanco. Cuatro semanas después de la inmunización, los ratones se expusieron por vía intrauterina con *chlamydia* infecciosa y se determinó la carga de *chlamydia*. La inmunización intranasal, pero no subcutánea, con la nueva composición de vacuna (UV-Ct-cSAP) dio como resultado una inmunidad protectora contra la posterior infección genital por *chlamydia* (FIG. 6B). Por lo tanto, la nueva composición de la vacuna indujo la inmunidad protectora cruzada de la mucosa.

[0145] A continuación, las células T CD4⁺ de tipo silvestre CD90.1⁺ transgénicas (NR₁) se transfirieron en ratones huésped CD90.2 un día antes de que se inmunizaron intrauterinamente (i.u.), por vía intranasal (i.n.) o por vía subcutánea (s.c.) con UV-Ct-cSAPs. En el día 7 después de la inmunización, se recogieron los úteros y se analizaron por citometría de flujo. Se enumeró el número absoluto de células T CD4⁺ transgénicas específicas de *chlamydia*. Las células T CD4⁺ transgénicas específicas de *chlamydia* migraron al tejido de la mucosa genital por inmunización intrauterina o intranasal, pero no por inmunización subcutánea (FIG. 6C).

[0146] Diferencias cuantitativa y/o cualitativas entre la respuesta de las células T específicas a *chlamydia* después de investigarse la inmunización intranasal y vacunación subcutánea. Las células de memoria que residen en el útero pueden imprimirse en los pulmones después de la inmunización, luego transitar hacia el tracto genital donde median la protección. Para probar esta hipótesis, los ratones fueron inyectados con células NR1 y luego inmunizados por diferentes rutas con la nueva composición de vacuna UV-Ct-cSAP. El número de células NR1 se cuantificó en varios órganos 7 y 30 días después de la vacunación. La inducción de las células circulatorias NR1 (p. ej., en la sangre, el bazo) así como el número de células NR1 en el ganglio linfático y el hígado fue comparable entre las diferentes rutas de inmunización (FIG. 6D).

[0147] En contraste, la inmunización intrauterina condujo a los más altos niveles de reclutamiento y la retención NR1 en la mucosa genital mientras que la vacunación subcutánea no condujo a ninguna retención NR1 (FIG. 6D). Curiosamente, un número significativo de células NR1 estaba presente en el útero incluso 30 días después de la inmunización intranasal (FIG. 6D). El número de células NR1 en los pulmones se invirtió en el número de células NR1 en el útero para la vacunación intranasal e intrauterina (FIG. 6D). Estos datos muestran que la inmunización por vía intrauterina o intranasal es suficiente para inducir el reclutamiento y retención de células NR1 protectoras en la mucosa genital.

[0148] Para diseccionar la función de las células T con memoria de circulación y residente de la mucosa, se inyectó a los ratones células NR1 y luego se vacunaron intranasalmente con UV-Ct-cSAP. Estos ratones inmunizados se dividieron en tres grupos y se trataron con anticuerpo monoclonal (mAb) anti-alfa-4 integrina ($\alpha 4$) y/o una IgG de control como se describe a continuación. Los tres grupos de ratones fueron desafiados con *chlamydia* viva por vía intrauterina nueve días después de la inmunización (D9). El primer grupo de ratones (Gr,1) se trató con el control IgG por vía intravenosa desde el día 3 hasta el día 11 (D3-11). El segundo grupo de ratones (Gr,2) se trató con mAb anti- $\alpha 4$ durante D3-11 para bloquear completamente la migración de células T específicas de *chlamydia*. El tercer grupo de ratones (Gr,3) se trató con la IgG de control durante D3-9 para permitir que las células T de memoria residentes en el tejido ingresen al tejido genital y luego se trató con mAb anti- $\alpha 4$ durante D9-11 después del desafío con *chlamydia* para bloquear el reclutamiento adicional de células T. El bloqueo de la integrina $\alpha 4$ previene eficazmente la acumulación de células T en el útero (FIG. 7C), pero no tuvo efecto sobre el número de células NR1 en el bazo (FIG. 7B). Las células NR1 sistémicas presentes en el bazo no se vieron afectadas por las inyecciones de anticuerpos $\alpha 4$ (FIG. 7D).

[0149] La FIG. 7E muestra que se observó acumulación de células NR1 en ratones Gr.1 que fueron tratados con IgG y ratones Gr. 3 que fueron tratados con mAb anti- α 4 solo después del desafío con *clamidia*, pero no en ratones Gr. 2 que fueron tratados con mAb anti- α 4 después de la vacunación y el desafío. FIG. 7F muestra que los ratones Gr. 3 tratados con mAb anti- α 4 solo después de la prueba de *clamidia* (el grupo que contiene células T de memoria residentes en el útero pero sin células de memoria circulatoria reclutadas adicionalmente) estaban significativamente protegidos contra la prueba de *clamidia* genital, en comparación con ratones de control ingenuos y ratones Gr. 2 tratados con mAb anti- α 4 después de la inmunización y el desafío.

Ejemplo 6. Las células T con memoria mucosa residente se inducen mediante inmunización en superficies mucosas distantes y confieren protección contra los desafíos bacterianos posteriores

[0150] Para probar el papel de las células T con memoria mucosa residente y las células T con memoria circulatoria reclutadas en la protección inducida por la vacuna contra posteriores desafíos de bacterias, se generaron e inmunizaron pares de ratones parabióticos como se muestra en la FIG. 8A. Uno de los compañeros parabióticos (CD45,2) se inmunizó por vía intranasal con UV-Ct-cSAP o UV-Ct antes (Grupo B) o después de la parabiosis (Grupo A), mientras que la otra pareja (CD45,1) no se inmunizó. Dos semanas después de la parabiosis, el quimerismo de los linfocitos fue superior al 45% (datos no mostrados). Ambos pares fueron desafiados con *clamidia* viva dos semanas después de la parabiosis o la inmunización, lo que ocurriera más tarde. El nivel de bacterias de *clamidia* en el útero de cada ratón se determinó mediante qPCR. Ambas parejas de los ratones del Grupo A estaban protegidas contra la subsiguiente exposición a *clamidia* genital (FIG. 8B).

[0151] Cuando dos ratones compartieron la circulación sanguínea antes de la inmunización con UV-Ct-cSAP, las células de memoria residentes en la mucosa inducidas por la inmunización pueden transitar hacia el útero de ambas parejas y conferir protección contra el posterior desafío bacteriano a ambos ratones. Para los ratones del Grupo B, solo la pareja inmunizada (CD45,2), no la otra pareja (CD45,1) estaba protegida contra la subsiguiente exposición a *clamidia* genital (FIG. 8C). El número de células NR-1 fue mayor en ratones que estaban protegidos contra la posterior infección genital por *clamidia* en comparación con los ratones que no estaban protegidos (Figuras 8D-8E). Es importante destacar que la inmunización intrauterina con UV-Ct indujo una tolerancia inmune que era independiente del momento de la parabiosis (Figuras 8F-8G).

[0152] Estos datos sugieren que las células T con memoria mucosa residente pueden ser inducidas por inmunización con la composición de vacuna descrita en el presente documento en una superficie mucosa distante y pueden conferir protección contra la posterior exposición bacteriana. Por el contrario, la inmunización con UV-Ct no modificado induce Tregs circulantes que influyen en la tolerancia inmune. Juntos, estos datos sugieren que la inmunidad cruzada de la mucosa se puede lograr usando las composiciones de vacuna contra la *clamidia* descritas en este documento.

Ejemplo 7. Generación y evaluación de la composición de la vacuna de *Francisella tularensis*

[0153] *Francisella tularensis* es una bacteria intracelular gramnegativa, que es altamente virulenta y causa tularemia. Existen varios tipos de tularemia, dependiendo de cómo y dónde ingresen las bacterias al cuerpo. La tularemia ulceroglandular es el tipo más común de tularemia, donde se forma una úlcera cutánea en el sitio de la infección, generalmente una picadura de insecto o animal. La tularemia neumónica causa signos y síntomas típicos de la neumonía y puede ser letal. Debido a su baja dosis infecciosa, la facilidad de propagación por aerosol y alta virulencia, *Francisella tularensis* está clasificada como un agente de Clase A por el gobierno de los Estados Unidos, junto con otros agentes potenciales del bioterrorismo como *Yersinia pestis*, viruela y ébola. Hay dos cepas de laboratorio diferentes de *Francisella tularensis*: la cepa atenuada LVS y la cepa completamente virulenta SchuS4. LVS se creó hace más de 50 años por el paso exhaustivo *in vitro* de la bacteria y se ha utilizado como vacuna viva. Los efectos secundarios adversos graves, la inmunidad incompleta y las propiedades inmunogénicas indefinidas hacen que LVS no sea una vacuna ideal.

[0154] Bacterias LVS vivas fueron inactivadas por exposición a la luz UV durante 30 minutos. Las bacterias LVS inactivadas se aislaron infectando células 293 de riñón embrionario humano (HEK) para excluir bacterias que proliferan activamente. Se prepararon nanopartículas cargadas con R848 y se unieron a *Francisella tularensis* inactivada con UV (UV-LVS) como se describe en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna que incluyen nanopartículas cargadas con R848 unidas a LVS inactivado con UV (UV-LVS-cSAP) se administraron a ratones intranasalmente. Los ratones de control se administraron por vía intranasal con LVS vivo o partículas de control (cSAP, UV-LVS, UV-LVS + SAP). Cuatro semanas después, los ratones inmunizados y los ratones de control se expusieron por vía intranasal con una dosis letal de LVS vivo, y se observó la supervivencia de estos ratones durante 21 días. FIG. 9A muestra que los ratones inmunizados con UV-LVS-cSAP estaban completamente protegidos contra la exposición posterior por la cepa LVS atenuada de *Francisella tularensis*.

