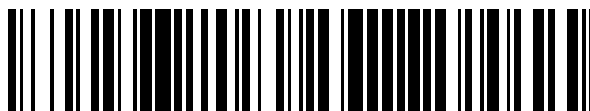


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 427**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/29** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2010** **E 10797727 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016** **EP 2451950**

54 Título: **Procedimientos para preparar vesículas y formulaciones producidas a partir de las mismas**

30 Prioridad:

**06.07.2009 US 223196 P**  
**30.10.2009 US 256912 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.06.2016**

73 Titular/es:

**VARIATION BIOTECHNOLOGIES INC. (100.0%)**  
**310 Hunt Club Road East, 2nd floor**  
**Ottawa ON K1V 1C1, CA**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, DAVID, E. y**  
**OGREL, ANDREI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 573 427 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

Procedimientos para preparar vesículas y formulaciones producidas a partir de las mismas

## Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica la prioridad bajo 35 U.S.C. § 119(e) para la solicitud provisional de los EE. UU. con número de serie 61/223.196, presentada el 6 de julio de 2009 y la solicitud provisional de los EE. UU. con número de serie 61/256.912, presentada el 30 de octubre de 2009.

## Antecedentes

- 10 Las vesículas se describieron por primera vez en la década de 1960 como un modelo de membranas celulares (véase Bangham *et al.*, J. Mol. Biol. 13:238-252, 1965). Las vesículas han encontrado varias aplicaciones en la administración de fármacos con moléculas pequeñas, adyuvancia de vacuna, transferencia génica y diagnóstico por imagen (por ejemplo, véase Liposome Technology, 3ª edición, editado por Gregory Gregoriadis, Informa HealthCare, 2006 y Liposomes: A Practical Approach (The Practical Approach Series, 264), 2ª edición, editado por Vladimir Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press, USA, 2003).

- 15 Se han descrito varios procedimientos para preparar vesículas (por ejemplo, véanse las referencias citadas anteriormente y Walde e Ichikawa, Biomol. Eng., 18:143-177, 2001). Sin embargo, sigue existiendo una necesidad en la técnica de obtener procedimientos que se puedan usar para atrapar sustancias dentro de vesículas.

- 20 Un procedimiento que se ha descrito en la técnica es el denominado procedimiento de fundido en 3 etapas. Inicialmente, se funden los lípidos formadores de vesículas a temperaturas altas (por ejemplo, 120 °C). Se crea una emulsión en una segunda etapa añadiendo un tampón acuoso (por ejemplo, tampón bicarbonato) a los lípidos fundidos. Finalmente, se homogeneiza la sustancia que se va a atrapar con los componentes de la emulsión a una temperatura reducida (por ejemplo, 50 °C) antes de la liofilización. De forma alternativa, se liofilizan las vesículas de la emulsión y a continuación se reconstituyen en presencia de la sustancia que se va a atrapar.

- 25 Aunque los procedimientos tales como este pueden ser muy adecuados para atrapar sustancias que pueden soportar temperaturas altas y/o moléculas pequeñas que se pueden difundir rápidamente en vesículas vacías, se ha descubierto que no son adecuados para atrapar los tipos de antígenos (por ejemplo, polipéptidos, virus, etc.) que están implicados comúnmente en las vacunas. En particular, se ha descubierto que estos procedimientos producen eficacias de atrapamiento bajas y pueden reducir drásticamente la actividad del antígeno subyacente (por ejemplo, como se mide por respuestas inmunitarias). Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de obtener procedimientos de preparación de vesículas que puedan atrapar antígenos minimizando además el impacto sobre la actividad del antígeno.

30 Mann *et al*, Vaccine 22: 2425-2429, 2004 divulga la preparación de vesículas fundiendo lípidos a 140°, a los que se le añade desoxicolato, seguido de una formulación con hemaglutinina de gripe.

## Resumen

La presente invención proporciona un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

## 35 Breve descripción del dibujo

- La **figura 1** compara los tamaños de partícula medios para dos formulaciones de vesícula que se prepararon usando el procedimiento de fundido en 3 etapas del ejemplo 1 y el procedimiento de fundido en 2 etapas invertido del ejemplo 2. Se liofilizaron las formulaciones y a continuación se rehidrataron en presencia de un tampón que contenía 2 µg de antígeno de hepatitis A inactivado. Se midió el tamaño de vesícula, que es un buen marcador de estabilidad, usando un Mastersizer inmediatamente después de la hidratación y 2, 4 y 6 horas después de esto.

- 40 La **figura 2** muestra la respuesta inmunitaria provocada por las vesículas que contienen el antígeno de hepatitis A. Se prepararon vesículas vacías usando el procedimiento de fundido en 3 etapas del ejemplo 1 y el procedimiento de fundido en 2 etapas invertido del ejemplo 2. Se liofilizaron las formulaciones y a continuación se rehidrataron en presencia de un tampón que contenía 2 µg de antígeno de hepatitis A inactivado. Se inmunizaron los ratones por vía oral 3 veces los días 0, 14 y 28, y se sometieron a prueba los sueros para determinar la reactividad 14 días después de la última vacunación. Cada símbolo representa esa valoración de punto final de suero de un animal individual.

- 50 La **figura 3** muestra que el contenido de sal biliar en las vesículas afecta a la maduración de las células dendríticas inmaduras como se evidencia por citometría de flujo. Se midió la maduración de células dendríticas inmaduras por citometría de flujo usando anticuerpos anti-MHC II y anti-CD86. Las CD maduras se definieron como doble positivo para ambos anticuerpos. Se trataron células dendríticas inmaduras con vesículas lipídicas de tensioactivo no iónico (VTNI) preparadas como en las etapas 1 y 2 del ejemplo 2 (sin la posterior adición de antígeno) y con o sin dos proporciones molares diferentes de ácido biliar con respecto a lípido total (0,1 y 0,5). Como control positivo, se trataron células dendríticas inmaduras con TNF-α solo.

La **figura 4** compara el espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  de vesículas ejemplares preparadas por los procedimientos del ejemplo 1 y 2 sin la adición de ningún antígeno. Se obtuvieron todos los espectros a 25 °C.

## Definiciones

En toda la presente divulgación, se emplean varios términos que se definen en los siguientes párrafos.

5 Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que contiene uno o más epítopos (lineales, conformacionales o bien ambos) que se pueden reconocer por un anticuerpo. En determinados modos de realización, un antígeno puede ser un virus, un polipéptido, un polinucleótido, un polisacárido, etc. El término "antígeno" indica tanto antígenos de subunidades, (es decir, antígenos que están separados y diferenciados de un organismo completo con el que está asociado el antígeno en la naturaleza), así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. En determinados modos de realización, un antígeno puede ser un "inmunógeno".

10 Como se usa en el presente documento, el término "atrapar" se refiere a cualquier tipo de asociación física entre una sustancia y una vesícula, por ejemplo, encapsulación, adhesión (a la pared interna o externa de la vesícula) o inclusión en la pared con o sin extrusión de la sustancia. El término se usa de manera intercambiable con los términos "cargar" y "contener".

15 Como se usa en el presente documento, los términos "respuesta inmunitaria" se refieren a una respuesta provocada en un animal. Una respuesta inmunitaria se puede referir a inmunidad celular, inmunidad humoral o puede implicar ambas. Una respuesta inmunitaria también puede estar limitada a una parte del sistema inmunitario. Por ejemplo, en determinados modos de realización, una formulación inmunógena puede inducir un incremento en la respuesta de IFN $\gamma$ . En determinados modos de realización, una formulación inmunógena puede inducir una respuesta de IgA mucosa (por ejemplo, como se mide en lavados nasales y/o rectales). En determinados modos de realización, una formulación inmunógena puede inducir una respuesta de IgG sistémica (por ejemplo, como se mide en el suero).

20 Como se usa en el presente documento, el término "inmunógeno" quiere decir que puede producir una respuesta inmunitaria en un huésped animal frente a una entidad distinta del huésped (por ejemplo, un virus de la hepatitis A o virus de la hepatitis B). En determinados modos de realización, esta respuesta inmunitaria forma la base de la inmunidad protectora provocada por una vacuna frente a un organismo infeccioso específico (por ejemplo, un virus de la hepatitis A o un virus de la hepatitis B). Un "inmunógeno" es una sustancia inmunógena (por ejemplo, una molécula).

25 Como se usa en el presente documento, los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad suficiente para mostrar un beneficio significativo en un paciente que se está tratando. La cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación inmunógena puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, la naturaleza de la formulación, la vía de administración, la salud, la estatura y/o la edad del paciente que se está tratando, etc.

30 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una proteína (es decir, una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos). En algunos modos de realización, los polipéptidos pueden incluir restos distintos de aminoácidos (por ejemplo, pueden ser glucoproteínas, los proteoglicanos, lipoproteínas, etc.) y/o se pueden procesar o modificar de otro modo. Los expertos en la técnica apreciarán que una "proteína" puede ser una cadena polipeptídica completa como se produce por una célula (con o sin una secuencia señal), o puede ser una porción de la misma. Los expertos en la técnica apreciarán que una proteína pueden incluir a veces más de una cadena polipeptídica, por ejemplo unida por uno o más enlaces disulfuro o asociada por otros medios. Los polipéptidos pueden contener L-aminoácidos, D-aminoácidos, o ambos y pueden contener cualquiera de una variedad de modificaciones aminoacídicas o análogos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación, amidación, etc, terminal. En algunos modos de realización, los polipéptidos pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos y combinaciones de los mismos.

35 Como se usa en el presente documento, el término "polisacárido" se refiere a un polímero de glúcidos. El polímero puede incluir glúcidos naturales (por ejemplo, arabinosa, lixosa, ribosa, xilosa, ribulosa, xilulosa, alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa, tagatosa, manoheptulosa, sedoheptulosa, octolosa y sialosa) y/o glúcidos modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, 2'-desoxirribosa y hexosa). Los polisacáridos ejemplares incluyen almidón, glucógeno, dextrano, celulosa, etc.

40 Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos. El polímero puede incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina), análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolopirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-iodouridina, C5-propiniluridina, C5-propinilcitidina, C5-metilcitidina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, dihidrouridina, metilpseudouridina, 1-metiladenosina, 1-metilguanosina, N6-metiladenosina y 2-tiocitidina), bases químicamente modificadas, bases biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas), bases intercaladas, glúcidos

modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, 2'-O-metilcitidina, arabinosa y hexosa), o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces 5'-N-fosforamidita).

Como se usa en el presente documento, el término "fármaco terapéutico de moléculas pequeñas" se refiere a una molécula terapéutica no polimérica que puede contener varios enlaces carbono-carbono y tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1500 Da (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 Da, menos de aproximadamente 500 Da o menos de aproximadamente 200 Da). Un fármaco terapéutico de moléculas pequeñas se puede sintetizar en un laboratorio (por ejemplo, por síntesis combinatoria, usando un microorganismo genomanipulado, etc.) o se puede encontrar en la naturaleza (por ejemplo, un producto natural). En general, un fármaco terapéutico de moléculas pequeñas puede modificar, inhibir, activar o afectar de otro modo a un acontecimiento biológico. Por ejemplo, los fármacos terapéuticos de moléculas pequeñas pueden incluir, pero no se limitan a, sustancias antisida, sustancias antineoplásicas, antibióticos, sustancias antidiabéticas, inmunodepresores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivos, relajantes musculares y sustancias antiparkinsonianas, antiespasmódicos y contractores musculares incluyendo bloqueantes de los canales, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios y/o antiprotozoicos, moduladores de las interacciones de la matriz extracelular celular incluyendo inhibidores del crecimiento celular y moléculas antiadhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de la síntesis de ADN, ARN o proteínas, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores antiangiogénicos, factores antisecretorios, anticoagulantes y/o agentes antitrombóticos, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos y agentes para obtención de imágenes. Se puede encontrar un listado más completo de moléculas pequeñas ejemplares adecuadas para su uso en los procedimientos de la presente divulgación en *Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications*, editado por Axel Kleemann y Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999; *Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, editado por Susan Budavari *et al.*, CRC Press, 1996, y *United States Pharmacopeia-25/National formulary-20*, publicada por la United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2001. Preferentemente, aunque no necesariamente, la molécula pequeña es una que ya se ha considerado segura y eficaz para su uso por el organismo o agencia gubernamental apropiada. Por ejemplo, los fármacos para uso en seres humanos enumerados por la FDA en 21 C.F.R. §§ 330,5, 331 a 361, y 440 a 460, y los fármacos para uso veterinario enumerados por la FDA en 21 C.F.R. §§ 500 a 589, se consideran todos aceptables para su uso de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" (o "tratando", "tratado", "tratamiento", etc.) se refiere a la administración de una formulación a un paciente que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el fin de aliviar, calmar, modificar, mejorar, superar o influir en la enfermedad, un síntoma o síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad. En determinados modos de realización, el término "tratar" se refiere a la vacunación de un paciente.

## **Descripción detallada de algunos modos de realización**

### **I. Procedimientos para preparar vesículas**

La presente divulgación proporciona procedimientos para preparar vesículas. En general, las vesículas tienen un compartimento acuoso encerrado por una o más bicapas que incluyen lípidos, opcionalmente con otras moléculas. Por ejemplo, como se analiza con más detalle a continuación, en algunos modos de realización, las vesículas de la presente divulgación comprenden moléculas potenciadoras del transporte (por ejemplo, sales biliares) que facilitan el transporte de lípidos a través de las membranas mucosas.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar vesículas que incluyen las etapas de proporcionar una mezcla fundida de lípidos formadores de vesículas y a continuación añadir la mezcla fundida a una solución acuosa que comprende un antígeno de modo que se formen las vesículas que contienen antígeno. En algunos modos de realización, la solución acuosa que comprende un antígeno se controla por temperatura. En algunos modos de realización, la solución acuosa que comprende un antígeno se mantiene a una temperatura de menos de aproximadamente 50 °C durante la etapa de adición (por ejemplo, menos de aproximadamente 40 °C, de menos de aproximadamente 30 °C, etc.). En algunos modos de realización, la solución acuosa que comprende un antígeno se mantiene en un intervalo de temperatura de entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 50 °C. En algunos modos de realización, la solución acuosa que comprende un antígeno se mantiene a temperatura ambiente.

Se debe entender que una mezcla fundida de lípidos formadores de vesículas se puede obtener de cualquier manera, por ejemplo, se funden los lípidos para formar una mezcla fundida. En algunos modos de realización, se funden los lípidos en un intervalo de temperatura entre 120 °C y 150 °C (por ejemplo, entre 120 °C y 125 °C, entre 120 °C y 130 °C, entre 120 °C y 140 °C, entre 130 °C y 140 °C, entre 135 °C y 145 °C, o entre 140 °C y 145 °C). En algunos modos de realización, se funden los lípidos a aproximadamente 120 °C. En algunos modos de realización, se funden los lípidos a aproximadamente 125 °C. En algunos modos de realización, se funden los lípidos a aproximadamente 130 °C. En algunos modos de realización, se funden los lípidos a aproximadamente 135 °C. En algunos modos de realización, se funden los lípidos a aproximadamente 140 °C. En algunos modos de realización, se funden los lípidos a aproximadamente 145 °C. En algunos modos de realización, se funden los lípidos a aproximadamente 150 °C.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar vesículas que incluyen las etapas de proporcionar un producto lipídico liofilizado y rehidratar el producto lipídico liofilizado con una solución acuosa que comprende un antígeno de modo que se formen vesículas que contienen antígeno. El producto lipídico liofilizado se prepara fundiendo los lípidos formadores de vesículas para producir una mezcla lipídica fundida y a continuación liofilizar la mezcla lipídica fundida.

Sin desear comprometerse con ninguna teoría, se cree que añadiendo una solución acuosa de antígenos al producto lipídico liofilizado, se forman vesículas en presencia del antígeno. Esto puede explicar las eficacias de atrapamiento altas observadas. Adicionalmente, los procedimientos de la presente divulgación evitan exponer el antígeno a disolventes orgánicos y temperaturas altas. Sin desear quedar limitado por ninguna teoría, esto puede explicar la actividad alta (es decir, antigenicidad y/o inmunogenicidad) de los antígenos atrapados en las formulaciones resultantes.

