



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 786**

51 Int. Cl.:
A61K 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01975585 .9**

86 Fecha de presentación : **28.09.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1322292**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

54

Título: **Composiciones de micropartículas y procedimientos de fabricación de las mismas.**

30

Prioridad: **28.09.2000 US 236077 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73

Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, Ca 94608, US

72

Inventor/es: **Fang, Jia-Hwa;**
Singh, Manmohan;
O'Hagan, Derek y
Hora, Maninder

74

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 278 786 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de micropartículas y procedimientos de fabricación de las mismas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona generalmente con composiciones farmacéuticas. En particular, la invención se relaciona con micropartículas con superficies adsorbentes, procedimientos para preparar tales micropartículas, y usos de las mismas. Adicionalmente, la invención se relaciona con composiciones que comprenden micropartículas biodegradables en las que agentes biológicamente activos, tales como polinucleótidos, polipéptidos, antígenos, y adyuvantes terapéuticos, se adsorben sobre la superficie de las micropartículas.

Antecedentes

Se han usado vehículos particulados para conseguir la liberación parenteral controlada de compuestos terapéuticos. Tales vehículos están diseñados para mantener el agente activo en el sistema de liberación para un periodo de tiempo prolongado. Los ejemplos de vehículos particulares incluyen aquellos derivados de polímeros de metacrilato de polimetilo, así como micropartículas derivadas de poli(láctidos) (ver, p.ej., la Patente de EE.UU. N° 3,773,919), poli(láctido-co-glicolido), conocidos como PLG (ver, p.ej., la Patente de EE.UU. N° 4,767,628) y polietilenglicol, conocido como PEG (ver, p.ej., la Patente de EE.UU. N° 5,648,095). Los polímeros de metacrilato de polimetilo no son degradables mientras las partículas PLG biodegradan mediante hidrólisis no enzimática aleatoria de las uniones éster a los ácidos láctico y glicólico, que se excretan a lo largo de las rutas metabólicas normales.

Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5,648,095 describe el uso de microesferas con productos farmacéuticos encapsulados como sistemas de liberación de fármaco para distribución nasal, oral, pulmonar y oral. También se han descrito formulaciones de distribución lenta que contienen diversos factores de crecimiento polipeptídicos. Ver, p.ej., la Publicación Internacional N° WO 94/12158, la Patente de EE.UU. N° 5,134,122 y la Publicación Internacional N° WO 96/37216.

Fattal *et al.*, Journal of Controlled Release 53:137-143 (1998), describe nanopartículas preparadas con polialquilcianoacrilatos (PACA) que tienen oligonucleótidos adsorbidos.

También se han usado vehículos particulados con antígenos adsorbidos o atrapados en intentos de provocar respuestas inmunes adecuadas. Tales vehículos presentan copias múltiples de un antígeno seleccionado para el sistema inmune y promueven la captura y retención de antígenos en nódulos linfáticos locales. Las partículas se pueden fagocitar por macrófagos y pueden mejorar la presentación del antígeno mediante la liberación de citokinas.

Por ejemplo, la Solicitud en trámite N° 09/015,652, del solicitante, publicada el 29 de Enero de 1998, describe el uso de micropartículas con antígeno adsorbido y con antígeno encapsulado para estimular respuestas inmunológicas mediadas por célula, así como procedimientos para fabricar las micropartículas.

En la Serie de Solicitudes de la Patente N° 09/015,652 en trámite, del solicitante, publicada el 29 de Enero de 1998, por ejemplo, se describe un procedimiento de formación de micropartículas que comprende combinar un polímero con un disolvente orgánico, añadir después un estabilizante de la emulsión, tal como el tensioactivo alcohol de polivinilo (APV), evaporar entonces el disolvente orgánico, formando de este modo micropartículas. La superficie de las micropartículas comprende el polímero y el estabilizante. Las macromoléculas tales como DNA, polipéptidos, y antígenos pueden entonces adsorberse sobre esas superficies.

Las Patentes de EE.UU. 5,814,482 y 6,015,686 describen Sistemas de Iniciación de Vectores Estratificados Eucarióticos (vectores ELVIS), particularmente aquellos derivados y construidos a partir de genomas de alfavirus (tales como el virus Sindbis), para uso en la estimulación de una respuesta a un antígeno, en procedimientos de inhibición de agentes patógenos, y en la distribución de secuencias heterólogas de nucleótidos a células y animales eucarióticos, entre otros.

