

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 428**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 39/39 | (2006.01) |
| A61K 47/34 | (2007.01) |
| A61K 47/36 | (2006.01) |
| A61K 47/50 | (2007.01) |
| A61K 9/16 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015 PCT/US2015/023567**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15160501**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015 E 15719034 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 3134118**

54 Título: **Formulaciones vacunales de partículas para la inducción de inmunidad innata y adaptativa**

30 Prioridad:

18.04.2014 US 201461981328 P
30.04.2014 US 201461986148 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.09.2020

73 Titular/es:

AUBURN UNIVERSITY (100.0%)
570 Devall Drive, Suite 102
Auburn, AL 36832, US

72 Inventor/es:

KALTENBOECK, BERNHARD;
GUPTA, RAM B.;
CHOWDHURY, ERFAN U. y
OBER, COURTNEY, A.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 782 428 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones vacunales de partículas para la inducción de inmunidad innata y adaptativa

5 **Antecedentes**

La presente divulgación se refiere en general al campo de las composiciones, kits y métodos para la inducción de una respuesta inmunitaria. En particular, la divulgación se refiere a formulaciones vacunales de partículas para la inducción de inmunidad innata o adaptativa contra una infección o enfermedad.

10 Los linfocitos auxiliares (Th) se pueden categorizar en dos subconjuntos distintos de células efectoras basándose en sus capacidades funcionales y perfiles de citocinas. Las células Th producen FN- γ , TNF- β , e IL-2 y ayudan a activar los macrófagos y los linfocitos T citotóxicos. Además, las células Th1 ayudan a otras células inmunitarias en la producción de los isotipos de anticuerpo que promueven la opsonización. Las células Th2 desencadenan que las células B produzcan y secreten anticuerpos. Por el contrario, las células Th2 son particularmente eficaces en la inducción para que las células B produzcan ciertos isotipos de anticuerpo tal como IgE e IgA, que neutralizan los patógenos intercelulares y ayudan a la opsonización, activación del complemento, mastocitos, y eosinófilos. Debido a estas diferencias funcionales, las Th1 y Th2 presentan una eficacia diferente en la eliminación de un agente patógeno. Las enfermedades que pueden prevenirse o tratarse satisfactoriamente mediante respuestas de las Th1 incluyen las infecciones micobacterianas tales como la tuberculosis, lepra, leishmaniasis y esquistosomiasis, que son infecciones intracelulares, y ciertas enfermedades víricas. Las respuestas de Th2 son protectoras contra helmintos y algunas bacterias tales como los neumos y meningococos.

25 Las células Th1 y Th2 se originan de una célula precursora común llamada Th0. La diferenciación de las células T auxiliares en Th1 y Th2 es un evento importante para la determinación del resultado de una respuesta inmunitaria (es decir, si un agente patógeno persistirá, si el huésped se protegerá, y/o si el huésped experimentará una inmunopatogénesis). Los agentes patógenos infecciosos pueden presentar una predisposición a inducir una forma de inmunidad mediada por células frente a una forma de inmunidad humoral. La defensa satisfactoria contra los agentes patógenos intracelulares tiende a asociarse con una dominancia de Th1 y la resultante actividad citolítica celular, mientras que la resistencia a los agentes patógenos extracelulares a menudo está dominada sobre todo por efectoras Th2, que dan lugar a la producción de altos niveles de inmunoglobulinas específicas de antígeno. Por lo tanto, un mejor entendimiento de los factores que contribuyen a la diferenciación de las células Th0 en células Th1 y Th2 ayudará a facilitar la preparación de una prevención más eficaz y a estrategias de tratamiento. El documento WO 2013/049106 describe composiciones, dispositivos de implante y métodos para la estimulación de una respuesta inmunitaria localmente en un sitio quirúrgico o de implante. Valpotic et al. (Acta Vet Scand. 2013 jul 18;55:54) describe el efecto de un bloque no iónico de copolímeros de polioxietileno y polioxipropileno sobre la actuación y reclutamiento de subconjuntos de células inmunitarias en cerdos destetados.

40 **Sumario**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Se desvelan composiciones, kits y métodos para la inducción de una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria inducida por la composición, kits y métodos es preferentemente una respuesta inmunitaria de células Th1 frente a una respuesta inmunitaria de células Th2.

45 Las composiciones y kits desvelados en el presente documento incluyen partículas biodegradables que tienen un diámetro medio eficaz de 0,5-10 μm que se ha demostrado en el presente documento que son eficaces en la estimulación de una respuesta inmunitaria innata o adaptativa. Como tales, se desvelan en el presente documento composiciones inmunogénicas de partículas y formulaciones vacunales para la inducción de una respuesta inmunitaria innata o adaptativa.

50 Las partículas desveladas de las composiciones y formulaciones son biodegradables y pueden incluir material polimérico o no polimérico. En algunos casos, las partículas biodegradables comprenden material polimérico formado a partir de monómeros de carbohidratos. Las partículas biodegradables se pueden formar por un proceso que incluye el secado por pulverización de una composición líquida para formar las partículas biodegradables.

55 Las composiciones y formulaciones pueden incluir opcionalmente excipientes para las partículas biodegradables. En algunas realizaciones, las composiciones y formulaciones incluyen un excipiente en polvo. En otras realizaciones, las composiciones y formulaciones comprenden una suspensión de partículas biodegradables en un excipiente que incluye una solución tensioactiva no iónica.

60 Las composiciones y formulaciones desveladas que comprenden las partículas biodegradables pueden administrarse a un sujeto con el fin de inducir una respuesta inmunitaria. En algunos casos, las composiciones y formulaciones desveladas se administran al sujeto a una dosis que suministre las partículas biodegradables al sujeto en una cantidad de entre aproximadamente $(\text{BW}/20)^{3/4}$ μg y $100 \times ((\text{BW}/20)^{3/4})$ μg , donde BW es el peso corporal del sujeto en gramos.

65

Las composiciones y formulaciones desveladas que comprenden las partículas biodegradables pueden incluir agentes adicionales para la modulación de una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, las composiciones y formulaciones desveladas que comprenden las partículas biodegradables comprenden adicionalmente un adyuvante. En más realizaciones adicionales, las composiciones y formulaciones desveladas que comprenden las partículas biodegradables comprenden adicionalmente un inhibidor de la apoptosis.

En algunos casos, las composiciones y formulaciones desveladas que comprenden las partículas biodegradables pueden administrarse a un sujeto en un método para la inducción de una respuesta inmunitaria innata en el sujeto. Por ejemplo, las composiciones y formulaciones pueden consistir en las partículas biodegradables y opcionalmente un adyuvante y/o un inhibidor de la apoptosis, y la formulación vacunal puede no comprender un antígeno para la inducción de inmunidad adaptativa.

Los métodos contemplados en el presente documento incluyen métodos que consisten en la administración de las composiciones y formulaciones que consisten esencialmente en partículas biodegradables. En algunos casos, los métodos consisten en la administración de composiciones y formulaciones que consisten esencialmente en una suspensión de partículas biodegradables, tal como una suspensión de las partículas biodegradables en una solución de tensioactivo no iónico. En otros casos, los métodos consisten en la administración de composiciones y formulaciones que consisten esencialmente en una suspensión de partículas biodegradables, tal como una suspensión de las partículas biodegradables en una solución de tensioactivo no iónico y un adyuvante. En más casos adicionales, los métodos consisten en la administración de composiciones y formulaciones que consisten esencialmente en una suspensión de partículas biodegradables, tal como una suspensión de las partículas biodegradables en una solución de tensioactivo no iónico, un adyuvante y un inhibidor de la apoptosis. En más casos adicionales, los métodos consisten en la administración de composiciones y formulaciones que consisten esencialmente en una suspensión de partículas biodegradables, tal como una suspensión de las partículas biodegradables en una solución de tensioactivo no iónico, un adyuvante y un inhibidor de la apoptosis y un antígeno (por ejemplo, un péptido antigénico o una mezcla de péptidos antigénicos).

En los métodos desvelados, las composiciones y formulaciones desveladas se pueden administrar a un sujeto con el fin de estimular la inmunidad mediante células T. Por ejemplo, las composiciones vacunales desveladas pueden administrarse a un sujeto con el fin de estimular la inmunidad mediante células T contra la infección por un agente patógeno. En algunos casos, las composiciones y formulaciones desveladas se pueden administrar a un sujeto con el fin de estimular una inmunidad mediante células Th1.

Los presentes inventores han observado que cuando las composiciones y formulaciones desveladas que comprenden las partículas biodegradables se administran a un sujeto, el sujeto gana peso con una velocidad relativamente mayor que un sujeto al que no se le han administrado las composiciones y formulaciones. Por lo tanto, los métodos desvelados incluyen métodos de administración de las composiciones y formulaciones desveladas para la inducción de la ganancia de peso en un sujeto. Los métodos desvelados también incluyen métodos de administración de las composiciones y formulaciones desveladas a un sujeto para aumentar la tasa de conversión de pienso en el sujeto. Los métodos desvelados también incluyen métodos de administración de las composiciones y formulaciones desveladas a un sujeto para aumentar la tasa de supervivencia. Los sujetos adecuados para los métodos de inducción de ganancia de peso y/o para aumentar la tasa de conversión del pienso, pero no se limita a, aves de corral tales como los pollos y pavos, cerdos y rumiantes, tales como el ganado, ovejas y cabras.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. A. Micrografía electrónica de barrido de micropartículas secadas por pulverización compuestas por PLGA-PEG: Pluronic L121 = 3:2. B. Porcentaje de supervivencia cuando se desafiaron el día 21 después de la administración de un estimulador inmunitario. C. Porcentaje de supervivencia cuando se desafiaron el día 11 después de la administración de un estimulador inmunitario. D. Porcentaje de supervivencia cuando se desafiaron el día 1 después de la administración de un estimulador inmunitario.

FIG. 2. A. Proporción acumulada de supervivientes frente a los días después del desafío con *C. abortus* para los ratones a los que se administró una composición de partículas de PLGA RG502H + Pluronic L121® frente a una composición de PLGA RG502H sin el Pluronic L121®. B. Pérdida de peso corporal frente a los días después del desafío con *C. abortus* para los ratones a los que se administró una composición de partículas de PLGA RG502H + Pluronic L121® frente a una composición de PLGA RG502H sin el Pluronic L121®. C. Proporción acumulada de supervivientes frente a los días después del desafío con *C. abortus* para los ratones a los que se administró una composición de PLGA RG502H + Resiquimod frente a una composición de partículas de PLGA RG502H sin el Pluronic L121®. D. Pérdida de peso corporal frente a los días después del desafío con *C. abortus* para los ratones a los que se administró una composición de PLGA RG502H + Resiquimod frente a una composición de partículas de PLGA RG502H sin el Pluronic L121®.

FIG. 3. Proporción acumulada de supervivientes frente a los días después del tratamiento en la eclosión de pollos a los que se administró el estimulador inmunitario frente al tampón de control.

FIG. 4. Peso corporal después de 21 días en los pollos a los que se administró un estimulador inmunitario frente al tampón de control.

FIG. 5. Tasa de conversión del pienso desde el día 0 al día 21 en los pollos a los que se administró un estimulador inmunitario frente al tampón de control.

FIG. 6. Proporción acumulada de supervivientes frente a los días después del desafío con *C. abortus* para los ratones a los que se administró una composición de partículas de nelfinavir y Pluronic L121®, con o sin inhibidor de la apoptosis Q-VD-OPH.

FIG. 7. A. Porcentaje de pérdida de peso corporal el día 11 después del desafío en ratones a los que se les administró una vacuna con el inhibidor de apoptosis Q-VD-OPH frente a una vacuna sin inhibidor de la apoptosis. B. Porcentaje de pérdida de peso corporal el día 11 después del desafío para ratones a los que se les administró el vehículo de la vacuna frente a la vacuna viva. C. Peso del pulmón el día 11 después del desafío en ratones a los que se les administró una vacuna con inhibidor de apoptosis Q-VD-OPH frente a una vacuna sin inhibidor de la apoptosis. D. Peso del pulmón el día 11 después del desafío en ratones a los que se les administró el vehículo de la vacuna frente a la vacuna viva. E. *C. abortus* / 100 mg de pulmón, \log_{10} sin inhibidor de apoptosis, 0,2 μg de Q-VD-OPH, o 0,2 μg de emricasan. F. *C. abortus* / 100 mg de pulmón, \log_{10} con el vehículo de vacuna o la vacuna viva.

FIG. 8. A. Peso de la bolsa de Fabricio el día 7 después del desafío con IBDV en pollos a los que se les administró una vacuna con inhibidor de apoptosis Q-VD-OPH frente a la vacuna sin inhibidor de apoptosis. B. Peso de la bolsa de Fabricio el día 7 después del desafío con IBDV en pollos a los que se les administró una suspensión de tampón de control frente a los pollos no desafiados. C. Valoración de inflamación de la bolsa en los pollos desafiados a los que se administró una vacuna con el inhibidor de apoptosis Q-VD-OPH frente a la vacuna sin inhibidor de la apoptosis. D. Valoración de la inflamación de la bolsa en los pollos desafiados a los que se administró una suspensión del tampón de control frente a los pollos no desafiados. E. Peso de la bolsa el día 7 después del desafío con IBDV corregido con la valoración de la inflamación en pollos a los que se les administró una vacuna con inhibidor de apoptosis Q-VD-OPH frente a la vacuna sin inhibidor de apoptosis. F. Peso de la bolsa el día 7 después del desafío con IBDV corregido con la valoración de la inflamación en pollos a los que se les administró una suspensión de tampón de control frente a los pollos no desafiados. G. Porcentaje de protección de la enfermedad en los pollos desafiados a los que se administró una vacuna con el inhibidor de apoptosis Q-VD-OPH frente a la vacuna sin inhibidor de la apoptosis. H. Porcentaje de protección de la enfermedad en los pollos desafiados a los que se administró una suspensión del tampón de control frente a los pollos no desafiados.

FIG. 9. Proporción acumulada de supervivientes frente a los días después del desafío con *C. abortus* en los ratones a los que se administra una composición de nelfinavir en partículas, Poli (I:C), y 1 fmol de péptidos de *C. abortus* frente a sin tratar.

FIG. 10. Proporción acumulada de supervivientes frente a los días después del desafío con *C. abortus* en los ratones a los que se administra una composición de nelfinavir en partículas, Pluronic L121®, y 1 fmol de péptidos de *C. abortus* frente a sin tratar.

FIG. 11. A. Porcentaje de pérdida de peso corporal el día 11 después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0, 0,02-0,2, o 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* y vacuna viva. B. Peso del pulmón el día 11 después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0, 0,02-0,2, o 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* y vacuna viva. C. Carga de *C. abortus* en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0, 0,02-0,2, o 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* y vacuna viva. D. Porcentaje de pérdida de peso corporal frente a los días después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 0,02-0,2 o 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus*. D. Porcentaje de pérdida de peso corporal frente a los días después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0 o 0,02-0,2 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus*. F. Porcentaje de pérdida de peso corporal frente a los días después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0 o 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus*. G. Porcentaje de pérdida de peso corporal frente a los días después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* y vacuna viva.

FIG. 12. A. Peso de la bolsa de Fabricio el día 7 después del desafío en pollos a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0, 0,54, o 3,82-191,2 fmoles de péptidos de IBDV frente a pollos no desafiados. B. Valoración de la inflamación de la bolsa el día 7 después del desafío en los pollos a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0, 0,54, o 3,82-191,2 fmoles de péptidos de IBDV frente a pollos no desafiados. C. Peso de la bolsa el día 7 después del desafío con IBDV corregido con la valoración de inflamación en los pollos a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0, 0,54, o 3,82-191,2 fmoles de péptidos de IBDV frente a

pollos no desafiados. D. Porcentaje de protección de la enfermedad en los pollos a los que se administró una vacuna que comprendía 0,0, 0,54, o 3,82-191,2 fmoles de péptidos de IBDV frente a pollos no desafiados.

5 FIG. 13. A. Porcentaje de pérdida de peso corporal frente el día 11 después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* y vacuna viva. B. Peso del pulmón el día 11 después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* y vacuna viva. C. Carga de *C. abortus* en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* y vacuna viva. D. Porcentaje de pérdida de peso corporal frente a los días después del desafío en los ratones a los que se administró una vacuna que comprendía 2,0 femtomoles de péptidos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* y vacuna viva.

15 Descripción detallada

Se desvelan en el presente documento composiciones, kits, y métodos para la inducción de una respuesta inmunitaria contra la enfermedad que se puede describir utilizando varias definiciones como se expone posteriormente.

20 A menos de que se especifique o indique otra cosa por el contexto, los términos "un", "una" y "el" significan "uno o más". Además, los nombres en singular tales como "adyuvante", "inhibidor de la apoptosis", y "antígeno" se debería interpretar como que significan "uno o más adyuvantes", "uno o más inhibidores de la apoptosis", y "uno o más antígenos", respectivamente, a menos de que se especifique otra cosa o se indique por el contexto.

25 Como se utilizan en el presente documento, "aproximadamente", "de manera aproximada", "sustancialmente" y "significativamente" se entenderán por los expertos habituados en la técnica y variarán hasta cierto punto según el contexto en el que se utilicen. Si existen usos del término que no esté claro para los expertos habituados en la técnica dado el contexto en la que se utilicen, "aproximadamente" y "de manera aproximada" significarán más o menos $\leq 10\%$ del término particular y "sustancialmente" y "significativamente" significarán más o menos $> 10\%$ del término particular.

30 Como se utiliza en el presente documento, los términos "incluyen" y "que incluyen" tienen el mismo significado que los términos "comprenden" y "que comprenden". Los términos "comprenden" y "que comprenden" se deberían interpretar como que son términos transitorios "abiertos" que permiten la inclusión de componentes adicionales además de los componentes mencionados en las reivindicaciones. Los términos "consisten" y "que consisten en" se deberían interpretar como que son términos transitorios "cerrados" que no permiten la inclusión de componentes adicionales distintos de los componentes mencionados en las reivindicaciones. La expresión "que consiste esencialmente en" se debería interpretar como parcialmente cerrada y que permite la inclusión solamente de componentes adicionales que no alteran fundamentalmente la naturaleza de la materia objeto que se reivindica.

35 Los términos "sujeto", "paciente" o "huésped" se pueden utilizar de manera intercambiable en el presente documento y se pueden referir a seres humanos o animales no humanos. Los animales no humanos pueden incluir, pero no se limitan a las aves de corral (por ejemplo, pollos y pavos), vacas, cerdos, caballos, perros y gatos.

40 Los términos "sujeto", "paciente", o "individuo" se pueden utilizar respecto a un ser humano o un animal no humano que tiene o está en riesgo de adquirir una infección por un agente patógeno (por ejemplo, un agente patógeno bacteriano, vírico o fúngico) o una enfermedad (por ejemplo, un cáncer o una enfermedad autoinmunitaria) que sea susceptible al tratamiento o protección mediante una vacuna. Por ejemplo, los individuos que se tratan con las composiciones desveladas en el presente documento pueden estar en riesgo de una infección con un agente patógeno o pueden haber sido infectados ya con el agente patógeno. Los individuos que se tratan con las composiciones desveladas en el presente documento pueden estar en riesgo de cáncer o pueden ya haber adquirido un cáncer. Los individuos que se tratan con las composiciones desveladas en el presente documento pueden estar en riesgo de una enfermedad autoinmunitaria o pueden ya haber adquirido una enfermedad autoinmunitaria.

45 Partículas biodegradables. Las composiciones desveladas incluyen composiciones que comprenden partículas biodegradables. Las partículas biodegradables tienen normalmente un diámetro medio eficaz de 0,1-20 μm y preferentemente de 0,5-10 μm . Se puede hacer referencia a las partículas biodegradables en el presente documento como "micropartículas" y/o "nanopartículas". Las partículas son biodegradables como se entendería en la técnica. El término "biodegradable" describe un material que es capaz de degradarse en un entorno fisiológico en los componentes básicos más pequeños. Preferentemente, los componentes básicos más pequeños son inocuos. Por ejemplo, un polímero biodegradable se puede degradar en componentes básicos que incluyen, pero no se limitan a, agua, dióxido de carbono, azúcares, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido tricarbóxico o aminoácidos), y alcoholes (por ejemplo, glicerol o polietilenglicol). Los materiales biodegradables que se pueden utilizar para preparar las partículas contempladas en el presente documento pueden incluir materiales desvelados en las Patentes de EE. UU. N.º 7.470.283; 7.390.333; 7.128.755; 7.094.260; 6.830.747; 6.709.452; 6.699.272; 6.527.801; 5.980.551; 5.788.979;

5.766.710; 5.670.161; y 5.443.458; y las Solicitudes Publicadas de EE. UU. N.º 20090319041; 20090299465; 20090232863; 20090192588; 20090182415; 20090182404; 20090171455; 20090149568; 20090117039; 20090110713; 20090105352; 20090082853; 20090081270; 20090004243; 20080249633; 20080243240; 20080233169; 20080233168; 20080220048; 20080154351; 20080152690; 20080119927; 20080103583; 5 20080091262; 20080071357; 20080069858; 20080051880; 20080008735; 20070298066; 20070288088; 20070287987; 20070281117; 20070275033; 20070264307; 20070237803; 20070224247; 20070224244; 20070224234; 20070219626; 20070203564; 20070196423; 20070141100; 20070129793; 20070129790; 20070123973; 20070106371; 20070050018; 20070043434; 20070043433; 20070014831; 20070005130; 10 20060287710; 20060286138; 20060264531; 20060198868; 20060193892; 20060147491; 20060051394; 20060018948; 20060009839; 20060002979; 20050283224; 20050278015; 20050267565; 20050232971; 20050177246; 20050169968; 20050019404; 20050010280; 20040260386; 20040230316; 20030153972; 20030153971; 20030144730; 20030118692; 20030109647; 20030105518; 20030105245; 20030097173; 20030045924; 20030027940; 20020183830; 20020143388; 20020082610; y 0020019661. Normalmente, las partículas biodegradables desveladas en el presente documento se degradan *in vivo* con una velocidad de degradación de manera que las partículas pierden más de aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % de su masa inicial después de aproximadamente 4, 5, 6, 7, o 8 semanas después de la administración. Las partículas pueden comprender o pueden estar formadas de un material biodegradable polimérico o no polimérico. Si las partículas comprenden un material polimérico, normalmente las partículas se degradan en monómeros biodegradables. Si las partículas comprenden un material no polimérico, normalmente las partículas se degradan en componentes biodegradables.