### **Lípidos formadores de vesículas**

Los lípidos son moléculas orgánicas que, en general, son insolubles en agua, pero solubles en sustancias orgánicas apolares (por ejemplo, éter, cloroformo, acetona, benceno, etc.). Los ácidos grasos son una clase de lípidos que incluyen un resto ácido unido a una cadena de hidrocarburos saturada o insaturada. Los ejemplos específicos incluyen ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, etc. Las sales de metales alcalinos de ácidos grasos son típicamente más solubles en agua de los propios ácidos. Los ácidos grasos y sus sales que incluyen cadenas de hidrocarburos con ocho o más carbonos a menudo presentan propiedades anfífilas debido a la presencia de regiones tanto hidrófilas (cabeza) como hidrófobas (cola) en la misma molécula. Los lípidos no iónicos que incluyen grupos con cabeza polar también pueden presentar propiedades anfífilas (es decir, tensioactivas). Los triésteres de ácidos grasos con glicerol (1,2,3-trihidroxipropano) componen otra clase de lípidos conocidos como triglicéridos que se encuentran comúnmente en grasas animales y aceites vegetales. Los ésteres de ácidos grasos con alcoholes monohídricos de cadena larga forman otra clase de lípidos que se encuentran en ceras. Los fosfolípidos también son otra clase de lípidos. Se asemejan a los triglicéridos en que son derivados de éster o amida de glicerol o esfingosina con ácidos grasos y ácido fosfórico. El resto fosfato del ácido fosfatídico resultante puede estar esterificado adicionalmente con etanolamina, colina o serina en el propio fosfolípido. Se debe entender que se pueden usar los procedimientos con cualquier lípido que pueda formar vesículas incluyendo cualquiera de los lípidos que se describen en la técnica anterior (por ejemplo, en Liposome Technology, 3ª edición, editado por Gregory Gregoriadis, Informa HealthCare, 2006 y Liposomes: A Practical Approach (The Practical Approach Series, 264), 2ª edición, editado por Vladimir Torchilin y Volkmar Weissig, Oxford University Press, USA, 2003).

En algunos modos de realización, el lípido formador de vesículas es un fosfolípido. Se puede usar cualquier fosfolípido natural o sintético. Sin limitación, los ejemplos de fosfolípidos específicos son L- $\alpha$ -(diesteárido)lecitina, L- $\alpha$ -(diapalmitoil)lecitina, ácido L- $\alpha$ -fosfátido, ácido L- $\alpha$ -(dilauroil)-fosfatídico, ácido L- $\alpha$ -(dimiristoil)fosfatídico, ácido L- $\alpha$ -(dioleoil)fosfatídico, DL- $\alpha$ -(dipalmitoil)fosfatídico, L- $\alpha$ -(diesteárido)fosfatídico, y los diversos tipos de L- $\alpha$ -fosfatidilcolinas preparados a partir de cerebro, hígado, yema de huevo, corazón, soja y similares, o de forma sintética, y sales de los mismos.

En algunos modos de realización, el lípido formador de vesículas es un tensioactivo no iónico. Las vesículas de tensioactivo no iónico se denominan en el presente documento "VTNI". Sin limitación, los ejemplos de tensioactivos no iónicos adecuados incluyen tensioactivos unidos a éster a base de glicerol. Dichos ésteres de glicerol pueden comprender uno de dos grupos acilo alifático superior, por ejemplo, que contienen al menos diez átomos de carbono en cada resto acilo. Los tensioactivos a base de dichos ésteres de glicerol pueden comprender más de una unidad de glicerol, por ejemplo, hasta 5 unidades de glicerol. Se pueden usar monoésteres de glicerol, por ejemplo, los que contienen un resto alquenoilo o alcanilo  $C_{12}$ - $C_{20}$ , por ejemplo, caproilo, lauroilo, miristilo, palmitoilo, oleilo o estearoilo. Un tensioactivo no iónico ejemplar es 1-monopalmitoilglicerol.

En algunos modos de realización, también se pueden usar tensioactivos unidos a éter como tensioactivo no iónico. Por ejemplo, son adecuados los tensioactivos unidos a éter basados en glicerol o un glicol que tiene un glicol alifático inferior de hasta 4 átomos de carbono, tal como etilenglicol. Los tensioactivos basados en dichos glicoles pueden comprender más de una unidad de glicol, por ejemplo, hasta 5 unidades de (por ejemplo, éter diglicolcetílico y/o éter polioxietilen-3-laurílico). Se pueden usar monoésteres de éter o glicerol, incluyendo los que contienen un resto alquenoilo o alcanilo  $C_{12}$ - $C_{20}$ , por ejemplo, caprilo, laurilo, miristilo, cetilo, oleilo o estearilo. Los productos de condensación de óxido de etileno que se pueden usar incluyen los divulgados en la publicación PCT n.º WO88/06882 (por ejemplo, tensioactivos de amina y éter alifático superior de polioxietileno). Los tensioactivos unidos a éter ejemplares incluyen éter 1-monocetílico de glicerol y éter diglicolcetílico.

### **Otros componentes**

En algunos modos de realización, las vesículas pueden contener otros componentes lipídicos y no lipídicos, siempre que estos no eviten la formación de vesículas. Se debe entender que estos componentes se pueden mezclar conjuntamente con los lípidos formadores de vesículas y/o se pueden mezclar conjuntamente con el/los antígeno(s).

En algunos modos de realización, se ha descubierto que puede ser ventajoso mezclar conjuntamente estos componentes con los lípidos formadores de vesículas.

En algunos modos de realización, las vesículas pueden incluir una molécula potenciadora del transporte que facilita el transporte de lípidos a través de las membranas mucosas. Como se describe en la patente de los EE. UU. N.º 5.876.721, se puede usar una variedad de moléculas como potenciadores del transporte. Por ejemplo, se pueden usar derivados de colesterol en los que el átomo de carbono C<sub>23</sub> de la cadena lateral lleva un ácido carboxílico, y/o derivados de los mismos, como potenciadores del transporte. Dichos derivados incluyen, pero no se limitan a, los "ácidos biliares" ácido cólico y ácido quenodesoxicólico, sus productos de conjugación con glicina o taurina tal como ácido glicocólico y taurocólico, derivados que incluyen ácido desoxicólico y ursodesoxicólico, y sales de cada uno de estos ácidos. Las VTNI que incluyen además un ácido biliar o sal se denominan en el presente documento "bilosomas". En algunos modos de realización, los potenciadores del transporte incluyen aminoácidos aciloxilados, tales como acilcarnitinas y sales de los mismos. Por ejemplo, se puede usar acilcarnitina que contiene restos alquenoilo y alcanóilo C<sub>6-20</sub>, tal como palmitoilcarnitina, como potenciadores del transporte. Como se usa en el presente documento, se pretende que el término aminoácido aciloxilado cubra aminoácidos primario, secundarios y terciarios así como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  aminoácidos. Las acilcarnitinas son ejemplos de  $\gamma$  aminoácidos aciloxilados. Se debe entender que las vesículas pueden comprender más de un tipo de potenciador del transporte, por ejemplo, una o más sales biliares diferentes y una o más acilcarnitinas. El/Los potenciador(es) del transporte, si están presentes, típicamente comprenderán entre un 40 y un 400 % por ciento en peso del lípido formador de vesículas (por ejemplo, entre un 60 y un 100 % en peso o entre un 70 y un 90 % en peso). En algunos modos de realización, el/los potenciador(es) del transporte, si están presentes comprenderán entre un 1 y un 40 % por ciento en peso del lípido formador de vesículas (por ejemplo, entre un 1 y un 20 % en peso, entre un 1 y un 25 % en peso, entre un 1 y un 30 % en peso, entre un 1 y un 35 % en peso, entre un 2 y un 25 % en peso, entre un 2 y un 30 % en peso o entre un 2 y un 35 % en peso).

En determinados modos de realización, las vesículas pueden carecer de una molécula potenciadora del transporte. En algunos modos de realización, las vesículas pueden carecer de un "ácido biliar" tal como ácido cólico y ácido quenodesoxicólico, sus productos de conjugación con glicina o taurina tales como ácido glicocólico y taurocólico, derivados que incluyen ácido desoxicólico y ursodesoxicólico, y sales de cada uno de estos ácidos. En algunos modos de realización, las vesículas pueden carecer de aminoácidos aciloxilados, tales como acilcarnitinas y sales de los mismos, y palmitoilcarnitinas.

En algunos modos de realización, las vesículas pueden incluir un tensioactivo iónico, por ejemplo, para provocar que las vesículas lleven una carga negativa. Por ejemplo, esto puede ayudar a estabilizar las vesículas y proporcionar una dispersión eficaz. Sin limitación, para este propósito se pueden usar materiales ácidos tales como ácidos alcanóicos y alquenoicos superiores (por ejemplo, ácido palmítico, ácido oleico) u otros compuestos que contienen grupos ácidos incluyendo fosfatos tales como fosfatos de dialquilo (por ejemplo, fosfato de dicetilo, o ácido fosfatídico o fosfatidilserina) y monoésteres de sulfato tales como sulfatos de alquilo superior (por ejemplo, cetilsulfato). El/Los tensioactivo(s) iónico(s), si están presentes, típicamente comprenderán, entre un 1 y un 25 % en peso del lípido formador de vesículas. Por ejemplo, entre un 2 y un 20 % en peso o entre un 5 y un 15 % en peso. En algunos modos de realización, el/los tensioactivo(s) iónico(s), si están presentes, comprenderán entre un 1 y un 50 % en peso del lípido formador de vesículas (por ejemplo, entre un 1 y un 35 % en peso, entre un 5 y un 40 % en peso, entre un 10 y un 40 % en peso, entre un 15 y un 40 % en peso, entre un 20 y un 40 % en peso, o entre un 20 y un 35 % en peso).

En algunos modos de realización, las vesículas pueden incluir un material hidrófobo apropiado de mayor masa molecular que facilita la formación de bicapas (tal como un esteroide, por ejemplo, un esteroide tal como colesterol). En algunos modos de realización, la presencia del esteroide puede ayudar a formar la bicapa de la que dependen las propiedades físicas de la vesícula. El esteroide, si está presente, típicamente comprenderá entre un 20 y un 120 % en peso del lípido formador de vesículas. Por ejemplo, entre un 25 y un 90 % en peso o entre un 35 y un 75 % en peso. En algunos modos de realización, el esteroide, si está presente, comprenderá entre un 25 y un 95 % en peso, entre un 25 y un 105 % en peso, entre un 35 y un 95 % en peso, o entre un 35 y un 105 % en peso del lípido formador de vesículas.

En algunos modos de realización, se puede incluir un lioprotector en cualquier solución o mezcla antes de la liofilización. Los lioprotectores ejemplares incluyen sacarosa, trehalosa, polietilenglicol (PEG), tampón dimetilsuccinato (DMS), seroalbúmina bovina (BSA).

En algunos modos de realización, las vesículas de la presente divulgación son bilosomas que incluyen además un tensioactivo iónico o un esteroide. En algunos modos de realización, los bilosomas pueden incluir un tensioactivo iónico y un esteroide.

En algunos modos de realización, las vesículas de la presente divulgación son vesículas de tensioactivo no iónico (VTNI) que carecen de una molécula potenciadora del transporte y que incluyen además un tensioactivo iónico o un esteroide. En algunos modos de realización, las vesículas pueden carecer de un "ácido biliar" tal como ácido cólico y ácido quenodesoxicólico, sus productos de conjugación con glicina o taurina tales como ácido glicocólico y taurocólico, derivados que incluyen ácido desoxicólico y ursodesoxicólico, y sales de cada uno de estos ácidos. En algunos modos de realización, las vesículas pueden carecer de aminoácidos aciloxilados, tales como acilcarnitinas y sales de los mismos, y palmitoilcarnitinas. En algunos modos de realización, las VTNI pueden carecer de una molécula

potenciadora del transporte (por ejemplo, cualquiera de las moléculas mencionadas anteriormente) e incluir un tensioactivo iónico y un esteroide.

### **Liofilización**

5 Como se analiza anteriormente y a continuación, en algunos modos de realización, los procedimientos de la presente divulgación incluyen una etapa de liofilización (ya sea de una mezcla lipídica fundida o de una formulación de vesículas que contienen antígeno). La liofilización es un procedimiento establecido para potenciar la estabilidad a largo plazo de los productos. Se cree que la potenciación de la estabilidad física y química se logra evitando la degradación y la hidrólisis. La liofilización implica congelar la preparación en cuestión y a continuación reducir la presión circundante (y opcionalmente calentar la preparación) para permitir que el/los disolvente(s) congelado(s) sublimen directamente de la fase sólida a gas (es decir, fase de secado). En determinados modos de realización, la fase de secado se divide en fases de secado primario y secundario.

15 La fase de congelación se puede realizar colocando la preparación en un recipiente (por ejemplo, un matraz, tubo Eppendorf, etc.) y opcionalmente girando el recipiente en un baño que se enfría por refrigeración mecánica (por ejemplo, usando hielo seco y metanol, nitrógeno líquido, etc.). En algunos modos de realización, la etapa de congelación implica enfriar la preparación hasta una temperatura que está por debajo del punto eutéctico de la preparación. Puesto que el punto eutéctico se produce a la temperatura más baja a la que pueden coexistir la fase sólida y líquida de la preparación, mantener el material a una temperatura por debajo de este punto garantiza que la sublimación en lugar de la evaporación

20 La fase de secado (o la fase de secado primario cuando se usan dos fases de secado) implica reducir la presión y opcionalmente calentar la preparación hasta un punto en el que el/los disolvente(s) se pueda(n) sublimar. Esta fase de secado típicamente retira la mayoría del/de los disolvente(s) de la preparación. Se apreciará que las fases de congelación y de secado no son necesariamente fases distintas sino que se pueden combinar de cualquier manera. Por ejemplo, en determinados modos de realización, las fases de congelación y de secado se pueden solapar.

25 Opcionalmente se puede usar una fase de secado secundario para retirar el/los disolvente(s) residual(es) que se adsorben durante la fase de congelación. Sin desear comprometerse con ninguna teoría, esta fase implica elevar la temperatura para romper cualquier interacción fisicoquímica que se haya formado entre las moléculas de disolvente y la preparación congelada. Una vez que se completa la fase de secado, se puede romper el vacío con un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o helio) antes de que se selle opcionalmente el producto liofilizado.

### **Rehidratación**

30 Como se analiza anteriormente, en algunos modos de realización, los procedimientos de la presente divulgación incluyen una etapa de rehidratar un producto lipídico liofilizado para formar vesículas que contienen antígeno. Esto se logra mezclando el producto lipídico liofilizado con una solución acuosa que comprende un antígeno. En algunos modos de realización, esto implica añadir la solución acuosa al producto lipídico liofilizado.

35 En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 10 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación. En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 20 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación. En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 30 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación. En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 40 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación. En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 50 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación. En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 60 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación. En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 70 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación. En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 80 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación. En algunos modos de realización, las vesículas que contienen antígeno contienen al menos aproximadamente un 90 % del antígeno añadido en la etapa de rehidratación.

50 En algunos modos de realización, la solución acuosa incluye un tampón. El tampón usado típicamente depende de la naturaleza del antígeno o antígenos en la solución acuosa. Por ejemplo, sin limitación, se puede usar un tampón PCB, un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , un tampón PBS, un tampón bicina, un tampón Tris, un tampón HEPES, un tampón MOPS, etc. El tampón PCB se produce mezclando propionato de sodio, cacodilato de sodio, y bis-Tris propano en las proporciones molares 2:1:2. Variar la cantidad de HCl añadido permite tamponar a lo largo de un intervalo de pH de 4-9. En algunos modos de realización, se puede usar un tampón carbonato.

55 En algunos modos de realización, una formulación de vesículas que contienen antígeno preparada por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente se puede liofilizar para un uso futuro, y posteriormente rehidratarse (por ejemplo, con agua o un tampón acuoso) antes de su uso. En algunos modos de realización, se puede añadir un coadyuvante durante esta etapa de rehidratación (por ejemplo, por inclusión en el agua estéril o tampón acuoso). En algunos modos de realización, una formulación de vesículas que contienen antígeno se puede almacenar a  $-80^\circ\text{C}$

antes de la liofilización. En algunos modos de realización, una formulación liofilizada se puede almacenar en un intervalo de temperaturas de entre -20 °C y 10 °C (por ejemplo, entre -5 °C y 10 °C, entre 0 °C y 5 °C o entre 2 °C y 8 °C).