La Solicitud de la Patente Internacional PCT/US99/17308, del solicitante, y la Solicitud de la Patente de EE.UU. N° de Serie 09/715,902 en trámite, describe procedimientos para fabricar micropartículas que hayan adsorbido macromoléculas, tales como un producto farmacéutico, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína, una hormona, una enzima, un mediador de transcripción o de translación, un intermediario de una ruta metabólica, un inmunomodulador, un antígeno, un adyuvante, o combinaciones de los mismos, y similares. Las micropartículas comprenden, por ejemplo, un polímero tal como un poli(alfa-hidroxi ácido) (p.ej., PLG), un polihidroxi ácido butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, y similares, y se forman usando, por ejemplo, detergentes catiónicos, aniónicos o no iónicos.

Mientras las micropartículas PLG con antígenos adsorbidos ofrecen ventajas significativas sobre otros sistemas más tóxicos, no se puede no obstante mejorar la adsorción de agentes biológicamente activos a la superficie de la micropartícula. Por ejemplo, a menudo es difícil o imposible adsorber agentes biológicamente activos voluminosos o cargados, tales como polinucleótidos, polipéptidos grandes, y similares, a la superficie de la micropartícula. Por lo

tanto, existe una necesidad continuada de sistemas de distribución flexibles para tales agentes y, particularmente para fármacos que son altamente sensibles y difíciles de formular.

Resumen de la invención

5

Los presentes inventores han hallado que la adsorción de macromoléculas a micropartículas se puede mejorar asegurando que el detergente queda dispuesto para formar un complejo con las macromoléculas en el momento de la adsorción. Esta disponibilidad se puede lograr, por ejemplo, proporcionando por separado una cantidad de detergente en el momento de la adsorción de la macromolécula o asegurando que el procedimiento para producir las micropartículas desemboca en un producto que contiene una cantidad sustancial de detergente no unido. Esta provisión se contrastará con técnicas anteriores, en las que las micropartículas se lavan a conciencia para eliminar el detergente residual antes de la adsorción de macromoléculas. Por ejemplo, en los Ejemplos encontrados en el documento PCT/US99/17308 anterior, las micropartículas se lavan múltiples veces con agua (es decir, se lavan con agua cuatro veces por centrifugación) antes de exponerlas a la macromolécula de interés. Tales pasos de lavado eliminan fundamentalmente todo el detergente no unido, desembocando en un producto final en el que más del 99% del detergente que queda está unido a las partículas.

10

15

Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición de micropartículas que comprende: (1) micropartículas, que además comprenden un polímero y una primera fracción de detergente que se une al polímero; y (2) un complejo de una macromolécula biológicamente activa con una segunda fracción de detergente, cuyo complejo se adsorbe sobre la superficie de las micropartículas. La primera fracción de detergente y la segunda fracción de detergente pueden comprender el mismo detergente o detergentes distintos.

20

Las macromoléculas biológicamente activas preferidas se seleccionan entre el grupo constituido por un polipéptido, un polinucleótido, un polinucleósido, un antígeno, un producto farmacéutico, una hormona, una enzima, un mediador de transcripción o de translación, un intermediario de una ruta metabólica, un inmunomodulador, y un adyuvante. Los polímeros preferidos son poli(α -hidroxi ácidos), más preferiblemente aquellos seleccionados entre el grupo constituido por poli(L-lactido), poli(D,L-actido) y poli(D,L-lactido-co-glicolido). Son más preferidos los polímeros de poli(D,L-lactido-co-glicolido). Los polímeros de poli(D,L-lactido-co-glicolido) preferidos son aquellos que tienen una relación molar lactido/glicolido de 30:70 a 70:30, más preferiblemente de 40:60 a 60:40, y que tienen un peso molecular que varía desde 10.000 hasta 100.000 Daltons, más preferiblemente desde 30.000 Daltons hasta 70.000 Daltons. Las macromoléculas biológicamente activas más preferidas incluyen antígenos bacterianos y virales (p.ej., antígenos del HIV tales como gp120, gp140, p24gag y p55gag, antígenos de la meningitis B, antígenos de estreptococos B, y antígenos de la hemaglutinina A de la influenza) y polinucleótidos que codifican para antígenos. Las macromoléculas biológicamente activas pueden estar, por ejemplo, en forma de plásmido, de vector ELVIS, o de constructo de un vector de RNA. Una macromolécula biológicamente activa particularmente referida es pCMV-p55gag.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