Las partículas biodegradables comprenden poliláctidos (PLA) incluyendo el ácido poliláctico, por ejemplo, poliglicólidos (PGA), incluyendo el ácido poliglicólico y copolímeros de PLA y PGA (es decir, PLGA). Otros polímeros adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, policaprolactona (PCL), poli (dioxanona) (PDO), colágeno, colágeno renaturalizado, gelatina, gelatina renaturalizada, gelatina reticulada, y sus copolímeros. El polímero de las partículas biodegradables se diseña para degradarse como resultado de la hidrólisis de las cadenas poliméricas en componentes biológicamente aceptables y progresivamente menores tales como poliláctidos, poliglicólidos, y sus copolímeros. Esta rotura eventualmente en ácido láctico y ácido glicólico, entran en el ciclo de Krebs y se rompen en dióxido de carbono y agua y se excretan.

Los no polímeros adecuados pueden incluir compuestos poco solubles tales como los compuestos que se ha demostrado que funcionan como inmunomoduladores. Un compuesto adecuado es el nelfinavir, que se ha demostrado que presenta un efecto de inmunopotenciación. Como tales, las partículas biodegradables que se contemplan en el presente documento pueden incluir partículas biodegradables formadas a partir de compuestos inmunomoduladores.

Las partículas biodegradables desveladas se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, secado por pulverización, precipitación, y molido. En algunas realizaciones, las partículas biodegradables se pueden formar a partir de una solución o suspensión de un material biodegradable opcionalmente en presencia de un o más agentes adicionales tales como adyuvantes, inhibidores de la apoptosis, y/o antígenos (por ejemplo, mediante secado por pulverización de la solución o suspensión). Como tales, las partículas biodegradables pueden comprender un material biodegradable y opcionalmente pueden comprender uno o más agentes adicionales tales como adyuvantes, inhibidores de la apoptosis, y/o antígenos.

Las partículas biodegradables desveladas pueden administrarse con el fin de inducir una respuesta en un sujeto. Los métodos no terapéuticos de la invención comprenden la administración de una composición que comprende partículas biodegradables para mejorar la tasa de conversión del pienso en un sujeto animal.

La dosis de partículas biodegradables que se administran en los métodos desvelados puede variar basándose en el peso de un sujeto. Por ejemplo, a un ratón que tenga un peso de 20 g se le puede administrar una dosis de partículas equivalente a aproximadamente 1 - 100 µg (o 2 - 50 µg o 5 - 20 µg). Esta dosis puede escalarse alométricamente basándose en la fórmula $(BW/20)^{3/4}$ = factor de escalado alométrico, donde "BW" es igual al peso corporal del animal diana en gramos. Asumiendo que el animal diana es un pollo que pese 1600 g, el factor de escalado alométrico es $(1.600/20)^{3/4}$ = 26,7. Multiplicando la cantidad de micropartículas de 10 µg que se utilizó para un ratón de 20 g por el factor de escalado de 26,7 para un pollo de 1600 g da como resultado una dosis de micropartículas de ~270 µg. De manera similar, para un ser humano que tenga un peso 80.000 g el factor de escalado alométrico es $(80000/20)^{3/4}$ = 503. Multiplicando la cantidad de micropartículas de 10 µg que se utilizó para un ratón de 20 g por el factor de escala de 503 para un ser humano de 80000 g da como resultado una dosis de micropartículas de ~5030 µg.

Adyuvantes Las composiciones desveladas en el presente documento incluyen opcionalmente un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que aumenta una respuesta inmunitaria. Un adyuvante puede servir como depósito tisular que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfóide que aumenta no específicamente la respuesta inmunitaria. Ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar en las composiciones desveladas incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes copoliméricos (por ejemplo, Pluronic L121® marca poloxamer 401, CRL1005, o un adyuvante copolimérico de bajo peso molecular tal como el adyuvante

5 Polygen®), poli (I:C), R-848 (un adyuvante tipo Th1), resiquimod, imiquimod, PAM3CYS, fosfatos de aluminio (por ejemplo, $AlPO_4$), loxoribina, adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como el BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) y antígenos derivados de *Corynebacterium parvum*, oligodesoxinucleótidos CpG (ODN), toxina colérica (por ejemplo, CTA1-DD), adyuvantes lipopolisacáridicos, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina (por ejemplo, Quil-A), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie tales como lisolectina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas o de hidrocarburos en agua (por ejemplo, MF59 disponible en Novartis Vaccines o Montanide ISA 720), hemocianinas de lapa californiana, y dinitrofenol.

10 Inhibidores de la apoptosis. Las composiciones desveladas en el presente documento pueden incluir opcionalmente un inhibidor de la apoptosis. Un "inhibidor de la apoptosis" se refiere a una molécula pequeña que inhibe el inicio o progresión celular a través del proceso de apoptosis. Los inhibidores de la apoptosis pueden incluir inhibidores pequeños de la pan-caspasa (por ejemplo, Q-VD-OPH y emriscan) o inhibidores de otras enzimas implicadas en las rutas apoptóticas, así como inhibidores de c-Myc, Bax, p53, tBid, y BCL que median en la apoptosis.

15 Antígenos y dosis. Las composiciones desveladas en el presente documento no comprenden un antígeno para la inducción de la inmunidad adaptativa.

20 Estimuladores inmunitarios. Las composiciones desveladas en el presente documento pueden incluir composiciones farmacéuticas que se administran como estimuladores inmunitarios. Normalmente, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz o concentración de un estimulador inmunitario.

Formulación de las composiciones farmacéuticas

25 Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden formular como vacunas para su administración a un sujeto que las necesite. Dichas composiciones se pueden formular y/o administrar en dosificaciones y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica médica teniendo en consideración factores tales como la edad, sexo, peso, y estado del paciente en particular, y la vía de administración.

30 Las composiciones pueden incluir soluciones farmacéuticas que comprenden vehículos, diluyentes, excipientes (por ejemplo, excipientes en polvo tales como lactosa, sacarosa, y manitol), y tensioactivos (por ejemplo, tensioactivos no iónicos tales como Kolliphor HS 15, Kolidon 12 PF, y Tween-20) como se sabe en la técnica. Además, las composiciones pueden incluir conservantes (por ejemplo, agentes antimicrobianos o antibacterianos tales como el cloruro de benzalconio). Las composiciones pueden incluir también agentes tampón (por ejemplo, con el fin de mantener el pH de la composición entre 6,5 y 7,5).

Las composiciones farmacéuticas se administran de manera no terapéutica.

40 Las composiciones desveladas en el presente documento se pueden suministrar mediante una variedad de vías. Las vías de suministro típicas incluyen la administración parenteral (por ejemplo, el suministro intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, o subcutáneo). Otras vías incluyen las vías intranasal e intrapulmonar. Las vías adicionales incluyen las vías de administración oral, intravaginal, e intrarrectal. Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas pueden incluir líquidos (por ejemplo, soluciones y emulsiones), pulverizaciones y aerosoles. En particular, las composiciones pueden formularse como aerosoles o pulverizaciones para el suministro intranasal o intrapulmonar. Los dispositivos adecuados para la administración en aerosoles o pulverizaciones para el suministro intranasal o intrapulmonar pueden incluir inhaladores y nebulizadores.

50 Las composiciones desveladas en el presente documento pueden coadministrarse o administrarse secuencialmente con otras composiciones inmunológicas, antigénicas o vacunales o terapéuticas, que incluye un adyuvante, o un agente químico o biológico dando en combinación con un antígeno para aumentar la inmunogenicidad del antígeno. Los agentes terapéuticos adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, citocinas tales como interferones (por ejemplo, IFN- γ) e interleucinas (por ejemplo, IL-2).

Régimen de vacunación de sensibilización-refuerzo

55 Como se utiliza en el presente documento, un "régimen de vacunación de sensibilización-refuerzo" se refiere a un régimen en el que se administra a un sujeto una primera composición y luego después de un determinado periodo de tiempo (por ejemplo, después de 2, 3, 4, 5, o 6 semanas), se le administra al sujeto una segunda composición, que puede ser la misma o diferente de la primera composición. La primera composición (y la segunda composición) puede administrarse una o más veces. Los métodos desvelados pueden incluir la sensibilización de un sujeto con una primera composición administrando la primera composición al menos una vez, permitiendo una longitud predeterminada de tiempo para que pasen (por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, o 6 semanas), y luego un refuerzo administrando la misma composición o una segunda composición diferente.

65 Caracterización de la respuesta inmunitaria en individuos vacunados

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden suministrar a sujetos en riesgo de una enfermedad (por ejemplo, la infección por un agente patógeno) o a sujetos que han adquirido la enfermedad (por ejemplo, un sujeto que se ha sido infectado por un agente patógeno). Con el fin de evaluar la eficacia de una composición inmunogénica o vacuna, la respuesta inmunitaria se puede evaluar midiendo la inducción de respuestas mediadas por células y/o anticuerpos contra epítopos en particular. Las respuestas de células T se pueden medir, por ejemplo, utilizando una tinción de tetrámeros de PBMC recientes o cultivadas, ensayos ELISPOT o utilizando ensayos de citotoxicidad funcionales, que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las respuestas de anticuerpo se pueden medir mediante ensayos conocidos en la técnica tales como un ELISA. El título o carga de un patógeno puede medirse utilizando métodos en la técnica incluyendo métodos que detectan el ácido nucleico de un agente patógeno. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 7.252.937). Las respuestas inmunitarias también pueden caracterizarse por las respuestas fisiológicas. (Véase Li et al, *Vaccine* 28 (2010) 1598-1605; y Stemke-Hale et al., *Vaccine* 2005 abr 27;23(23):3016-25). La respuesta inmunitaria también se puede medir mediante respuestas patológicas tales como la pérdida o ganancia total de peso por el animal (por ejemplo, la pérdida de peso asociada con la infección por un agente patógeno). La respuesta inmunitaria también se puede medir por las respuestas de pérdida o ganancia de peso de un órgano del animal (por ejemplo, la ganancia de peso del pulmón infectado con *C. abortus*, o la ganancia de peso de la bolsa de Fabricio en pollos infectados con el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar la materia objeto desvelada.

Glosario de términos y acrónimos y descripción de los experimentos

- PLGA RG502H: copolímero biodegradable poli (láctido-co-glicólido-poli (50 %:50 %)).
- PLA-PEG: copolímero biodegradable poli(láctido-co-glicólido (50 %:50 %)), modificado químicamente mediante la incorporación de polietilenglicol al 5 % (PEGilación) con un peso molecular de 5.000.
- PLA L206S: polímero biodegradable poli(L-láctido).
- Nelfinavir: mesilato de nelfinavir, que es un inhibidor de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana y se utiliza como un fármaco antirretrovírico. El nelfinavir también tiene actividad inmunoestimulante y/o inmunopotenciadora y es poco hidrosoluble.
- Pluronic L121: copolímero en bloque polioxietileno-polioxipropileno, que es un tensioactivo y un adyuvante.
- Resiquimod o R-848: ligando selectivo para el receptor 7 tipo Toll (TLR7) en el ratón, que es un adyuvante.
- Di-behenato de trehalosa: análogo sintético de dimicolato de trehalosa del factor cordal del bacilo tuberculoso, que es un adyuvante.
- Poli (I:C): polirribonucleótido de doble cadena poli(I):poli(C), que es un adyuvante y que induce el interferón.
- Q-VD-OPH: inhibidor de la pan-caspasa que se une de manera irreversible a las caspasas activadas para bloquear la apoptosis. El Q-VD-OPH está compuesto por los aminoácidos valina y aspartato con quinolil en el extremo N y un grupo di-fluorofenoxi metilcetona en el extremo C. El Q-VD-OPH es altamente permeable para la célula y no tóxico *in vitro* e *in vivo* a altas concentraciones.
- Emricasan o IDN-6556: inhibidor de la caspasa de amplio espectro irreversible que bloquea la apoptosis.
- Kolliphor HS 15: 15-hidroxi estearato - polietilenglicol, USP: 15-Hidroxiestearato polioxil, Ph. Eur.: Macrogol 15-hidroxiestearato, que es un agente solubilizante y emulsionante no iónico.
- Kollindon 12 PF: polivinilpirrolidona soluble con un peso molecular de 2.000-3.000, que es un agente solubilizante, dispersante, e inhibidor de la cristalización.
- Tween-20: tensioactivo de polioxietileno no iónico.
- Cloruro de Benzalconio: compuesto de amonio cuaternario con eficacia antimicrobiana sobre un amplio intervalo de pH a una concentración de menos del 0,02 %.
- PBS: Solución salina tampón de fosfato.
- IBDV: Virus infeccioso de la enfermedad de la bolsa, que es un virus ADN de doble cadena de la familia de *Birnavirus* que produce una infección de la bolsa de Fabricio en pollos jóvenes que destruye los linfocitos B de este

órgano. La ausencia de linfocitos B hace que estos pollos sean incapaces de producir anticuerpos y los hace por tanto altamente susceptibles a muchas enfermedades infecciosas.

5 C3H/HeJ: estirpe de ratón endogámico que tiene una mutación en el gen del receptor 4 tipo Toll (*TLR4*) que da como resultado una proteína TLR4 truncada (acortada). La TLR-4 se une a un polisacárido bacteriano (LPS) y desencadena la respuesta inflamatoria después de la exposición al LPS. Debido a la ausencia virtual de respuesta al LPS, los ratones C3H/HeJ montan muy poca respuesta inflamatoria innata y también presentan una respuesta inmunitaria adaptativa aberrante. Estos ratones son extremadamente sensibles a las bacterias gram-negativas incluyendo las clamidias. Después del desafío de infección con clamidias intranasal se mantienen sin síntomas
10 clínicos apreciables durante aproximadamente una semana, pero entonces una gran parte de los ratones desafiados mueren durante las siguientes dos semanas debido a un sobrecrecimiento no inhibido de clamidias. El tratamiento con estimuladores inmunitarios puede sustituir parcialmente la ausencia de señalización de TLR4 y hace a estos ratones más resistentes a la infección por clamidias. Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos con estimulador inmunitario en ratones con esta estirpe de ratón.

15 A/J: estirpe endogámica de ratón que produce una respuesta inmunitaria innata débil con baja inflamación. Después del desafío intranasal con clamidia, los ratones intactos de esta estirpe desarrollan una enfermedad grave y altas cargas de clamidia en el pulmón debido al poco control sobre el crecimiento de las clamidias. Por el contrario, los ratones que son inmunes a las clamidias debido a la exposición previa a una infección de bajo nivel o debido a la
20 vacunación satisfactoria están completamente protegidos y no desarrollan la enfermedad. Por lo tanto, se llevaron a cabo en parte experimentos de vacunación con esta estirpe de ratón.

25 129S6: estirpe de ratón endogámica que tiene un defecto en el brazo efector del sistema inmunitario innato con una señalización de DAP12 aberrante en las células T citolíticas (NK). Debido a este defecto, los 129S6 montan una respuesta inmunitaria innata débil a las clamidias y son altamente susceptibles a *C. abortus*. Por el contrario, los ratones 129S6 montan una respuesta inmunitaria adaptativa completamente protectora después de la exposición a una infección de bajo nivel o debido a una vacunación satisfactoria, y están completamente protegidos y no desarrollan enfermedad después de la vacunación. Por lo tanto, se llevaron a cabo en parte experimentos de
30 vacunación con esta estirpe de ratón.

35 Experimentos con ratones: En el desafío de los ratones para los experimentos de infección con *Chlamydia abortus*, solo se utilizaron ratones hembra debido a que se pueden mantener en jaulas sin las graves peleas que son comunes en los ratones macho. Normalmente, para los experimentos con el estimulador inmunitario sin vacunación previa, se utilizaron ratones de 10 semanas de edad. Para los experimentos de vacunación, se vacunaron primero ratones más jóvenes de aproximadamente 6 semanas de edad o recibieron una dosis baja intranasal inmunizante de
40 infección con *C. abortus*, y se desafiaron con una alta dosis de infección 4-6 semanas más tarde a las 10-12 semanas de edad. Para el desafío intranasal, los ratones recibieron una anestesia ligera con isoflurano, y se depositaron 20 µl de una suspensión de 10^8 a 3×10^8 bacterias viables de *C. abortus* en un tampón de sacarosa-fosfato-glutamato en las narinas, desde las cuales los ratones inhalaban las bacterias. Para los experimentos con el estimulador inmunitario, se observaron los ratones hasta 3 semanas más tarde y se practicó la eutanasia a los ratones supervivientes. En los experimentos de vacunación, se practicó la eutanasia a los ratones entre los 10-12 días después del desafío.

45 En los experimentos de vacunación, los pulmones del ratón se pesaron y se homogeneizaron, se extrajo el ADN, y se determinaron las cargas pulmonares de genoma de *C. abortus* mediante una PCR en tiempo real explorando el gen del ARNr 23S de *Chlamydia spp.* Todos los experimentos con ratones estaban aprobados por el Auburn University Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

50 En todos los experimentos vacunales, los antígenos utilizados eran péptidos 20 méricos de las proteínas candidatas vacunales de *C. abortus* Dnax2, GatA, GatC, Omp90A, Pbp3. Estos péptidos se solapaban en 10 aminoácidos y por lo tanto comprendían todos los péptidos 10 méricos posibles de estas proteínas.

55 Experimentos con pollos: En los experimentos con pollos para la evaluación del tratamiento con estimulador inmunitario sobre la resistencia a las infecciones circulantes naturales y/o sobre el crecimiento corporal sin desafío de infección experimental, se utilizaron pollos híbridos de broiler convencionales recién eclosionados que pesaban 45-50 g el día de la eclosión y se les inyectaba por vía subcutánea el estimulador inmunitario en micropartículas. El peso corporal de estos pollos se determinó después de 3 semanas.

60 Para los experimentos de vacunación con IBDV, los pollos híbridos de broiler convencionales recién eclosionados se inmunizaron con micropartículas que contenían péptidos 20 méricos solapados de todas las proteínas del virus IBDV. Después de 3 semanas, los pollos recibieron un desafío intranasal del virus suspendido en PBS. Los pollos se pesaron y se les practicó la eutanasia después de 7 días, y se determinó el sexo, peso y apariencia de la Bolsa de Fabricio.

65 **Ejemplo 1. Experimento de estimulador inmunitario en ratones**

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprende una suspensión de partículas biodegradables para inducir una respuesta inmunitaria innata como un "estimulador inmunitario" en ratones con los parámetros de la Tabla 1.

5

Tabla 1

| | |
|------------------|--|
| Sistema modelo | Experimento de estimulador inmunitario en ratones: terminación del análisis de supervivencia día 21 después del desafío |
| Estirpe de ratón | C3H/HeJ, de 10 semanas de edad al inicio del experimento |
| Desafío | 10 ⁸ cuerpos elementales de <i>C. abortus</i> , 21, 11 o 1 días después del estimulador inmunitario |
| Administración | 1 x intranasal (IN) de 10 µg de una preparación de estimulador inmunitario en micropartículas y 30 µg de lactosa en polvo microfino en 20 µl de PBS/0,1 % Kolliphor HS 15 1x PBS de control: 20 µl intranasal |
| Formulación | Micropartículas (de 1-10 µm) secadas por pulverización a partir de PLGA-PEG y Pluronic L121 (3:2) |
| Conclusión | Se descubrió que la administración local (intranasal) del estimulador inmunitario en micropartículas en el sitio de inoculación del desafío era eficaz si se daba 1 día antes del desafío hasta al menos 3 semanas antes de la inoculación de desafío. |

Como se indica en la Tabla 1, se prepararon micropartículas que tenían un diámetro medio eficaz de 1-10 µm mediante secado por pulverización de una solución de PLGA-PEG y Pluronic L121 (3:2). (Véase la Figura 1A). Con el fin de preparar el estimulador inmunitario, se mezclaron 10 µg de las micropartículas con 30 µg de lactosa en polvo microfino y se añadieron a 20 µl de PBS/0,1 % de Kolliphor HS 15 para formar una suspensión. El estimulador inmunitario (20 µl) se administró por vía intranasal a los ratones de 10 semanas de edad (estirpe C3H/HeJ). Como control, se administró 1x PBS. Los ratones se desafiaron los días 1, 11 o 21 después de la administración mediante administración intranasal de 10⁸ cuerpos elementales de *C. abortus*. Los resultados que se presentan en las Figuras 1B, C y D ilustran que los ratones a los que se les administró el estimulador inmunitario presentaban una tasa de supervivencia mayor que los ratones a los que se les administró el control. Estos resultados demuestran que puede administrarse un estimulador inmunitario que no contenga un antígeno contra *C. abortus* con el fin de inducir una inmunidad innata.