### **Tamaño de vesícula y procesamiento**

- 5 Se apreciará que una formulación de vesícula incluirá típicamente una mezcla de vesículas con un intervalo de tamaños. Se debe entender que los valores de diámetro enumerados a continuación corresponden al diámetro más frecuente dentro de la mezcla. En algunos modos de realización, > 90 % de las vesículas en una formulación tendrán un diámetro que está dentro de un 50 % del valor más frecuente (por ejemplo,  $1000 \pm 500$  nm). En algunos modos de realización, la distribución puede ser más estrecha, por ejemplo, > 90 % de las vesículas en una formulación pueden tener un diámetro que está dentro de un 40, 30, 20, 10 o 5 % del valor más frecuente. En algunos modos de realización, se puede usar sonicación o ultrasonificación para facilitar la formación de vesículas y/o para modificar el tamaño de partícula de vesícula. En algunos modos de realización, se puede usar filtración, diálisis y/o centrifugación para ajustar la distribución de tamaño de vesícula.

- 15 En general, las vesículas producidas de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación pueden ser de cualquier tamaño. En algunos modos de realización, las formulaciones pueden incluir vesículas con un diámetro en el intervalo de aproximadamente 150 nm a aproximadamente 15 µm, por ejemplo, de aproximadamente 800 nm a aproximadamente un 1,5 µm. En determinados modos de realización, las vesículas pueden tener un diámetro que es mayor que 10 µm, por ejemplo, de aproximadamente 15 µm a aproximadamente 25 µm. En determinados modos de realización, las vesículas pueden tener un diámetro en el intervalo de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 10 µm, por ejemplo, de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 4 µm. En determinados modos de realización, las vesículas pueden tener un diámetro que es menor que 150 nm, por ejemplo, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm.

### **Antígenos**

- 25 En general, se debe entender que cualquier antígeno o antígenos se pueden atrapar usando un procedimiento de la presente divulgación. Como se analiza previamente, el antígeno o antígenos pueden estar asociados con vesículas de cualquier manera. En algunos modos de realización, el antígeno o antígenos pueden estar presentes en el núcleo acuoso de las vesículas. Sin embargo, dependiendo de su hidrofobicidad, un antígeno también puede estar parcial o completamente asociado con una bicapa. En general, se ha de entender asimismo que, en algunos modos de realización, una formulación de vesícula puede incluir cantidades de uno o más antígenos que no están asociados con vesículas.

30 En algunos modos de realización, los procedimientos de la presente divulgación se pueden usar para atrapar uno o más de los antígenos incluidos en una vacuna. La tabla 1 es una lista no limitante de vacunas adecuadas.

**Tabla 1**

<b>Vacuna</b>	<b>Enfermedad</b>
BioThrax <sup>®</sup>	Carbunco
DTaP (Daptacel <sup>®</sup> , Infanrix <sup>®</sup> , Tripedia <sup>®</sup> )	Difteria
Td (Decavac <sup>®</sup> )	Difteria
DT, TT	Difteria
Tdap (Boostrix <sup>®</sup> , Adacel <sup>®</sup> )	Difteria
DTaP/IPV/HepB (Pediarix <sup>®</sup> )	Difteria
DTaP/Hib (TriHIBit <sup>®</sup> )	Difteria
HepA (Havrix <sup>®</sup> , Vaqta <sup>®</sup> )	Hepatitis A
HepA/HepB (Twinrix <sup>®</sup> )	Hepatitis A
HepB (Engerix-B <sup>®</sup> , Recombivax HB <sup>®</sup> )	Hepatitis B
HepB/Hib (Comvax)	Hepatitis B
DTaP/IPV/HepB (Pediarix), HepA/HepB (Twinrix <sup>®</sup> )	Hepatitis B
Hib (ActHIB <sup>®</sup> , HibTITER <sup>®</sup> , PedvaxHIB <sup>®</sup> )	HIB
HepB/Hib (Comvax <sup>®</sup> )	HIB
DTaP/Hib (TriHIBit <sup>®</sup> )	HIB
PVH (Gardasil <sup>®</sup> )	PVH
Gripe (Fluarix <sup>®</sup> , Fluvirin <sup>®</sup> , Fluzone <sup>®</sup> , Flulaval <sup>®</sup> , FluMist <sup>®</sup> )	Gripe estacional



(continuación)

<b>Vacuna</b>	<b>Enfermedad</b>
Gripe (Afluria <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Agriflu <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Begrivac <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Enzira <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Fluad <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Fluvax <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Fluviral, Fluviral S/F <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Crippol <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Inflexal, Inflexal S, Inflexal V <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Influvac <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Mastaflu <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Mutagrip <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Optaflu <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe (Vaxigrip <sup>®</sup> )	Gripe estacional
Gripe pandémica H1N1 (Arepanrix <sup>®</sup> )	Gripe pandémica H1N1
Gripe pandémica H1N1 (Calvapan <sup>®</sup> )	Gripe pandémica H1N1
Gripe pandémica H1N1 (Focetria <sup>®</sup> )	Gripe pandémica H1N1
Gripe pandémica H1N1 (Gripe A (H1N1) 2009 Monovalent Vaccine <sup>®</sup> )	Gripe pandémica H1N1
Gripe pandémica H1N1 (Pandemrix <sup>®</sup> )	Gripe pandémica H1N1
JE (JE-Vax <sup>®</sup> )	Encefalitis japonesa
Enfermedad de Lyme (LYMERix <sup>®</sup> )	Enfermedad de Lyme
Sarampión (Attenuvax <sup>®</sup> )	Sarampión
MMR (M-M-R II <sup>®</sup> )	Sarampión
MMRV (ProQuad <sup>®</sup> )	Sarampión
Conjugado mening. (Menactra <sup>®</sup> )	Meningocócica
Polisacárido mening. (Menomune <sup>®</sup> )	Meningocócica
Paperas (Mumpsavax <sup>®</sup> )	Paperas
MMR (M-M-R II <sup>®</sup> )	Paperas
MMRV (ProQuad <sup>®</sup> )	Paperas
DTaP (Daptacel <sup>®</sup> , Infanrix <sup>®</sup> , Tripedia <sup>®</sup> )	Tosferina
Tdap (Boostrix <sup>®</sup> )	Tosferina
DTaP/IPV/HepB (Pediarix <sup>®</sup> )	Tosferina
DTaP/Hib (TriHIBit <sup>®</sup> )	Tosferina
Conjugado neumo. (Prevnar <sup>®</sup> )	Neumocócica
Polisacárido neumo. (Pncumovax 23 <sup>®</sup> )	Neumocócica
Polio (Ipol <sup>®</sup> )	Poliomelitis
DTaP/IPV/HepB (Pediarix <sup>®</sup> )	Poliomelitis
Rabia (BioRab <sup>®</sup> , Imovax Rabies <sup>®</sup> , RabAvert <sup>®</sup> )	Rabia
Rotavirus (RotaTeq <sup>®</sup> )	Rotavirus
Rubéola (Meruvax II <sup>®</sup> )	Rubéola
MMR (M-M-R II <sup>®</sup> )	Rubéola

(continuación)

Vacuna	Enfermedad
MMRV (ProQuad <sup>®</sup> )	Rubéola
Zóster (zostavax <sup>®</sup> )	Zóster
Vaccinia (Dryvax <sup>®</sup> )	Viruela y viruela símica
DTaP (Daptacel <sup>®</sup> , Infanrix <sup>®</sup> , Tripedia <sup>®</sup> )	Tétanos
Td (Decavac <sup>®</sup> )	Tétanos
DT, TT	Tétanos
Tdap (Boostrix <sup>®</sup> )	Tétanos
DTaP/IPV/HepB (Pediarix <sup>®</sup> )	Tétanos
DTaP/Hib (TriHIBit <sup>®</sup> )	Tétanos
BCG	Tuberculosis
Antitifoidea (Typhim Vi <sup>®</sup> )	Tifoidea
Antitifoidea oral (Vivotif Berna <sup>®</sup> )	Tifoidea
Varicela (Varivax <sup>®</sup> )	Varicela (Varicella)
MMRV (ProQuad <sup>®</sup> )	Varicela (Varicella)
Fiebre amarilla (YF-Vax <sup>®</sup> )	Fiebre amarilla

En las siguientes secciones se analizan algunos antígenos ejemplares que se podrían usar.

### Hepatitis A

5 La hepatitis A es una hepatopatía grave provocada por el virus de la hepatitis A (VHA). El virus se encuentra en las heces de personas con hepatitis A. Como se muestra en la tabla 1, en la actualidad están autorizadas varias vacunas de la hepatitis A inactivadas. Por ejemplo, Havrix<sup>®</sup> se fabrica por GlaxoSmithKline Biologicals. La patente de los EE. UU. N.º 6.180.110 describe la cepa de VHA atenuado (VHA 4380) usada en Havrix<sup>®</sup> que se derivó originalmente de la cepa HM175 del VHA (patente de los EE. UU. N.º 4.894.228). Havrix<sup>®</sup> contiene una suspensión estéril de VHA inactivado con formalina. La actividad del antígeno vírico se referencia a un patrón usando un ELISA y se expresa en términos de unidades de ELISA (U). Cada dosis de adulto de 1 ml de la vacuna consiste en 1440 U de antígeno vírico, adsorbido en 0,5 mg de aluminio como hidróxido de aluminio (alum). Havrix<sup>®</sup> (al igual que con todas las demás vacunas de la hepatitis A autorizadas) se suministra como una suspensión estéril para administración intramuscular (i.m.). Aunque una dosis de Havrix<sup>®</sup> proporciona al menos protección a corto plazo, en la actualidad se recomienda una segunda dosis de recuerdo después de seis a doce meses para garantizar una protección a largo plazo.

15 Otro ejemplo de una vacuna de la hepatitis A inactivada, AIMMUGEN<sup>®</sup> se ha autorizado y comercializado en Japón desde 1994 por Kaketsuken. AIMMUGEN<sup>®</sup> contiene una suspensión estéril de VHA inactivado con formaldehído. La dosis de adulto recomendada es de 0,5 µg i.m. a los 0, 1 y 6 meses.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno de VHA" se refiere a cualquier antígeno que puede estimular un anticuerpo neutralizante para VHA en seres humanos. El antígeno de VHA puede comprender partículas de virus vivo atenuado o partículas de virus atenuado inactivado o puede ser, por ejemplo una cápside de VHA o proteína vírica de VHA, que se puede obtener convenientemente por tecnología de ADN recombinante.

25 En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar formulaciones inmunógenas que incluyen un virus de la hepatitis A inactivado o atenuado (también denominado "antígeno vírico de hepatitis A" o "antígeno vírico" en el presente documento). Se apreciará que se pueden usar los procedimientos para preparar un virus de la hepatitis A inactivado. En general, estos procedimientos implicarán propagar un virus de la hepatitis A en una célula huésped, lisar la célula huésped para liberar el virus, aislar y a continuación inactivar el antígeno vírico. Después de la retirada del medio de cultivo celular, se lisan las células para formar una suspensión. Esta suspensión se purifica a través de procedimientos de ultrafiltración y cromatografía de permeación en gel. A continuación, se trata el lisado purificado con formalina para garantizar la inactivación vírica (por ejemplo, véase Andre *et al.*, Prog. Med. Virol. 37:72-95, 1990).

35 En la preparación de AIMMUGEN<sup>®</sup>, se propaga la cepa de virus de la hepatitis A KRM0003 (establecida a partir de un VHA natural, que se ha aislado a partir de las heces de un paciente con hepatitis A) en células GL37 (una cepa celular establecida para la producción de vacunas a partir de una cepa celular original de riñón de mono verde africano). Se inoculan células GL37 con VHA cepa KRM0003 y se recoge el antígeno vírico, se purifica exhaustivamente y se inactiva con formaldehído.

Otro ejemplo de un virus de la hepatitis A inactivado que está comercialmente disponible pero no es una vacuna autorizada es el antígeno de hepatitis A (VHA-ag) de Meridian Life Sciences. Como Havrix<sup>®</sup>, el Meridian VHA-ag también deriva del virus de la hepatitis A cepa HM175 pero se propaga en células FRhK-4 (riñón fetal de macaco de la

India). Después de la retirada del medio de cultivo celular, se lisan las células para formar una suspensión y se purifica parcialmente la suspensión por centrifugación con gradiente y se inactiva por tratamiento con formalina.

Se apreciará que se puede usar cualquier cepa de virus de la hepatitis A, por ejemplo, sin limitación cualquiera de las siguientes cepas que se han descrito en la técnica (y otras variantes no humanas):

- 5 • virus de la hepatitis A humano Hu/Arizona/HAS-15/1979
- virus de la hepatitis A humano Hu/Australia/HM175/1976
- virus de la hepatitis A humano Hu/China/H2/1982
- virus de la hepatitis A humano Hu/Costa Rica/CR326/1960
- virus de la hepatitis A humano Hu/Francia/CF-53/1979
- 10 • virus de la hepatitis A humano Hu/Georgia/GA76/1976
- virus de la hepatitis A humano Hu/Alemania/GBM/1976
- virus de la hepatitis A humano Hu/Japón/HAJ85-1/1985
- virus de la hepatitis A humano Hu/Los Angeles/LA/1975
- virus de la hepatitis A humano Hu/África del Norte/MBB/1978
- 15 • virus de la hepatitis A humano Hu/Noruega/NOR-21/1998
- virus de la hepatitis A humano Hu/Sierra Leona/SLF88/1988
- virus de la hepatitis A humano MSM1
- virus de la hepatitis A humano Shanghai/LCDC-1/1984

20 Además, aunque la formalina y el formaldehído se usan comúnmente para inactivar las vacunas de la hepatitis A autorizadas inactivadas, se debe entender que se podrían usar otras técnicas, por ejemplo, el tratamiento con cloro, exposición a temperaturas altas (el antígeno vírico se inactiva por encima de 85 °C/185°F), etc.

En determinados modos de realización puede resultar ventajoso añadir etapas adicionales al procedimiento tradicional para preparar un virus de la hepatitis A inactivado. Por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 6.991.929 describe incluir una etapa de tratamiento de proteasa (por ejemplo, tripsina) después de que el virus se haya propagado. Se descubrió que esta etapa mejora la retirada del material de célula huésped y proporciona una preparación vírica más pura.

Aunque todas las vacunas de la hepatitis A autorizadas en la actualidad incluyen antígenos víricos inactivados, también se han descrito en la literatura vacunas alternativas que incluyen el antígeno vírico atenuado. En determinados modos de realización, una formulación inmunógena puede comprender un antígeno vírico atenuado de este tipo. Como es bien conocido en la técnica, la ventaja de una vacuna atenuada radica en el potencial para una mayor inmunogenicidad lo que resulta de su capacidad para replicarse *in vivo* sin provocar una infección completa.

Un procedimiento que se ha usado en la técnica para preparar los virus de la hepatitis A atenuados es la adaptación vírica que implica pasar en serie una cepa vírica a través de múltiples cultivos celulares. Con el tiempo, la cepa muta y a continuación se pueden identificar las cepas atenuadas. En determinados modos de realización, se puede pasar el virus a través de diferentes cultivos celulares. Por ejemplo, los investigadores han generado virus de la hepatitis A atenuados pasando la cepa CR326 dieciséis veces en cultivos de células de pulmones diploides humanas (MRCS) (véase Preboste *et al.*, J. Med. Virol. 20:165-175, 2005). Se obtuvo una cepa ligeramente más virulenta pasando la misma cepa quince veces en cultivos de células de riñón fetal de macaco de la India (FRhK6) más ocho veces en cultivos de células MRCS. También se ha descrito una vacuna de la hepatitis A atenuada alternativa que se preparó de esta forma a partir de la cepa H2 (véase la patente europea n.º 0413637 y Mao *et al.*, Vaccine 15:944-947, 1997).

40 En determinados modos de realización puede resultar ventajoso realizar una o más de las etapas de cultivo celular a una temperatura reducida. Por ejemplo, la patente europea n.º 0413637 describe incluir una o más etapas de inoculación en las que se reduce la temperatura (por ejemplo, a 32-34 °C en lugar de 35-36 °C).