Aún otros aspectos de la invención están dirigidos a procedimientos para producir composiciones de micropartículas. En general, estos procedimientos comprenden: (a) formación de una emulsión que comprende (i) un polímero seleccionado entre el grupo constituido por un poli(α -hidroxi ácido), un polihidroxi ácido butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, y un policianoacrilato, (ii) un disolvente orgánico, (iii) un detergente y (iv) agua; seguido de (b) eliminación del disolvente orgánico. Aproximadamente el 10-90% del detergente total de la composición resultante está unido preferiblemente a micropartículas de esta forma de realización, más preferiblemente aproximadamente el 10-60%, y más preferiblemente aproximadamente el 25-40%. En general, estas composiciones de micropartículas se incuban subsiguientemente con una macromolécula biológicamente activa, tal como las descritas anteriormente, para producir una composición biológicamente activa.

Preferiblemente la emulsión es una emulsión de agua-en-aceite-en-agua que se forma mediante un proceso que comprende: (a) emulsionar una fase orgánica que comprende el polímero y el disolvente orgánico con una primera fase acuosa que comprende agua para formar una emulsión de agua-en-aceite; y (b) emulsionar una segunda fase acuosa que comprende el detergente catiónico y agua con la emulsión formada en el paso (a) para formar una emulsión de agua-en-aceite-en-agua.

En algunas formas de realización preferidas, el detergente es un detergente catiónico, que se proporciona en la emulsión en una relación de peso a peso del detergente respecto al polímero desde aproximadamente 0,05:1 hasta aproximadamente 0,5:1. En estas formas de realización, el procedimiento además comprende preferiblemente filtración de flujo transversal de las partículas tras el paso de eliminación del disolvente. En una forma de realización específica, el polímero es poli(D,L-lactido-co-glicolido), el detergente catiónico es CTAB, y el detergente catiónico se proporciona en la emulsión en una relación de peso a peso del detergente respecto al polímero desde aproximadamente 0,1:1 hasta aproximadamente 0,5:1.

En otras formas de realización preferidas, el detergente es un detergente catiónico que se proporciona en la emulsión en una relación de peso a peso del detergente respecto al polímero desde aproximadamente 0,001:1 hasta aproximadamente 0,05:1. A estos bajos niveles, típicamente no existe la necesidad de un paso de filtración o lavado para eliminar el exceso de detergente. En una forma de realización específica, el detergente catiónico es CTAB, el polímero es poli(D,L-lactido-co-glicolido), el detergente catiónico se proporciona en la emulsión en una relación de peso a peso del detergente respecto al polímero desde aproximadamente 0,002 hasta aproximadamente 0,04:1, y las micropartículas no están sujetas a un paso para eliminar el exceso de CTAB de la composición.

Aún otros aspectos de la invención se dirigen a procedimientos para producir composiciones de micropartículas, cuyos procedimientos comprenden: (1) proporcionar una micropartícula en un proceso de emulsificación, cuya micropartícula comprende un polímero y una primera fracción de detergente que está unida a la micropartícula; y (2) adsorber un complejo de una macromolécula biológicamente activa y una segunda fracción de detergente sobre la superficie de la micropartícula. La primera fracción de detergente y la segunda fracción de detergente pueden comprender el mismo detergente o detergentes distintos. El polímero se selecciona entre el grupo constituido por un poli(α -hidroxi ácido), un polihidroxi ácido butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, y un policianoacrilato.

En algunas formas de realización, la primera y segunda fracciones de detergente comprenden el mismo detergente. El detergente preferiblemente es un detergente catiónico, por ejemplo, CTAB. En estas formas de realización, aproximadamente el 10-90%, más preferiblemente aproximadamente el 10-60%, y más preferiblemente aproximadamente el 25-40% del detergente total de la composición de micropartículas está en forma de la primera fracción de detergente que está unida a las micropartículas. Típicamente, todo el detergente se añade durante el transcurso del proceso de emulsificación.

En otras formas de realización, la primera fracción de detergente comprende un primer detergente y la segunda fracción de detergente comprende un segundo detergente que difiere del primer detergente. Típicamente, el primer detergente se añade en el transcurso del proceso de emulsificación y el segundo detergente se añade después del proceso de emulsificación, preferiblemente en concurrencia con la macromolécula biológicamente activa. Preferiblemente, la primera fracción de detergente comprende un detergente no iónico, tal como PVA, y la segunda fracción de detergente comprende un detergente catiónico, tal como CTAB.

Estas y otras formas de realización de la presente invención se le ocurrirán a aquellos con habitual experiencia en la técnica en vista de la inminente descripción.