Ejemplo 2. Experimento de estimulador inmunitario en ratones

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprende una suspensión de partículas biodegradables y un adyuvante para inducir una respuesta inmunitaria innata como un "estimulador inmunitario" en ratones con los parámetros de la Tabla 2.

25

Tabla 2

| | |
|------------------|---|
| Sistema modelo | Experimento de estimulador inmunitario en ratones: terminación del análisis de supervivencia día 21 después del desafío |
| Estirpe de ratón | C3H/HeJ, de 10 semanas de edad al inicio del experimento |
| Desafío | 3 x 10 ⁸ cuerpos elementales de <i>C. abortus</i> , 1 día después del estimulador inmunitario |
| Administración | 1 x intranasal, 10 µg de cada preparación de estimulador inmunitario en micropartículas suspendidos en 20 µl de tampón de suspensión (un 0,1 % de Kolliphor HS 15, un 0,001 % de cloruro de benzalconio en PBS); antes de la suspensión, cada preparación de estimulador inmunitario se mezcló con una cantidad de 3 veces de lactosa en polvo microfino. |
| Formulación | Micropartículas (de 0,5-10 µm) secadas por pulverización a partir de un vehículo biodegradable y adyuvante: PLGA RG502H y adyuvantes: 1) Pluronic L121: 3,5 µg de Pluronic L121 y 6,5 µg de PLGA RG502H; 2) Resiquimod: 0,2 µg de resiquimod y 9,8 µg de PLGA RG502H; 3) Sin adyuvante: 10 µg de PLGA de RG502H. |
| Conclusiones | 1) Una preparación de micropartículas de PLGA RG502H más adyuvante administrada por vía intranasal a 10 µg por ratón era un estimulador inmunitario eficaz. 2) La adición de adyuvantes a las micropartículas de PLGA RG502H aumentaban el efecto estimulador inmunitario. 3) Diferentes adyuvantes mediaban un efecto estimulador inmunitario similar. |

Como se indica en la Tabla 2, se prepararon micropartículas que tenían un diámetro medio eficaz de 0,5-10 µm mediante secado por pulverización de una solución de PLGA RG502H (copolímero poli(láctido-co-glicólido-poli (50 %:50 %)) y adyuvantes. La formulación de micropartículas 1) incluía 6,5 µg de PLGA RG502H y 3,5 µg de Pluronic L121; la formulación de micropartículas 2) incluía 9,8 µg de PLGA RG502H y 0,2 µg de resiquimod; y la formulación de partículas 3) incluía 10 µg de PLGA RG502H (es decir, sin adyuvante). Las formulaciones de micropartículas se mezclaron con una cantidad de 3 veces de lactosa en polvo microfino y se añadieron a 20 µl de tampón de suspensión (un 0,1 % de Kolliphor HS 15, un 0,001 % de cloruro de benzalconio en PBS) para preparar

30

un estimulador inmunitario. El estimulador inmunitario (20 µl) se administró por vía intranasal a los ratones de 10 semanas de edad (estirpe C3H/HeJ). Los ratones se desafiaron el día 1 después de la administración mediante administración intranasal de 10⁸ cuerpos elementales de *C. abortus*. Los resultados que se presentan en la Figura 2A y B ilustran que los ratones a los que se les administró el estimulador inmunitario que comprendía un adyuvante presentaban una tasa de supervivencia mayor y una menor pérdida de peso corporal que los ratones a los que se les administró el estimulador inmunitario que carecía de adyuvante. Estos resultados demuestran que los adyuvantes pueden utilizarse para aumentar el efecto de un estimulador inmunitario que comprende micropartículas para inducir la inmunidad innata.

10 Ejemplo 3. Ensayo de estimulador inmunitario en pollos

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprende una suspensión de partículas biodegradables para inducir una respuesta inmunitaria innata como un "estimulador inmunitario" en pollos con los parámetros de la Tabla 3.

Tabla 3

| | |
|------------------|---|
| Sistema modelo | Ensayo de estimulador inmunitario en pollos: Dos experimentos de crecimiento agrupados desde la eclosión hasta el día 28 con administración del estimulador inmunitario o tampón de suspensión de control el día de la eclosión; análisis de supervivencia de impacto sobre las pérdidas de pollos |
| Estirpe de pollo | Pollos broiler convencionales |
| Tratamiento | 1 x 200 µl por vía subcutánea |
| Desafío | NINGUNO |
| Formulaciones | 1) 270 µg de estimulador inmunitario en micropartículas (de 1-10 µm) secadas por pulverización a partir de PLGA-PEG y Pluronic L121 (6,5:3,5) combinados con 810 µg lactosa en polvo microfino 2) Suspensión de tampón (200 µl: Un 0,1 % de Kolliphor HS 15, un 0,001 % de cloruro de benzalconio en PBS) |
| Dosificación | La dosis del estimulador inmunitario en micropartículas se escaló alométricamente 27 veces para el peso diana de 1.600 g de los pollos a las 3 semanas en comparación con los 10 µg de estimulador inmunitario en partículas para los 20 g de peso diana del ratón: $(1.600/20)^{3/4} = 26,7$. |
| Antígeno | NINGUNO |
| Conclusión | La administración subcutánea de un estimulador inmunitario en micropartículas suministrado como micropartículas de PLGA-PEG secadas por pulverización que contengan un adyuvante copolimérico era eficaz. El efecto se observaba utilizando una única dosis total de 270 microgramos del estimulador inmunitario. |

Como se indica en la Tabla 3, se prepararon micropartículas que tenían un diámetro medio eficaz de 1-10 µm mediante secado por pulverización de una solución de PLGA-PEG y Pluronic L121 (6,5:3,5). Con el fin de preparar la composición de estimulador inmunitario, se combinaron 270 µg de las micropartículas con 810 µg de lactosa en polvo microfino y se añadieron a 200 µl de tampón de suspensión (un 0,1 % de Kolliphor HS 15, un 0,001 % de cloruro de benzalconio en PBS). Se llegó a los 270 µg de micropartículas mediante el escalado alométrico de la cantidad de 10 µg de micropartículas utilizada para un ratón de 20 g basándose en la fórmula $(BW/20)^{3/4}$ = factor de escalado alométrico, donde "BW" es igual al peso corporal del animal diana en gramos. Asumiendo que el peso diana de un pollo es de 1600 g, el factor de escalado alométrico es $(1.600/20)^{3/4} = 26,7$. Multiplicando la cantidad de micropartículas de 10 µg que se utilizó para un ratón de 20 g por el factor de escala de 26,7 da como resultado ~270 µg.

El estimulador inmunitario así formulado (200 µl) se administró por vía subcutánea a pollos broiler convencionales el día de la eclosión. Se administró el tampón de suspensión sin las micropartículas como control. Los pollos no se desafiaron y se determinó la tasa de supervivencia acumulada para los pollos a los que se había administrado el estimulador inmunitario frente al control. Los resultados que se presentan en las Figura 3 ilustran que los pollos a los que se les administró el estimulador inmunitario presentaban una tasa de supervivencia acumulada mayor que los pollos a los que se les administró el control. Estos resultados demuestran que se puede administrar un estimulador inmunitario que no contenga un antígeno con el fin de aumentar la tasa de supervivencia en pollos.

Ejemplo 4. Ensayo de estimulador inmunitario y aumento del crecimiento en pollos

Se ensayó la capacidad de una composición que comprende una suspensión de partículas biodegradables para inducir una respuesta inmunitaria innata como un "estimulador inmunitario" en pollos con los parámetros de la Tabla 4.

Tabla 4

| | |
|----------------|---|
| Sistema modelo | Ensayo de estimulador inmunitario y aumento del crecimiento en pollos: Evaluación del efecto del estimulador inmunitario sobre el peso corporal |
| Animal | pollos, eclosionados el día del experimento |
| Administración | 1 x subcutánea de 270 µg de una preparación de estimulador inmunitario en micropartículas y 810 µg de lactosa en polvo microfino en 200 µl de PBS/0,1 % Kolliphor HS 15 1x PBS de control: 200 µl subcutáneos |
| Formulación | Micropartículas (de 1-10 µm) secadas por pulverización a partir de PLGA-PEG y Pluronic L121 (6,5:3,5) |
| Conclusiones | La inyección subcutánea a escala alométrica de 270 µg del estimulador inmunitario en micropartículas el día de la eclosión aumenta el peso corporal de pollos de 22 días de edad unos 116 g desde 886 g a 1012 g (un 14,2 %). |

5 Como se indica en la Tabla 4, se prepararon micropartículas que tenían un diámetro medio eficaz de 1-10 µm mediante secado por pulverización de una solución de PLGA-PEG y Pluronic L121 (6,5:3,5). Con el fin de preparar la composición de estimulador inmunitario, se combinaron 270 µg de las micropartículas con 810 µg de lactosa en polvo microfino y se añadieron a 200 µl de tampón de suspensión (un 0,1 % de Kolliphor HS 15, un 0,001 % de cloruro de benzalconio en PBS).

10 El estimulador inmunitario así formulado (200 µl) se administró por vía subcutánea a pollos broiler convencionales el día de la eclosión. Se administró el tampón de suspensión sin las micropartículas como control. Los pollos no se desafiaron y se evaluó la ganancia de peso 21 días después de la administración. Los resultados que se presentan en las Figura 4 ilustran que los pollos a los que se les administró el estimulador inmunitario presentaban un peso corporal medio mayor que los pollos a los que se les administró el control. Estos resultados demuestran que se puede administrar un estimulador inmunitario que no contenga un antígeno con el fin de aumentar el crecimiento en pollos.

15 Ejemplo 5

20 Se ensayó la capacidad de una composición que comprende una suspensión de partículas biodegradables para inducir una respuesta inmunitaria innata como un "estimulador inmunitario" y para mejorar la tasa de conversión de pienso en pollos con los parámetros de la Tabla 5.

Tabla 5

| | |
|-------------------|--|
| Sistema modelo | Ensayo de estimulador inmunitario y aumento del crecimiento en pollos: Evaluación del efecto del estimulador inmunitario sobre la conversión del pienso |
| Estirpe de pollo | Pollos broiler convencionales |
| Desafío | NINGUNO |
| Tratamiento | 1 x subcutáneo de 270 µg de una preparación de estimulador inmunitario en micropartículas y 810 µg de lactosa en polvo microfino en 200 µl de tampón de suspensión (PBS/0,1 % Kolliphor HS 15/un 0,001 % de cloruro de benzalconio) al eclosionar 1x de control: 200 µl de tampón de suspensión por vía subcutánea al eclosionar |
| Formulación | Micropartículas (de 1-10 µm) secadas por pulverización a partir de PLGA-PEG y Pluronic L121 (6,5:3,5) |
| Dosis de antígeno | NINGUNA |
| Conclusión | Una única dosis subcutánea, escalada alométricamente del estimulador inmunitario en micropartículas reducía significativamente la tasa de conversión de pienso desde 1,264 g de pienso para 1,0 g de ganancia de peso corporal en los pollos de control a 1,243 g de pienso para 1,0 g de ganancia de peso corporal en pollos tratados con el estimulador inmunitario. |

25 Como se indica en la Tabla 5, se prepararon micropartículas que tenían un diámetro medio eficaz de 1-10 µm mediante secado por pulverización de una solución de PLGA-PEG y Pluronic L121 (6,5:3,5). Con el fin de preparar la composición de estimulador inmunitario, se combinaron 270 µg de las micropartículas con 810 µg de lactosa en polvo microfino y se añadieron a 200 µl de tampón de suspensión (un 0,1 % de Kolliphor HS 15, un 0,001 % de cloruro de benzalconio en PBS).

30 El estimulador inmunitario así formulado (200 µl) se administró por vía subcutánea a pollos broiler convencionales el día de la eclosión. Se administró el tampón de suspensión sin las micropartículas como control. El tamaño de la muestra era de 96 pollos broiler hembra cada una en 12 gallineros en batería de 8 pollos alimentados durante 3 semanas. Los pollos no se desafiaron y se evaluó la tasa de conversión de pienso midiendo el consumo de pienso por peso corporal (es decir, g de pienso necesarios por ganancia de peso corporal). Los resultados que se presentan

en las Figura 5 ilustran que los pollos a los que se les administró el estimulador inmunitario presentaban una mejor tasa de conversión del pienso que los pollos a los que se les administró el control. Estos resultados demuestran que se puede administrar un estimulador inmunitario que no contenga un antígeno con el fin de aumentar la tasa de conversión de pienso.

5

Ejemplo 6. Ensayo de estimulador inmunitario en ratones con inhibidor de la apoptosis

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprende una suspensión de partículas biodegradables y un inhibidor de la apoptosis para inducir una respuesta inmunitaria innata como un "estimulador inmunitario" y para aumentar la tasa de supervivencia en ratones con los parámetros de la Tabla 6.

10

Tabla 6

| | |
|----------------------------------|--|
| Sistema modelo | Experimento de estimulador inmunitario en ratones: análisis de supervivencia día 21 después de terminar el desafío |
| Estirpe de ratón | C3H/HeJ, de 10 semanas de edad al inicio del experimento |
| Desafío | 10 ⁸ cuerpos elementales de <i>C. abortus</i> 3 días después del tratamiento |
| Tratamiento | 1X por vía intraperitoneal (en 200 µl de HBSS) y 1/10 de la dosis intranasal (en 20 µl de HBSS) |
| Vehículos | 1) 8 µg de nelfinavir y 3,6 µg de Pluronic L121® 2) 8 µg de nelfinavir y 3,6 µg de Pluronic L121® + 0,16 µg de Q-VD-OPH (inhibidor de la apoptosis) |
| Dosis de estimulador inmunitario | Estimulador inmunitario suministrado como un total de 12 µg compuesto por micropartículas secadas por pulverización de ~5 µm |
| Conclusión | La inhibición de la apoptosis modula la respuesta inmunitaria innata de no protectora a protectora si se incluye un inhibidor de la apoptosis de molécula pequeña en un estimulador inmunitario suministrado como micropartículas de nelfinavir secadas por pulverización que contengan un adyuvante copolimérico. Este efecto se produce con una única dosis total de 12 microgramos del estimulador inmunitario. |

15 Como se indica en la Tabla 6, las micropartículas se prepararon a partir de nelfinavir (8 µg) combinado con Pluronic L121® (3,6 µg) y se añadieron a HBSS (200 µl) para preparar un estimulador inmunitario. Se añadió el inhibidor de la apoptosis Q-VD-OPH (0,16 µg) para ensayar su efecto sobre la estimulación inmunitaria. El estimulador inmunitario se administró por vía intraperitoneal (200 µl) e intranasal (20 µl) a ratones C3H/HeJ que tenían 10 semanas de edad al inicio del experimento. Los ratones se desafiaron entonces a los 3 días después de la administración mediante administración intranasal de 10⁸ cuerpos elementales de *C. abortus*. Los resultados que se
20 presentan en las Figura 6 ilustran que los ratones a los que se les administró el estimulador inmunitario que comprendía un inhibidor de la apoptosis presentaban una tasa de supervivencia acumulada mayor que los ratones a los que se les administró un estimulador inmunitario que carecía del inhibidor de la apoptosis. Estos resultados demuestran que los inhibidores de la apoptosis pueden utilizarse para aumentar el efecto de un estimulador
25 inmunitario que comprende las micropartículas para inducir la inmunidad innata.

Ejemplo 7. Ensayo de vacunación en ratones con un inhibidor de la apoptosis y un antígeno

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprendía una suspensión de partículas biodegradables, un inhibidor de la apoptosis (Q-VD-OPH o emricasan), y un antígeno para inducir una respuesta protectora de células T frente a una respuesta no protectora/patógena en ratones con los parámetros de la Tabla 7.

30

Tabla 7

| | |
|----------------------|---|
| Sistema modelo | Ensayo de vacunación en ratones Modelo de desafío respiratorio con <i>C. abortus</i> , terminación el día 11 después del desafío. Se analizaron el cambio de peso corporal y el peso del pulmón el día 11 después del desafío. |
| Estirpe de ratón | 129S6, de 6 semanas de edad cuando el tratamiento |
| Desafío | 3 x 10 ⁸ cuerpos elementales de <i>C. abortus</i> 6 semanas después del tratamiento |
| Tratamiento | 1x intranasal en 20 µl de tampón de suspensión |
| Vehículos/control es | 1. Vacuna: 6,5 µg de PLGA-PEG y 3,6 µg de Pluronic L121® + péptidos de <i>C. abortus</i> 2. Vacuna + inhibidor de la apoptosis: 6,5 µg de PLGA-PEG y 3,6 µg de Pluronic L121® + péptidos de <i>C. abortus</i> + 0,2 µg Q-VD-OPH 3. Vacuna + inhibidor de la apoptosis: 6,5 µg de PLGA-PEG y 3,6 µg de Pluronic L121® + péptidos de <i>C. abortus</i> + 0,2 µg de emricasan 4. Vehículo vacunal: 6,5 µg de PLGA-PEG y 3,6 µg de Pluronic L121® 5. Vacuna viva: inoculación intranasal de <i>C. abortus</i> a dosis baja (que produce la máxima protección) |

35

(continuación)

| | |
|--------------------------|--|
| Dosis de antígeno/vacuna | 0,2 femtomoles de cada uno de los péptidos 20-méricos que se solapan de las 5 proteínas mejor protectoras de <i>C. abortus</i> en un total de 10 µg de vacuna |
| Conclusión | La inhibición de la apoptosis modula la respuesta inmunitaria de los ratones a la vacuna de células T de no protectora/patógena a protectora si se incluye un inhibidor de la apoptosis de molécula pequeña en una vacuna suministrada como micropartículas de PLGA-PEG secadas por pulverización que contengan un adyuvante copolimérico. Este efecto se produce con una única dosis total de ~10 microgramos de la vacuna. |

Como se indica en la Tabla 7, las micropartículas se prepararon a partir de PLGA-PEG (6,5 µg) y se añadieron a Pluronic L121 (3,6 µg) para formar una composición de micropartículas para su uso como vehículo y control. (Véase vehículo vacunal 4, en la Tabla 7). Se preparó una vacuna añadiendo péptidos de *C. abortus* al vehículo en forma de 0,2 femtomoles de cada uno de los péptidos 20 méricos solapados de 5 proteínas protectoras de *C. abortus* (véase la Solicitud Publicada de EE. UU. N.º 2012/0009220) en un total de 10 µg de vacuna. (Véase Vacuna 1, en la Tabla 7). También se preparó una composición vacunal que comprende un inhibidor de la apoptosis añadiendo 0,2 µg de Q-VD-OPH (véase Vacuna + inhibidor de la apoptosis 2, en la Tabla 7) o 0,2 µg de emricasan (véase Vacuna + inhibidor de la apoptosis 3, Tabla 7). Se utilizó una vacuna viva como control. (Véase Vacuna viva 5, en la Tabla 7). Las composiciones vacunales y los controles se administraron por vía intranasal (20 µl) a ratones de 6 semanas de edad (estirpe 129S6). Los ratones se desafiaron 6 semanas después de la administración mediante administración intranasal de 10⁸ cuerpos elementales de *C. abortus*. Los resultados presentados en la Figura 7A, B, C y D ilustran que los ratones a los que se les administró la vacuna que contenía el inhibidor de la apoptosis presentaban la menor pérdida de peso y la menor ganancia de peso del pulmón similar a la de la vacuna viva, sugiriendo que el inhibidor de la apoptosis modulaba la respuesta de células T desde no protectora/patógena a protectora.

Ejemplo 8. Ensayo de vacunación en pollos con un inhibidor de la apoptosis y un antígeno

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprendía una suspensión de partículas biodegradables, un inhibidor de la apoptosis, y un antígeno para inducir una respuesta protectora de células T frente a una respuesta no protectora/patógena en pollos con los parámetros de la Tabla 8.