[0155] Protección conferida por la composición de vacuna contra el desafío subsiguiente por el SchuS4 totalmente virulenta cepa de *Francisella tularensis* se investigó. Los ratones se inmunizaron por vía intranasal con UV-LVS-cSAP, o se trataron con LVS vivos, o partículas de control (UV-LVS o UV-LVS + SAP). Se realizaron dos inmunizaciones de refuerzo o tratamientos con la misma composición a intervalos de dos semanas. Cuatro semanas después, los ratones inmunizados y los ratones de control se expusieron por vía intranasal con la cepa SchuS4 completamente virulenta, y

se observó la supervivencia de estos ratones durante 30 días. FIG. 9B muestra que los ratones inmunizados con UV-LVS-cSAP estaban parcialmente protegidos contra el desafío posterior por la cepa SchuS4 completamente virulenta de *Francisella tularensis*.

5 [0156] Se estudió el efecto de la vía de administración en la inmunidad protectora. Los ratones fueron tratados con UV-LVScSAP, LVS vivo o UV-LVS + SAP, ya sea por vía subcutánea o intraperitoneal. Cuatro semanas después, los ratones inmunizados y los ratones de control se expusieron por vía intranasal con una dosis letal de LVS vivo, y se observó la supervivencia de estos ratones durante 21 días. La protección completa contra el desafío posterior con LVS se obtuvo después de la inmunización con UV-LVS-cSAP por la ruta intraperitoneal (FIG. 9C), pero no por la ruta subcutánea (FIG. 9D).

10 [0157] Se estudió la inducción de anticuerpos IgG e IgM cuatro semanas después de la inmunización con UV-LVS-cSAP. Los niveles de anticuerpos IgG inducidos (FIG. 9E) e IgM (FIG. 9F) fueron mayores en ratones inmunizados con UV-LVS-cSAP que en ratones vivos infectados con LVS. El tratamiento con las partículas de control (UV-LVS + SAP o UV-LVS) no indujo un aumento en los anticuerpos IgG o IgM (Figuras 9E-9F).

15 [0158] Estos datos sugieren que la inmunización con la composición de vacuna *Francisella tularensis* descrita en el presente documento es protectora contra los desafíos posteriores de *Francisella tularensis*.

20 **Ejemplo 8. Generación y evaluación de composición de vacuna *Streptococcus pneumoniae***

[0159] *Streptococcus pneumoniae*, o *neumococo*, es una bacteria Gram-positiva, alfa-hemolítica, aerotolerante anaeróbica. Una bacteria patógena humana importante, el *neumococo* es una causa importante de neumonía y puede aislarse en casi el 50% de los casos de neumonía. A pesar del nombre, el *neumococo* puede causar muchos tipos de infecciones neumocócicas que no sean neumonía, incluida la sinusitis aguda, otitis media, meningitis, bacteriemia, sepsis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, peritonitis, pericarditis, celulitis y absceso cerebral.

25 [0160] Bacterias de *neumococo* vivas son inactivadas mediante exposición a luz UV durante 30 minutos. Las bacterias de *neumococo* inactivadas se aíslan infectando las células 293 del riñón embrionario humano (HEK) para excluir las bacterias que proliferan activamente.

30 [0161] Las nanopartículas cargadas con R848 se preparan y se unen a *neumococos* inactivados con UV como se describe en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna que incluyen nanopartículas cargadas con R848 unidas a *neumococos* inactivados con UV se administran a ratones por vía intranasal y se evalúan por los métodos descritos en el Ejemplo 2. Un mes más tarde, los ratones inmunizados con la composición de la vacuna contra el *neumococo* y los ratones de control ingenuo se retan con *neumococo* vivo, y se preparan muestras de ARN a partir de tejidos de ratones. Las cargas de *neumococo* se miden por qPCR de ARN de *neumococo* 16s normalizado a GAPDH de ratón. Se determina que la composición de la vacuna contra el *neumococo* es efectiva cuando la carga de *neumococo* es menor en los ratones inmunizados con la composición de la vacuna que en los ratones de control.

35 40 **Ejemplo 9. Generación y evaluación de composición de la vacuna *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina**

[0162] *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) es cualquier cepa de *Staphylococcus aureus* que se ha desarrollado, a través del proceso de selección natural, resistencia a los antibióticos betalactámicos, incluyendo las penicilinas (metilicina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, etc.) y las cefalosporinas. Las cepas que no pueden resistir estos antibióticos se clasifican como *Staphylococcus aureus* sensible a la metilicina o MSSA. El desarrollo de dicha resistencia a los antibióticos no hace que las bacterias sean más intrínsecamente tóxicas que las cepas de *Staphylococcus aureus* que no tienen resistencia a los antibióticos, pero la resistencia hace que la infección por MRSA sea más difícil de tratar con tipos estándar de antibióticos y, por lo tanto, más peligroso.

45 50 [0163] *Staphylococcus aureus* coloniza más comúnmente las fosas nasales, otras vías respiratorias, heridas abiertas, catéteres intravenosos o el tracto urinario. Las personas sanas pueden portar MRSA asintóticamente durante períodos que van desde unas pocas semanas hasta muchos años. Los pacientes con sistemas inmunes comprometidos tienen un riesgo significativamente mayor de infección secundaria sintomática. MRSA es especialmente problemático en hospitales, prisiones y hogares de ancianos, donde los pacientes con heridas abiertas, dispositivos invasivos y sistemas inmunes debilitados tienen un mayor riesgo de infección que el público en general.

55 60 [0164] Los MRSA vivos se inactivan por exposición a la luz UV durante 30 minutos. Los MRSA inactivados se aíslan infectando las células 293 del riñón embrionario humano (HEK) para excluir las bacterias que proliferan activamente.

[0165] Las nanopartículas cargadas con R848 se preparan y se unen a MRSA inactivado por UV descrito en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna que incluyen nanopartículas cargadas con R848 unidas a MRSA inactivado por UV se administran a ratones por vía nasal y se evalúan por los métodos descritos en el Ejemplo 2. Un mes después, los ratones inmunizados con la composición de la vacuna MRSA y los ratones de control ingenuo se desafían con MRSA vivo, y se preparan muestras de ARN a partir de tejidos de ratones. Las cargas de MRSA se miden por qPCR de

MRSA 16s ARN normalizado a GAPDH de ratón. Se determina que la composición de la vacuna MRSA es efectiva cuando la carga de MRSA es menor en los ratones inmunizados con la composición de la vacuna que en los ratones de control.

5 **Ejemplo 10. Generación y evaluación de la composición de la vacuna del virus de la influenza A**

5 [0166] El virus de la influenza A es un género de la familia de virus Orthomyxoviridae y puede causar influenza en aves y mamíferos. Algunos aislamientos del virus de la influenza A causan enfermedades graves tanto en aves domésticas como en humanos. La transmisión de los virus de la influenza A de las aves acuáticas silvestres a las aves domésticas puede causar un brote y dar lugar a pandemias de influenza humana.

10 [0167] Los virus vivos de la Influenza A se inactivan por exposición a la luz UV durante 30 minutos. Los virus de Influenza A inactivados se aíslan infectando las células 293 del riñón embrionario humano (HEK) para excluir los virus que proliferan activamente.

15 [0168] Las nanopartículas cargadas con R848 se preparan y se unen a virus de Influenza A inactivados con UV como se describe en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna que incluyen nanopartículas cargadas con R848 unidas a virus de Influenza A inactivados con UV se administran a ratones por vía intranasal y se evalúan por los métodos descritos en el Ejemplo 2. Un mes después, los ratones inmunizados con las composiciones de vacuna de virus de Influenza A y los ratones de control ingenuo se desafían con virus de Influenza A vivos, y las muestras de ARN se preparan a partir de muestras de sangre de ratones. Las cargas del virus de la influenza A se miden por qPCR de ARN del virus de la influenza A normalizado a GAPDH de ratón. Se determina que la composición de la vacuna del virus de la influenza A es efectiva cuando la carga del virus de la influenza A es menor en los ratones inmunizados con la composición de la vacuna que en los ratones de control.

25 **Ejemplo 11. Generación y evaluación de composición de vacuna del virus humano sincitial respiratorio (VRS)**

30 [0169] El virus respiratorio sincitial humano (VRS) es un virus que causa infecciones del tracto respiratorio. El VRS es un virus de ARN monocatenario de sentido negativo de la familia *Paramyxoviridae*, que incluye virus respiratorios comunes como los que causan sarampión y paperas. VRS es miembro de la subfamilia de *paramixovirus Pneumovirinae*. Es una causa importante de infecciones del tracto respiratorio inferior y visitas al hospital durante la infancia y la niñez. En los Estados Unidos, el 60% de los bebés están infectados durante su primera temporada de VRS, y casi todos los niños se habrán infectado con el virus entre los 2-3 años de edad. Alrededor del 2-3% de los pacientes infectados con VRS desarrollan bronquiolitis, lo que requiere hospitalización.

35 [0170] Los virus VRS vivos se inactivan por exposición a la luz UV durante 30 minutos. Los virus VRS inactivados se aíslan infectando las células 293 del riñón embrionario humano (HEK) para excluir el virus de proliferación activa. También se puede preparar una vacuna contra el VRS utilizando partículas similares a virus o virus seudotipados que contienen proteínas de VRS antigénicas.

40 [0171] Las nanopartículas cargadas con R848 se preparan y se unen al VRS inactivado con UV como se describe en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna que incluyen nanopartículas cargadas con R848 unidas al VRS inactivado con UV se administran a ratones por vía intranasal y se evalúan por los métodos descritos en el Ejemplo 2. Un mes después, los ratones inmunizados con la composición de la vacuna contra el VRS y los ratones de control ingenuo se desafían con el VRS vivo, y se preparan muestras de ARN a partir de tejidos de ratones. Las cargas de VRS se miden por qPCR de ARN de VRS 16s normalizado a GAPDH de ratón. Se determina que la composición de la vacuna contra el VRS es efectiva cuando la carga del VRS es menor en los ratones inmunizados con la composición de la vacuna que en los ratones de control que no están inmunizados.