Breve descripción del dibujo

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un aparato apropiado para producir las micropartículas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, química de polímeros, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la capacidad de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, p.ej., *Remington's Pharmaceutical*

5 *Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); *Methods in Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds, Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, KS., ed, CRC Press, 1997) y *Seymour Carragher's Polymer Chemistry* (4th edition, Marcel Dekker Inc., 1996).

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas aquí, sean *supra* o *infra*, se incorporan aquí en su totalidad mediante referencia.

10 Usadas en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, el término “micropartícula” se refiere a una o más micropartículas, y similares.

15 A. Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, que se entienden definidos como se indica a continuación.

A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes y relaciones de aquí se dan sobre una base de pesos.

20 El término “micropartícula” usado aquí, se refiere a una partícula de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 150 μm de diámetro, más preferiblemente de aproximadamente 200 nm hasta aproximadamente 30 μm de diámetro, y aún más preferiblemente de aproximadamente 500 nm hasta aproximadamente 10 μm de diámetro. Preferiblemente, la micropartícula será de un diámetro que permita la administración parenteral o mucosa sin que se ocluyan agujas y capilares. El tamaño de partícula se determina fácilmente mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como espectroscopia de correlación fotónica, difracción de láser y/o microscopía electrónica de barrido. El término “partícula” también puede usarse para indicar una micropartícula según se define aquí.

30 Las micropartículas de polímeros para usar aquí se forman a partir de materiales que son esterilizables, no tóxicos y biodegradables. Tales materiales incluyen, sin limitación, poli(α -hidroxi ácido), polihidroxi ácido butírico, policaprolactona, polioctoéster, polianhidrido, PACA y policianoacrilato. Preferiblemente, las micropartículas para usar con la presente invención son micropartículas de polímeros derivadas de un poli(α -hidroxi ácido), en particular, de un poli(lactido) (“PLA”) o un copolímero de D,L-lactido y glicolido o ácido glicólico, tal como un poli(D,L-lactido-co-glicolido) (“PLG” o “PLGA”), o un copolímero de D,L-lactido y caprolactona. Las micropartículas de polímero pueden derivarse de cualquiera de diversos materiales de salida poliméricos que tienen una variedad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como el PLG, una variedad de relaciones lactido:glicolido, cuya selección será en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de la macromolécula coadministrada. Estos parámetros se discuten más detalladamente a continuación.

40 El término “detergente” usado aquí incluye tensioactivos, agentes dispersivos, agentes suspensivos, y estabilizantes de la emulsión. Los detergentes aniónicos incluyen, pero sin limitarse a, SDS (dodecil sulfato sódico), SLS (lauril sulfato sódico), DSS (disulfosuccinato), alcoholes grasos sulfatados, y similares. Los detergentes catiónicos incluyen, pero sin limitarse a, cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio, o “CTAB”), cloruro de benzalkonio, DDA (bromuro de dimetil dioctodecil amonio), DOTAP (dioleoil-3-trimetilamonio,propano), y similares. Los detergentes no iónicos incluyen, pero sin limitarse a, tensioactivos no iónicos tales como PVA, povidona (también conocida como polivinilpirrolidona o PVP), ésteres de sorbitan, polisorbatos, monoéteres de glicol polioxietilados, fenoles alquil polioxietilados, poloxámeros, y similares.

50 Tras la formación de micropartículas, el detergente puede estar unido o no unido a las mismas. Cuando está unido, el detergente se puede fijar a las micropartículas mediante cualquier mecanismo que incluye, pero sin limitarse a, enlace iónico, puentes de hidrógeno, enlace covalente, captura física, fuerzas de Van der Waals, y unión mediante interacciones hidrófilas/hidrófobas.

55 El término “macromolécula” usado aquí se refiere, sin limitación, a un producto farmacéutico, un polinucleótido, un polipéptido, una hormona, una enzima, un mediador de transcripción o de translación, un intermediario de una ruta metabólica, un inmunomodulador, un antígeno, un adyuvante, o combinaciones de los mismos. Se describen macromoléculas particulares para usar con la presente invención con más detalle en lo que sigue. Una macromolécula “hecha complejo” es una macromolécula que ha formado una asociación con un detergente y que entonces es apta para la adsorción de una micropartícula.

60 El término “producto farmacéutico” se refiere a compuestos biológicamente activos tales como antibióticos, agentes antivirales, factores de crecimiento, hormonas, y similares, discutidos con más detalle a continuación.