Tabla 8

| | |
|--------------------------|---|
| Sistema modelo | Ensayo de vacunación en pollos Modelo de desafío respiratorio con el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV), terminación el día 7 después del desafío. |
| Pollos | Pollos broiler convencionales, tratamiento el día de la eclosión |
| Desafío | Suspensión intranasal con IBDV a las 3 semanas después del tratamiento |
| Tratamiento | 1 x subcutáneo en 200 µl de tampón de suspensión |
| Vehículos/controles | 1. Vacuna: 175,5 µg de PLGA-PEG y 94,5 µg de Pluronic L121® + péptidos de IBDV 2. Vacuna + inhibidor de la apoptosis: 175,5 µg de PLGA-PEG y 94,5 µg de Pluronic L121® + péptidos de IBDV + 2,7, 5,4 o 10,8 µg de Q-VD-OPH 3. Pollos tratados con tampón de suspensión y desafiados con IBDV 4. Pollos tratados con tampón de suspensión y no desafiados con IBDV (sin enfermedad) |
| Dosis de antígeno/vacuna | 0,54 femtomoles de cada uno de los péptidos 20 méricos solapados de todas las proteínas del virus IBDV en un total de 270 µg de vacuna en micropartículas, escalada alométricamente 27 veces para el peso diana de 1.600 g de los pollos a las 3 semanas en comparación con los 10 µg de vacuna en micropartículas para un peso diana de un ratón de 20 g: $(1.600/20)^{3/4} = 26,7$. |
| Conclusión | La inhibición de la apoptosis modula la respuesta inmunitaria de los pollos a la vacuna de células T desde no protectora/patógena a protectora si se incluye un inhibidor de la apoptosis de molécula pequeña en una vacuna suministrada como micropartículas de PLGA-PEG secadas por pulverización que contengan un adyuvante copolimérico. Este efecto se produce con una única dosis de vacuna total de ~270 microgramos |

Como se indica en la Tabla 8, las micropartículas preparadas de una solución de PLGA-PEG y Pluronic L121 (175,5 µg: 94,5 µg) y péptidos del IBDV que consisten en 0,54 femtomoles de péptidos 20 méricos solapados de todas las proteínas del virus IBDV. Se incluyó el inhibidor de la apoptosis Q-VD-OPH en cantidades de 2,7, 5,4 o 10,8 µg. Con el fin de preparar las composiciones vacunales, se añadieron las micropartículas a 200 µl de tampón de suspensión.

Las composiciones vacunales y el control se administraron por vía subcutánea a pollos broiler convencionales el día de la eclosión. Se administró el tampón de suspensión solo como control. Los pollos se desafiaron tres semanas después de la administración administrando IBDV. Se analizaron el peso y la inflamación de la Bolsa de Fabricio el día 7 después del desafío, donde el IBDV se dirige selectivamente a las células B de la Bolsa de Fabricio de los pollos, dando lugar a inflamación seguido por atrofia. Esto reduce el peso de la Bolsa después de que baje la inflamación. La inflamación se valoró en una escala de 1-4, y el aumento del peso de la bolsa causado por la

inflamación se corrigió dividiendo el peso de la bolsa por la valoración de la inflamación. Los resultados que se presentan en la Figura 8A, B, C, D, E, F, G y H sugieren que el inhibidor de la apoptosis modulaba la respuesta de células T desde no protectora/patógena a protectora en los pollos inmunizados desafiados con el IBDV.

5 Ejemplo 9. Experimento de vacunación en ratones

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprendía una suspensión de partículas biodegradables que comprenden nelfinavir y un antígeno para inducir una respuesta protectora de células T en ratones con los parámetros de la Tabla 9.

10

Tabla 9. Experimento de vacunación en ratones

| | |
|-------------------|--|
| Sistema modelo | Experimento de vacunación en ratones: terminación del análisis de supervivencia día 21 después del desafío |
| Estirpe de ratón | C3H/HeJ, de 6 semanas de edad al inicio del experimento |
| Desafío | 10 ⁸ cuerpos elementales de <i>C. abortus</i> 4 semanas después de la 3 ^a vacunación |
| Vacunación | 3 x con intervalos de 4 semanas por vía subcutánea entre las escápulas |
| Dosis de antígeno | 0,1 femtomoles de cada péptido (0,22 pg de cada péptido) por ratón |
| Vehículo vacunal | 2 mg de nelfinavir y 50 µg de Poli (I:C) en 200 µl de HBSS = suministro antigénico como micropartículas de 1-20 µm de precipitado y nelfinavir molido con el adyuvante coprecipitado Poli (I:C) y los péptidos antigénicos |
| Conclusión | La vacunación con una dosis baja de antígeno eficaz puede utilizar diferentes adyuvantes y diferentes modalidades de suministro de micropartículas. |

Como se indica en la Tabla 9, las micropartículas que tienen un diámetro eficaz de (1-20 µm) se prepararon moliendo el nelfinavir que es muy poco hidrosoluble, inhibidor de proteasa HIV con el que tiene un efecto de inmunopotenciación. Las partículas de nelfinavir molido se coprecipitaron con 50 µg de Poli (I:C) y péptidos antigénicos en forma de 0,1 femtomoles de cada uno de los péptidos 20 méricos solapados de 5 proteínas de *C. abortus* que demostraron ser protectoras contra la infección (véase la Solicitud Publicada N.º 2012/0009220). Las partículas coprecipitadas se añadieron a 200 µl de HBSS para formar una composición vacunal. Las composiciones vacunales y el control (200 µl de HBSS) se administraron por vía subcutánea entre las dos escápulas de ratones de 6 semanas de edad (cepa C x H/HeJ) en tres veces a intervalos de cuatro semanas después de la vacunación. Los ratones se desafiaron a las 4 semanas después de la tercera vacunación mediante la administración intranasal de 10⁸ cuerpos elementales de *C. abortus* y se evaluó la proporción acumulada de ratones supervivientes. Como se indica en la Figura 9, los ratones vacunados presentaban ~ un 70 % de supervivencia acumulada mientras que los ratones de control presentaban ~ un 10 % de supervivencia acumulada.

15

20

25

Ejemplo 10. Experimento de vacunación en ratones

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprendía una suspensión de partículas biodegradables que comprenden nelfinavir y un antígeno para inducir una respuesta protectora de células T en ratones con los parámetros de la Tabla 10.

30

| | |
|-------------------|---|
| Sistema modelo | Experimento de vacunación: terminación del análisis de supervivencia día 21 después del desafío |
| Estirpe de ratón | C3H/HeJ, de 6 semanas de edad al inicio del experimento |
| Desafío | 10 ⁸ cuerpos elementales de <i>C. abortus</i> 6 semanas después de la vacunación |
| Vacunación | 1 x por vía subcutánea entre las escápulas |
| Dosis de antígeno | 1 femtomol de cada péptido (2,2 pg de cada péptido) por ratón |
| Vehículo vacunal | 5 mg de nelfinavir y 0,25 mg de Pluronic L121® en 200 µl de HBSS = suministro de antígeno como micropartículas de 1-10 µm secadas por pulverización |
| Conclusión | La vacunación de baja dosis de antígeno eficaz mediante el suministro en micropartículas puede utilizar una única vacunación de preparaciones secadas por pulverización que utilizan nelfinavir como vehículo y un copolímero como adyuvante. |

Como se indica en la Tabla 10, se prepararon micropartículas que tenían un diámetro medio eficaz de (1-10 µm) mediante secado por pulverización de nelfinavir (5 mg) y Pluronic L121® (0,25 mg). Las micropartículas se administraron con péptidos antigénicos en forma de 1,0 femtomoles de cada uno de los péptidos 20 méricos solapados de 5 proteínas de *C. abortus* que demostraron ser protectoras contra la infección (véase la Solicitud Publicada N.º 2012/0009220) en 200 µl de HBSS. Las composiciones vacunales y el control (200 µl de HBSS) se administraron por vía subcutánea entre las escápulas de ratones de 6 semanas de edad (estirpe C3H/HeJ). Los ratones se desafiaron a las 6 semanas después de la vacunación mediante la administración intranasal de 10⁸ cuerpos elementales de *C. abortus* y se evaluó la proporción acumulada de ratones supervivientes. Como se indica en la Figura 10, los ratones vacunados presentaban ~ un 60 % de supervivencia acumulada mientras que los ratones sin tratar presentaban ~ un 20 % de supervivencia acumulada.

35

40

Ejemplo 11. Ensayo de vacunación en ratones

- 5 Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprendía una suspensión de partículas biodegradables, un adyuvante copolimérico, y un antígeno para inducir una respuesta protectora de células T en ratones con los parámetros de la Tabla 11.

Tabla 11

| | |
|--------------------------|--|
| Sistema modelo | Ensayo de vacunación en ratones Modelo de desafío respiratorio con <i>C. abortus</i> , terminación el día 11 después del desafío. Se analizaron el cambio de peso corporal y el peso del pulmón el día 11 después del desafío, el cambio de peso corporal (pérdida) desde el día 2 - día 11 después del desafío. |
| Estirpe de ratón | 129S6, de 6 semanas de edad cuando el tratamiento |
| Desafío | 3×10^8 cuerpos elementales de <i>C. abortus</i> 6 semanas después del tratamiento |
| Tratamiento | 1x subcutáneo en 200 μ l de tampón de suspensión |
| Vehículos/controles | 1. Vacunas bajas en péptidos: 6,5 μ g de PLGA-PEG y 3,6 μ g de Pluronic L121® + 0,02 o 0,2 fM de péptidos de <i>C. abortus</i> 2. Vacunas altas en péptidos: 6,5 μ g de PLGA-PEG y 3,6 μ g de Pluronic L121® + 2,0 fM de péptidos de <i>C. abortus</i> 3. Vehículo vacunal: 6,5 μ g de PLGA-PEG y 3,6 μ g de Pluronic L121® 4. Vacuna viva: inoculación intranasal de <i>C. abortus</i> a dosis baja (que produce la máxima protección) |
| Dosis de antígeno/vacuna | 0,0, 0,02, 0,2 o 2,0 femtomoles de cada uno de los péptidos 20-méricos que se solapan de las 5 proteínas mejor protectoras de <i>C. abortus</i> en un total de 10 μ g de vacuna compuesta por micropartículas que tenían un diámetro medio eficaz de $\sim 2 \mu$ m |
| Conclusión | Es posible una vacunación eficaz con baja dosis de antígeno con una única vacunación de 10 μ g de micropartículas secadas por pulverización utilizando PLGA-PEG como vehículo y un copolímero como adyuvante. El aumento de la dosis de péptido antigénico de 0,02 o 0,2 fM a 2,0 fM modula la respuesta inmunitaria de las células T a la vacuna en los ratones desde no protectora/patógena a protectora. |

- 10 Las composiciones vacunales se prepararon combinando micropartículas de PLGA-PEG (6,5 μ g), Pluronic L121® (3,5 μ g) como adyuvante copolimérico, 0,0, 0,02, 0,2 o 2,0 femtomoles de péptidos de cada péptido 20 mérico solapado de las 5 proteínas de *C. abortus* que habían demostrado ser protectoras contra la infección (véase la Solicitud Publicada N.º 2012/0009220), en 200 μ l de tampón de suspensión.
- 15 Las composiciones vacunales y los controles (0,0 femtomoles de péptidos y la vacuna viva) se administraron por vía subcutánea entre las escápulas de ratones de 6 semanas de edad (estirpe 129S6). Los ratones se desafiaron a las 6 semanas después de la vacunación mediante la administración intranasal de 10^8 cuerpos elementales de *C. abortus* y se evaluaron la pérdida de peso corporal y la ganancia de peso del pulmón. Los resultados presentados en la Figura 11A, B, C, D, E, F, y G ilustran que los ratones a los que se les administró la vacuna que contenía 2,0 femtomoles de péptidos presentaban la menor pérdida de peso corporal y la menor carga de Chlamydia, y la menor ganancia de peso del pulmón similar a las de la vacuna viva, sugiriendo que una dosis de 2,0 femtomoles de péptidos modulaba la respuesta de células T desde no protectora/patógena a protectora.
- 20

Ejemplo 12. Ensayo de vacunación en pollos

- 25 Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprendía una suspensión de partículas biodegradables, un adyuvante copolimérico, y un antígeno para inducir una respuesta protectora de células T en pollos con los parámetros de la Tabla 12.

30

Tabla 12

| | |
|--------------------|--|
| Sistema modelo | Ensayo de vacunación en pollos Modelo de desafío respiratorio con el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV), terminación el día 7 después del desafío. Se analizó el peso y la inflamación de la Bolsa de Fabricio el día 7 después del desafío. |
| Pollos | Pollos broiler convencionales, tratamiento el día de la eclosión |
| Desafío | Suspensión intranasal con IBDV a las 3 semanas después del tratamiento |
| Tratamiento | 1 x subcutáneo en 200 μ l de tampón de suspensión |
| Vacunas/control es | 1. Vacunas altas en péptidos: 175,5 μ g de PLGA-PEG y 94,5 μ g de Pluronic L121® + 0,54 fmoles de cada péptido de IBDV 2. Vacunas altas en péptidos: 175,5 μ g de PLGA-PEG y 94,5 μ g de Pluronic L121® + 3,82 o 27,0 o 191,2 fmoles de cada péptido de IBDV 3. Pollos tratados con tampón de suspensión y desafío con IBDV 4. Pollos tratados con tampón de suspensión y sin desafío con IBDV (sin enfermedad) |

(continuación)

| | |
|-----------------|---|
| Dosis de vacuna | Los péptidos 20 méricos solapados de todas las proteínas del virus IBDV en un total de 270 µg de vacuna en micropartículas, se escalaron alométricamente 27 veces para el peso diana de 1.600 g de los pollos a las 3 semanas en comparación con los 10 µg de vacuna en micropartículas para un peso diana de un ratón de 20 g: $(1.600/20)^{3/4} = 26,7$. |
| Conclusión | El aumento de la dosis del péptido antigénico en una única dosis vacunal de ~270 microgramos en total modula la respuesta inmunitaria de las células T a la vacuna en los pollos desde no protectora/patógena a protectora en una vacuna suministrada como micropartículas de PLGA-PEG secadas por pulverización que contienen un adyuvante copolimérico. |

Como se indica en la Tabla 12, las micropartículas se prepararon a partir de una solución de PLGA-PEG y Pluronic L121 (175,5 µg: 94,5 µg) y péptidos del IBDV consistían en 0,54, 3,82, 27,0 o 191,2 femtomoles de péptidos 20 méricos solapados de todas las proteínas del virus IBDV. Con el fin de preparar las composiciones vacunales, se añadieron las micropartículas a 200 µl de tampón de suspensión.

Las composiciones vacunales y el control se administraron por vía subcutánea a pollos broiler convencionales el día de la eclosión. Los pollos se desafiaron tres semanas después de la administración administrando IBDV. Se analizó el peso y la inflamación de la Bolsa de Fabricio el día 7 después del desafío. La inflamación se valoró en una escala de 1-4, y el aumento del peso de la bolsa causado por la inflamación se corrigió dividiendo el peso de la bolsa por la valoración de la inflamación. Los resultados que se presentan en la Figura 12A, B, C, y D sugieren que una dosis de 3,82 - 191,2 femtomoles (frente a una dosis de 0,54 femtomoles) modulaba la respuesta de células T desde no protectora/patógena a protectora en los pollos inmunizados desafiados con el IBDV.

Ejemplo 13. Ensayo de vacunación en ratones

Este ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos. Se ensayó la capacidad de una composición que comprendía una suspensión de partículas biodegradables, un adyuvante copolimérico, y un antígeno para inducir una respuesta protectora de células T en ratones con los parámetros de la Tabla 13.

Tabla 13

| | |
|--------------------------|---|
| Sistema modelo | Ensayo de vacunación en ratones Modelo de desafío respiratorio con <i>C. abortus</i> , terminación el día 11 después del desafío. Se analiza el cambio en el peso corporal y el peso del pulmón el día 11 después del desafío. |
| Estirpe de ratón | 129S6, de 6 semanas de edad cuando el tratamiento |
| Desafío | 3×10^8 cuerpos elementales de <i>C. abortus</i> 6 semanas después del tratamiento |
| Tratamiento | 1x subcutáneo en 200 µl de tampón de suspensión |
| Vehículos/controles | 1. Vacuna: 6,5 µg de PLA L206S y 3,6 µg de Pluronic L121® + péptidos de <i>C. abortus</i> 2. Vehículo vacunal: 6,5 µg de PLA L206S y 3,6 µg de Pluronic L121® 3. Vacuna viva: inoculación intranasal de <i>C. abortus</i> a dosis baja (que produce la máxima protección) |
| Dosis de antígeno/vacuna | 2,0 femtomoles de cada uno de los péptidos 20 méricos solapados de las 5 proteínas mejor protectoras de <i>C. abortus</i> en un total de 10 µg de vacuna compuesta de micropartículas de ~2 µm |
| Conclusión | Los diferentes polímeros son eficaces como vehículos para el suministro de una vacuna como micropartículas poliméricas secadas por pulverización que contienen un adyuvante polimérico. Este efecto se produce con una única dosis total de ~10 microgramos de la vacuna. |

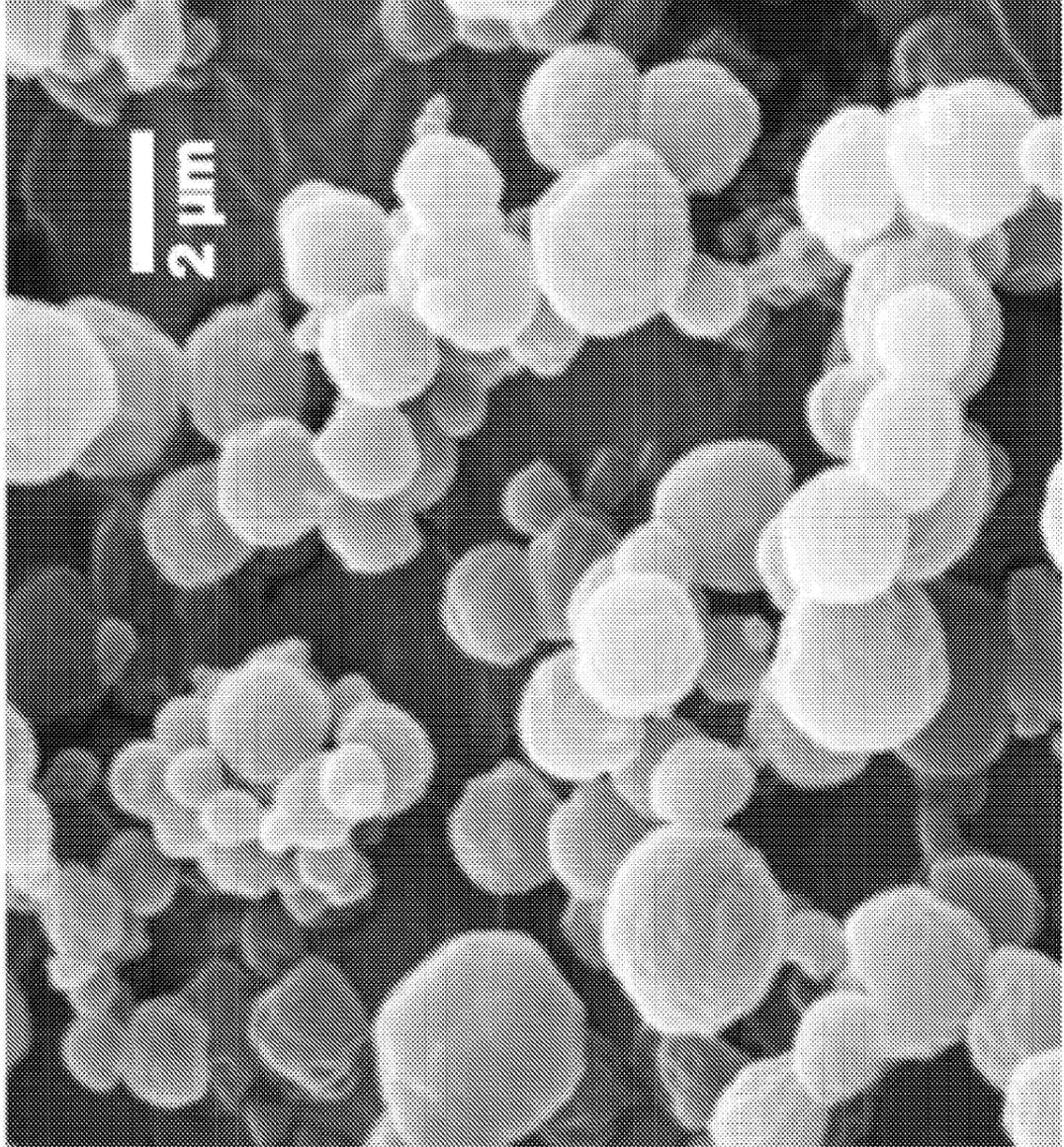
Como se indica en la Tabla 13, se prepararon las micropartículas a partir de PLGA L206S (6,5 µg) y se añadieron al Pluronic L121 (3,6 µg) junto con 2,0 femtomoles de cada uno de los péptidos 20 méricos solapados de las 5 proteínas protectoras de (véase la Solicitud Publicada de EE. UU. N.º 2012/0009220) en un total de 10 µg para formar una vacuna. (Véase la Vacuna 1. En la Tabla 13). Las micropartículas también se prepararon a partir de PLGA-PEG (6,5 µg) y se añadieron a Pluronic L121 (3,6 µg) para formar un vehículo como control. (Véase el vehículo vacunal 2. En la Tabla 13). Se utilizó una vacuna viva como control. (Véase Vacuna viva 3, en la Tabla 13). Las composiciones vacunales y los controles se administraron por vía intranasal (20 µl) a ratones de 6 semanas de edad (estirpe 129S6). Los ratones se desafiaron a las 6 semanas después de la administración mediante administración intranasal de 10^8 cuerpos elementales de *C. abortus*. Los resultados presentados en la Figura 13A, B, C y D ilustran que los ratones a los que se administró la vacuna que contenía 2,0 femtomoles presentaban una baja pérdida de peso corporal, una baja ganancia de peso del pulmón, una carga baja de *C. abortus*, y un bajo porcentaje de pérdida de peso corporal frente a los días después del desafío, de manera similar a la vacuna viva.