La patente de los EE. UU. N.º 6.180.110 describe un virus de la hepatitis A atenuado (VHA 4380) que crece en células MRC-5. Los investigadores identificaron mutaciones en VHA 4380 que parecían estar asociadas con la atenuación, comparando su genoma con el genoma de una cepa más virulenta. Esto les permitió diseñar cepas de VHA mutantes con características óptimas para una vacuna de la hepatitis A atenuada candidata. Se apreciará que este enfoque se pudo aplicar a cualquier virus de la hepatitis A atenuado conocido y se pudo usar para modificar genéticamente las variantes sin la necesidad de adaptación vírica.

## Hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) provoca infecciones tanto agudas como crónicas. El amplio espectro clínico de la infección por VHB varía desde hepatitis asintomática a sintomática aguda; desde un estado de portador de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) inactiva a cirrosis hepática y sus complicaciones durante la fase crónica (Fattovich, J. Hepatol. 39:s50-58, 2003). El VHB se transmite en la exposición parenteral o mucosa a fluidos corporales positivos en HBsAg generalmente de personas infectadas con VHB (Hilleman, Vaccine 21:4626-4649, 2003).

En la actualidad, existen dos vacunas comerciales usadas para prevenir la infección por VHB, ambas están fabricadas usando tecnología recombinante. Por ejemplo, Engerix-B™ es una vacuna contra hepatitis B de ADN recombinante no infeccioso desarrollado por GlaxoSmithKline Biologicals. Contiene el antígeno de superficie purificado del VHB obtenido cultivando células de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente, que llevan el gen del antígeno de superficie del VHB.

Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno de superficie de la hepatitis B" o "HBsAg" se refiere a cualquier antígeno HBsAg o fragmento del mismo que presenta la antigenicidad del antígeno de superficie del VHB en seres humanos.

Engerix-B™ y otras vacunas de la hepatitis B autorizadas, que se administran por vía parenteral, han sido exitosas en inducir una respuesta inmunitaria sistémica a VHB. Sin embargo, los anticuerpos producidos como parte de la respuesta inmunitaria sistémica no pueden proporcionar protección en el nivel de la mucosa, que es el sitio de entrada principal para la mayoría de los agentes infecciosos incluyendo el VHB. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de obtener una vacuna para la hepatitis B administrada por vía oral.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar formulaciones inmunógenas que incluyen un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento del mismo que presenta la antigenicidad de HBsAg. Todas las vacunas de la hepatitis B conocidas incluyen un HBsAg recombinante. Se debe entender que se puede usar una cualquiera de estas vacunas de hepatitis B autorizada como una fuente de antígeno en un procedimiento de la presente divulgación para producir una formulación inmunógena.

En general, se puede usar cualquier procedimiento para preparar un antígeno de superficie de hepatitis B. La preparación del HBsAg está bien documentada (por ejemplo, véase Harford *et al.*, Develop. Biol. Standard 54: 125, 1983 y Gregg *et al.*, Biotechnology 5:479, 1987, entre otros). En general, se pueden usar procedimientos de tecnología de ADN recombinante que implican cultivar células modificadas genéticamente, que llevan el gen del antígeno de superficie de VHB. El antígeno de superficie expresado se purifica a continuación y se formula normalmente como una suspensión del antígeno de superficie adsorbido en hidróxido de aluminio (por ejemplo, véase Valenzuela *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1-5, 1983 y McAleer *et al.*, Nature 307:178-180, 1984).

## Gripe

La gripe es una enfermedad infecciosa común del sistema respiratorio asociada con la familia de virus *Orthomyxoviridae*. Gripe A y B son los dos tipos de virus de la gripe que provocan epidemia humana. Los virus de la gripe A se categorizan además en subtipos en base a dos antígenos de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (N). Los virus de la gripe B no se categorizan en subtipos. Se reconoce la vacunación como la única forma más eficaz de evitar o atenuar la gripe para los que tienen un riesgo alto de enfermedad grave por infección gripal y complicaciones relacionadas. La inoculación de antígeno preparado a partir del virus de la gripe inactivado estimula la producción de anticuerpos específicos. En general, se proporcionó protección sólo frente a las cepas de virus a partir de las que se prepara la vacuna o de cepas estrechamente relacionadas.

Las vacunas antigripales, de todos los tipos, normalmente son vacunas trivalentes. En general, contienen antígenos derivados de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B. Las cepas del virus de la gripe que se van a incorporar en las vacunas antigripales cada estación se determinan por la Organización mundial de la salud (OMS) en colaboración con las administraciones sanitarias nacionales y los fabricantes de vacunas. Se apreciará que se puede usar cualquier cepa del virus de la gripe de acuerdo con la presente divulgación, y que las cepas del virus de la gripe diferirán de año en año en base a las recomendaciones de la OMS.

También se engloban las vacunas monovalentes, que pueden ser útiles, por ejemplo, en una situación pandémica. Una vacuna de la gripe pandémica monovalente muy probablemente contendrá el antígeno de gripe de una única cepa A. En algunos modos de realización, los antígenos de la gripe se derivan de cepas de gripe pandémica. Por ejemplo, en algunos modos de realización, los antígenos de la gripe son antígenos víricos de la gripe A (H1N1 de origen porcino).

En todo el mundo se usan predominantemente tres tipos de vacunas inactivadas para proteger frente a la gripe: vacunas de virus completos, vacunas de virus fraccionados que contienen componentes externos e internos del virus, y vacunas de subunidades compuestas sólo de los componentes externos del virus (hemaglutinina y neuraminidasa). Sin desear quedar limitado por ninguna teoría, se cree que la mayor pureza de las vacunas de subunidades debe hacer que sean menos reactógenas y mejor toleradas. A la inversa, se cree que las vacunas de virus completos y virus fraccionados contienen más epítomos y por tanto son más inmunógenas.

En algunos modos de realización, los antígenos de la gripe se basan en vacunas de subunidades. En general, las vacunas de subunidades contienen sólo las partes del virus de la gripe que se necesitan para una vacunación eficaz (por ejemplo, que provocan una respuesta inmunitaria protectora). En algunos modos de realización, los antígenos de la gripe de subunidades se preparan a partir de partículas de virus (por ejemplo, purificación de componentes particulares del virus). En algunos modos de realización, los antígenos de la gripe de subunidades se preparan por procedimientos recombinantes (por ejemplo, expresión en cultivo celular). Por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 5.858.368 describe procedimientos de preparación de una vacuna antigripal recombinante usando tecnología de ADN recombinante. La vacuna antigripal trivalente resultante se basa en una mezcla de antígenos de hemaglutinina recombinante clonados a partir de virus de la gripe que tienen potencial epidémico. Los antígenos de hemaglutinina recombinantes son glucoproteínas de longitud completa, no escindidas, producidas a partir de vectores de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas y purificadas en condiciones sin desnaturalización. En algunos modos de realización, los antígenos de la gripe de subunidades se generan por procedimientos sintéticos (por ejemplo, síntesis peptídica). Las vacunas de subunidades pueden contener antígenos de superficie purificados, antígenos de hemaglutinina y antígenos de neuraminidasa preparados a partir de cepas seleccionadas determinadas por la OMS. Sin desear comprometerse con ninguna teoría, se cree que los antígenos de superficie, antígenos de hemaglutinina y antígenos de neuraminidasa desempeñan un papel significativo en provocar la producción de anticuerpos neutralizantes del virus tras la vacunación.

En algunos modos de realización, los antígenos de la gripe son antígenos de virus fraccionados. Las vacunas preparadas usando antígenos de virus fraccionados contienen típicamente una mayor concentración de las porciones más inmunógenas del virus (por ejemplo, hemaglutinina y neuraminidasa), mientras que se disminuye la concentración de las proteínas víricas menos inmunógenas así como de las proteínas no víricas presentes en huevos (usadas para producir el virus) o de agentes extraños en (por ejemplo, virus de la leucosis aviar, otros microorganismos y residuos celulares). En general, los antígenos de virus fraccionados se preparan por un procedimiento físico que implica romper la partícula vírica, en general con un detergente o disolvente orgánico (por ejemplo, Triton X-100), y separar o purificar las proteínas víricas en diferentes grados, tal como por centrifugación en un gradiente de sacarosa o paso de líquido alantoideo en una columna cromatográfica. En algunos modos de realización, la rotura y la separación de partículas víricas se sigue por diálisis o ultrafiltración. Los antígenos de virus fraccionados normalmente contienen la mayoría de o todas las proteínas estructurales del virus aunque no necesariamente en las mismas proporciones que se producen en el virus completo. Los procedimientos de fraccionamiento vírico así como agentes de fraccionamiento adecuados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de patente de los EE. UU. N.º 20090155309). En algunos modos de realización, la concentración de antígeno final (por ejemplo, antígenos de hemaglutinina y/o neuraminidasa) del antígeno de virus fraccionado se estandariza usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISA).

En algunos modos de realización, los antígenos de la gripe son antígenos de virus completos. Se cree que en individuos no sensibilizados, las vacunas preparadas con antígenos de virus completos pueden ser más inmunógenas e inducir una mayor respuesta de anticuerpos protectores a una menor dosis de antígenos que otras formulaciones (por ejemplo, antígenos de virus fraccionados o de subunidades). Sin embargo, las vacunas antigripales que incluyen antígenos de virus completos pueden producir más efectos secundarios que otras formulaciones.

Los antígenos víricos de la gripe presentes en las formulaciones inmunógenas descritas en el presente documento pueden ser infecciosos, inactivados o atenuados.

En determinados modos de realización, una formulación inmunógena puede comprender un antígeno vírico inactivado. Se apreciará que se puede usar cualquier procedimiento para preparar un antígeno vírico de la gripe inactivada. El documento WO 09/029695 describe procedimientos ejemplares para producir una vacuna del virus inactivado completo. En general, estos procedimientos implicarán propagar un virus de la gripe en una célula huésped, lisando opcionalmente la célula huésped para liberar el virus, aislar y a continuación inactivar el antígeno vírico. Se usa comúnmente un tratamiento químico del virus (por ejemplo, formalina, formaldehído, entre otros) para inactivar el virus para la formulación de vacuna. Sin embargo, se debe entender que se podrían usar otras técnicas, por ejemplo, tratamiento con cloro, exposición a altas temperaturas, etc. En estos tratamientos, la cubierta externa del virión típicamente se deja intacta mientras se altera la función de replicación. Las vacunas de virus no replicantes contienen preferentemente más antígeno que las vacunas con virus vivos que se pueden replicar en el huésped.

En determinados modos de realización, una formulación inmunógena puede comprender un antígeno vírico atenuado. Como es bien conocido en la técnica, una ventaja de una vacuna preparada con un antígeno vírico atenuado radica en el potencial para la mayor inmunogenicidad lo que resulta de su capacidad para replicarse *in vivo* sin provocar una infección completa. Las vacunas de virus vivos que se preparan a partir de cepas atenuadas preferentemente carecen de patogenicidad pero todavía se pueden replicar en el huésped. Un procedimiento que se ha usado en la técnica para preparar antígenos víricos de la gripe es la adaptación vírica que implica pasar en serie una cepa vírica a través de múltiples cultivos celulares. Con el tiempo, la cepa muta y a continuación se pueden identificar las cepas atenuadas. En determinados modos de realización, se puede pasar el virus a través de diferentes cultivos celulares. En determinados modos de realización puede resultar ventajoso realizar una o más de las etapas de cultivo celular a una temperatura reducida.

En la actualidad están autorizadas varias vacunas antigripales (véase la tabla 1). Por ejemplo, Fluzone<sup>®</sup>, que es una vacuna antigripal inactivada con células fraccionadas, se desarrolla y se fabrica por Sanofi Pasteur, Inc. y se puede usar de acuerdo con la presente divulgación. Fluzone<sup>®</sup> contiene una suspensión estéril preparada a partir de virus de la gripe propagados en huevos de gallina embrionados. Los fluidos que contienen virus se recogen y se inactivan con formaldehído. El virus de la gripe se concentra y se purifica en una solución de gradiente de densidad de sacarosa lineal usando una centrifugadora de flujo continuo. A continuación, se rompe químicamente el virus usando un tensioactivo no iónico, octoxinol-9, (Triton<sup>®</sup> X-100) produciendo un antígeno vírico fraccionado. Después se purifica adicionalmente el virus fraccionado por medios químicos y se suspende en solución isotónica de cloruro de sodio tamponada con fosfato de sodio. A continuación, se estandariza la vacuna Fluzone<sup>®</sup> de acuerdo con los requisitos para la temporada gripal y se formula para que contenga 45 µg de hemaglutinina (HA) por 0,5 ml de dosis, en la proporción recomendada de 15 µg de HA cada una, representativa de las tres cepas prototipo (por ejemplo, 2007-2008 vacuna preparada con cepas A/Islands Salomón/3/2006 (H1N1), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) y B/Malasia/2506/2004). La vacuna Fluzone<sup>®</sup> se formula para inyección intramuscular.

Otro ejemplo de una vacuna antigripal autorizada que se puede usar de acuerdo con la presente divulgación es Vaxigrip<sup>®</sup>, que es una vacuna antigripal inactivada con células fraccionadas también desarrollada y fabricada por Sanofi Pasteur, Inc. Vaxigrip<sup>®</sup> se prepara de forma similar al procedimiento indicado anteriormente para Fluzone<sup>®</sup> y se formula de forma similar para inyección intramuscular.

Aún otro ejemplo de una vacuna antigripal autorizada que se puede usar de acuerdo con la presente divulgación es Flumist<sup>®</sup>. Flumist<sup>®</sup> es una vacuna trivalente con virus vivos atenuados para administración por pulverización intranasal. Las cepas del virus de la gripe en Flumist<sup>®</sup> tienen tres mutaciones genéticas que dan lugar a un crecimiento restringido por temperatura y un fenotipo atenuado. El efecto acumulativo de las propiedades antigénicas y los virus de la gripe modificados genéticamente es que se pueden replicar en la nasofaringe e inducir inmunidad protectora. Para producir Flumist<sup>®</sup>, se inoculan huevos sin patógeno específico (SPF) con cada una de las cepas víricas apropiadas y se incuban para permitir la replicación vírica de la vacuna. Se recoge el líquido alantoideo de estos, se mezcla y a continuación se aclara por filtración. Se concentra el virus por ultracentrifugación y se diluye con tampón de estabilización para obtener las concentraciones finales de fosfato de potasio y sacarosa. A continuación, se filtran de forma estéril los virus recogidos para producir las masas monovalentes. Posteriormente, se mezclan las masas monovalentes de las tres cepas y se diluyen según se requiera para lograr la potencia deseada con tampones estabilizantes para producir la vacuna trivalente a granel. A continuación se carga directamente la vacuna a granel en pulverizadores individuales para administración nasal. Cada pulverizador de Flumist<sup>®</sup> refrigerado precargado contiene una única dosis de 0,2 ml. Cada dosis de 0,2 ml contiene  $10^{6,5-7,5}$  FFU de reagrupados de virus de la gripe vivos atenuados de cada una de las tres cepas víricas apropiadas.

Como se describe anteriormente, en la actualidad están autorizadas varias vacunas antigripales. Se debe entender que una cualquiera o la combinación de estas vacunas antigripales autorizadas se puede combinar con una vesícula como se describe en el presente documento para producir una formulación inmunógena. Por ejemplo, Fluzone<sup>®</sup> y/o Vaxigrip<sup>®</sup> comerciales se pueden combinar de esta manera para producir una formulación inmunógena activa. En algunos modos de realización, en primer lugar se purifican las vacunas antigripales autorizadas (por ejemplo, para retirar coadyuvante de alumbre u otros reactivos en la vacuna). En algunos modos de realización, las vacunas antigripales autorizadas no se purifican antes de la formulación con una vesícula como se describe en el presente documento.

La solicitud de patente PCT N°. PCT/US09/47911 describe algunos otros antígenos de la gripe ejemplares que se podrían usar en los procedimientos y formulaciones de la presente divulgación. Los antígenos de la gripe ejemplares también se han descrito en las patentes de los EE. UU. N.º 7.527.800; 7.537.768; 7.514.086; 7.510.719; 7.494.659; 7.468.259; 7.399.840; 7.361.352; 7.316.813; 7.262.045; 7.244.435; 7.192.595; 7.052.701; 6.861.244; 6.743.900; 6.740.325; 6.635.246; 6.605.457; 6.534.065; 6.372.223; 6.344.354; 6.287.570; 6.136.606; 5.962.298; 5.948.410; y 5.919.480.