50 **Ejemplo 12. Generación y evaluación de la composición de la vacuna contra el coronavirus del SARS**

55 [0172] El síndrome respiratorio agudo severo (SARS) es una enfermedad respiratoria viral de origen zoonótico causada por el coronavirus del SARS (SARS-CoV). Entre noviembre de 2002 y julio de 2003, un brote de SARS en el sur de China causó 775 muertes en varios países con una tasa de mortalidad de aproximadamente 9,6%, según la Organización Mundial de la Salud. Los síntomas iniciales son similares a los de la gripe y pueden incluir fiebre, mialgia, síntomas de letargo, tos, dolor de garganta y otros síntomas inespecíficos.

60 [0173] Los virus vivos del SARS-CoV se inactivan por exposición a la luz UV durante 30 minutos. Los virus inactivados de SARS-CoV se aíslan infectando células del riñón embrionario humano (HEK) 293 para excluir el virus de proliferación activa.

65 [0174] Las nanopartículas cargadas de CpG se sintetizan encapsulando el oligodesoxinucleótido CpG tipo C en nanopartículas usando un proceso de emulsión simple o doble como se describe en el documento US 2012/0213812. La encapsulación se logra disolviendo el oligodesoxinucleótido CpG tipo C en un tampón acuoso y luego usando esta solución en el proceso de emulsión simple o doble con los copolímeros de cambio de carga descritos en el Ejemplo 2 para formar nanopartículas por autoensamblaje. Las nanopartículas cargadas con CpG se unen luego a SARS-CoV

inactivado con UV como se describe en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna que incluyen nanopartículas cargadas con CpG unidas a SARS-CoV inactivado con UV se administran a ratones por vía intranasal y se evalúan mediante los métodos descritos en el Ejemplo 2.

5 [0175] Un mes más tarde, los ratones inmunizados con la composición de vacuna de SARS-CoV y los ratones de control sin tratamiento previo son desafiados con vivo SARS-CoV, y muestras de ARN se preparan a partir de tejidos de ratones. Las cargas de SARS-CoV se miden por qPCR de ARN de SARS-CoV 16s normalizado a GAPDH de ratón. Se determina que la composición de la vacuna SARS-CoV es efectiva cuando la carga de SARS-CoV es menor en los ratones inmunizados con la composición de la vacuna que en los ratones de control que no están inmunizados.

10

Ejemplo 13. Generación y evaluación de la composición de la vacuna contra el norovirus

15 [0176] El norovirus es un género de virus genéticamente diversos de ARN monocatenario, sin envoltura, de la familia *Caliciviridae*. Los virus son transmitidos por alimentos o agua contaminados fecalmente; por contacto de persona a persona; y por aerosolización del virus y posterior contaminación de las superficies. Los norovirus son la causa más común de gastroenteritis viral en humanos y afectan a personas de todas las edades. Los virus conocidos en el género se consideran todas las cepas variantes de una sola especie llamada virus Norwalk. Esta especie causa aproximadamente el 90% de los brotes epidémicos no bacterianos de gastroenteritis en todo el mundo y puede ser responsable del 50% de todos los brotes de gastroenteritis transmitidos por alimentos en los Estados Unidos. La infección por norovirus se caracteriza por náuseas, vómitos intensos, diarrea acuosa y dolor abdominal y, en algunos casos, pérdida del gusto. Puede producirse letargo general, debilidad, dolores musculares, dolor de cabeza y fiebre baja.

20 [0177] Los norovirus vivos se inactivan por exposición a la luz ultravioleta durante 30 minutos. Los norovirus inactivados se aíslan infectando las células 293 del riñón embrionario humano (HEK) para excluir el virus de proliferación activa.

25 [0178] Las nanopartículas cargadas con CpG se sintetizan como se describe en el Ejemplo 12. Las nanopartículas cargadas con CpG se unen luego a Norovirus inactivados con UV como se describe en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna que incluyen nanopartículas cargadas con CpG unidas a Norovirus inactivados con UV se administran a ratones intranasalmente y evaluados por los métodos descritos en el Ejemplo 2.

30 [0179] Un mes después, los ratones inmunizados con la composición de la vacuna contra el norovirus y los ratones de control ingenuo se desafían con norovirus vivos, y se preparan muestras de ARN a partir de tejidos de ratones. Las cargas de Norovirus se miden por qPCR de Norovirus 16s ARN normalizado a GAPDH de ratón. Se determina que la composición de la vacuna contra el norovirus es efectiva cuando la carga de norovirus es menor en los ratones inmunizados con la composición de la vacuna que en los ratones de control que no están inmunizados.

35 **Ejemplo 14. Generación y evaluación de la composición de la vacuna del virus de inmunodeficiencia humana (VIH)**

40 [0180] El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), una afección en humanos en donde el fallo progresivo del sistema inmunitario permite que prosperen infecciones oportunistas y cánceres potencialmente mortales. La infección con VIH ocurre por la transferencia de sangre, semen, fluido vaginal, pre-eyaculación o leche materna. Dentro de estos fluidos corporales, el VIH está presente como partículas virales libres y como virus dentro de las células inmunes infectadas. El VIH infecta las células vitales del sistema inmunitario humano, como las células T auxiliares (específicamente las células T CD4⁺), los macrófagos y las células dendríticas, destruyendo esas células.

45 [0181] Los virus del VIH se inactivan por exposición a la luz ultravioleta durante 30 minutos. Los virus del VIH inactivados se aíslan mediante la infección de células del riñón embrionario humano (HEK) 293 para excluir virus que proliferan activamente.

50 [0182] Las nanopartículas cargadas de monofosforilo lípido A (MPLA) se sintetizan encapsulando MPLA en nanopartículas usando el proceso de emulsión simple o doble. Las nanopartículas cargadas con MPLA se unen luego al VIH inactivado con UV como se describe en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna que incluyen nanopartículas cargadas con MPLA unidas al VIH inactivado con UV se administran a ratones por vía intranasal y se evalúan mediante los métodos descritos en el Ejemplo 2.

55 [0183] Un mes después, los ratones inmunizados con la composición de la vacuna contra el VIH y los ratones de control ingenuo se enfrentan con VIH vivo, y se preparan muestras de ARN a partir de tejidos de ratones. Las cargas de VIH se miden por qPCR de ARN de VIH 16s normalizado a GAPDH de ratón. Se determina que la composición de la vacuna contra el VIH es efectiva cuando la carga del VIH es menor en los ratones inmunizados con la composición de la vacuna que en los ratones de control que no están inmunizados.

60

Ejemplo 15. Generación y evaluación de composición de vacuna contra tuberculosis

65

5 [0184] La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por varias cepas de micobacterias, por lo general *Mycobacterium tuberculosis*. La tuberculosis generalmente ataca los pulmones, pero también puede afectar otras partes del cuerpo. Se transmite por el aire cuando las personas que tienen una tos de infección activa de TB, estornudan o transmiten fluidos respiratorios a través del aire. La mayoría de las infecciones no tienen síntomas, conocidos como tuberculosis latente. Aproximadamente una de cada diez infecciones latentes eventualmente progresa a una enfermedad activa que, si no se trata, mata a más del 50% de los infectados. Los síntomas clásicos de la infección activa de TB son una tos crónica con esputo teñido de sangre, fiebre, sudores nocturnos y pérdida de peso. La infección de otros órganos causa una amplia gama de síntomas. El tratamiento es difícil y requiere la administración de múltiples antibióticos durante un largo período de tiempo. La resistencia a los antibióticos es un problema creciente en múltiples infecciones de tuberculosis resistente a los medicamentos (TB-MDR).

15 [0185] *Mycobacterium tuberculosis* se inactiva por exposición a la luz UV durante 30 minutos. Las *Mycobacterium tuberculosis* inactivadas se aíslan infectando las células 293 del riñón embrionario humano (HEK) para excluir el virus de proliferación activa.

20 [0186] Las nanopartículas cargadas con (MPLA) de lípido de monofosforilo A se sintetizan como se describe en el Ejemplo 14. Nanopartículas cargadas con MPLA luego son unidas a *Mycobacterium tuberculosis* inactivada por UV tal como se describe en el Ejemplo 2. Las composiciones de vacuna incluyendo nanopartículas cargadas con MPLA unidas a *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por UV se administran a ratones por vía intranasal y se evaluaron por los métodos descritos en el Ejemplo 2.

25 [0187] Un mes más tarde, los ratones inmunizados con composición de vacuna de *Mycobacterium tuberculosis* y ratones de control ingenuo son desafiados con *Mycobacterium tuberculosis* viva, y las muestras de ARN se preparan a partir de tejidos de ratones. Las cargas de *Mycobacterium tuberculosis* se miden mediante qPCR de ARN de *Mycobacterium tuberculosis* 16s normalizado a GAPDH de ratón. Se determina que la composición de la vacuna de *Mycobacterium tuberculosis* es efectiva cuando la carga de *Mycobacterium tuberculosis* es menor en ratones inmunizados con la composición de vacuna que en los ratones de control que no están inmunizados.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición para usar en la estimulación de una respuesta inmune de la mucosa contra chlamydia trachomatis, que comprende:

5 una chlamydia trachomatis inactivada, y una o más nanopartículas poliméricas cargadas de adyuvante, en donde una o más nanopartículas poliméricas cargadas de adyuvante están unidas a la chlamydia trachomatis inactivada a través de la atracción electrostática, en donde una o más nanopartículas poliméricas cargadas con adyuvante comprenden polímeros biodegradables, en donde los polímeros biodegradables son poli
10 (ácido láctico-co-glicólico)-bloque-poli(L-histidina)-bloque-poli(copolímeros tribloque de etilenglicol) (PLGA-PLH-PEG), y en donde la composición se administrará a un sujeto que lo necesite a través de una ruta vaginal o urinaria.