Se han mencionado varias referencias de patente y no patente en el presente documento. En el caso que haya una inconsistencia entre la definición de un término en la memoria descriptiva en comparación con una definición del

término en una referencia citada, se debería interpretar el término basándose en la definición de la memoria descriptiva.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método no terapéutico para la mejora de la tasa de conversión del pienso en un sujeto animal, comprendiendo el método no terapéutico la administración de una composición que comprende partículas biodegradables, teniendo las partículas biodegradables un diámetro medio eficaz de 0,5-10 μm y comprenden poliláctidos (PLA), donde la composición no comprende un antígeno para la inducción de una inmunidad adaptativa, y donde la composición comprende adicionalmente un tensioactivo.
- 10 2. El método no terapéutico de la reivindicación 1, donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.
3. El método no terapéutico de 1, donde el poliláctido (PLA) comprende poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).
- 15 4. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición comprende adicionalmente un excipiente en polvo para las partículas biodegradables.
5. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las partículas biodegradables se forman mediante un proceso que incluye el secado por pulverización.
- 20 6. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la composición comprende una suspensión de las partículas biodegradables.
- 25 7. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las partículas biodegradables se administran al sujeto animal a una dosis de entre $(\text{BW}/20)^{3/4}$ μg de partículas/peso corporal y $100 \times ((\text{BW}/20)^{3/4})$ μg partículas/peso corporal, donde BW es el peso corporal del sujeto animal en gramos.
8. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición comprende adicionalmente un adyuvante.
- 30 9. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la composición comprende adicionalmente un inhibidor de la apoptosis.
10. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la composición consiste esencialmente en una suspensión de partículas.
- 35 11. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el sujeto animal es un ave de granja, un cerdo o un rumiante.
- 40 12. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la composición se administra mediante las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intranasal, intrapulmonar, oral, intravaginal, o intrarrectal.
13. El método no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la composición se administra mediante una vía oral.



A

Figura 1

Figura 1

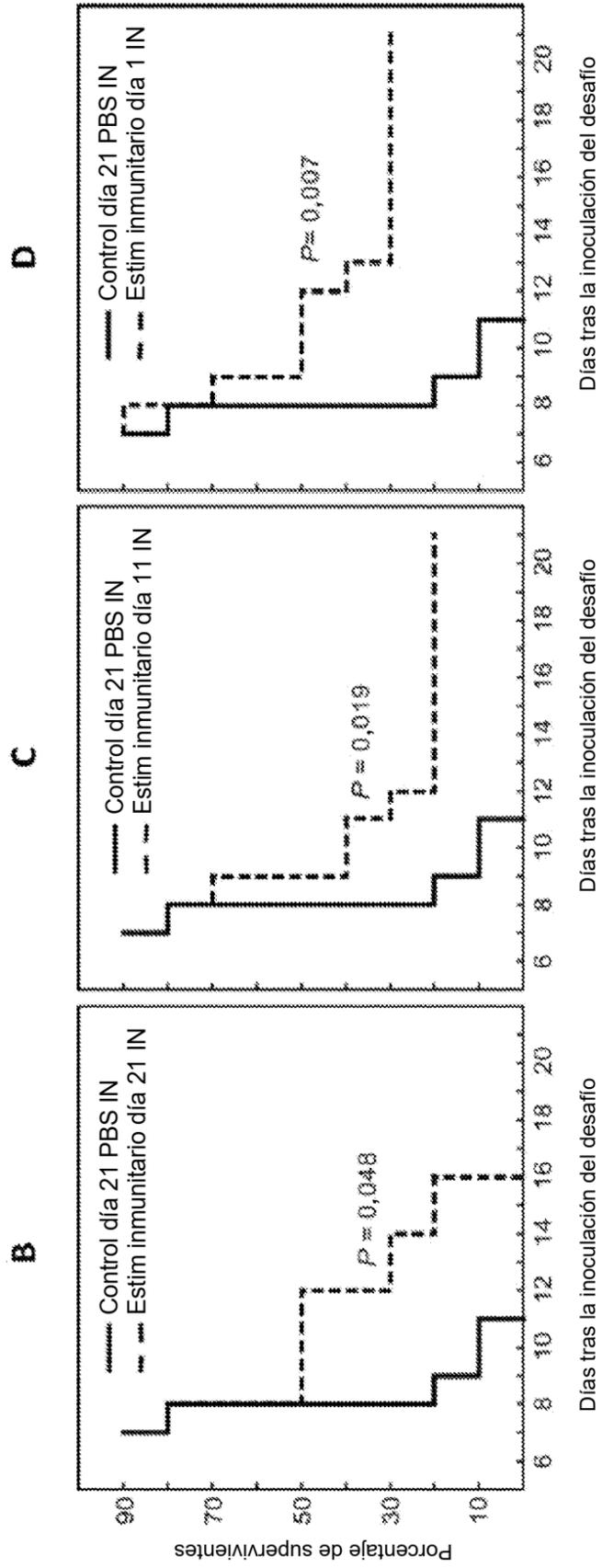


Figura 2

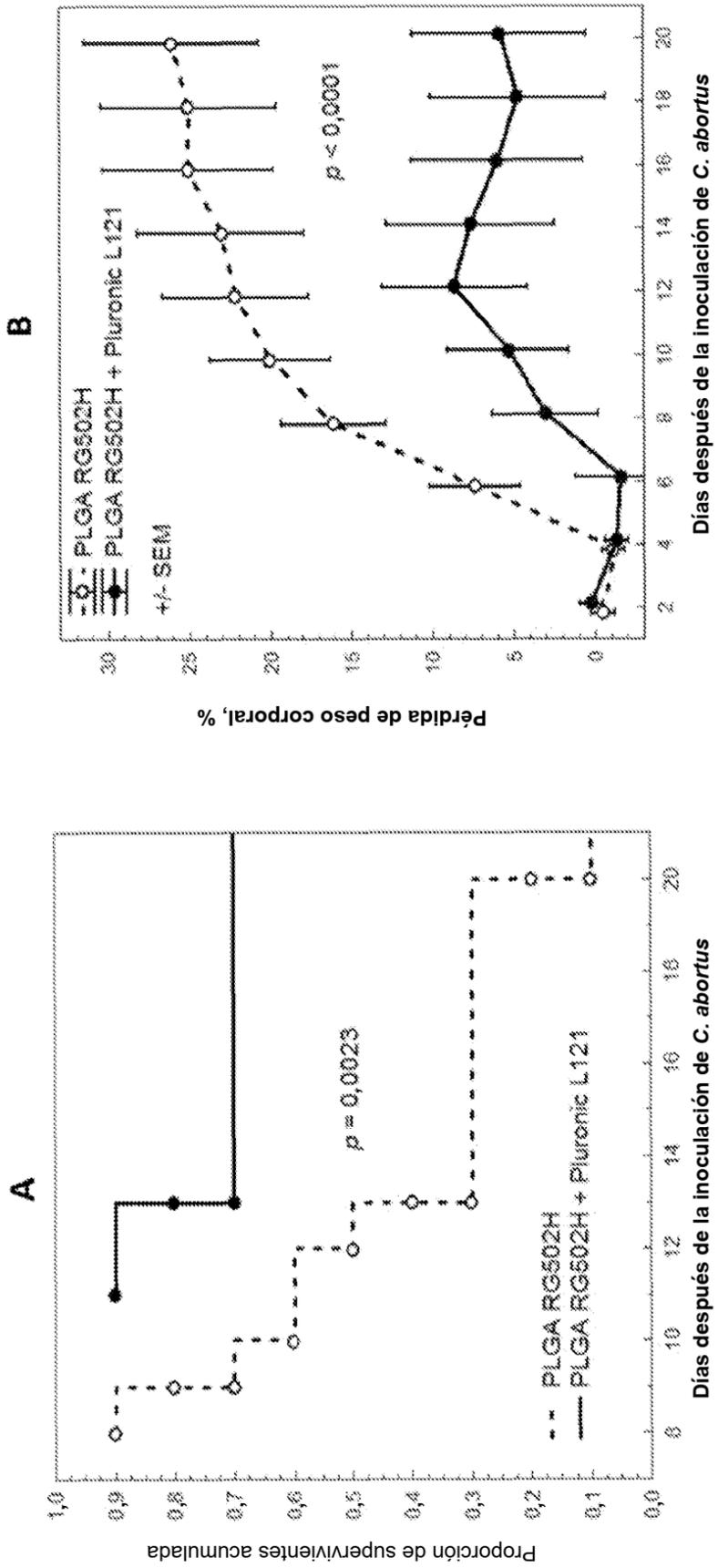
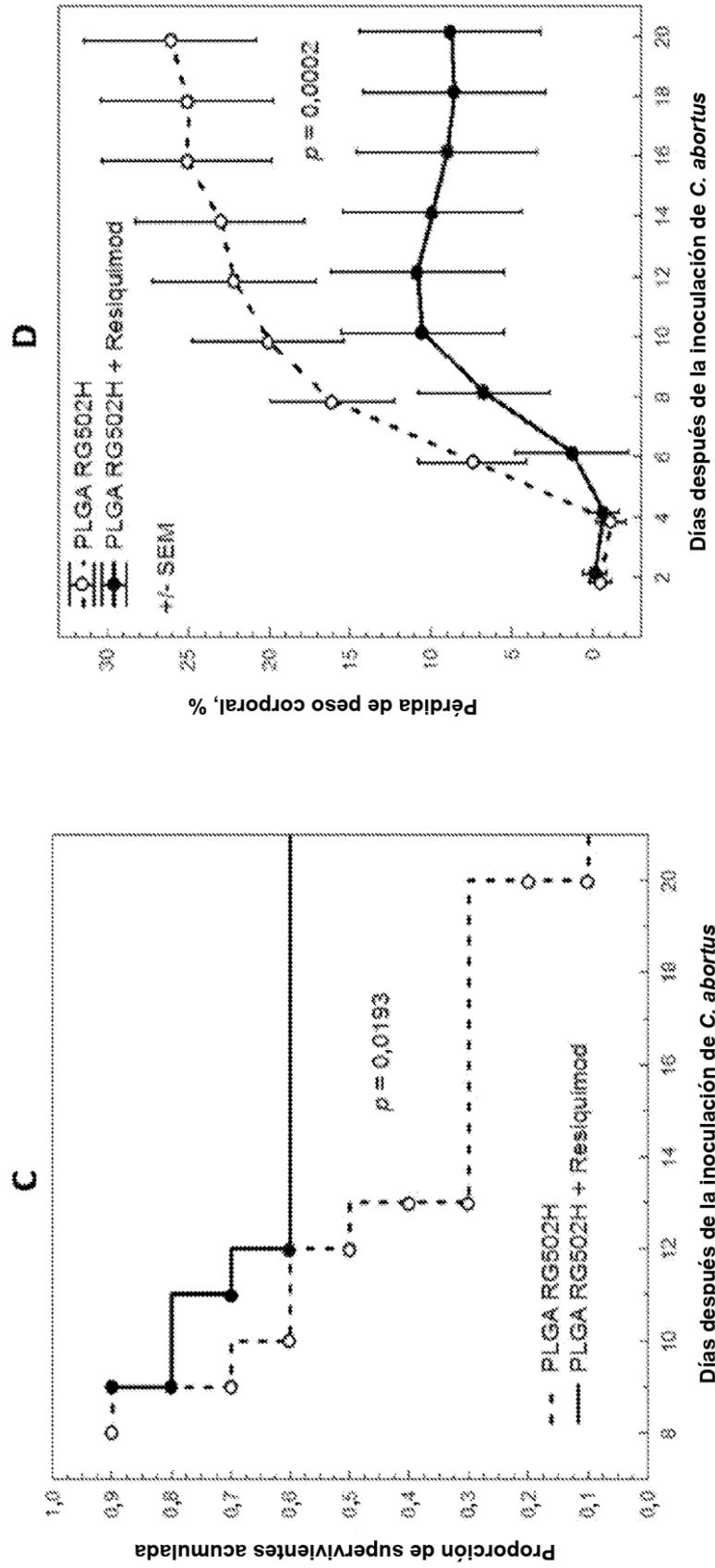