### Otros virus

El virus de la hepatitis C (VHC) se reconoce ahora como la causa principal de hepatitis ni A, ni B (NANB) asociada a transfusión. El VHC es un virus de ARN de sentido positivo monocatenario con similitudes con los flavivirus y pestivirus (Miller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2057, 1991 y Weiner *et al.*, Virology 180: 842, 1990). Las patentes de los EE. UU. N.º 7.348.011; 6.831.169; 6.538.123 y 6.235.888 describen todas antígenos de VHC ejemplares que se pueden emplear en una vacuna.

El retrovirus de inmunodeficiencia humana (VIH) es el responsable del sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), una enfermedad en la que el sistema inmunitario del organismo falla dejándolo vulnerable a infecciones oportunistas. Las patentes de los EE. UU. N.º 7.067.134; 7.063.849; 6.787.351; 6.706.859; 6.692.955; 6.653.130; 6.649.410; 6.541.003; 6.503.753; 6.500.623; 6.383.806; 6.090.392; 5.861.243; 5.817.318; y 4.983.387 describen todas antígenos de VIH ejemplares que se pueden emplear en una vacuna. También se divulgan diversos antígenos de VIH en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 20090117141 y 20090081254.

En determinados modos de realización, una formulación inmunógena que se prepara de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación puede comprender un antígeno que es termolábil. Como se usa en el presente documento, los términos "antígenos termolábiles" se refieren a un antígeno que pierde la integridad antigénica cuando se expone a determinadas temperaturas elevadas. En algunos modos de realización, la exposición de un antígeno termolábil a temperaturas elevadas destruye más de un 20 % de la integridad antigénica del antígeno (por ejemplo, más de un 30 %, más de un 40 %, más de un 50 % o más) medida en un ensayo de integridad antigénica (por ejemplo, un ELISA) en comparación con el antígeno no manipulado. En determinados modos de realización, un antígeno termolábil pierde la integridad antigénica a temperaturas por encima de 30 °C (por ejemplo, por encima de 35 °C, por encima de 40 °C, por encima de 45 °C, o por encima de 50 °C). En algunos modos de realización, el almacenamiento de un antígeno termolábil a una de estas temperaturas elevadas durante más de 3 minutos (por ejemplo, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos o más) destruye más de un 20 % de la integridad antigénica del antígeno (por ejemplo, más de un 30 %, más de un 40 %, más de un 50 % o más) medida en un ensayo de integridad antigénica (por ejemplo, un ELISA) en comparación con el antígeno no manipulado. Como se analiza anteriormente, los procedimientos de la presente divulgación son particularmente beneficiosos para los antígenos termolábiles debido a que pueden utilizar una temperatura menor de solución de antígeno, lo que permite una mejor conservación de la integridad antigénica.

Se debe entender que la presente divulgación no se limita a los antígenos y que, en general, los procedimientos se pueden usar para atrapar cualquier sustancia sea antigénica o no antigénica. Por lo tanto, en algunos modos de realización, los procedimientos de la presente divulgación se pueden usar para atrapar uno o más polipéptidos, polinucleótidos o polisacáridos que pueden ser o no antigénicos. Las clases específicas de sustancias incluyen, pero no se limitan a, coadyuvantes, enzimas, receptores, neurotransmisores, hormonas, citocinas, modificadores de la respuesta celular tales como factores de crecimiento y factores quimiotácticos, anticuerpos, haptenos, toxinas, interferones, ribozimas, agentes antisentido, plásmidos, ADN y ARN. En algunos modos de realización, el polipéptido puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo humanizado. En algunos modos de realización, estas sustancias son termolábiles ya que se convierten en degradantes en las condiciones al que se hace referencia anteriormente en el contexto de los antígenos.

### **Coadyuvantes**

En determinados modos de realización, los procedimientos de la presente divulgación pueden incluir además una etapa de añadir uno o más coadyuvantes a una formulación de vesícula. Como es bien conocido en la técnica, los coadyuvantes son agentes que potencian las respuestas inmunitarias. Los coadyuvantes son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", Pharmaceutical Biotechnology, Volumen 6, Eds. Powell and Newman, Plenum Press, New York and London, 1995). En algunos modos de realización, se puede añadir un coadyuvante una vez que se ha preparado la formulación de vesícula (con antígeno atrapado). En algunos modos de realización, se puede añadir un coadyuvante durante el procedimiento de preparación de las formulaciones de vesícula (por ejemplo, junto con lípidos formadores de vesículas u otros componentes de vesícula, junto con el antígeno o con una etapa dedicada).

En determinados modos de realización, se añade un coadyuvante antes de que se añada el antígeno. En algunos modos de realización, el coadyuvante se funde conjuntamente con lípidos formadores de vesículas. En algunos modos de realización, un coadyuvante de TLR-4 (descrito a continuación) se funde conjuntamente con lípidos formadores de vesículas. En determinados modos de realización, se añade un coadyuvante después de que se añada un antígeno. En algunos modos de realización, se añade el coadyuvante junto con un lioprotector después de que se añada un antígeno. En algunos modos de realización, se añade un coadyuvante de TLR-3 (descrito a continuación) junto con un lioprotector después de que se añada un antígeno. En algunos modos de realización, el lioprotector es sacarosa.

Los coadyuvantes ejemplares incluyen coadyuvante completo de Freund (CFA), coadyuvante incompleto de Freund (IFA), escualeno, escualano y alumbre (hidróxido de aluminio), que son materiales bien conocidos en la técnica, y están comercialmente disponibles de varias fuentes. En determinados modos de realización, se pueden usar sales de aluminio o calcio (por ejemplo, sales de fosfato o hidróxido) como coadyuvantes. Se ha usado alumbre (hidróxido de aluminio) en muchas vacunas existentes. Típicamente, se incluye de aproximadamente 40 a aproximadamente 700 µg de aluminio por dosis cuando se administra i.m. Por ejemplo, Havrix® incluye 500 µg de aluminio por dosis.

En varios modos de realización, también se pueden usar emulsiones de aceite en agua o emulsiones de agua en aceite como coadyuvantes. Por ejemplo, la fase de aceite puede incluir escualeno o escualano y un tensioactivo. En varios modos de realización, se pueden usar tensioactivos no iónicos tales como los mono- y di-ésteres de ácidos grasos C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub> de sorbitano y manida. Preferentemente, la fase de aceite comprende de aproximadamente un 0,2 a aproximadamente un 15 % en peso de la formulación inmunógena (por ejemplo, de aproximadamente un 0,2 a un 1 %). La publicación PCT N.º WO 95/17210 describe emulsiones ejemplares.

El coadyuvante denominado QS21 es una fracción de saponina inmunológicamente activa que tiene actividad coadyuvante derivada de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina, y los procedimientos de su producción se divulgan en la patente de los EE. UU. N.º 5.057.540. Los derivados sintéticos y semisintéticos de las saponinas de Quillaja saponaria Molina también son útiles, tales como las descritas en las patentes de los EE. UU. N.º 5.977.081 y 6.080.725.

Los TLR son una familia de proteínas homólogas al receptor Toll de *Drosophila*, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y, por tanto, ayudan al cuerpo a distinguir entre moléculas propias y no propias. Las sustancias comunes en patógenos víricos se reconocen por los TLR como patrones moleculares asociados a patógenos. Por ejemplo, TLR-3 reconoce patrones en el ARN bicatenario, TLR-4 reconoce patrones en los lipopolisacáridos mientras que TLR-7/8 reconocen patrones que contienen adenosina en ARN y ADN víricos y bacterianos. Cuando se desencadena un TLR por dicho reconocimiento de patrón, se produce una serie de acontecimientos de señalización que da lugar a la inflamación y la activación de respuestas inmunitarias innata y adaptativa. Varios ligandos sintéticos que contienen los patrones moleculares reconocidos por varios TLR se están desarrollando como coadyuvantes y se pueden incluir en una formulación inmunógena como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, poli(ácido ribonucleico:ribocitidílico) o poli(I:C) (disponible de InvivoGen de San Diego, CA) es un análogo sintético de ARN bicatenario (un patrón molecular asociado a infección vírica) y un coadyuvante ejemplar que es un agonista para TLR-3 (por ejemplo, véase Field *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58:1004 (1967) y Levy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62:357 (1969)). En algunos modos de realización, se puede combinar poli(I:C) con otros agentes para mejorar la estabilidad (por ejemplo, reduciendo la degradación por medio de la actividad de las ARNasas). Por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 3.952.097; 4.024.241 y 4.349.538 describen complejos de poli(I:C) con poli-L-lisina. También se ha demostrado que la adición de poli-arginina a poli(I:C) reduce la degradación por medio de la actividad de las ARNasas. Poli (IC:LC) es un poli(I:C) bicatenario sintético estabilizado con poli-L-lisina-carboximetilcelulosa. La publicación de patente de los EE. UU. N.º 20090041809 describe ácidos nucleicos bicatenarios con uno o más de un nucleósido de ácido nucleico bloqueado (ANB) que puede actuar como agonistas de TLR-3. Los expertos en la técnica podrán identificar otros coadyuvantes de agonistas de TLR-3 adecuados.

Los derivados de lípidos A atenuados (DLA) tales como monofosforil lípido A (MPL) y 3-desacil monofosforil lípido A (3D-MPL) son coadyuvantes ejemplares que son agonistas para TLR-4. Los DLA son moléculas similares al lípido A que se han alterado o construido de modo que la molécula presente efectos adversos menores o diferentes de los del lípido A. Estos efectos adversos incluyen pirogenicidad, toxicidad y reactividad local de Schwarzman como se evaluó en el ensayo de dosis letal al 50 % en embrión de pollo (CELD<sub>50</sub>). MPL y 3D-MPL se describen en las patentes de los EE. UU. N.º 4.436.727 y 4.912.094, respectivamente. El MPL se derivó originalmente del lípido A, un componente de los lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS), un modulador del sistema inmunitario potente pero muy tóxico. El 3D-MPL difiere del MPL en que el residuo acilo que está unido con éster a la glucosamina terminal reductora en la posición 3 se ha retirado selectivamente. Se apreciará que MPL y 3D-MPL pueden incluir una mezcla de varios patrones de sustitución de ácidos grasos, es decir, heptaacilo, hexaacilo, pentaacilo, etc., con longitud de la cadena de ácidos grasos variables. Por tanto, se engloban varias formas de MPL y 3D-MPL, incluyendo mezclas de los mismos, por la presente divulgación.

En algunos modos de realización, estos DLA se pueden combinar con dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), por ejemplo, en una emulsión de escualeno/Tween™ 80 al 2 % (por ejemplo, véase la patente GB N.º 2122204). MPL está disponible de Avanti Polar Lipids, Inc. de Alabaster, AL como PHAD (disacárido de hexaacilo fosforilado). Los expertos en la técnica podrán identificar otros coadyuvantes de agonistas de TLR-4 adecuados. Por ejemplo, se han descrito otros lipopolisacáridos en la publicación PCT N.º WO 98/01139; la patente de los EE. UU. N.º 6.005.099 y la patente EP N.º 729473.

## II. Formulaciones de vesícula

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona formulaciones de vesícula que contienen antígeno preparadas usando estos procedimientos. En algunos modos de realización, las formulaciones de vesícula que contienen antígeno presentan niveles de atrapamiento de antígeno que son mayores que los obtenibles usando los procedimientos de la técnica anterior. En algunos modos de realización, las formulaciones de vesícula que contienen antígeno presentan niveles de actividad de antígeno (es decir, antigenicidad y/o inmunogenicidad) que son mayores que los obtenibles usando los procedimientos de la técnica anterior.

Las formulaciones de vesícula inmunógenas son útiles para tratar muchas enfermedades en seres humanos incluyendo adultos y niños. En general, sin embargo, se pueden usar con cualquier animal. En determinados modos de realización, los procedimientos en el presente documento se pueden usar para aplicaciones veterinarias, por ejemplo, aplicaciones caninas y felinas. Si se desea, los procedimientos en el presente documento también se pueden usar con animales de granja, tales como razas ovina, aviar, bovina, porcina y equina.

En general, las formulaciones de vesícula inmunógenas descritas en el presente documento se administrarán en dichas cantidades y durante un tiempo tal que sea necesario o suficiente para inducir una respuesta inmunitaria. Los regímenes de dosificación pueden consistir en una única dosis o una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo. La cantidad exacta de antígeno que se va a administrar puede variar de un paciente a otro y puede depender de varios factores. Por tanto, se apreciará que, en general, la dosis precisa usada será la determinada por el médico prescriptor y dependerá no sólo del peso del paciente y la vía de administración, sino también de la frecuencia de dosificación, la edad del paciente y la gravedad de los síntomas y/o el riesgo de infección. En determinados modos de realización, la dosis de antígeno en una formulación inmunógena puede variar de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 5 mg, por ejemplo, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 750 µg. Dosis menores de antígeno pueden ser



suficientes cuando se usa administración sublingual u oral, o en presencia de coadyuvante. Dosis mayores pueden ser más útiles cuando se administran por vía oral, en especial en ausencia de coadyuvantes.

En general, las formulaciones se pueden administrar a un paciente por cualquier vía. En particular, los resultados en los ejemplos demuestran que las formulaciones inmunógenas descritas en el presente documento pueden inducir una respuesta protectora incluso cuando se administra por vía oral. Se apreciará que la vía oral es particularmente deseable en vista de las ventajas de la administración oral sobre cualquier forma de inyección (es decir, cumplimiento, distribución de masa, etc.). También se apreciará que los resultados son inesperados en vista del hecho de que la mayoría de las vacunas (incluyendo todas las vacunas de la hepatitis A conocidas) hasta el momento se han administrado por vía parenteral.

Por tanto, en determinados modos de realización, las formulaciones inmunógenas se pueden administrar por vía oral (incluyendo por vía oral, vía sublingual y por lavado gástrico u otros medios de alimentación artificial). Dicha administración oral se puede lograr usando formulaciones sólidas o líquidas, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, multipartículas, geles, películas, óvulos, elixires, soluciones, suspensiones, etc. En determinados modos de realización, cuando se usa una formulación líquida, la formulación se puede administrar conjuntamente con una formulación básica (por ejemplo, una solución de bicarbonato) para neutralizar el pH del estómago. En determinados modos de realización, la formulación básica se puede administrar antes y/o después de la formulación inmunógena. En determinados modos de realización, la formulación básica se puede combinar con la formulación inmunógena antes de su administración o tomarse al mismo tiempo que la formulación inmunógena.

Aunque la administración oral es de especial interés, se apreciará que, en determinados modos de realización, una formulación inmunógena también se puede formular para la administración por vía parenteral, por ejemplo, por inyección. En dichos modos de realización, la administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea, o por medio de técnicas de infusión o inyección sin aguja. Por dicha administración parenteral, las formulaciones inmunógenas se pueden preparar y mantener en formulaciones liofilizadas convencionales y reconstituirse antes de su administración con una solución salina farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina al 0,9 %. El pH de la formulación inyectable se puede ajustar, como es conocido en la técnica, con un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido metanosulfónico. Otros vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear incluyen la solución Ringer y USP. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de sustancias inyectables. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o incorporando agentes esterilizantes en forma de formulaciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Las formulaciones inmunógenas también se pueden administrar por vía intranasal o por inhalación y se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol o inhalador de polvo seco desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. El recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador puede contener una solución o suspensión del anticuerpo, por ejemplo, usando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitano. Las cápsulas y cartuchos (fabricados, por ejemplo, a partir de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para contener una mezcla en polvo de la formulación inmunógena y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las formulaciones para administración rectal son preferentemente supositorios que se pueden preparar mezclando la formulación inmunógena con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que sean sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en la bóveda rectal y liberan los anticuerpos. También se pueden usar enemas de retención y catéteres rectales como es conocido en la técnica. Los vehículos potenciadores de la viscosidad tales como hidroxipropilcelulosa también son determinados vehículos de la divulgación para administración rectal ya que facilitan la retención de la formulación en el recto. En general, el volumen del vehículo que se añade a la formulación se selecciona para aumentar al máximo la retención de la formulación. En particular, el volumen no debe ser tan grande como para poner en peligro la retención de la formulación administrada en bóveda rectal.