15 2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una o más nanopartículas poliméricas cargadas con adyuvante comprenden un agonista de receptor de tipo Toll.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

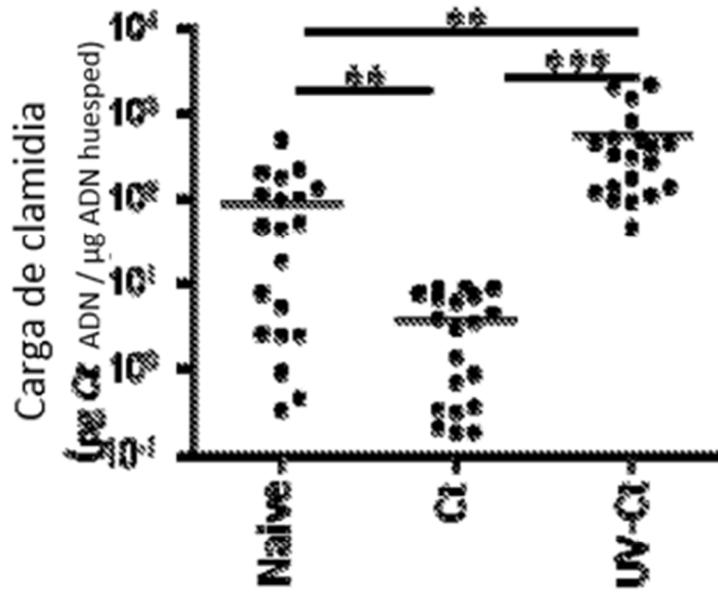


FIG. 1B

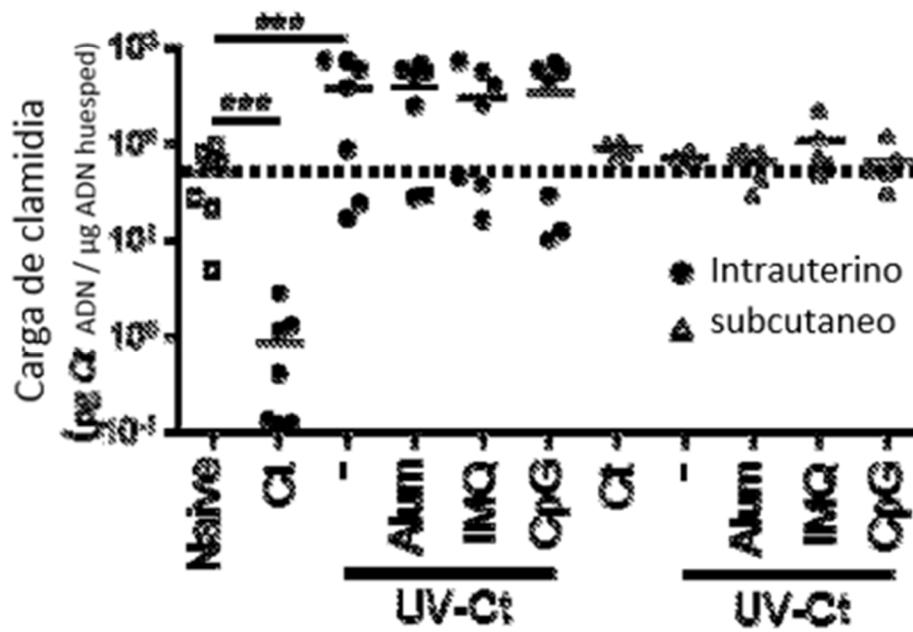


FIG. 1C

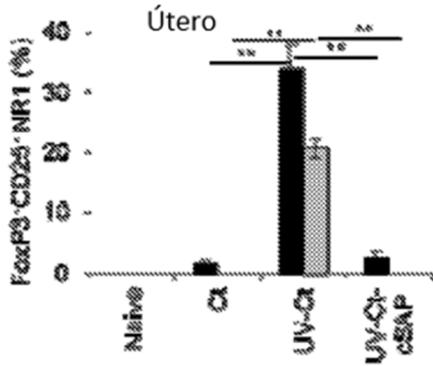


FIG. 1D

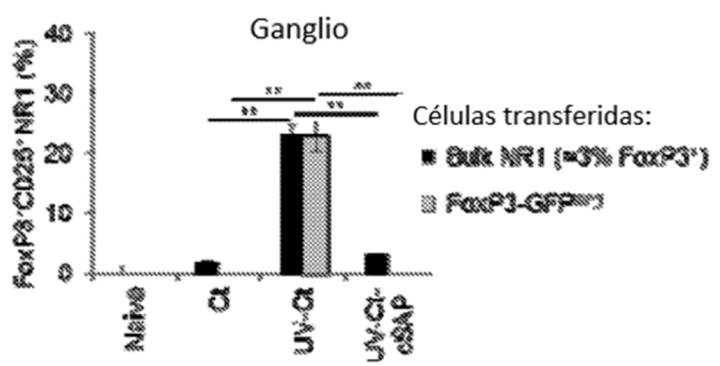


FIG. 1E

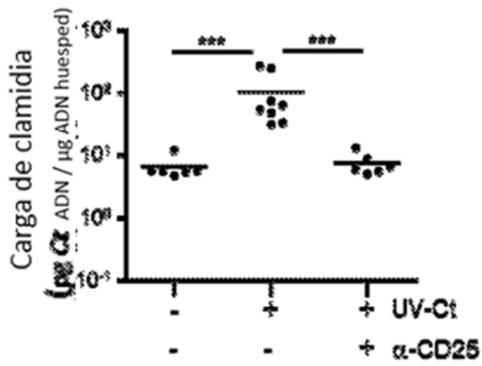


FIG. 1F

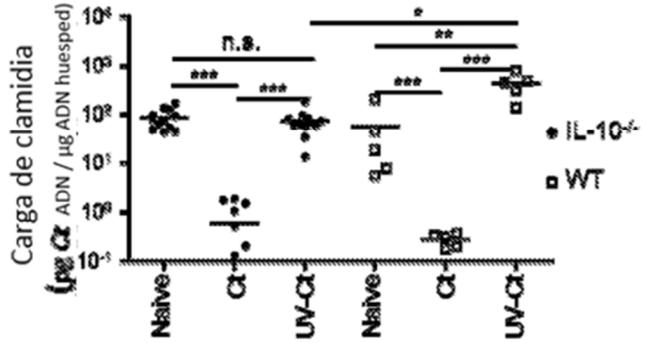