Figura 2



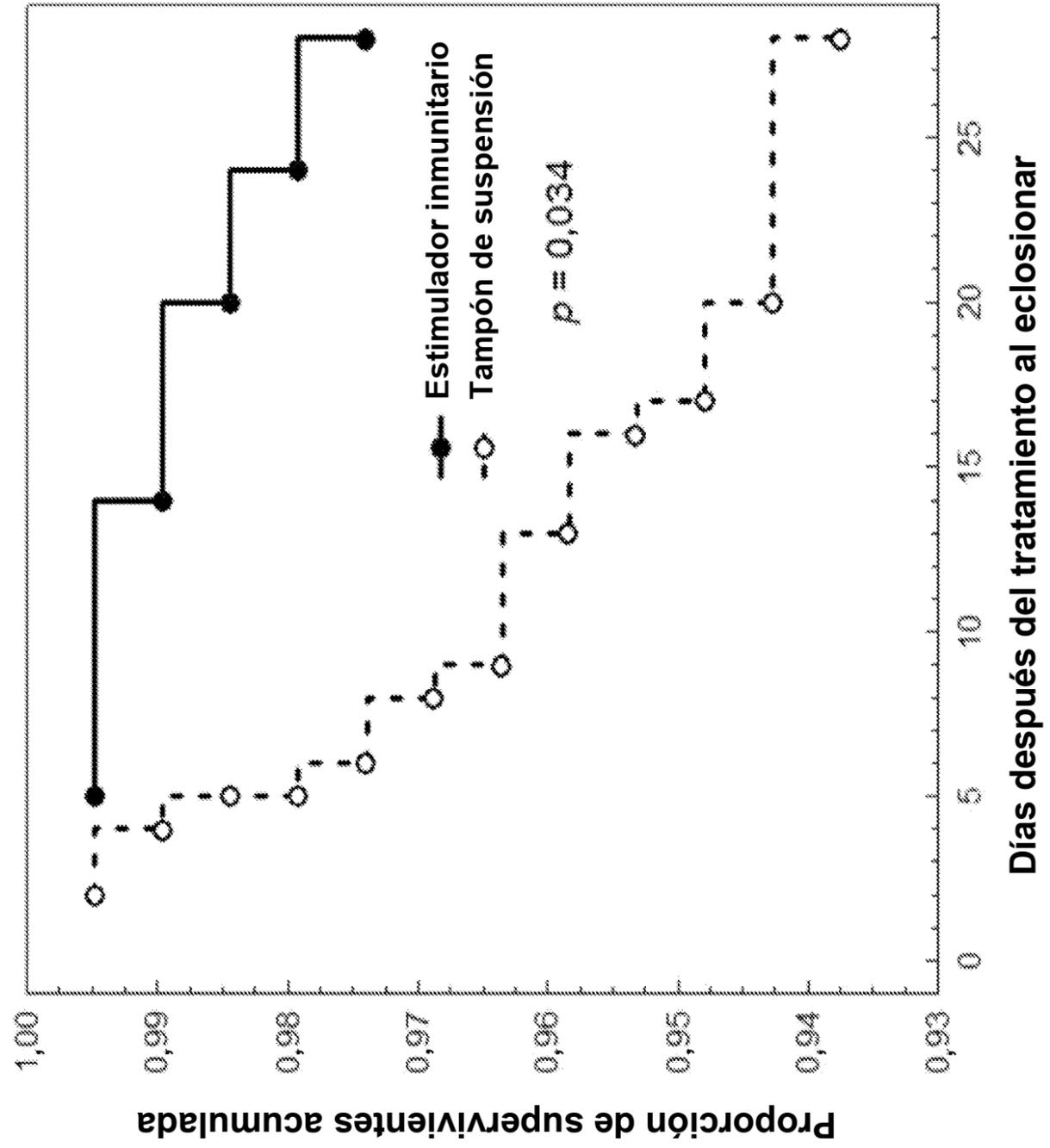


Figura 3

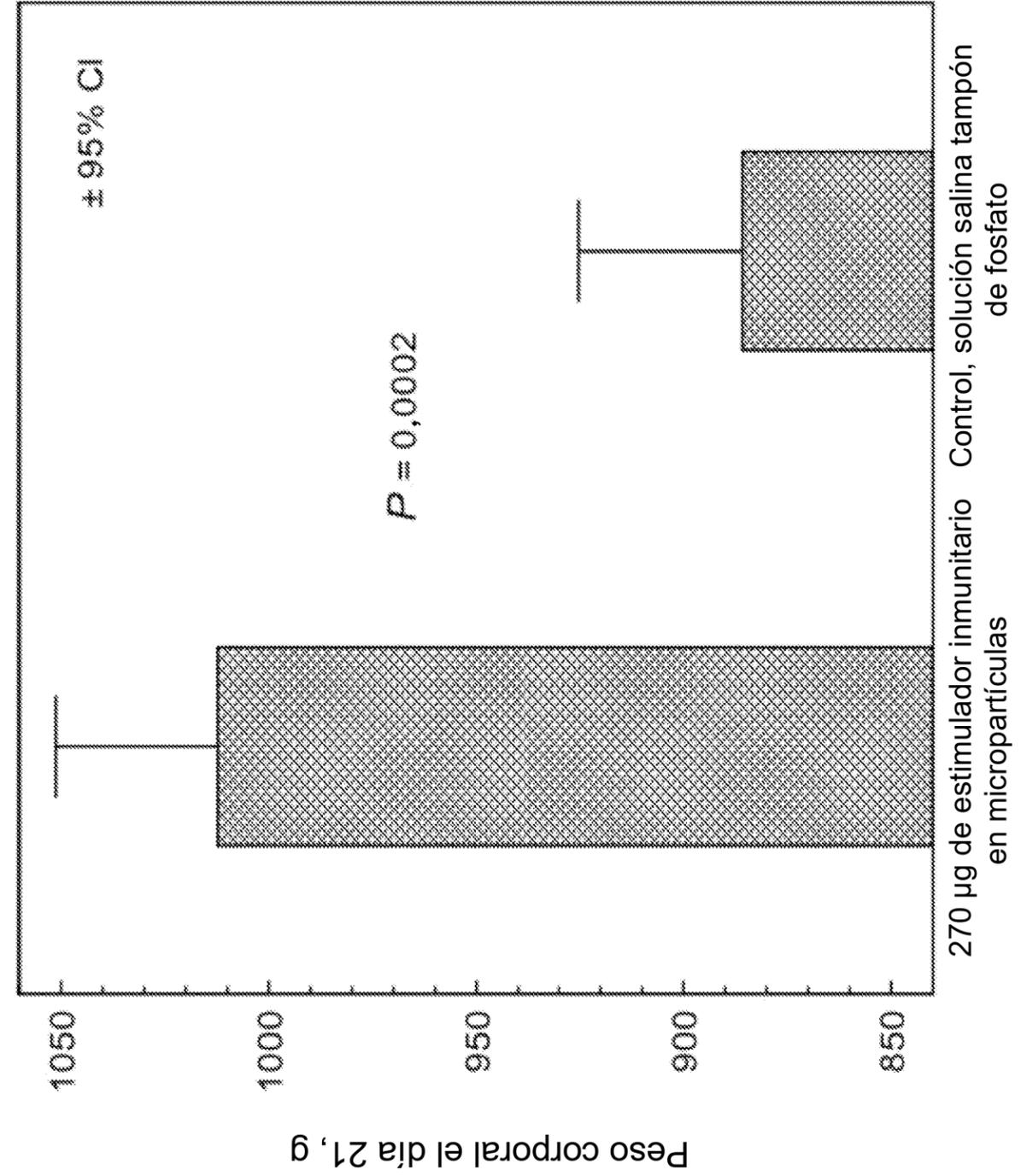


Figura 4

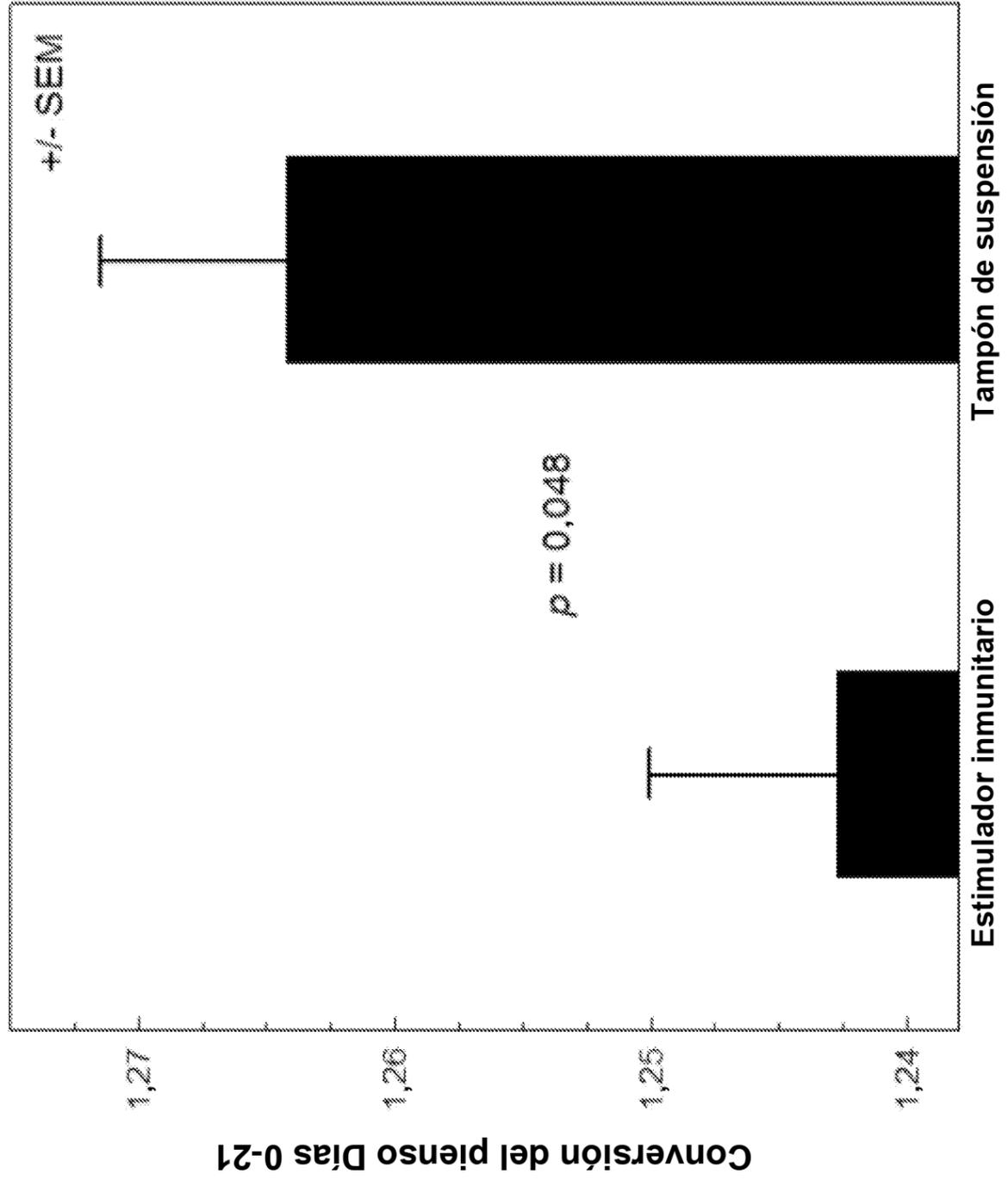


Figura 5

Figura 6

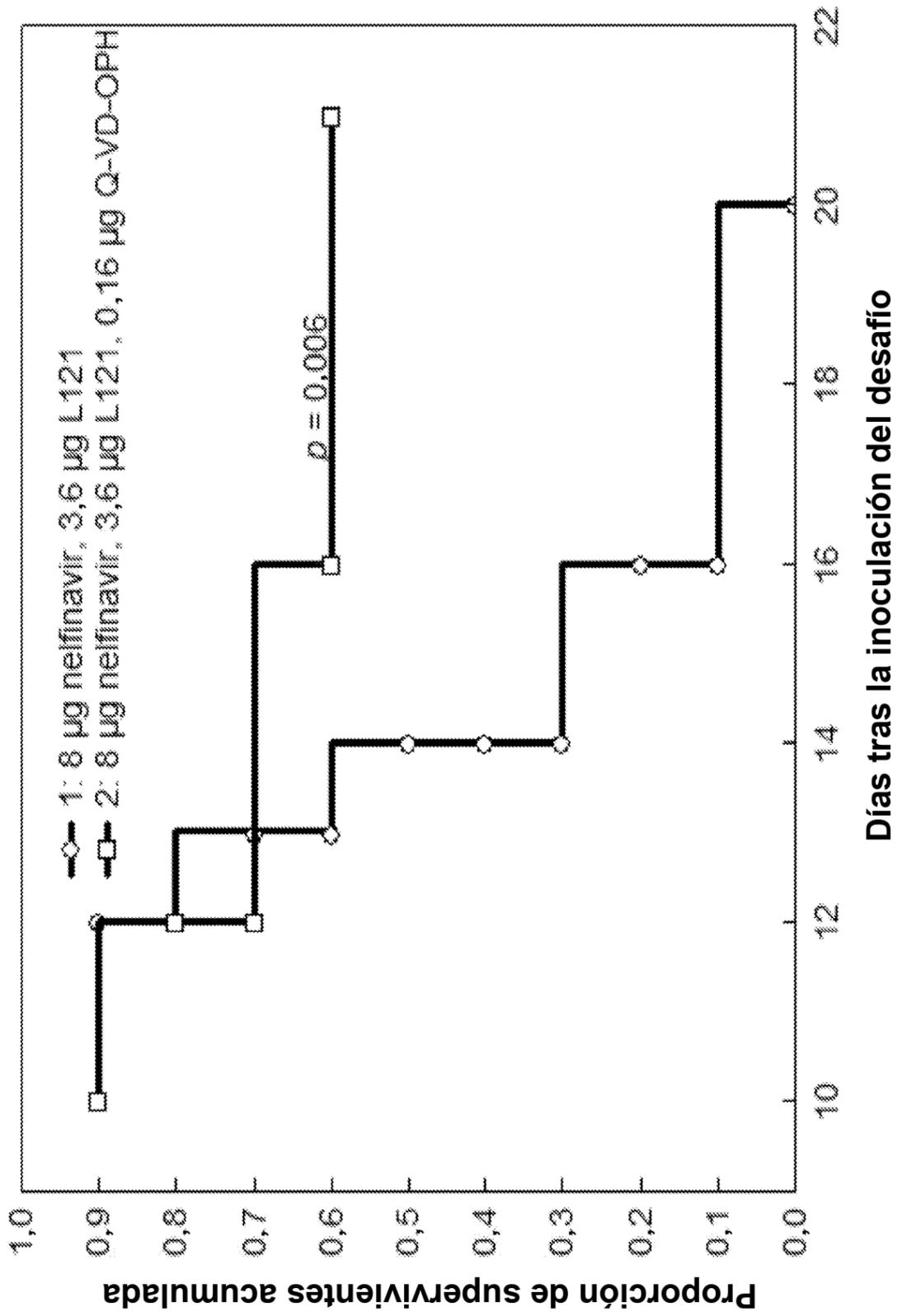


Figura 7

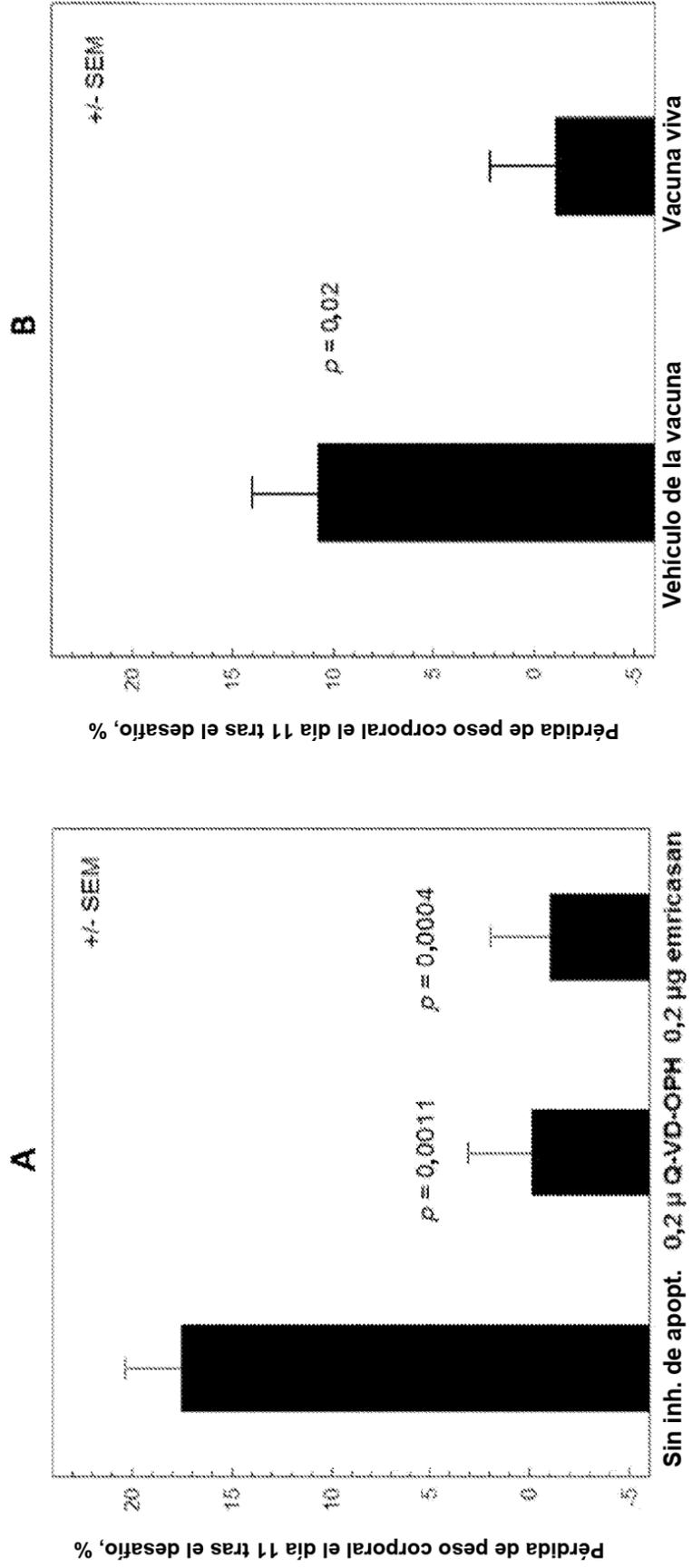


Figura 7