### **Formulaciones ejemplares**

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona formulaciones inmunógenas que incluyen un antígeno, un coadyuvante de agonista de TLR-3 y una vesícula que comprende un tensioactivo no iónico y un potenciador del transporte que facilita el transporte de moléculas similares a lípidos a través de las membranas mucosas. En algunos modos de realización, estas formulaciones se pueden administrar por vía oral. En algunos modos de realización, el coadyuvante de agonista de TLR-3 comprende poli(I:C). En algunos modos de realización, el coadyuvante de agonista de TLR-3 comprende poli(IC:LC). En algunos modos de realización, el potenciador del transporte es un ácido biliar, un derivado del mismo o una sal de cualquiera de estos (por ejemplo, desoxicolato de

sodio). En algunos modos de realización, el tensioactivo no iónico es un éster de glicerol (por ejemplo, 1-monopalmitoilglicerol). En algunos modos de realización, la vesícula comprende además un anfifilo iónico (por ejemplo, dicetilfosfato). En algunos modos de realización, la vesícula comprende además un esteroide (por ejemplo, colesterol). En algunos modos de realización, las vesículas comprenden 1-monopalmitoilglicerol, dicetilfosfato, colesterol y desoxicolato de sodio.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona formulaciones inmunógenas que incluyen un antígeno, un coadyuvante de agonista de TLR-3 y una vesícula que comprende un tensioactivo no iónico. En algunos modos de realización, estas formulaciones se pueden administrar por vía parenteral (por ejemplo, por inyección intramuscular). En algunos modos de realización, el coadyuvante de agonista de TLR-3 comprende poli(I:C). En algunos modos de realización, el coadyuvante de agonista de TLR-3 comprende poli(IC:LC). En algunos modos de realización, el tensioactivo no iónico es un éster de glicerol (por ejemplo, 1-monopalmitoilglicerol). En algunos modos de realización, la vesícula comprende además un anfifilo iónico (por ejemplo, dicetilfosfato). En algunos modos de realización, la vesícula comprende además un esteroide (por ejemplo, colesterol). En algunos modos de realización, las vesículas comprenden 1-monopalmitoilglicerol, dicetilfosfato y colesterol. En algunos modos de realización, la vesícula puede carecer de un molécula potenciadora del transporte. En algunos modos de realización, la vesícula puede carecer de un "ácido biliar" tal como ácido cólico y ácido quenodesoxicólico, sus productos de conjugación con glicina o taurina tales como ácido glicocólico y taurocólico, derivados que incluyen ácido desoxicólico y ursodesoxicólico, y sales de cada uno de estos ácidos. En algunos modos de realización, la vesícula puede carecer de aminoácidos aciloxilados, tales como acilcarnitinas y sales de los mismos, y palmitoilcarnitinas.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona formulaciones inmunógenas que incluyen un antígeno, un coadyuvante de agonista de TLR-4 y una vesícula que comprende un tensioactivo no iónico y un potenciador del transporte que facilita el transporte de moléculas similares a lípidos a través de las membranas mucosas. En algunos modos de realización, estas formulaciones se pueden administrar por vía oral. En algunos modos de realización, el coadyuvante de agonista de TLR-4 comprende monofosforil lípido A o 3-desacil monofosforil lípido A. En algunos modos de realización, el potenciador del transporte es un ácido biliar, un derivado del mismo o una sal de cualquiera de estos (por ejemplo, desoxicolato de sodio). En algunos modos de realización, el tensioactivo no iónico es un éster de glicerol (por ejemplo, 1-monopalmitoilglicerol). En algunos modos de realización, la vesícula comprende además un anfifilo iónico (por ejemplo, dicetilfosfato). En algunos modos de realización, la vesícula comprende además un esteroide (por ejemplo, colesterol). En algunos modos de realización, las vesículas comprenden 1-monopalmitoilglicerol, dicetilfosfato, colesterol y desoxicolato de sodio.

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona formulaciones inmunógenas que incluyen un antígeno, un coadyuvante de agonista de TLR-4 y una vesícula que comprende un tensioactivo no iónico. En algunos modos de realización, estas formulaciones se pueden administrar por vía parenteral (por ejemplo, por inyección intramuscular). En algunos modos de realización, el coadyuvante de agonista de TLR-4 comprende monofosforil lípido A o 3-desacil monofosforil lípido A. En algunos modos de realización, el tensioactivo no iónico es un éster de glicerol (por ejemplo, 1-monopalmitoilglicerol). En algunos modos de realización, la vesícula comprende además un anfifilo iónico (por ejemplo, dicetilfosfato). En algunos modos de realización, la vesícula comprende además un esteroide (por ejemplo, colesterol). En algunos modos de realización, las vesículas comprenden 1-monopalmitoilglicerol, dicetilfosfato y colesterol. En algunos modos de realización, la vesícula puede carecer de un molécula potenciadora del transporte. En algunos modos de realización, la vesícula puede carecer de un "ácido biliar" tal como ácido cólico y ácido quenodesoxicólico, sus productos de conjugación con glicina o taurina tales como ácido glicocólico y taurocólico, derivados que incluyen ácido desoxicólico y ursodesoxicólico, y sales de cada uno de estos ácidos. En algunos modos de realización, la vesícula puede carecer de aminoácidos aciloxilados, tales como acilcarnitinas y sales de los mismos, y palmitoilcarnitinas.

En determinados modos de realización, las formulaciones de la presente divulgación comprenden vesículas que presentan una estructura laminar (por ejemplo, una estructura bicapa). En algunos modos de realización, las formulaciones de la presente divulgación son sustancialmente carentes de estructuras no laminares (por ejemplo, micelas).

Se apreciará que las características físicas (por ejemplo, estructura laminar) de las vesículas presentes en las formulaciones descritas en el presente documento se pueden medir por cualquier procedimiento conocido. Por ejemplo, en algunos modos de realización, las características físicas de las vesículas se pueden medir por RMN de  $^{31}\text{P}$  a 25 °C. En algunos modos de realización, un pico anisótropo con un máximo de campo alto alrededor de -2,5 ppm con una anisotropía de desplazamiento químico de aproximadamente 15 a 20 ppm es indicativo de la presencia de una estructura laminar. En algunos modos de realización, un pico isótropo observado en los espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  centrado alrededor de 2,5 ppm es indicativo de la presencia de estructuras no laminares. En algunos modos de realización, los espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  de una formulación de la presente divulgación carece sustancialmente de un pico isótropo alrededor de 2,5 ppm. En algunos modos de realización, si está presente un pico isótropo alrededor de 2,5 ppm entonces tiene una intensidad (altura de pico) que es menor que la intensidad (altura de pico) de un pico anisótropo con una anisotropía de desplazamiento químico de aproximadamente 15 a 20 ppm y un máximo de campo alto alrededor de -2,5 ppm. En algunos modos de realización, si está presente un pico isótropo alrededor de 2,5 ppm entonces tiene una intensidad (altura de pico) que es menor de un 50 % de la intensidad (altura de pico) de un pico anisótropo con una anisotropía de desplazamiento químico de aproximadamente 15 a 20 ppm y un máximo de campo

alto alrededor de -2,5 ppm (por ejemplo, menor de un 40 %, menor de un 30 %, menor de un 20 %, menor de un 10 %, menor de un 5 %, menor del 2 % o menor de un 1 %).

En algunos modos de realización, la presente divulgación proporciona una cualquiera de las formulaciones mencionadas anteriormente en forma liofilizada.

### 5 III. Kits

Aún en otro aspecto, la presente divulgación proporciona kits que incluyen un producto lipídico liofilizado en un primer recipiente y una solución acuosa que comprende un antígeno (y opcionalmente un coadyuvante) en un segundo recipiente. En algunos modos de realización, el kit también incluye instrucciones para mezclar el contenido de los dos recipientes para producir formulaciones de vesícula que contienen antígeno.

10 Como se analiza anteriormente, el producto lipídico liofilizado es uno que se preparó previamente fundiendo lípidos formadores de vesículas para producir una mezcla lipídica fundida y a continuación liofilizando la mezcla lipídica fundida para producir el producto lipídico liofilizado.

Aún en otro aspecto, la presente divulgación proporciona kits que incluyen cualquier formulación de vesícula que contiene antígeno liofilizada de la presente divulgación en un primer recipiente y una solución acuosa (que contiene opcionalmente un coadyuvante) en un segundo recipiente. En algunos modos de realización, el kit también incluye instrucciones para mezclar el contenido de los dos recipientes para rehidratar la formulación de vesícula que contiene antígeno.

En algunos modos de realización, el kit puede incluir componentes adicionales tales como una jeringuilla para inyectar la formulación de vesícula que contiene antígeno en un paciente.

### 20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de modos ejemplares de fabricar y poner en práctica determinadas formulaciones que se describen en el presente documento. Se debe entender que estos ejemplos sólo son con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de las formulaciones y procedimientos descritos en el presente documento.

#### 25 Ejemplo 1: Procedimiento de fundido en tres etapas para preparar vesículas

Este ejemplo describe un procedimiento de fundido en tres etapas que se usó para preparar algunas de las vesículas que se describen en los ejemplos posteriores.

En la etapa 1, se dispuso una proporción molar a 5:4:1 de los siguientes lípidos: 1-monopalmitoilglicerol (MPG, 270 mg), colesterol (CHO, 255 mg) y fosfato de dicetilo (DCP, 90 mg) en un vaso de precipitados de vidrio de fondo plano de 50 ml, asegurándose de que no se adhiere nada de polvo en la pared del vaso de precipitados de vidrio. A continuación, se fundió la mezcla lipídica en un baño de aceite calentado a 120 °C durante 10 minutos, con agitación ocasional en el vaso de precipitados de vidrio cubierto con lámina de aluminio.

Mientras que se mantenía la temperatura de la mezcla lipídica fundida a 120 °C, se creó una emulsión en la etapa 2 añadiendo 10,9 ml de tampón bicarbonato 25 mM, pH 7,6 (precalentado a 50 °C). Se homogeneizó de inmediato la emulsión durante 2 minutos a 50 °C (homogeneización a 8000 rpm en baño de agua a 50 °C). Mientras aún se está homogeneizando, se añaden 1,1 ml de una solución de desoxicolato de sodio 100 mM (una "sal biliar") en tampón bicarbonato 25 mM, pH 9,7 (precalentado a 50 °C) y se continuó la homogeneización durante 8 minutos a 50 °C.

En la etapa 3, se añadió el antígeno (por ejemplo, antígeno de VHA o antígeno de superficie de VHB) en una solución de PBS de aproximadamente pH 7,2 a la mezcla lipídica fundida calentada que contenía la sal biliar.

40 En una variación de este procedimiento en 3 etapas, se enfrió la mezcla lipídica fundida preparada con sal biliar en la etapa 2 hasta 30 °C, se incubó en una incubadora/agitador (220 rpm) durante 2 horas, se congeló a -80 °C, se liofilizó y a continuación se reconstituyó con la solución de antígeno en tampón fosfato 100 mM pH 8,5 antes de su uso.

#### Ejemplo 2: Procedimiento de fundido en dos etapas invertido para preparar vesículas

Este ejemplo describe un procedimiento de fundido en dos etapas invertido que se usó para preparar algunas de las vesículas que se describen en los ejemplos posteriores.

En la etapa 1, se usó la misma proporción molar 5:4:1 de lípidos (MPG:CHO:DCP); sin embargo, en este procedimiento, también se incluyó una proporción molar 0,1-0,5 de ácido desoxicólico (un "ácido biliar") y se fundió conjuntamente con los lípidos en un baño de aceite calentado a 135 °C durante 10 minutos. En el procedimiento del ejemplo 1, sólo se añadió una solución acuosa de sal biliar en la etapa 2 después de convertir los lípidos fundidos en una emulsión.

En esta fase, se preincubó una solución madre de antígeno (por ejemplo, 4 ml de 25 µg/ml de solución de antígeno de VHA diluida con 6 ml de tampón PBS, pH 7,11 o 1,25 ml de 1,0 mg/ml de solución de antígeno de superficie de VHB diluida con 8,75 ml de tampón PBS, pH 7,2) durante 5 minutos en un baño de agua caliente (25 °C a 50 °C). En la etapa 2, se homogeneizó la solución madre de antígeno resultante (a 8.000 rpm), se añadió la mezcla lipídica fundida y se continuó la homogeneización durante otros 10 minutos. Se agitó el homogeneizado resultante durante 2 horas a 220 rpm y 30 °C. Se añadieron 10 ml de una solución de sacarosa 400 mM en tampón PBS al homogeneizado agitado y se mezcló en vórtex adicionalmente el homogeneizado durante 30 segundos. Se congeló esta mezcla a -80 °C, se liofilizó y a continuación se reconstituyó en tampón fosfato 100 mM pH 8,5 antes de su uso.

En una variación de este procedimiento en 2 etapas, se enfrió la solución de ácido biliar / lípido fundido conjuntamente preparada en la etapa 1 hasta 30 °C, se incubó en una incubadora/agitador (220 rpm) durante 2 horas, se congeló a -80 °C, se liofilizó y a continuación se reconstituyó con la solución de antígeno en tampón fosfato 100 mM pH 8,5 antes de su uso.

### Ejemplo 3: Análisis de la integridad del antígeno de la hepatitis B

Se homogeneizaron las soluciones de antígeno de superficie de VHB a 8.000 rpm a temperaturas de 4 °C, 25 °C y 50 °C. La tabla 2 a continuación compara el porcentaje de antígeno resultante medido por ELISA con relación al antígeno no manipulado medido directamente por ELISA. Como se muestra, la exposición de HBsAg a los 50 °C implicados en el procedimiento de fundido en 3 etapas del ejemplo 1 destruyó más de un 50 % de la integridad antigénica del antígeno. El uso del procedimiento de fundido en 2 etapas invertido de la presente divulgación permite que la temperatura del tampón que contiene antígeno se reduzca sustancialmente (por ejemplo, a 25 °C). El procedimiento de fundido en 2 etapas invertido, debido a que puede utilizar una temperatura menor de solución de antígeno, permite una mejor conservación de la antigenicidad de la subunidad de proteína.

**Tabla 2**

Antígeno	Temperatura de solución de antígeno		
	4 °C	25 °C	50 °C
HBsAg	67 %	71 %	38 %

### Ejemplo 4: Análisis del atrapamiento del antígeno de la hepatitis B

Este ejemplo describe experimentos que se realizaron para medir los niveles de atrapamiento de antígeno de superficie de la hepatitis B. Se midieron los niveles de atrapamiento usando un ensayo de ninhidrina. El ensayo de ninhidrina es un procedimiento colorimétrico para determinar la concentración de un polipéptido en una muestra. Las sustancias que contienen grupos amino reaccionan con el reactivo de ninhidrina para proporcionar un complejo de color azul púrpura.

Se atrapó el antígeno de superficie de la hepatitis B en vesículas usando los procedimientos del ejemplo 1 y 2. Se sometieron a prueba dos proporciones diferentes de ácido biliar (0,10 y 0,50) usando el procedimiento del ejemplo 2. Se hidrolizaron los antígenos de superficie de la hepatitis B atrapados de las vesículas, se neutralizaron, se mezclaron con el reactivo de ninhidrina y a continuación se incubaron a 110 °C. A continuación, se dejó que se enfriara la solución y se midió la absorbancia a 595 nm. Existe una relación lineal entre la absorbancia a esta longitud de onda y la cantidad de polipéptido presente en la muestra original. La tabla 3 muestra que se lograron niveles altos de atrapamiento de antígeno (en este caso antígeno de superficie de VHB) usando el procedimiento de 2 etapas invertido del ejemplo 2. La tabla 3 también sugiere que la eficacia de atrapamiento se puede ver afectada por el contenido en ácido biliar.