FIG. 2A

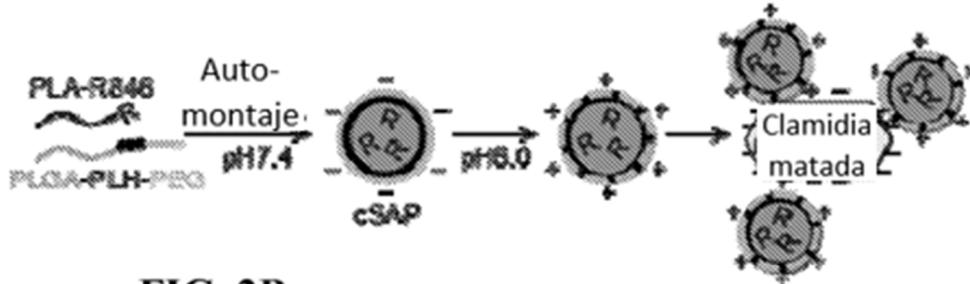


FIG. 2B

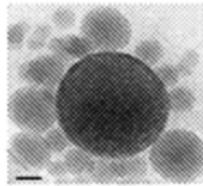


FIG. 2C

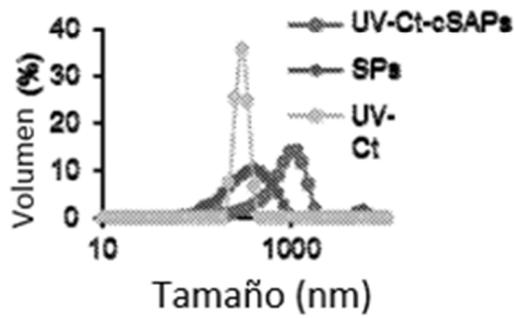


FIG. 2D

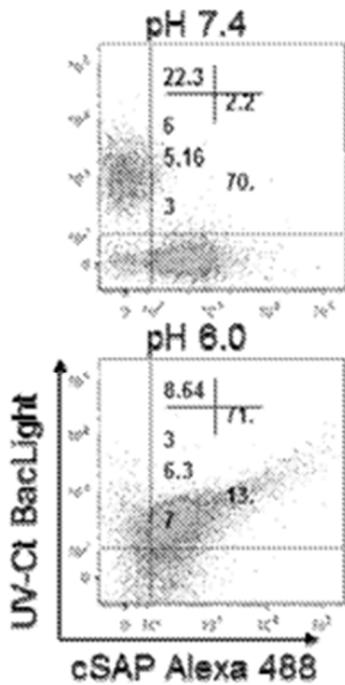


FIG. 2E

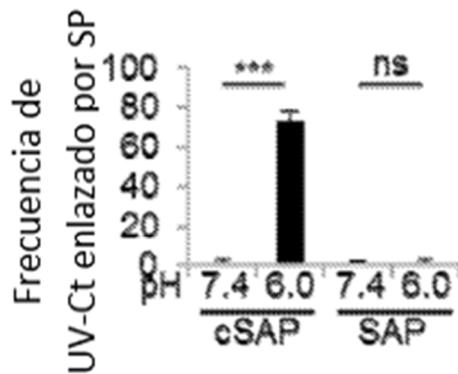


FIG. 2F

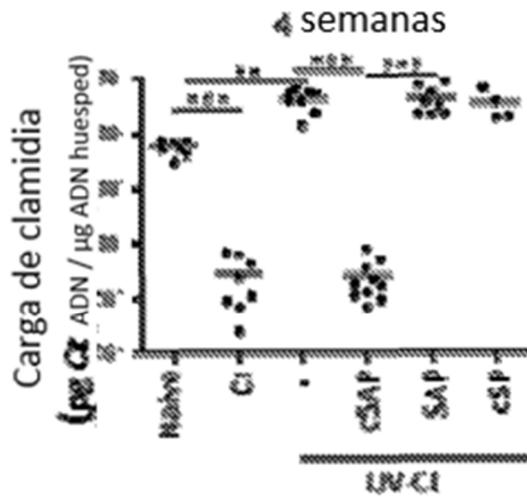


FIG. 2G

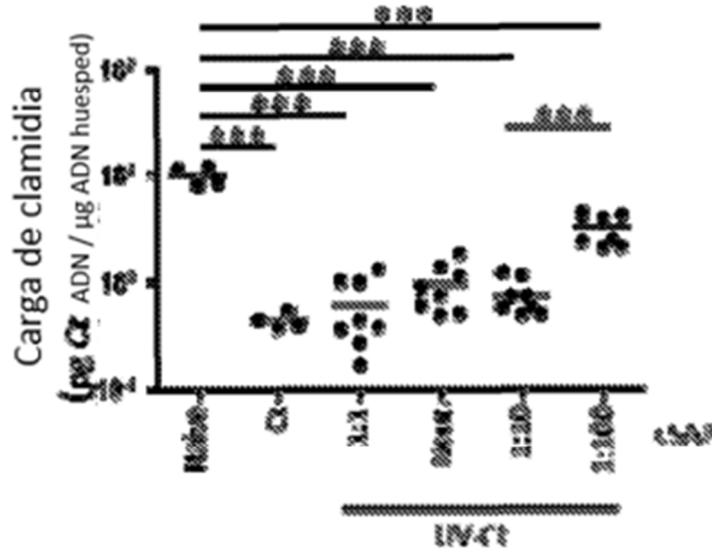


FIG. 2H

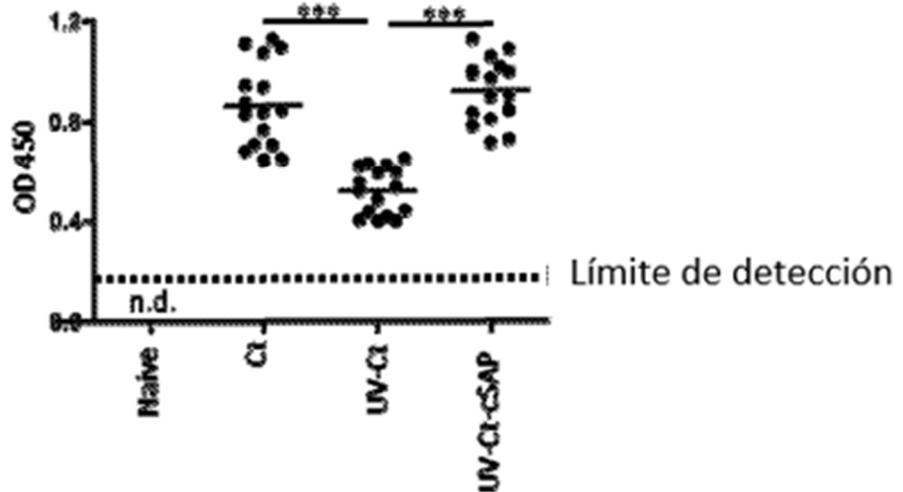


FIG. 3A

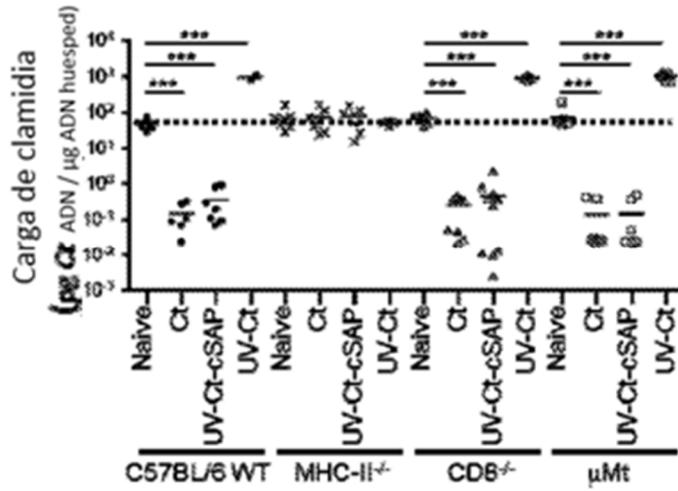


FIG. 3B

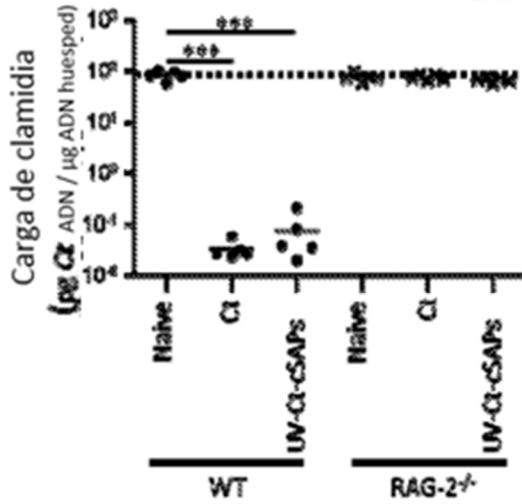


FIG. 3C