65 El término “adyuvante” se refiere a cualquier sustancia que ayuda o modifica la acción de un producto farmacéutico, incluyendo pero sin limitarse a adyuvantes inmunológicos, que incrementan o diversifican la respuesta inmune a un antígeno.

Un “polinucleótido” es un polímero de ácido nucleico, que típicamente codifica para una proteína o polipéptido biológicamente activo (p.ej., inmunogénico o terapéutico). Dependiendo de la naturaleza del polipéptido codificado por el polinucleótido, un polinucleótido puede incluir algo tan bajo como 10 nucleótidos, p.ej., si el polinucleótido codifica para un antígeno. Además, un “polinucleótido” puede incluir secuencias de cadenas dobles y sencillas y se refiere a, pero sin limitarse a, cDNA a partir de mRNA viral, procariótico o eucariótico, secuencias de RNA y DNA genómico de DNA viral (p.ej. RNA y DNA de virus y retrovirus) o procariótico, y especialmente secuencias de DNA sintético. El término también engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos básicos conocidos del DNA y RNA. El término incluye además modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), de una secuencia nativa, preferiblemente tales en las que la molécula de ácido nucleico codifica para una proteína antigénica terapéutica. Estas modificaciones pueden ser intencionadas, como mediante mutagénesis dirigidas a una localización, o pueden ser accidentales, como mediante mutaciones que producen los antígenos en receptores.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, se incluyen en la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), de una secuencia nativa, preferiblemente tales en las que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica o tenga un efecto terapéutico sobre un sujeto al que se administre la proteína.

Por “antígeno” se quiere significar una molécula que contiene uno o más epítopos capaces de estimular un sistema inmune del receptor para crear una respuesta inmune celular específica contar un antígeno cuando el antígeno es presentado de acuerdo con la presente invención, o una respuesta humoral de anticuerpos. Un antígeno puede ser capaz de provocar una respuesta celular o humoral por sí mismo o cuando se presenta en combinación con otra molécula. Normalmente, un epítipo incluirá entre aproximadamente 3-15, generalmente aproximadamente 5-15, aminoácidos. Los epítopos de una proteína dada se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeado de epítopos, bien conocidas en la técnica. Ver, p.ej., *Epitope Mapping Protocols* in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Human Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, se pueden determinar epítopos lineales mediante, p.ej., sintetizando simultáneamente grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a fracciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos están aún fijados a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, p.ej., La Patente de EE.UU. N° 4,708,871; Geysen *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 :3998-4002; Geysen *et al.* (1986) *Molec. Immunol.* 23 : 709-715, incorporadas todas aquí mediante referencia en su totalidad. Igualmente, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tales como mediante, p.ej., cristalografía de rayos-X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, p.ej., *Epitope Mapping Protocols*, *supra*.

El término “antígeno” usado aquí indica ambas subunidades de antígenos, es decir, antígenos separados y diferenciados de todo un organismo con el que se asocia el antígeno en la naturaleza, así como bacterias, virus, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotipo, o fragmentos de los mismos, y mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar a un antígeno o determinante de antígeno, también se capturan bajo la definición de antígeno usada aquí. Igualmente, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa una proteína terapéutica o inmunogénica, o determinante antigénico *in vivo*, tal como en terapia génica y aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, también se incluye en la definición de antígeno de aquí.

Además, para objetos de la presente invención, los antígenos pueden derivar de cualquiera de varios virus, bacterias, parásitos y hongos conocidos, así como cualquiera de los diversos antígenos tumorales conocidos. Es más, para objetos de la presente invención, un “antígeno” se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), de la secuencia nativa, tanto como para que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser intencionadas, como mediante mutagénesis dirigidas a una localización, o pueden ser accidentales, como mediante mutaciones que producen los antígenos en receptores.

Una “respuesta inmunológica” a un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a moléculas presentes en la composición de interés. Para objetos de la presente invención, una “respuesta inmune humoral” se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo, mientras una “respuesta inmune celular” es la mediada por linfocitos-T y/u otras células sanguíneas blancas. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta antigénica específica por células-T citolíticas (“CTLs”). Las CTLs tienen especificidad para antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y expresadas sobre las superficies de las células. Las CTLs ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta antigénica específica por células-T ayudantes. Las células-T ayudantes actúan para ayudar a estimular el funcionamiento, y centrar la actividad de, células efectoras no específicas contra células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas MHC sobre su superficie. Una “respuesta inmune celular” también se refiere a la producción de citokinas, quimiokinas y otras moléculas tales producidas por células-T activadas y/u otras células sanguíneas blancas, incluyendo aquellas derivadas de células-T CD4+ y CD8+.