**Tabla 3**

Antígeno	Procedimiento de preparación de vesículas		
	Fundido en 3 etapas	Fundido en 2 etapas invertido	
Sal / ácido biliar	Proporción 0,17 de sal biliar	Proporción 0,50 de ácido biliar	Proporción 0,10 de ácido biliar
HBsAg	42 %	56 %	40 %

### Ejemplo 5: Caracterización fisicoquímica de la estabilidad de vesícula después de la rehidratación

Este ejemplo describe experimentos que se realizaron para medir la estabilidad de vesícula usando dispersión de luz dinámica. Se determinó el tamaño de partícula y la distribución de tamaño usando un Malvern Zetasizer Instrument

Nano ZS (ZEN3600) usando lecturas por triplicado y un tiempo de equilibrio de 2 minutos. Se añadieron 20 ml de muestra de vesícula a 980 ml de tampón bicarbonato pH 7,6, se agitó en vórtex, y después se añadió a una cubeta de poliestireno (Sarstedt 67,754). Se realizó el análisis estadístico usando Minitab v14 con una prueba de la t de 2 muestras en el nivel de confianza del 95 %. Los resultados obtenidos del análisis de tamaño nanométrico se muestran en la figura 1. Se midieron vesículas preparadas como se describe en los ejemplos 1 y 2 usando un Mastersizer inmediatamente después de la rehidratación en presencia de tampón que contenía 2 µg de antígeno de VHA y a 2, 4 y 6 horas después de la rehidratación. Como se muestra en la figura 1, las vesículas preparadas por el procedimiento de fundido en 2 etapas invertido del ejemplo 2 eran más estables (evaluadas por estabilidad de tamaño) con el tiempo que las vesículas preparadas por el procedimiento de fundido en 3 etapas del ejemplo 1. La estabilidad de vesícula después de la hidratación es un factor potencialmente importante para las formulaciones de vesícula que se administrarán a un paciente.

#### **Ejemplo 6: Respuesta de anticuerpos al antígeno de la hepatitis A en la inmunización de ratones**

Este ejemplo describe las pruebas *in vivo* de determinadas formulaciones inmunógenas en ratones. Se prepararon vesículas como se describe en los ejemplos 1 y 2 y a continuación se rehidrataron en presencia de tampón que contenía 2 µg de antígeno de VHA. Se vacunaron ratones BALB/c hembra (n = 4) tres veces por sonda oral con estas vesículas que contenían antígeno los días 0, 14 y 28 (equivalente a 2 µg antígeno VHA/dosis).

Posteriormente se recogieron muestras de suero para evaluar los valores de IgG específica de la hepatitis A inducidos por vacunación oral. Se sometieron a prueba las muestras de suero recogidas 14 días después de la última inmunización por ELISA frente a antígeno de VHA inactivado. Como se muestra en la figura 2, la vacunación por vía oral de ratones con las vesículas preparadas por el procedimiento de fundido en 2 etapas invertido del ejemplo 2 indujo respuestas de IgG sistémicas (suero) significativamente más altas frente al antígeno de la hepatitis A que las vesículas preparadas por el procedimiento de fundido en 3 etapas del ejemplo 1. Cada símbolo representa el valor de punto final de suero de un animal individual. Estos datos demuestran que la hidratación de vesículas vacías preparadas usando el procedimiento de fundido en 2 etapas invertido con antígeno de VHA da como resultado una mejor inmunogenicidad en comparación con la hidratación de vesículas preparadas usando el procedimiento de fundido en 3 etapas.

Varios investigadores han demostrado que las vacunas de la hepatitis A y las vacunas de la hepatitis B autorizadas actualmente administradas por inyección intramuscular (i.m.) inducen anticuerpos IgG neutralizantes. Se ha descubierto que las formulaciones inmunógenas de la hepatitis A administradas por vía oral pueden inducir anticuerpos IgG de forma sistémica (muestras de suero) y anticuerpos IgA por vía mucosa (muestras de lavado nasal). Puesto que la infección por hepatitis A y hepatitis B se produce por medio de superficies mucosas, una respuesta de IgA (el rasgo característico de una respuesta inmunitaria mucosa) puede ser más eficaz que una respuesta de IgG sistémica. Sólo se podrían esperar respuestas de IgG sistémica si las formulaciones de hepatitis A o hepatitis B inmunógenas se fueran a administrar por vías parenterales estándar (por ejemplo, por inyección i.m.).

#### **Ejemplo 7: El contenido en sal biliar de las vesículas afecta a la maduración de células dendríticas inmaduras**

Ahora se acepta que, en general, las células dendríticas (CD) son importantes células presentadoras de antígeno que desempeñan un papel para establecer si un antígeno (por ejemplo, antígeno de VHA) induce tolerancia o una respuesta inmunitaria protectora en el intestino (Alpan *et al.*, J. Immunol. 166 (8): 4843-4852, 2001). La activación de las CD, habitualmente por estímulos inflamatorios, promueve la expresión de moléculas de coestimuladoras y la presentación de antígenos de una manera que permite la sensibilización productiva de linfocitos T.

En resumen, se aislaron progenitores de CD derivadas de médula ósea de ratones BALB/c indiferenciados y se cultivaron en presencia de interleucina 4 (IL-4) y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) lo que da lugar a la diferenciación para el fenotipo de CD inmaduras (5 días). El tratamiento posterior con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) diferencia además las CD inmaduras en células dendríticas maduras. Se incubaron CD inmaduras con vesículas lipídicas de tensioactivo no iónico (VTNI) preparadas como en las etapas 1 y 2 del ejemplo 2 (sin la posterior adición de antígeno) con o sin dos proporciones molares diferentes de ácido biliar con respecto a lípido total (0,1 y 0,5). Como control positivo, se trataron CD inmaduras con TNF-α solo. Se midió la maduración de CD inmaduras por citometría de flujo usando anticuerpos anti-MHC II y anti-CD86. Las CD maduras se definieron como doble positivo para ambos anticuerpos. Como se muestra en la figura 3, las VTNI sin ácido biliar no afectaron significativamente a la maduración de CD inmaduras mientras que las VTNI con ácido biliar incrementaron la maduración de las CD. Los resultados también sugieren que este incremento en la maduración se puede ver afectado por el contenido en ácido biliar.

#### **Ejemplo 8: Caracterización de vesículas por RMN de <sup>31</sup>P**

Este ejemplo describe la caracterización por RMN de <sup>31</sup>P de determinadas vesículas ejemplares que se prepararon de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación.

Se prepararon vesículas como se describe en los ejemplos 1 y 2 sin la adición de ningún antígeno. Se reconstituyen vesículas liofilizadas en tampón bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>). La concentración lipídica final era de 50 mg/ml. Se transfirieron 4 ml de vesículas suspendidas en un tubo de RMN de 10 mm y se añadieron unas pocas gotas de D<sub>2</sub>O.

El espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  de vesículas preparadas usando el procedimiento de fundido en 2 etapas invertido se muestra en la figura 4A. La forma de línea asimétrica, con una meseta de campo bajo y un pico de campo alto y una anisotropía de desplazamiento químico de aproximadamente 20 ppm corresponde a DCP organizado en una estructura laminar típica.

- 5 El espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  de vesículas preparadas usando el procedimiento de fundido en 3 etapas se muestra en la figura 4B. Se observó un pico isótropo superpuesto sobre la línea ancha y centrado alrededor de 2,5 ppm en las muestras preparadas por este procedimiento. El pico isótropo se puede atribuir probablemente a la presencia de las estructuras no laminares tales como micelas, fase hexagonal, o vesículas de tamaño muy pequeño (nanotamaño).

#### **Ejemplo 9: Procedimiento de fundido en dos etapas invertido para preparar vesículas**

- 10 Este ejemplo describe un procedimiento de fundido en dos etapas invertido ejemplar que se puede usar para preparar vesículas. Se dispone una proporción molar 5:4:1 de lípidos (5,575 g de MPG, 5,218 g de CHO, y 1,845 g de DCP) en un vaso de precipitados de vidrio de fondo plano de 250 ml, asegurándose de que no se adhiere nada de polvo en la pared del vaso de precipitados de vidrio. En determinados modos de realización, cuando se fabrican bilosomas, se añade ácido biliar en esta etapa, por ejemplo, una proporción molar 0,5 de ácido desoxicólico (0,662 g de ácido desoxicólico).

Usando una abrazadera para sujetar el vaso de precipitados que contiene lípidos y ácido biliar, se cubre el vaso de precipitados con una lámina de aluminio y se deja que los lípidos se fundan en un baño de aceite calentado a de 140 °C a 145 °C, con agitación ocasional en el vaso de precipitados.

- 20 En esta fase, se prepara la solución madre de antígeno mezclando el antígeno y tampón fosfato concentrado (5,174 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 1,179 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en 15 ml de agua estéril WFI). Se homogeneiza la solución madre de antígeno a 8000 rpm en un recipiente SS de 1 l esterilizado. Se transfieren rápidamente los lípidos fundidos (con o sin ácido biliar) en el recipiente SS por medio de un embudo de vidrio esterilizado mientras se continúa homogeneizando la solución. Se homogeneiza la mezcla durante 10 minutos a 8000 rpm. Se transfiere la suspensión resultante en un frasco estéril de 1 l y se agitan durante 1-2 horas a 220 rpm y de 30 ° a 35 °C.

- 25 En determinados modos de realización, se divide la suspensión resultante en dos volúmenes iguales (225 ml cada uno) y se añade el poli(IC:LC) coadyuvante como sigue.

Para el primer grupo, se prepara poli(IC:LC) en solución de sacarosa 400 mM mezclando 22,5 ml de una suspensión de poli(IC:LC) (45 mg de poli(IC:LC) a 2 mg/ml) y 202,5 ml de solución de sacarosa 400 mM en tampón fosfato 100 mM. Se añade la suspensión resultante al primer volumen de 225 ml de la suspensión antígeno/vesícula y se agita durante 5 minutos a 220 rpm y de 30 ° a 35 °C.

- 30 Para el segundo grupo, se prepara poli(IC:LC) en solución de sacarosa 400 mM mezclando 7,5 ml de una suspensión de poli(IC:LC) (15 mg de poli(IC:LC) a 2 mg/ml) y 217,5 ml de solución de sacarosa 400 mM en tampón fosfato 100 mM.

- 35 Se añade la suspensión resultante al segundo volumen de 225 ml de la suspensión antígeno/vesícula y se agita durante 5 minutos a 220 rpm y de 30 ° a 35 °C.

A continuación se pueden congelar las muestras a -80 °C durante la noche. En determinados modos de realización, posteriormente se liofilizan las muestras y se almacenan a 4 °C.

#### **Ejemplo 10: Procedimiento de fundido en dos etapas invertido para preparar vesículas**

- 40 Este ejemplo describe otro procedimiento de fundido en dos etapas invertido ejemplar que se puede usar para preparar vesículas. Se dispone una proporción molar 5:4:1 de lípidos (496 g de 1-monopalmitoil glicerol (MPG), 496 g de colesterol (CHO) y 164 g de fosfato de dicetilo (DCP)) en un vaso de precipitados de vidrio de fondo plano, asegurándose de que no se adhiere nada de polvo a la pared del vaso de precipitados de vidrio. Se funde conjuntamente un agonista de TLR-4 junto con los lípidos (por ejemplo, 12 mg de PHAD™ (disacárido de hexaacilo fosforilado de Avanti Polar Lipids)). Se fija el vaso de precipitados y se cubre con una lámina de aluminio y se funden los lípidos en un baño de aceite caliente a 120-125 °C con agitación ocasional en el vaso de precipitados.

- 45 En esta fase, se prepara la solución madre de antígeno mezclando el antígeno y un tampón fosfato concentrado (5,980 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 1,363 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en 20 ml de agua estéril). Se homogeneiza la solución madre de antígeno a 8.000 rpm a 30-35 °C, y se transfieren rápidamente los lípidos fundidos con agonista de TLR-4 al vaso de precipitados se transfieren mientras se homogeneiza la solución. Se homogeneiza la mezcla a 8.000 rpm de forma continua durante 10 minutos a 30-35 °C. Se agita la suspensión de lípido-antígeno resultante durante 1-2 horas a 220610 rpm a 30-35 °C.

En algunos modos de realización, se puede añadir solución de sacarosa en agua a la solución de vesícula/antígeno y se agitar durante 5 minutos a 220610 rpm a 30-35 °C.

A continuación se pueden congelar las muestras a -80 °C durante la noche. En determinados modos de realización, posteriormente se liofilizan las muestras y se almacenan a 4 °C.

### Incorporación por referencia

- 5 El contenido de cualquier referencia a la que se haga referencia en el presente documento se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

### Otros modos de realización

Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren únicamente como ejemplares. Otros modos de realización serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva o la puesta en práctica de los procedimientos, las formulaciones y los kits divulgados en el presente documento.

- 10 En particular, aunque el análisis anterior se ha centrado en el atrapamiento de antígenos, se debe entender que, en general, los procedimientos se pueden usar para atrapar cualquier sustancia sea antigénica o no antigénica. Por lo tanto, en algunos modos de realización, los procedimientos de la presente divulgación se pueden usar para atrapar uno o más polipéptidos, polinucleótidos o polisacáridos que pueden ser o no antigénicos. Las clases específicas de sustancias incluyen, pero no se limitan a, coadyuvantes, enzimas, receptores, neurotransmisores, hormonas, citocinas, modificadores de la respuesta celular tales como factores de crecimiento y factores quimiotácticos, anticuerpos, haptenos, toxinas, interferones, ribozimas, agentes antisentido, plásmidos, ADN y ARN. En algunos modos de realización, el polipéptido puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo humanizado. La tabla 4 proporciona una lista no limitante de sustancias ejemplares que se podrían atrapar usando los procedimientos de la presente divulgación.

20 **Tabla 4**

Sustancia	Fármaco de referencia
interferón gamma-lb	Actimmune <sup>®</sup>
alteplasa	Activase <sup>®</sup> /Cathflo <sup>®</sup>
factor antihemofílico	Advate
albúmina humana	Albutein <sup>®</sup>
laronidasa	Aldurazyme <sup>®</sup>
interferón alfa-n3	Alferon N <sup>®</sup>
factor antihemofílico humano	Alfanate <sup>®</sup>
factor de coagulación humano IX filtrado con virus	AlfaNine <sup>®</sup> SD
alefacept	Amevive <sup>®</sup>
bivalirudina	Angiomax <sup>®</sup>
darbepoetina alfa	Aranesp <sup>™</sup>
bevacizumab	Avastin <sup>™</sup>
interferón beta-la	Avonex <sup>®</sup>
factor de coagulación IX	BeneFIX <sup>™</sup>
interferón beta-lb	Betaseron <sup>®</sup>
tositumomab	Bexxar <sup>®</sup>
factor antihemofílico	Bioclote <sup>™</sup>
hormona del crecimiento humano	BioTropin <sup>™</sup>
toxina botulínica de tipo A	Botox <sup>®</sup>
alemtuzumab	Campath <sup>®</sup>

(continuación)

<b>Sustancia</b>	<b>Fármaco de referencia</b>
acritumomab; tecnecio-99 marcado	CEA-Scan <sup>®</sup>
alglucerasa	Ceredase <sup>®</sup>
imiglucerasa	Cerezyme <sup>®</sup>
Fab inmunitario polivalente de Crotalidae	CroFab <sup>™</sup>
Fab de anticuerpos antidigoxínicos	DigiFab <sup>™</sup>
rasburicasa	ELITEK <sup>®</sup>
etanercept	Enbrel <sup>®</sup>
epoetina alfa	Epogen <sup>®</sup>
cetuximab	Erbix <sup>™</sup>
algasidasa beta	Fabrazyme <sup>®</sup>
urofolitropina	Fertinex <sup>™</sup>
folitropina beta	Follistim <sup>™</sup>
teriparatida	Forteo <sup>®</sup>
somatropina humana	Genotropin <sup>®</sup>
glucagón	GlucaGen <sup>®</sup>
folitropina alfa	Gonal-F <sup>®</sup>
factor antihemofílico	Helixate <sup>®</sup>
factor XIII	Hemofil <sup>®</sup>
insulina	Humalog <sup>®</sup>
complejo humano factor antihemofílico/factor von Willebrand	Humate-P <sup>®</sup>
somatotropina	Humatrope <sup>®</sup>
adalimumab	Humira <sup>™</sup>
insulina humana	Humulina <sup>®</sup>
hialuronidasa humana recombinante	Hilenex <sup>™</sup>
interferón alfacon-1	Infergen <sup>®</sup>
eptifibatida	Integrilin <sup>™</sup>
interferón alfa	Intron A <sup>®</sup>
palifermina	Kepivance
anakinra	Kineret <sup>™</sup>
factor antihemofílico	Kogenate®FS
insulina glargina	Lantus <sup>®</sup>
factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos	Leukine <sup>®</sup>
lutropina alfa, inyectable	Luveris
ranibizumab	Lucentis <sup>®</sup>