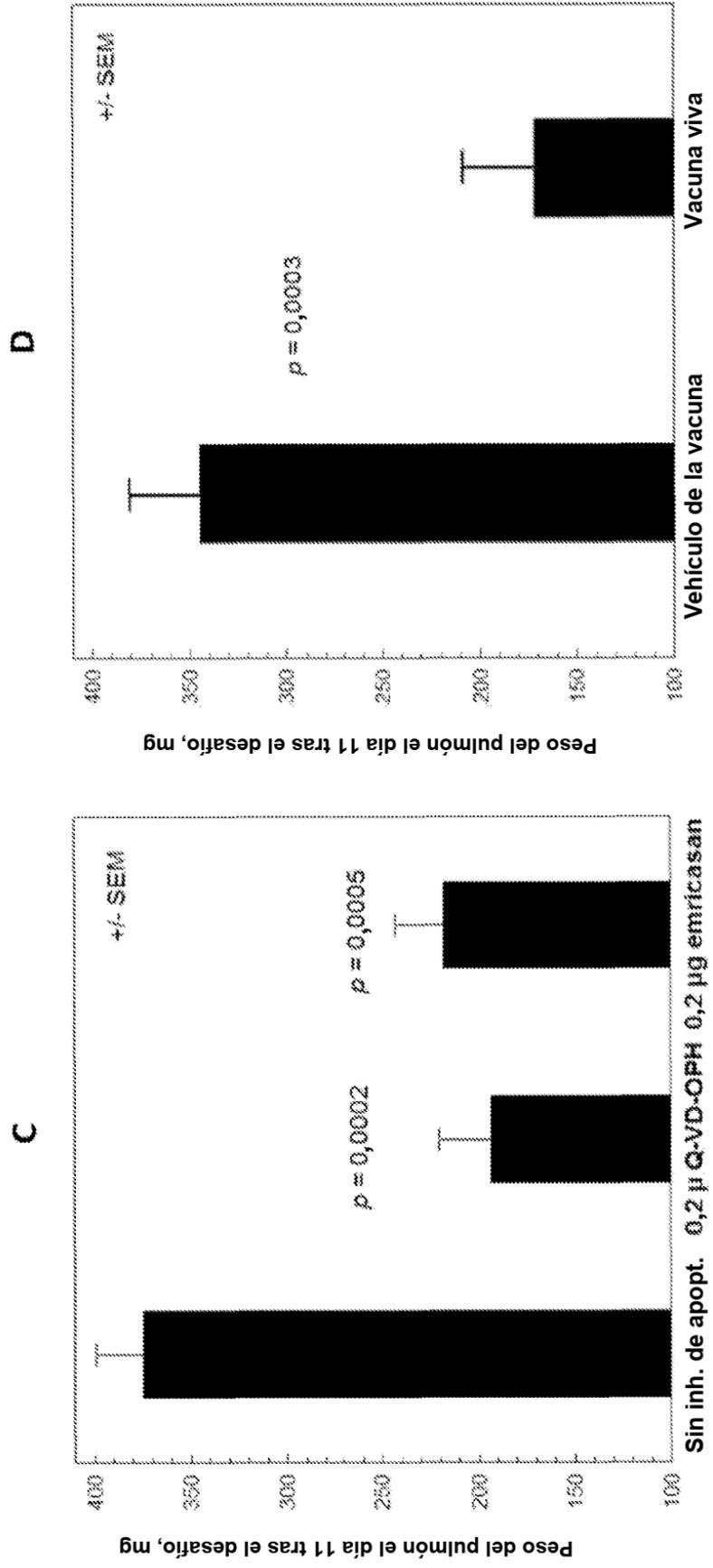


Figura 7

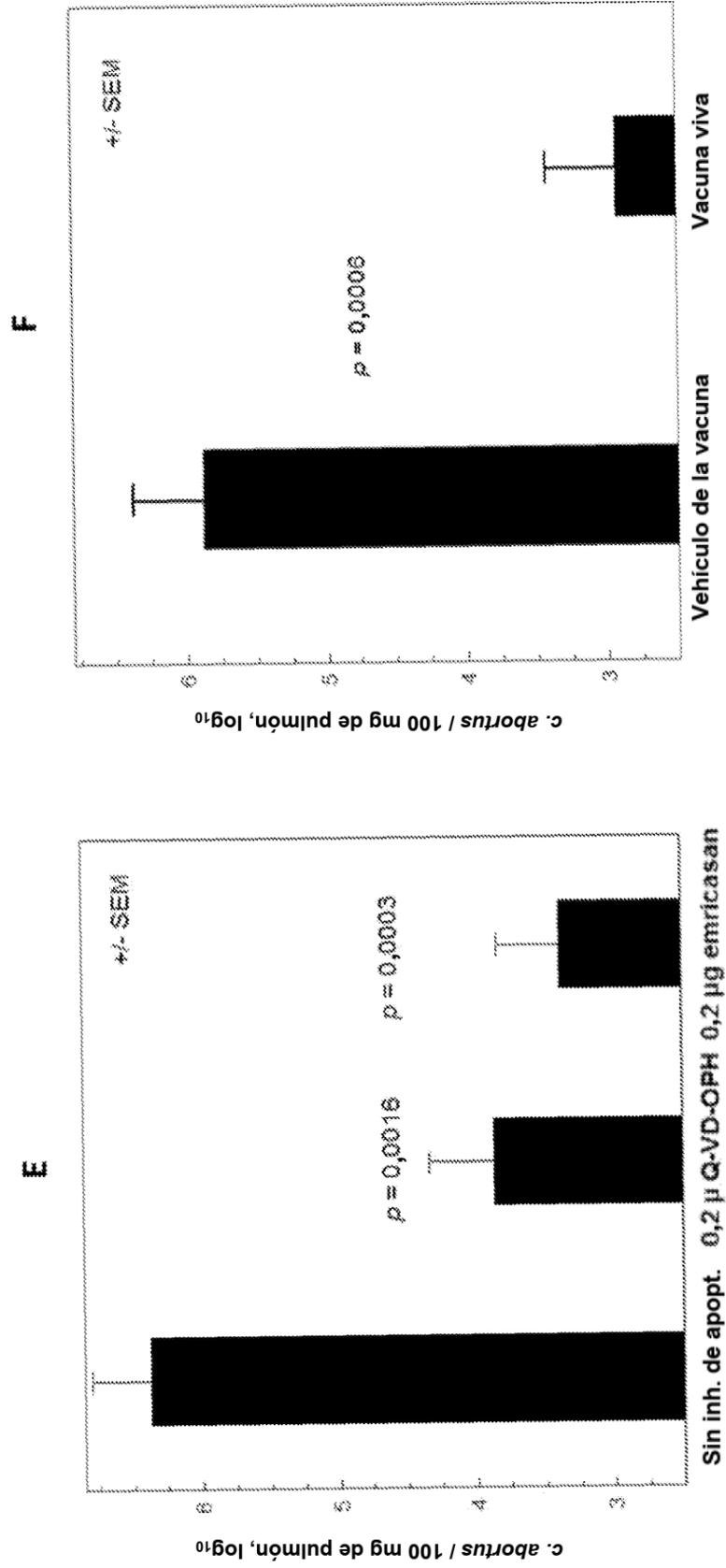


Figura 8

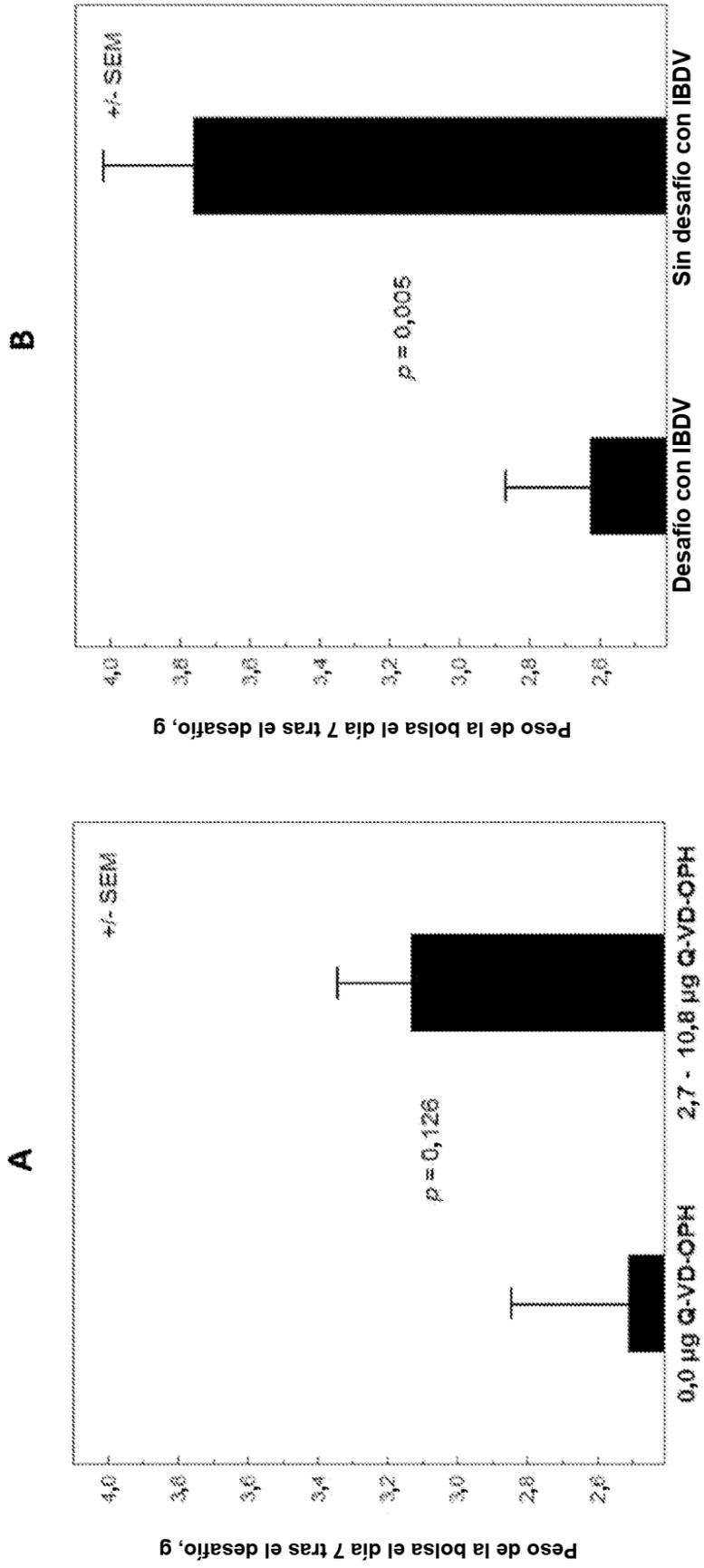


Figura 8

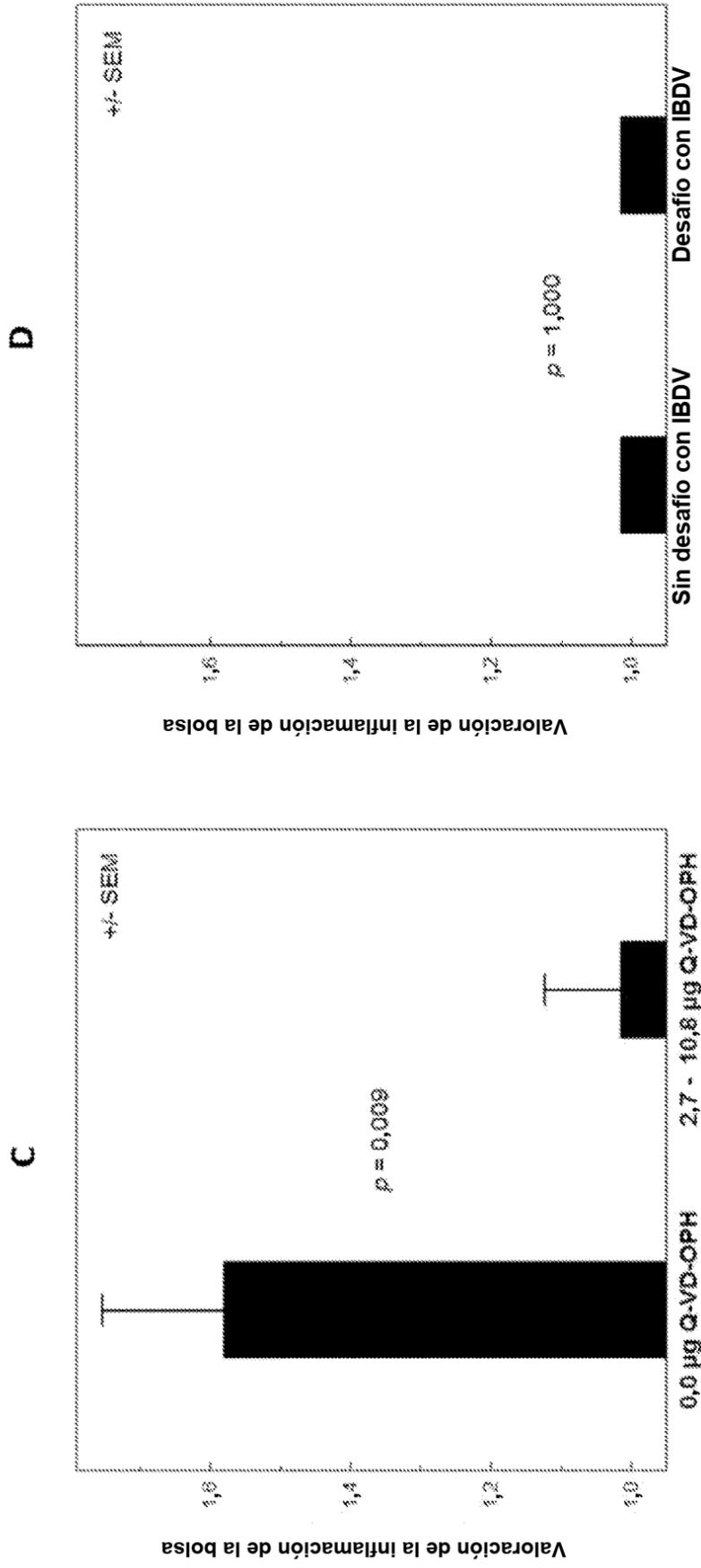


Figura 8

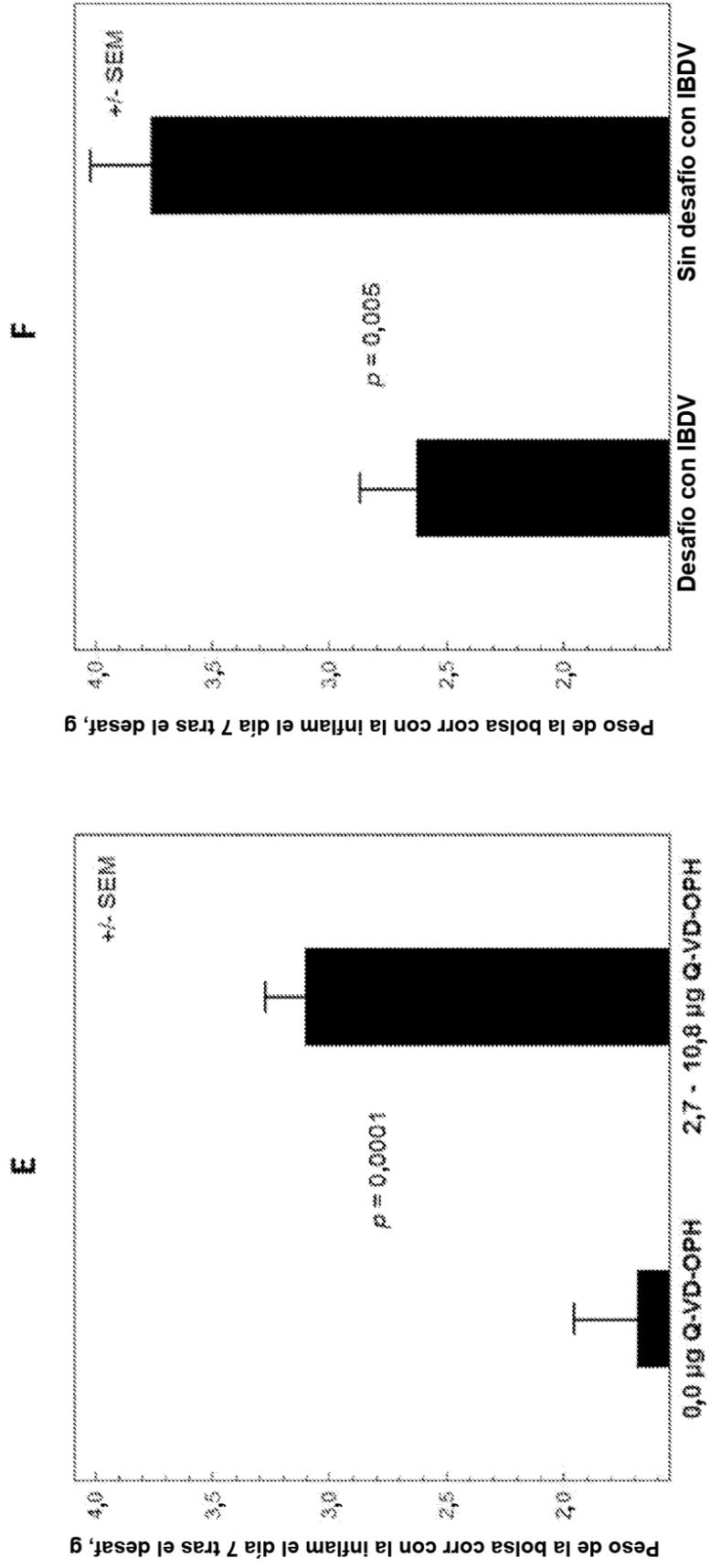
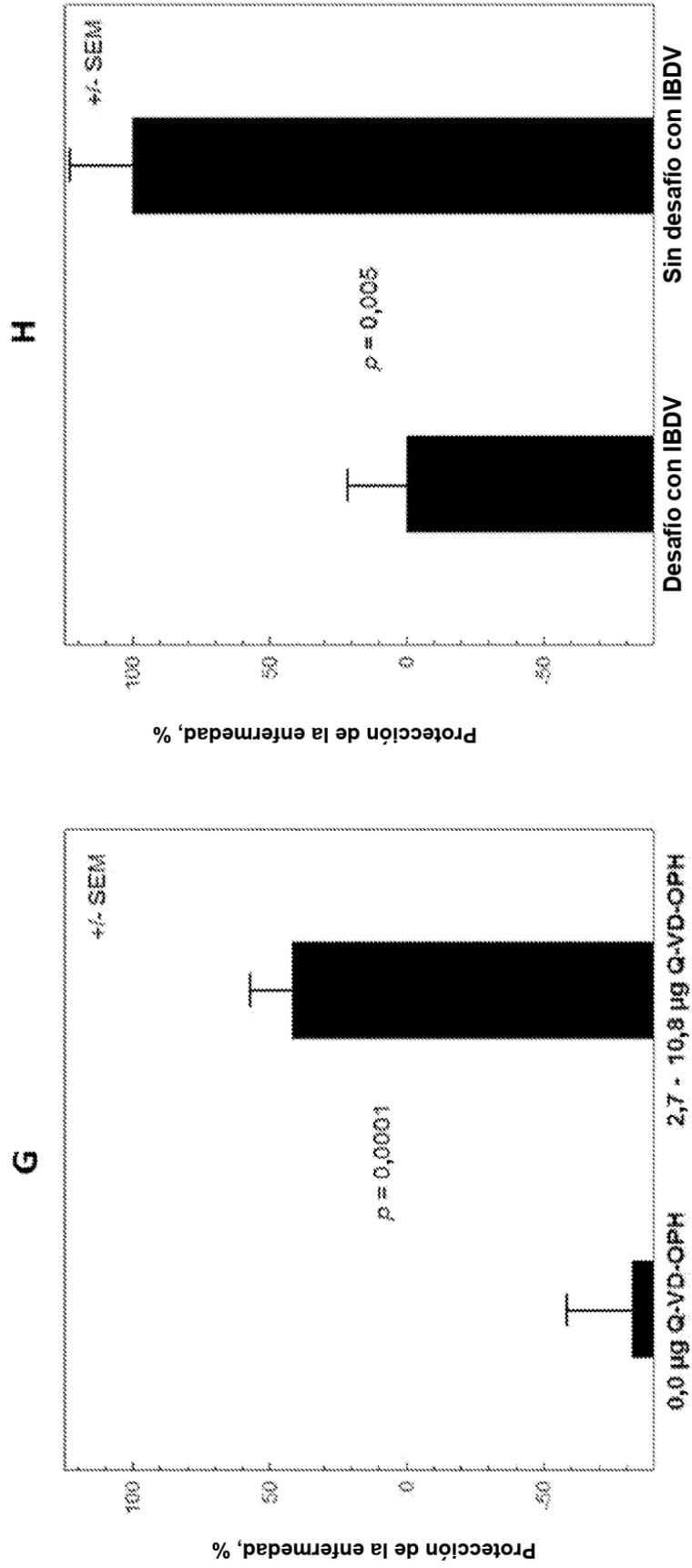