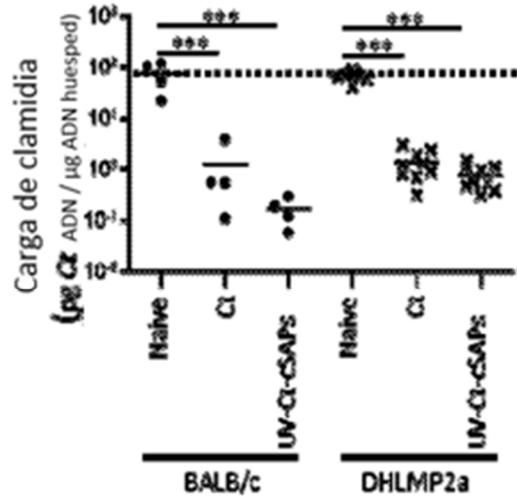


FIG. 3D

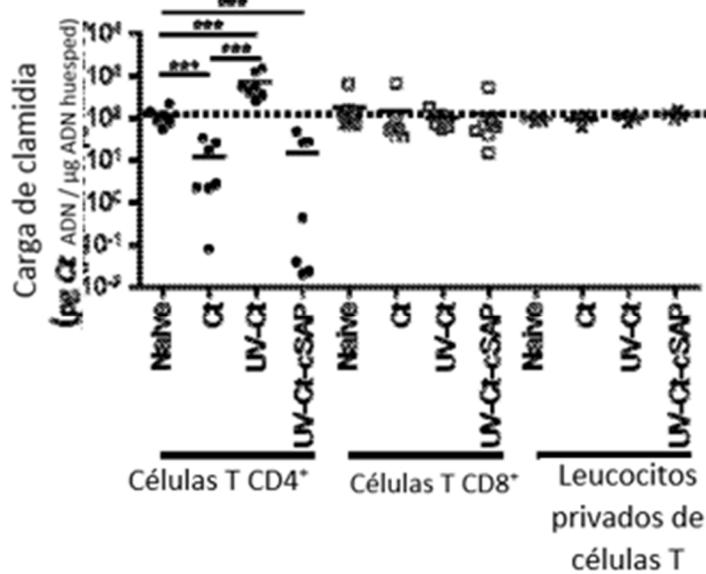


FIG. 4A

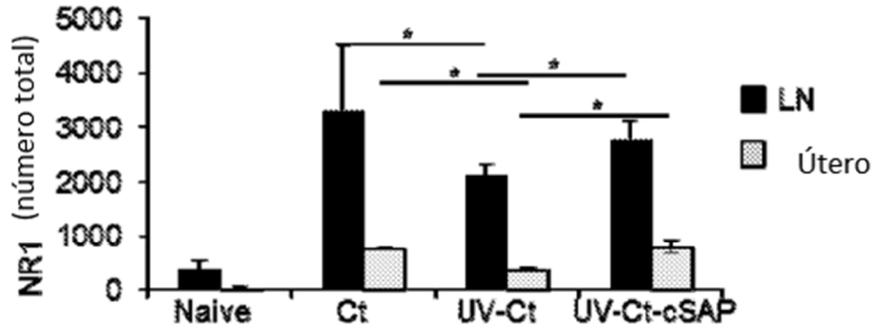


FIG. 4B

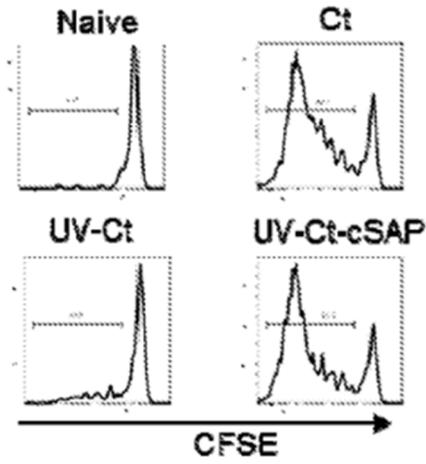


FIG. 4C

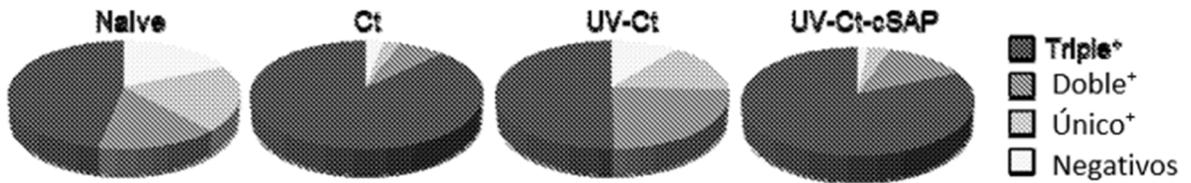


FIG. 5A

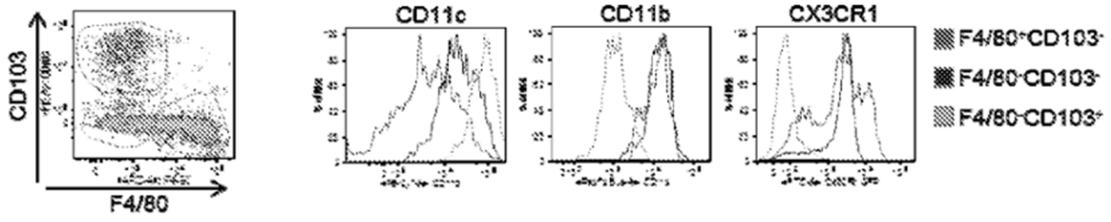


FIG. 5B

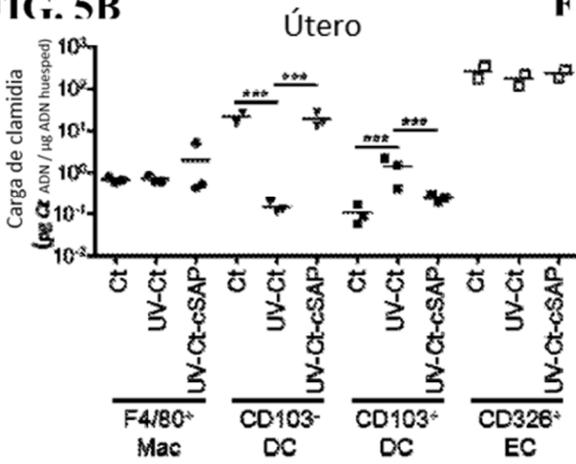


FIG. 5C

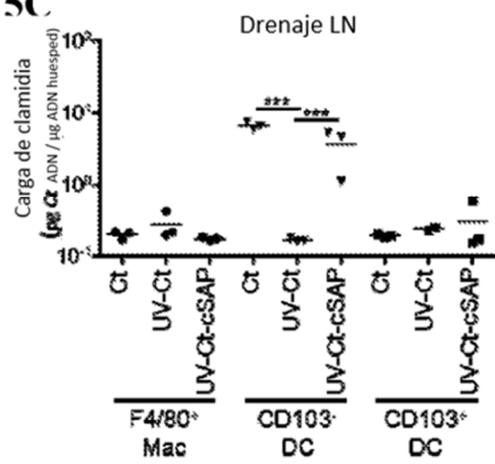


FIG. 5D

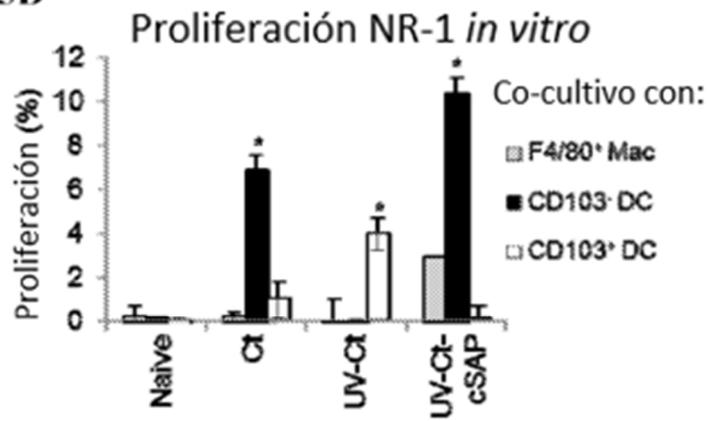


FIG. 5E

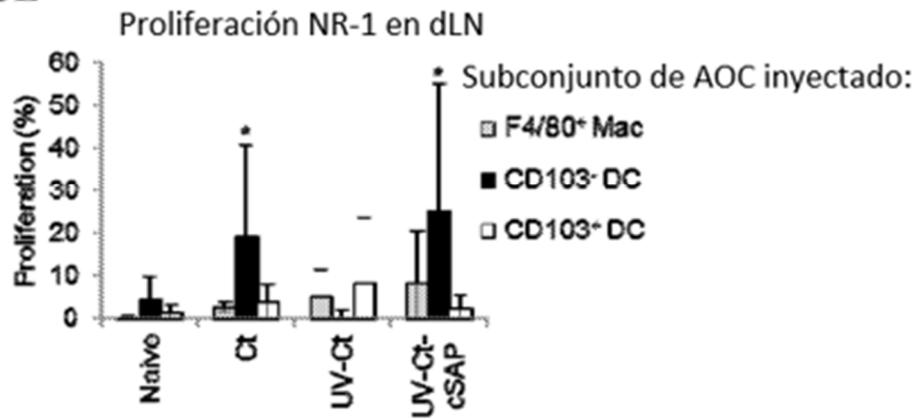


FIG. 5F