(continuación)

<b>Sustancia</b>	<b>Fármaco de referencia</b>
gemtuzumab ozogamicina	Milotarg™
galsulfasa	Naglazyme™
nesiritida	Natrecor®
pegfilgrastim	Neulasta™
oprelvecina	Neumega®
filgrastim	Neupogen®
fanolesomab	NeuroSpec™
somatropina	Norditropin®/Norditropin NordiFlex®
insulina; suspensión de cinc	Novolin L®
insulina; suspensión de isofano	Novolin N®
insulina, regular	Novolin R®
insulina	Novolin®
factor de coagulación VIIa	NovoSeven®
somatropina	Nutropin®
inmunoglobulina intravenosa	Octagam®
L-asparaginasa pegilada	Oncaspar®
abatacept	Orencia™
muromomab-CD3	Ortoclonc OKT3®
gonadotropina coriónica humana	Ovidrel®
interferón alfa-2a pegilado	Pegasys®
interferón alfa-2b pegilado	PEG-Intron™
abarélix	Plenaxis™
epoetina alfa	Procrit®
aldesleucina	Proleukin, IL-2®
somatrem	Protropin®
dornasa alfa	Pulmozyme®
efalizumab	Raptiva™
interferón beta-la	Rebif®
factor antihemofílico	Recombinate®
rAHF/factor antihemofílico	ReFacto®
lepirudina	Refludin®
infliximab	Remicade®
abciximab	ReoPro™
reteplasa	Retavase™

(continuación)

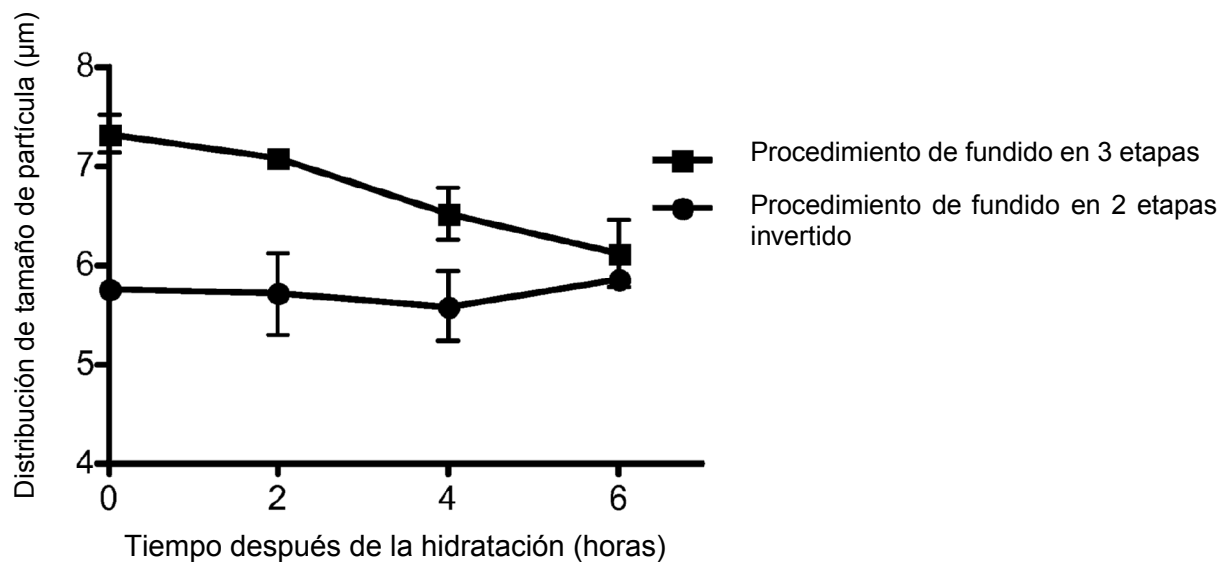
<b>Sustancia</b>	<b>Fármaco de referencia</b>
rituximab	Rituxan™
interferón alfa-2a	Roferon-A®
somatropina	Saizen®
secretina porcina sintética	SecreFlo™
basiliximab	Simulect®
eculizumab	Soliris®
pegvisomant	Somavert®
palivizumab	Synagis™
tirotropina alfa	Thyrogen®
tenecteplasa	TNKase™
natalizumab	Tysabri®
interferón alfa-n1	Wellferon®
drotrecogina alfa	Xigris™
omalizumab	Xolair®
daclizumab	Zenapax®
ibritumomab tiuxetán	Zevalin™
somatotropina	Zorbitive™ (Serostim®)

Además, aunque se considera que los procedimientos de la presente divulgación son particularmente aplicables a sustancias termolábiles que son sensibles a su entorno químico y/o físico (por ejemplo, sustancias biológicas tales como microbios, polipéptidos, polinucleótidos, polisacáridos, etc.) se debe entender que, en algunos modos de realización, los procedimientos también se pueden usar para atrapar sustancias más estables incluyendo productos terapéuticos de moléculas pequeñas tradicionales.

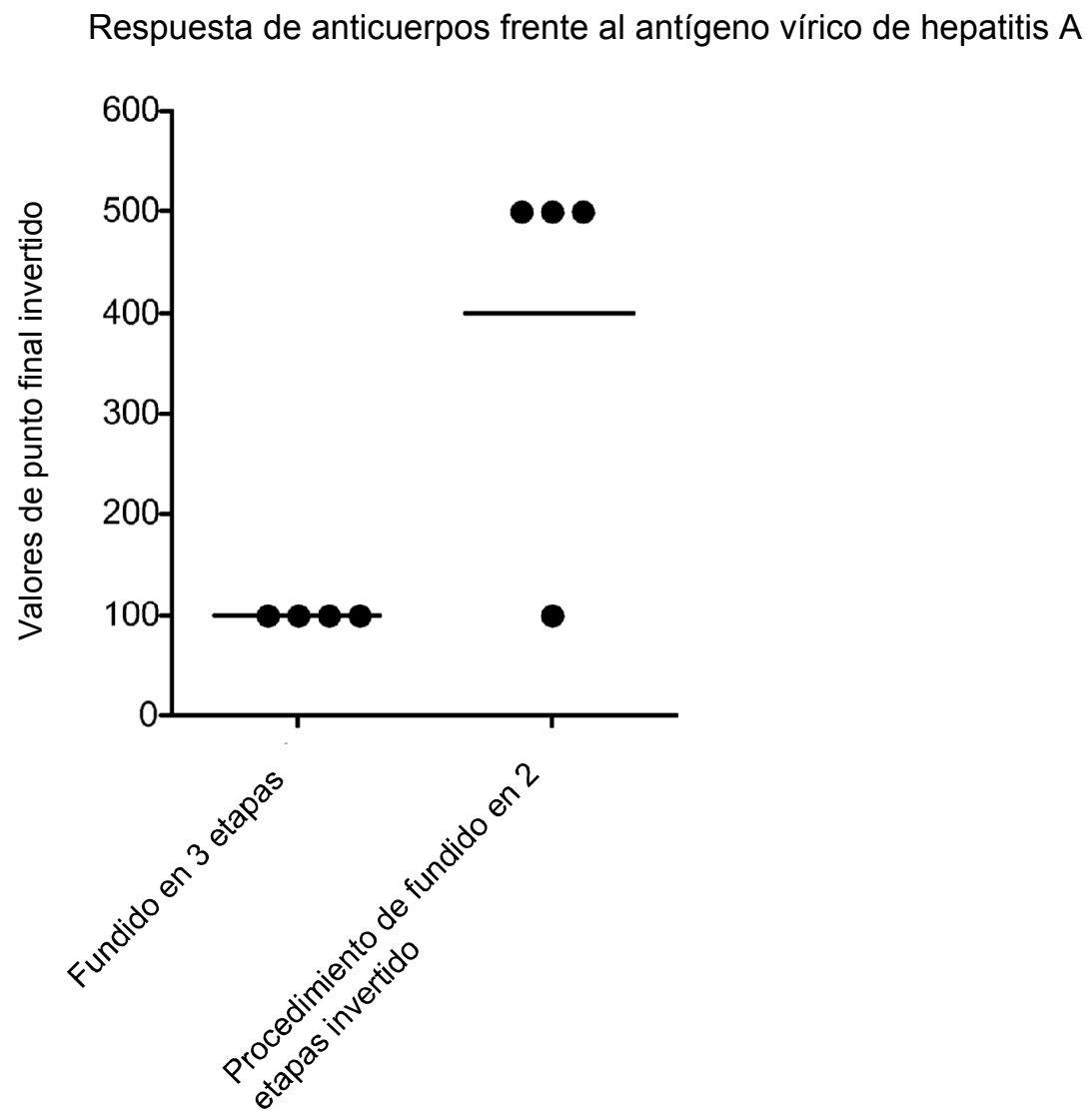
5

# REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que comprende:  
proporcionar una mezcla fundida de lípidos formadores de vesículas; y  
añadir la mezcla fundida a una solución acuosa que comprende un antígeno de modo que se forman vesículas que contienen antígeno.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los lípidos formadores de vesículas son fosfolípidos, o tensioactivos no iónicos, por ejemplo 1-monopalmitoilglicerol.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la mezcla de lípidos formadores de vesículas comprende además:  
un tensioactivo iónico tal como dicetilfosfato, ácido fosfatídico o fosfatidilserina; o un esteroide, tal como colesterol.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la solución acuosa comprende un lioprotector tal como sacarosa.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además liofilizar las vesículas que contienen antígeno.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además rehidratar las vesículas que contienen antígeno después de que se hayan liofilizado.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la mezcla de lípidos formadores de vesículas comprende un coadyuvante tal como un agonista de TLR-4, preferentemente un derivado de lípido A atenuado, tal como un monofosforil derivado de lípido A, o un 3-desacil monofosforil derivado de lípido A.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además añadir un coadyuvante, tal como un agonista de TLR-3, preferentemente con un lioprotector, después de que se formen las vesículas que contienen antígeno,  
en el que el agonista de TLR-3 es preferentemente ácido polirribonucleotídico:polirribocitidílico, estabilizado opcionalmente con poli-L-lisina carboximetilcelulosa; y  
en el que el lioprotector es preferentemente sacarosa, trehalosa, polietilenglicol (PEG), tampón dimetil-succinato (DMS), seroalbúmina bovina (BSA), manitol o dextrano.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la solución acuosa que comprende un antígeno se controla por temperatura.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la solución acuosa que comprende un antígeno se mantiene a una temperatura de menos de aproximadamente 50 °C, por ejemplo, menos de aproximadamente 40 °C o menos de aproximadamente 30 °C, durante la formación de las vesículas que contienen antígeno.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la mezcla lipídica fundida comprende además un potenciador del transporte que facilita el transporte de lípidos a través de las membranas mucosas.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la mezcla lipídica fundida carece de un potenciador del transporte que facilita el transporte de lípidos a través de las membranas mucosas.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el antígeno es un virus, tal como un virus atenuado o un virus inactivado.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el virus es hepatitis A o gripe.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido, un polinucleótido y un polisacárido.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el polipéptido es un polipéptido vírico.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el polipéptido vírico es un polipéptido de la hepatitis B, un polipéptido de la hepatitis C, un polipéptido del VIH o un polipéptido de la gripe.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el polipéptido de la hepatitis B es HBsAg.
19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el antígeno es termolábil.



**Figura 1**



**Figura 2**

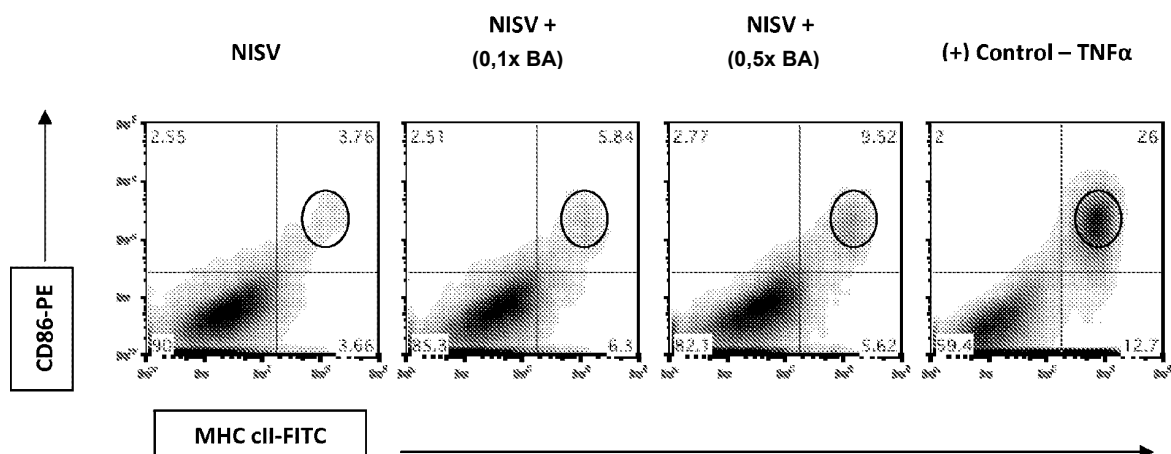
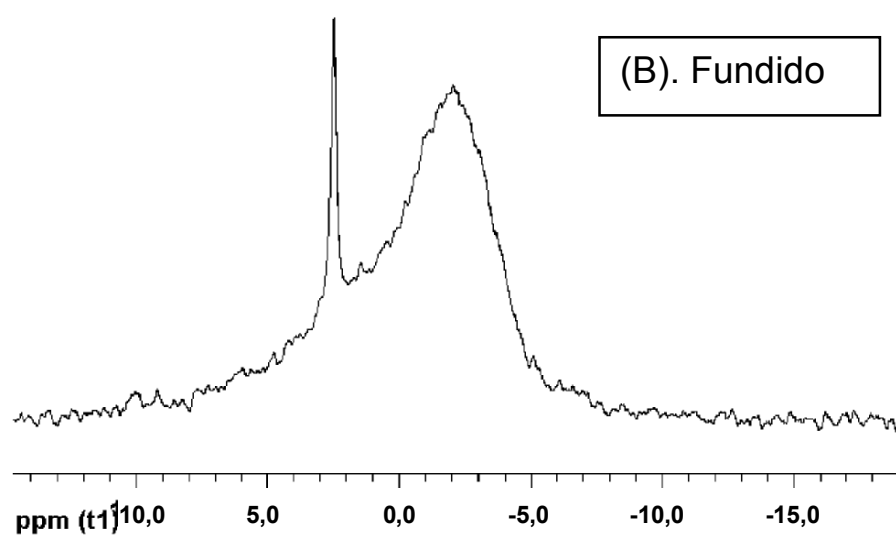
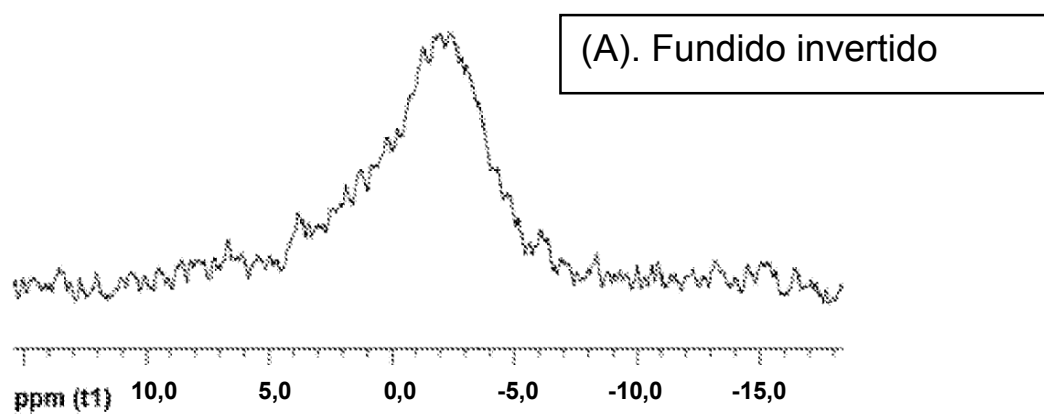


Figura 3



**Figura 4**