Figura 8



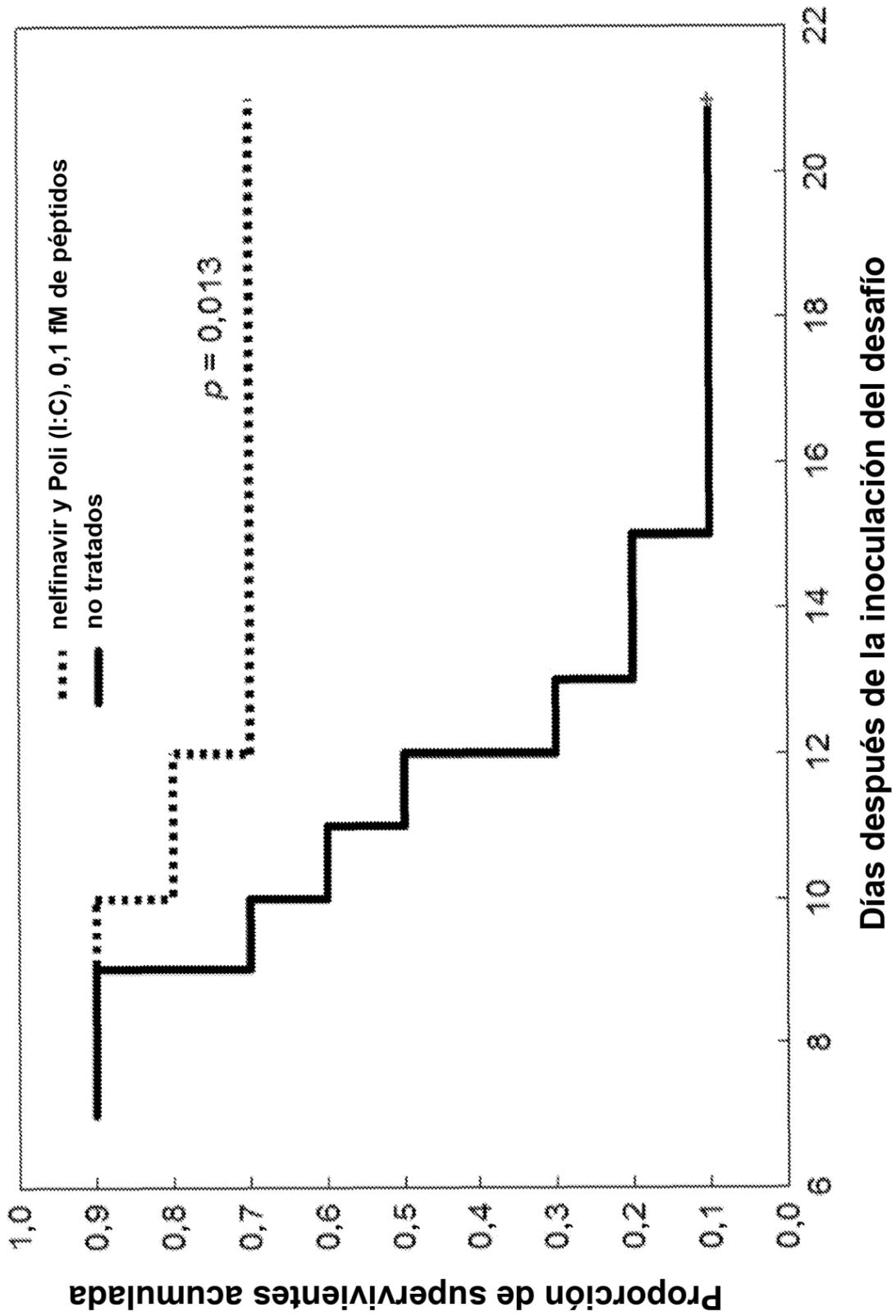


Figura 9

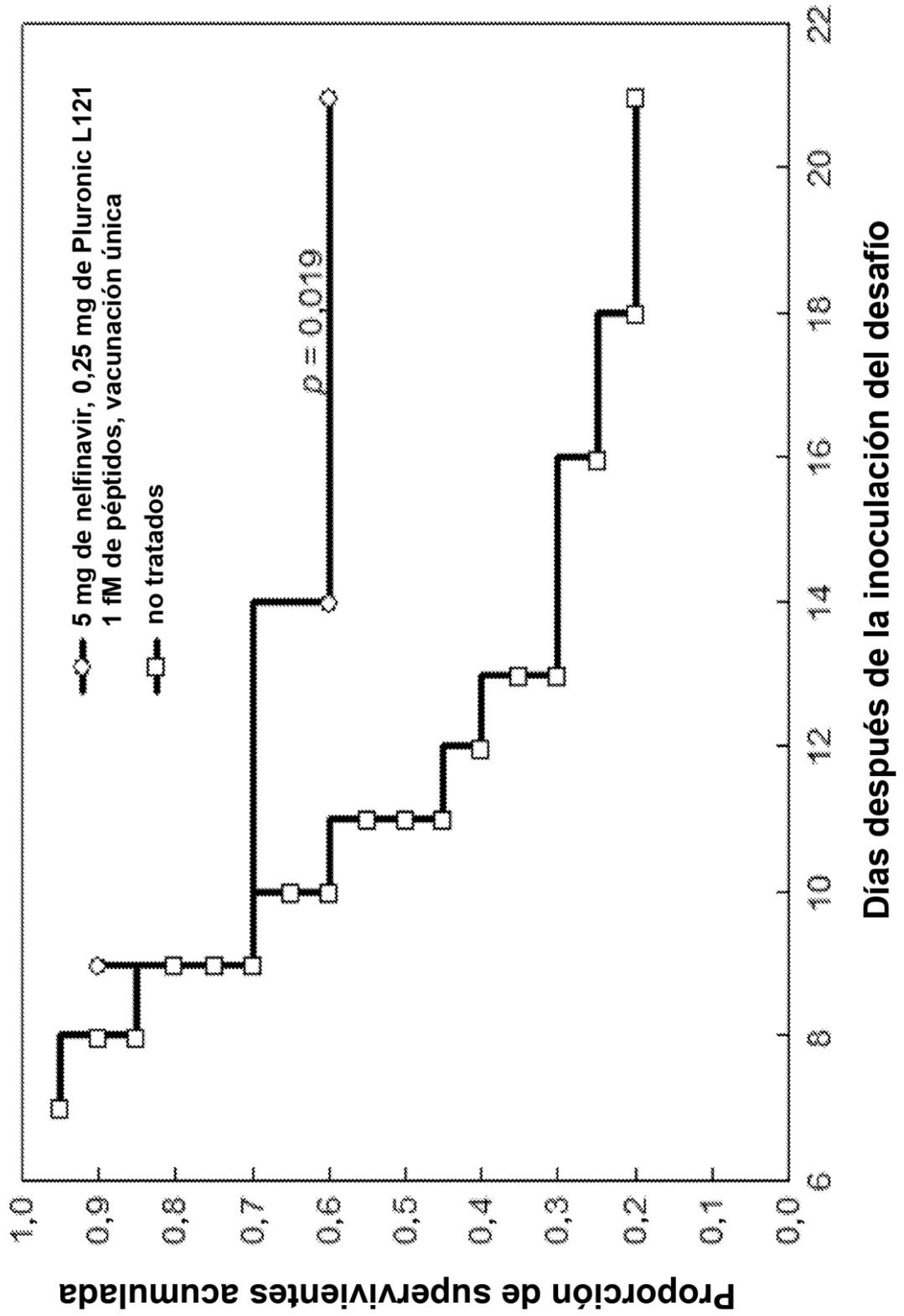


Figura 10

Figura 11

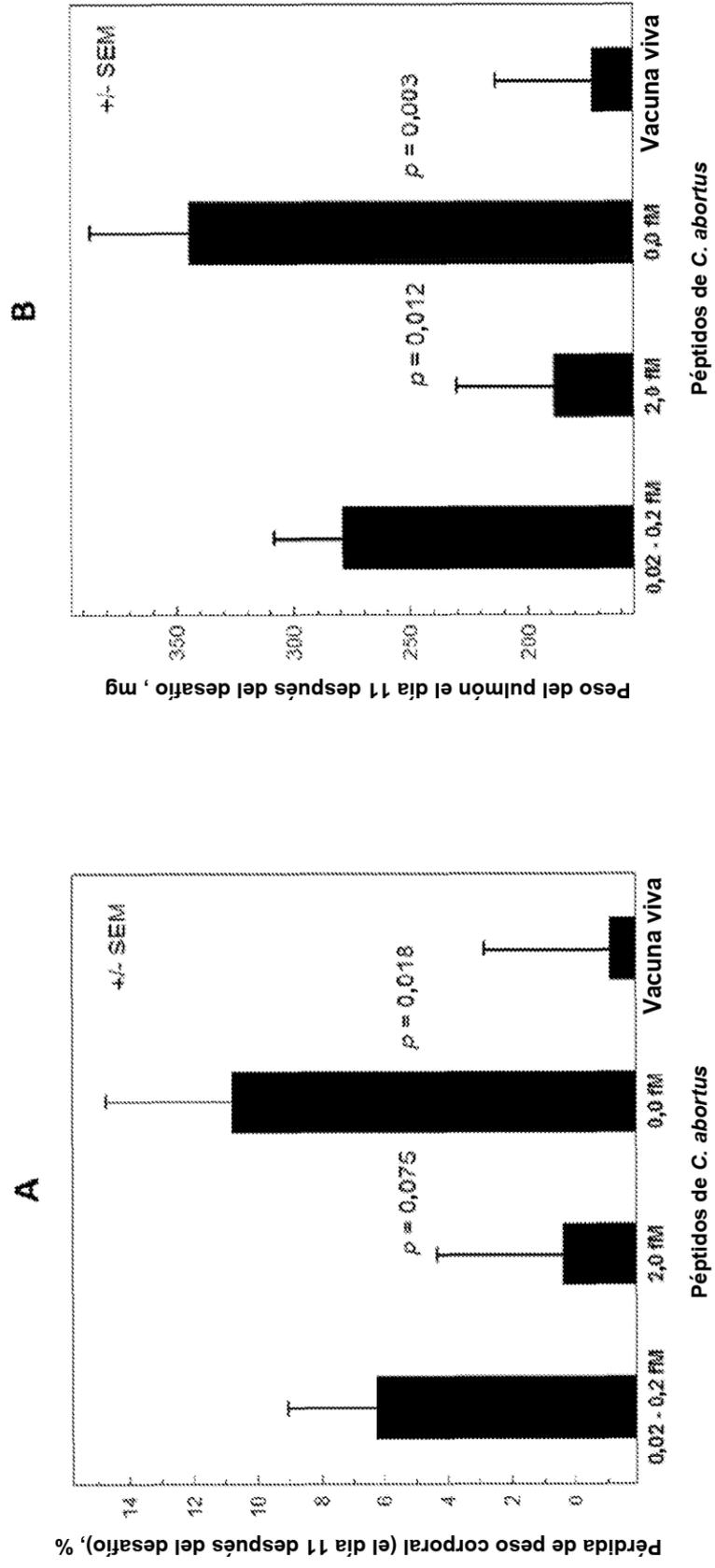


Figura 11

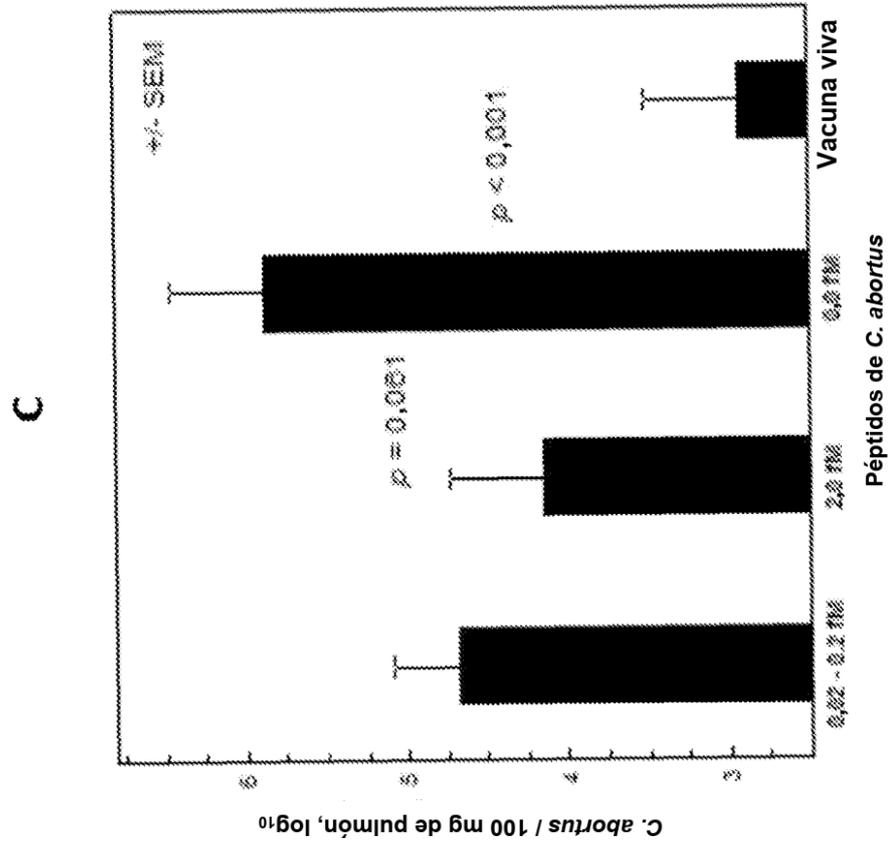


Figura 11

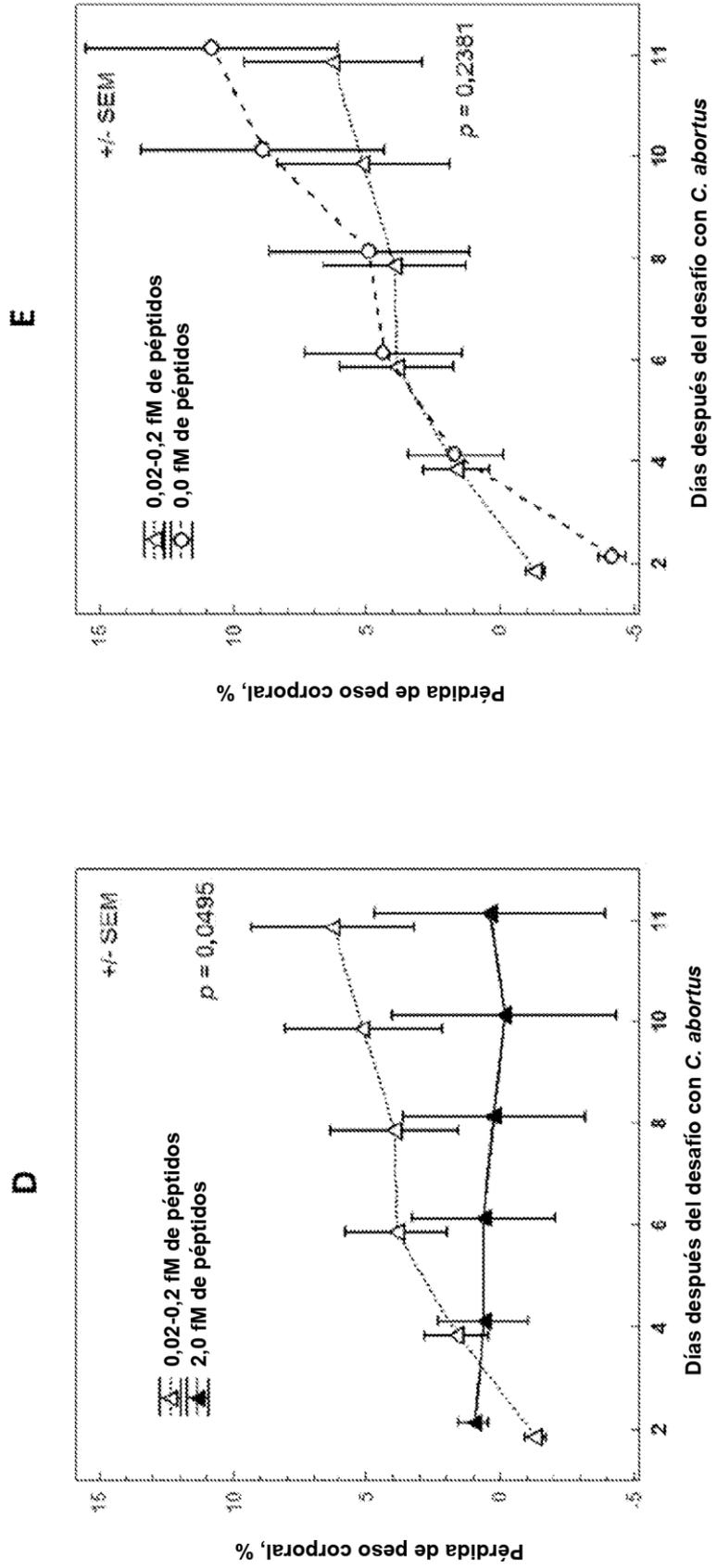


Figura 11

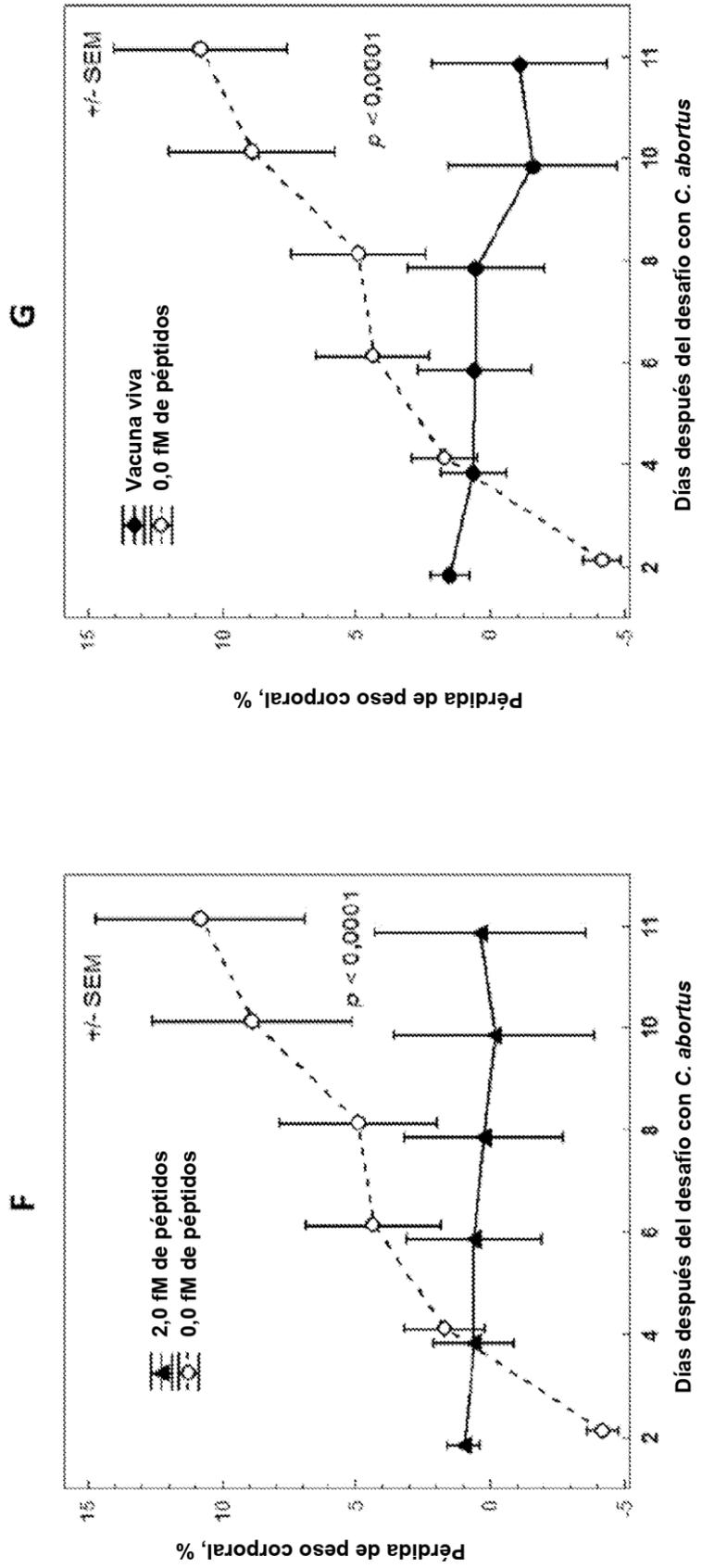


Figura 12

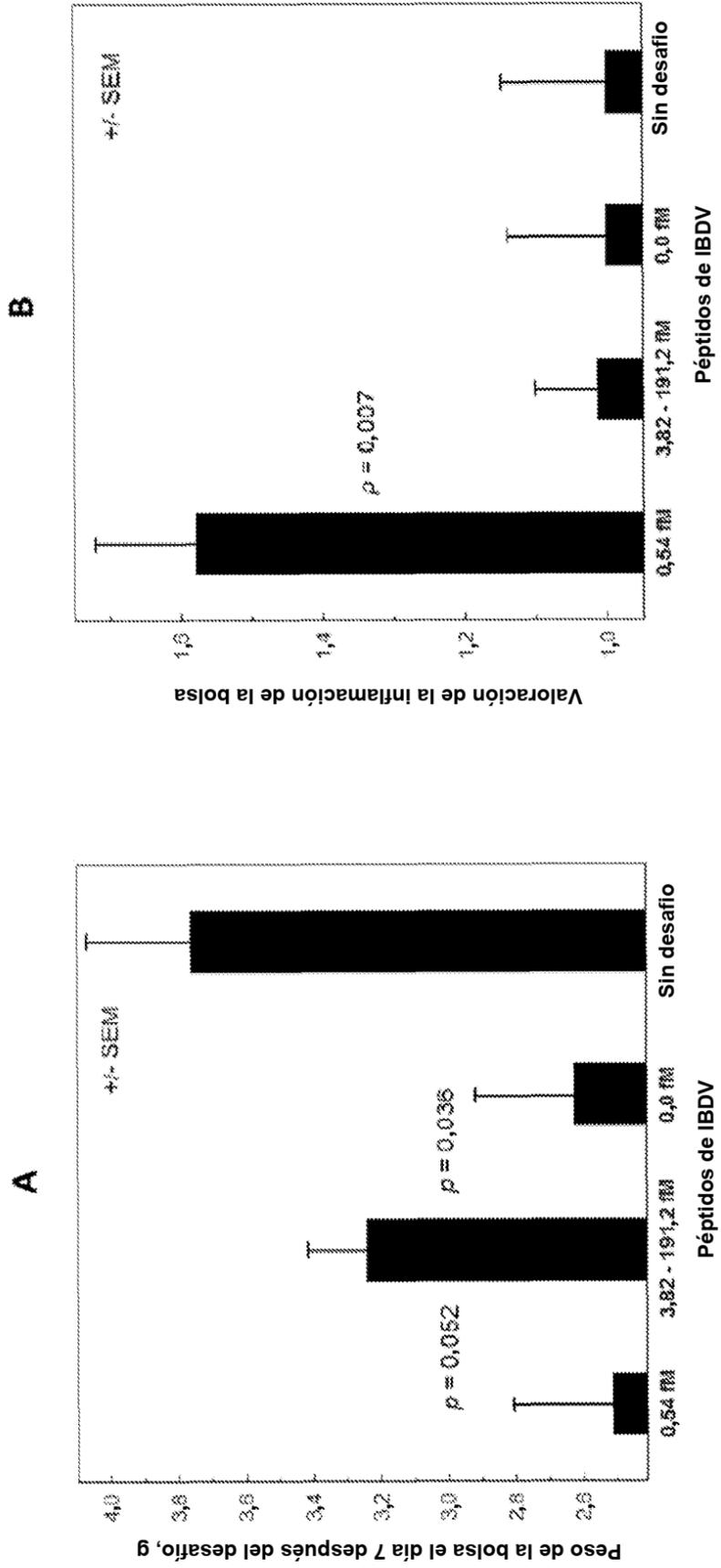


Figura 12

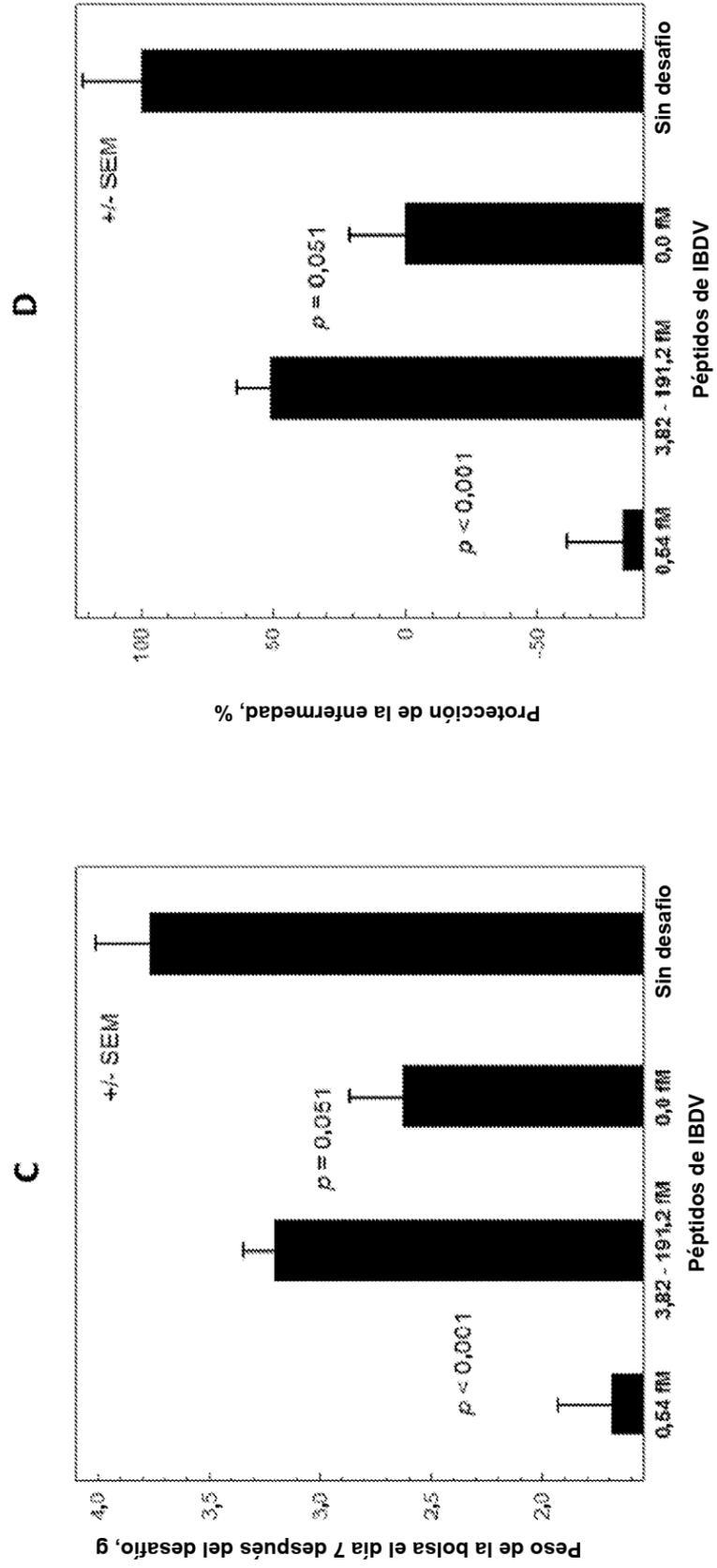


Figura 13

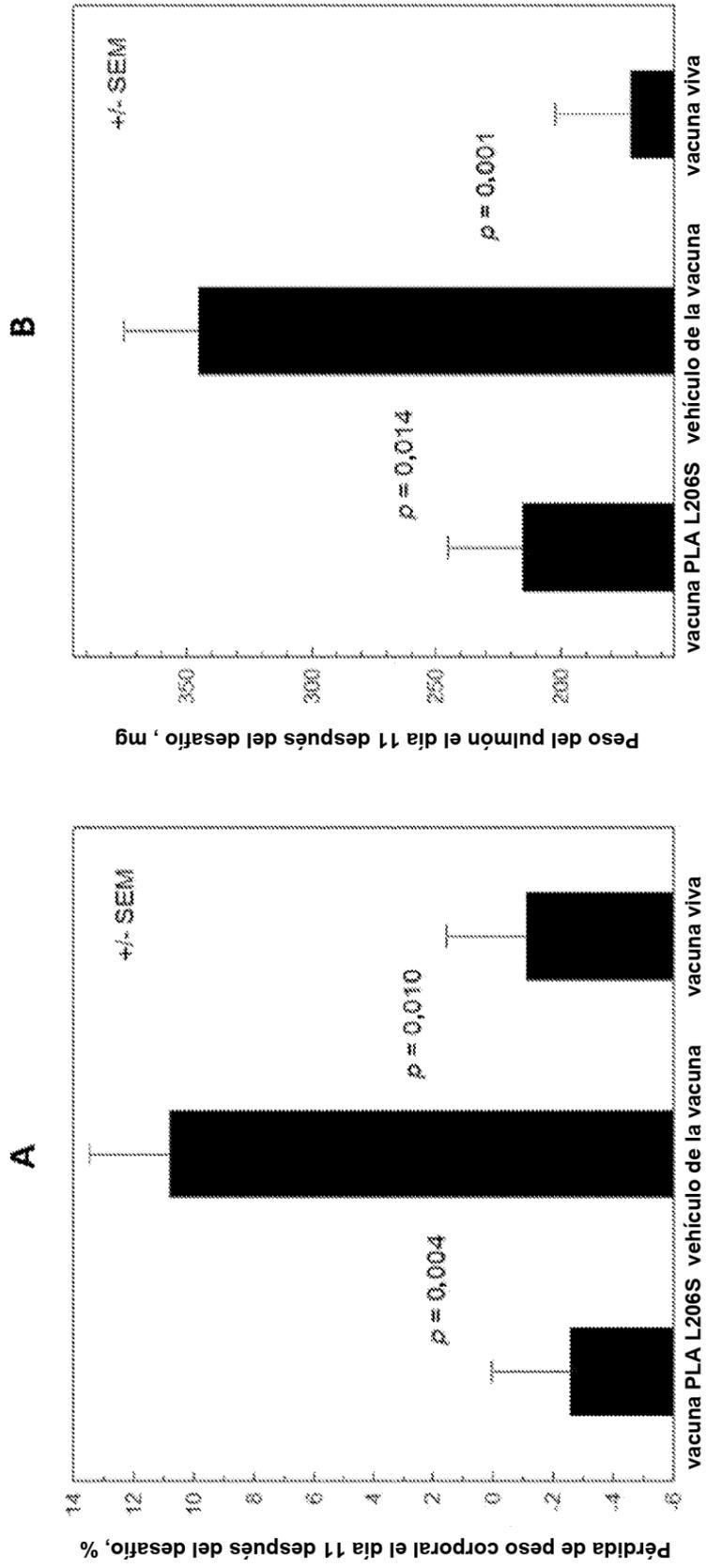


Figura 13