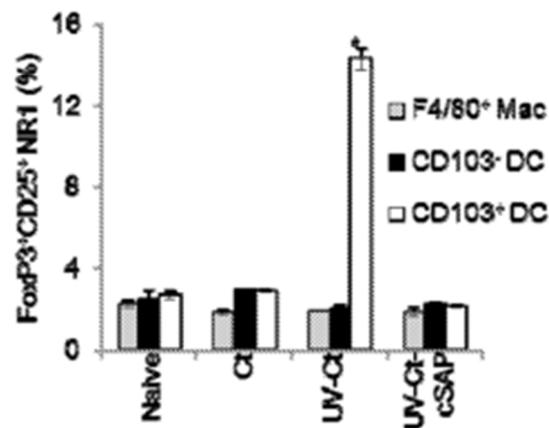


FIG. 6A

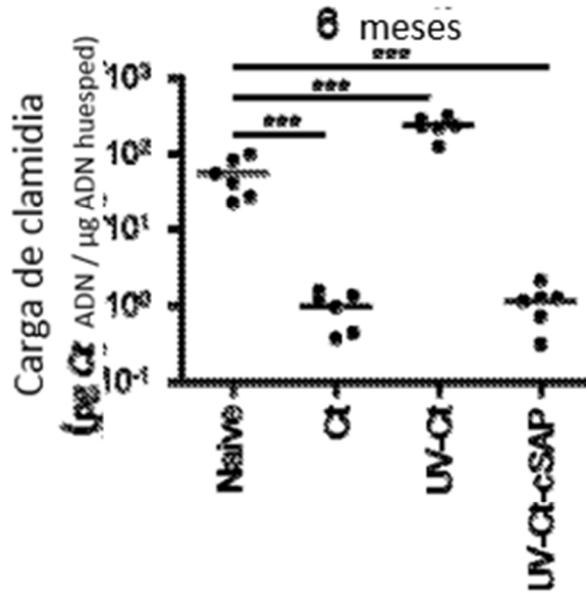


FIG. 6B

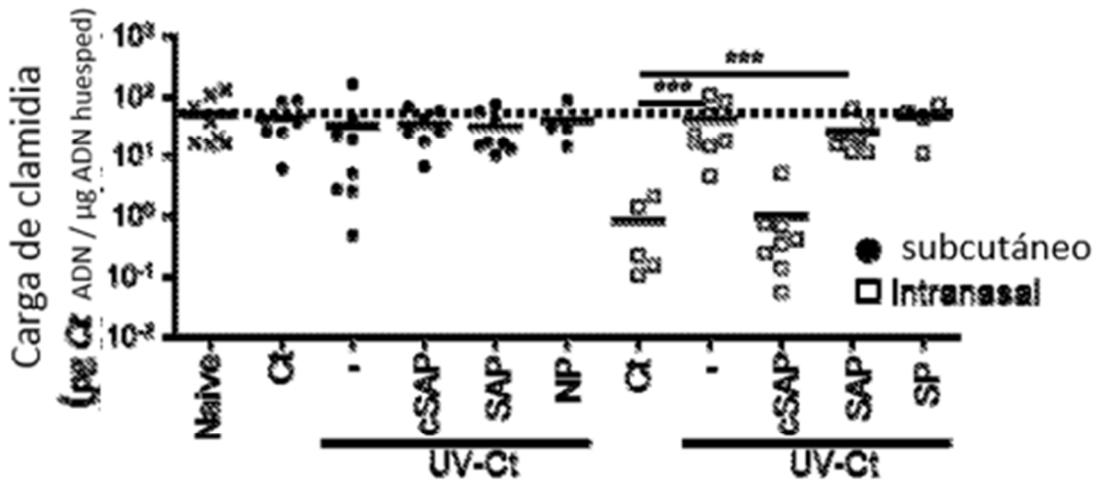


FIG. 6C

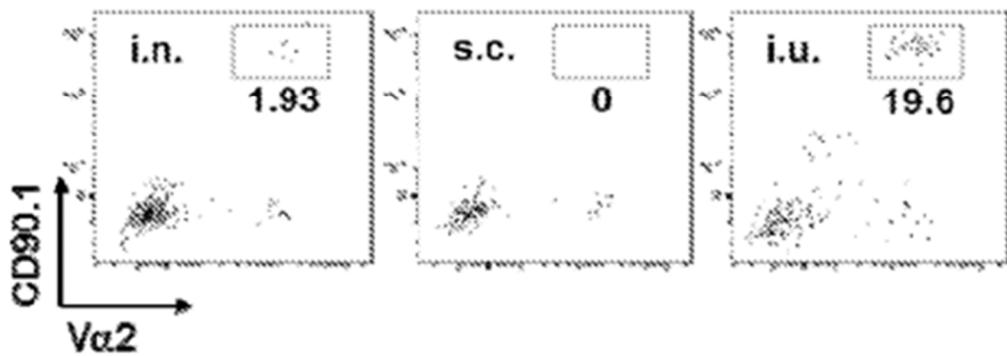


FIG. 6D

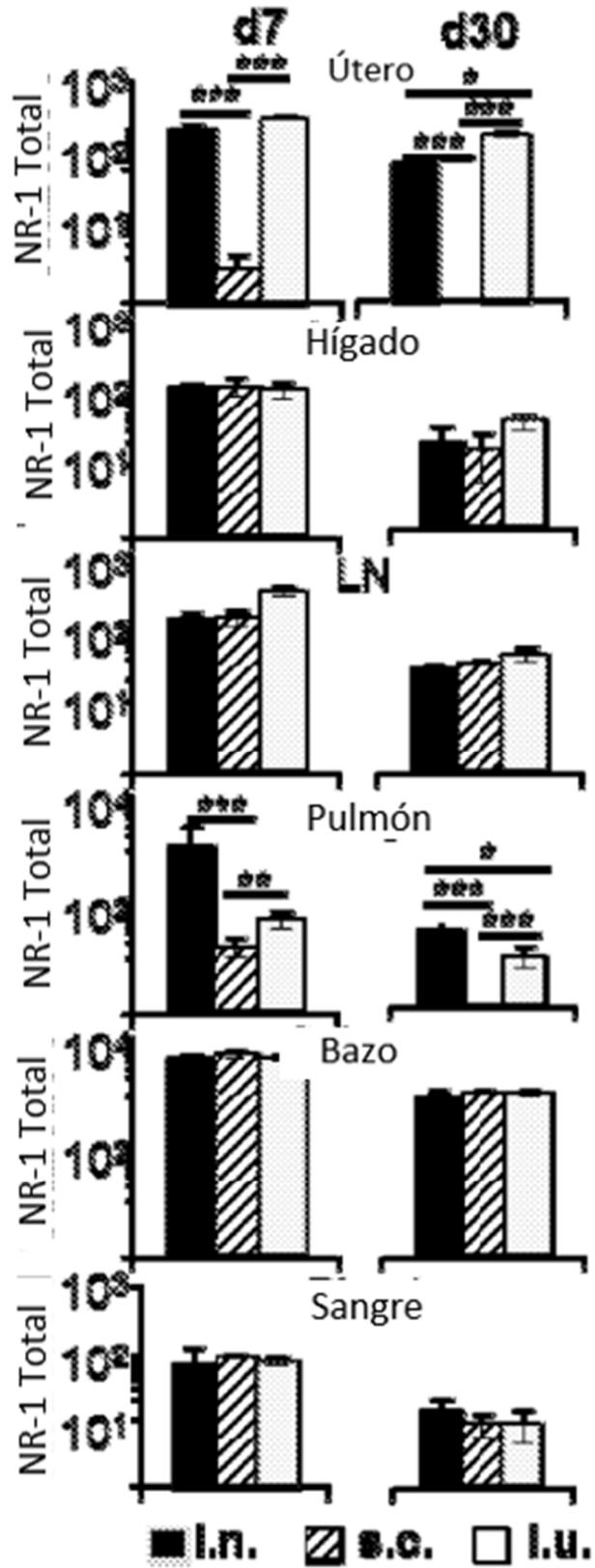


FIG. 7A



FIG. 7B

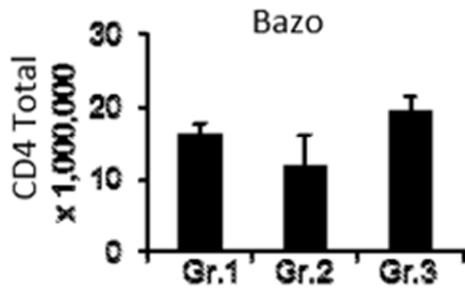


FIG. 7C

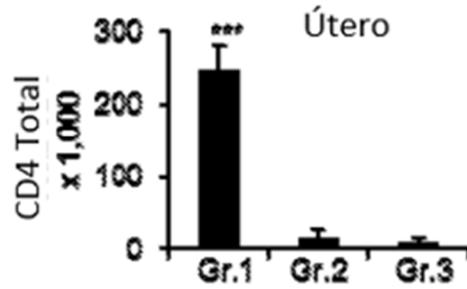


FIG. 7D

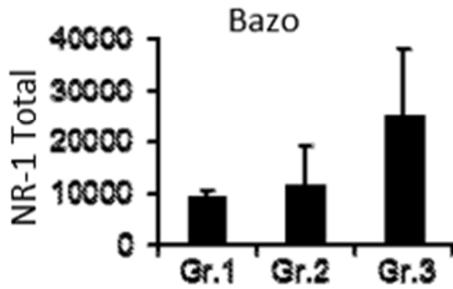


FIG. 7E

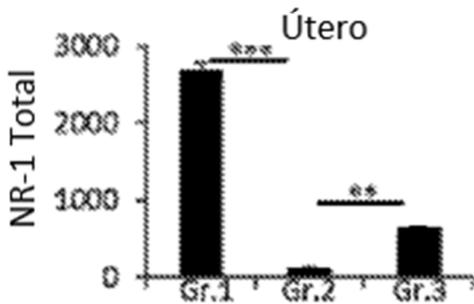


FIG. 7F

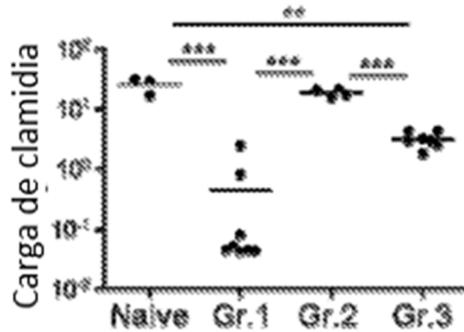


FIG. 8A

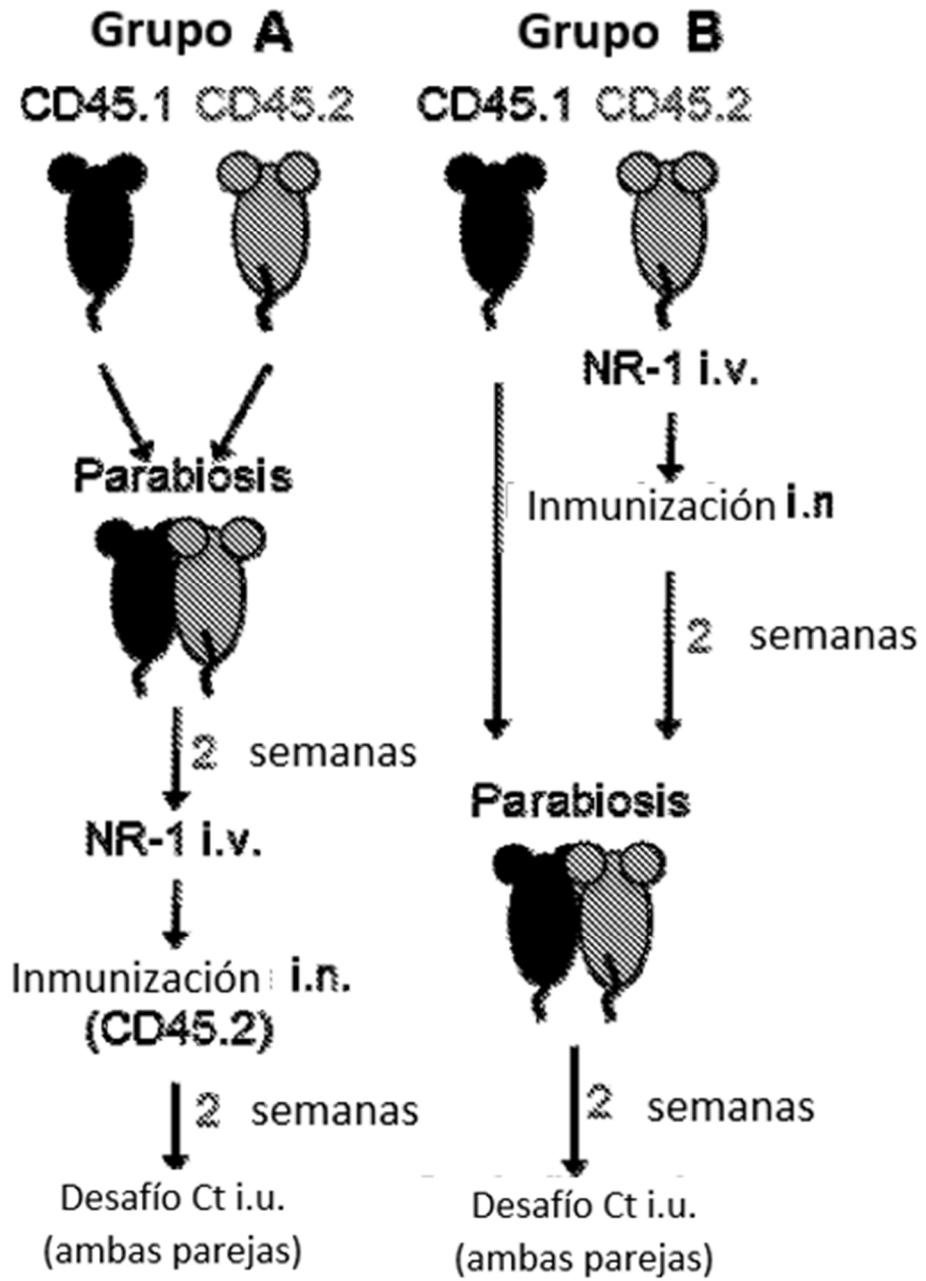


FIG. 8B

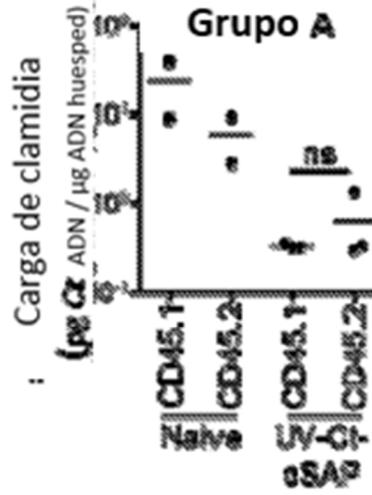


FIG. 8C

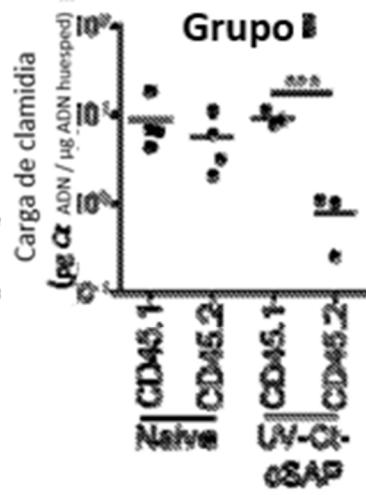


FIG. 8D

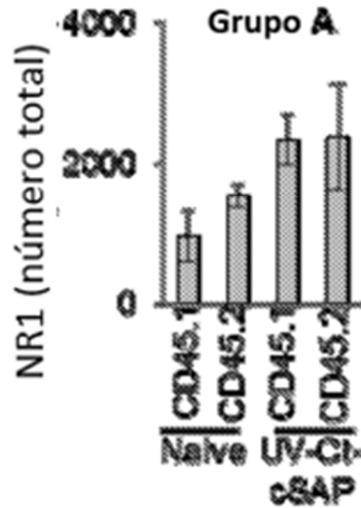


FIG. 8E

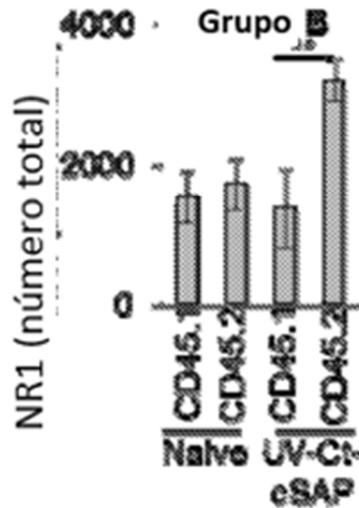


FIG. 8F

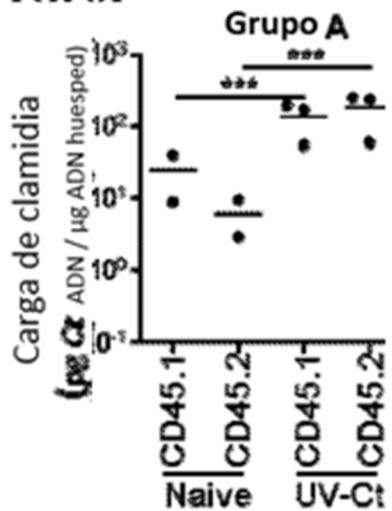


FIG. 8G

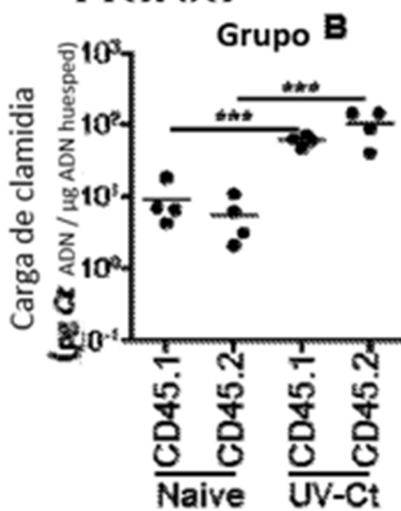


FIG. 9A

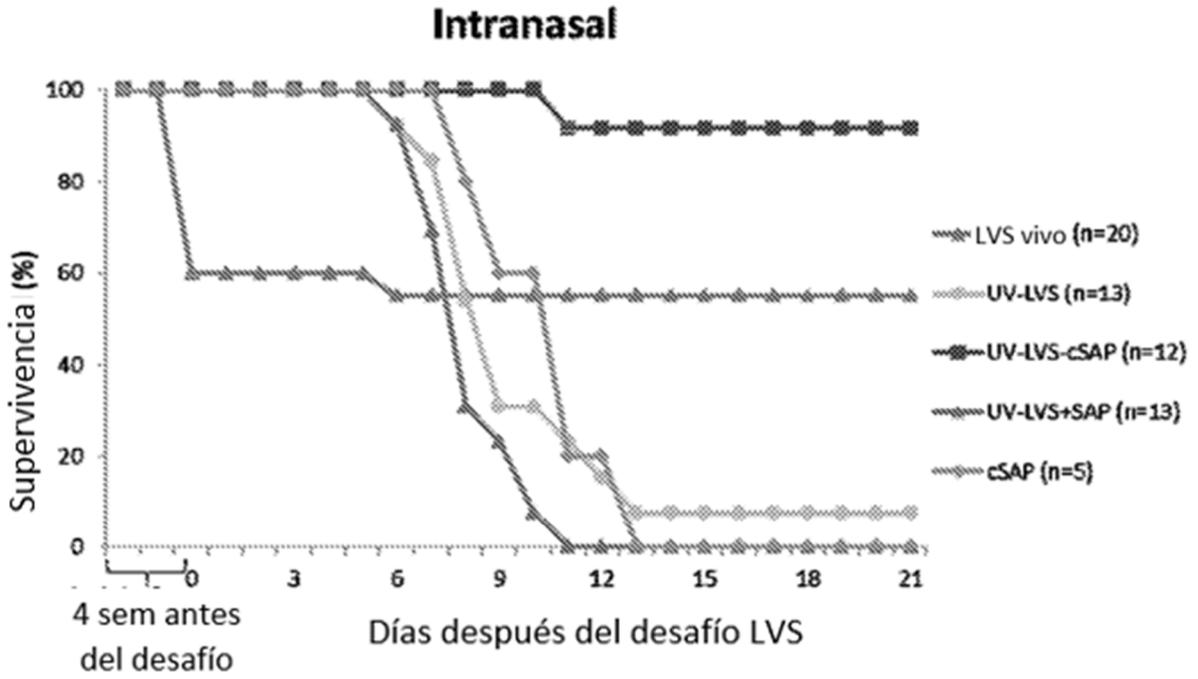


FIG. 9B

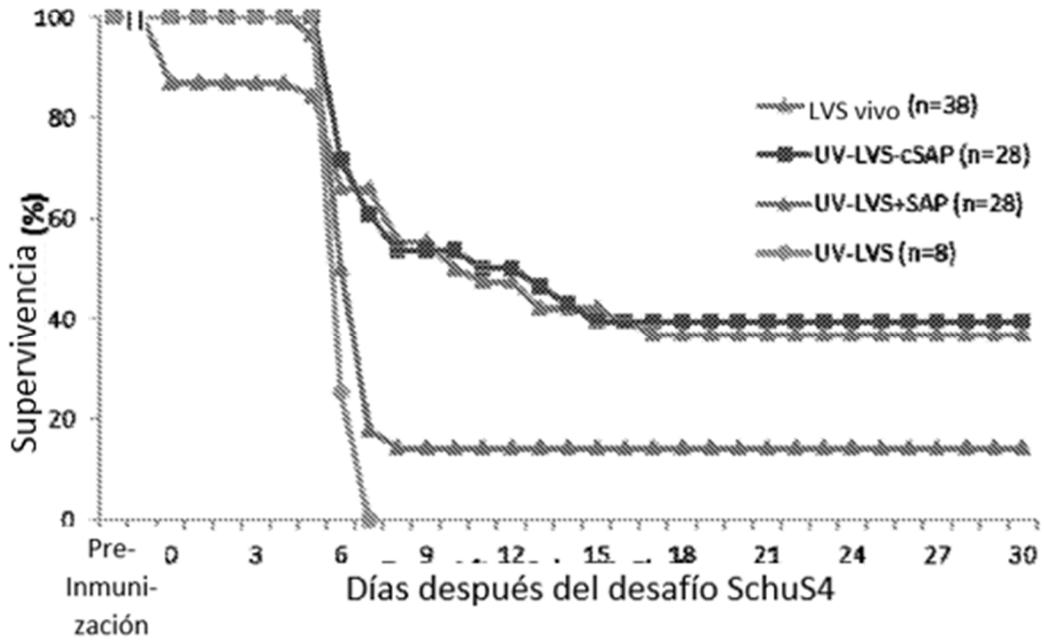


FIG. 9C

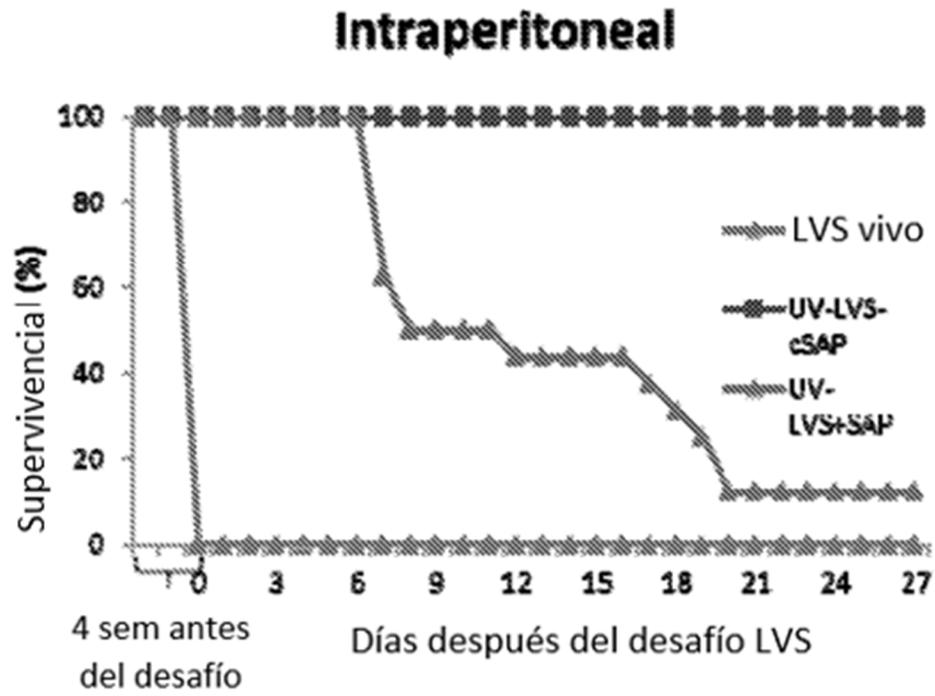


FIG. 9D