ES 2 278 786 T3

Una composición, tal como una composición inmunogénica, o vacuna que produzca una respuesta inmune celular, puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación de antígeno en asociación con moléculas MHC en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por célula se dirige a, o próxima a, células que presentan el antígeno en su superficie. Además, se pueden generar linfocitos-T específicos de antígenos para permitir la protección futura de un receptor inmunizado.

La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por célula se puede determinar mediante un número de ensayos, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos con células citotóxicas CTL, ensayando con linfocitos-T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medida de producción de citocinas por células-T en respuesta a la reestimulación con antígeno. Tales ensayos se conocen bien en la técnica. Ver, p.ej., Erickson *et al.*, *J. Immunol.* (1993) 151:4189-4199; Doe *et al.*, *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2369-2376; y los ejemplos que siguen.

Por tanto, una respuesta inmunológica usada aquí puede ser una que estimule la producción de CTLs, y/o la producción o activación de células-T ayudantes. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmune mediada por anticuerpos. Por consiguiente, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por células-B; y/o la activación de células-T supresoras y/o células-T $\gamma\delta$ dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad, y/o lograr el complemento de anticuerpo, o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) para proporcionar protección a un receptor inmunizado. Tales respuestas se pueden determinar usando inmunoensayos estándar y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica.

Una composición que contiene un antígeno seleccionado adsorbido a una micropartícula, presenta “inmunogenicidad mejorada” cuando posee una capacidad para provocar una respuesta inmune mayor que la respuesta inmune provocada por una cantidad equivalente del antígeno cuando se libera sin asociación con la partícula. Por lo tanto, una composición puede presentar “inmunogenicidad mejorada” porque el antígeno es más fuertemente inmunogénico en virtud de la adsorción a la micropartícula, o porque es necesaria una menor dosis de antígeno para lograr una respuesta inmune en el sujeto al que se administra. Tal inmunogenicidad mejorada se puede determinar administrando la composición de micropartícula/antígeno, y controles de antígeno a animales y comparando los valores de anticuerpo contra los dos usando ensayos estándar tales como radioinmunoensayo y ELISAs, bien conocidos en la técnica.

Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” de una composición que comprende micropartículas con macromoléculas adsorbidas, como las proporcionadas aquí, se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente de la composición de micropartícula/macromolécula para tratar o diagnosticar una afección de interés. Por ejemplo, estas expresiones pueden referirse a una cantidad suficiente para proporcionar una respuesta deseada, tal como una respuesta inmunológica, y el efecto terapéutico correspondiente, o en el caso de liberación de una proteína terapéutica, una cantidad suficiente para llevar a cabo tratamiento del sujeto, como se define en lo que sigue. Como se señalará más adelante, la cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, y condición general del sujeto, la gravedad de la afección que esté siendo tratada, y la macromolécula particular de interés, modo de administración, y similares. Se puede determinar una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual por cualquier experto en la técnica que use experimentación rutinaria.

Por “sujeto vertebrado” se quiere significar cualquier miembro del subfilo cordados, que incluye, sin limitación, mamíferos tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras, caballos, y humanos; animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluyendo aves domésticas, silvestres y mascotas tales como gallos y gallinas incluyendo pollitos, pavos y otras aves gallináceas. El término no indica una edad particular. Por tanto, se entiende que quedan abarcados animales adultos y recién nacidos.

Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se quiere significar un material que no es indeseable biológicamente o de otra manera, es decir, el material se puede administrar a un individuo junto con la formulación de micropartículas sin provocar efectos biológicos indeseables en el individuo o interactuar de una forma deletérea con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

El término “excipiente” se refiere a sustancias que se proporcionan habitualmente en las formas de dosificación completadas, e incluyen vehículos, ligantes, desintegrantes, rellenos (diluyentes), lubricantes, deslizantes (mejorantes de flujo), ayudantes de compresión, colores, endulzantes, conservantes, agentes suspensivos/dispersivos, formadores/revestidores de películas, aromas y tintas de impresión.

Por “pH fisiológico” o un “pH en el intervalo fisiológico” se quiere significar un pH en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 8,0 inclusive, más típicamente en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6 inclusive.

Usado aquí, “tratamiento” (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo “tratar” o “tratado”) se refiere a cualquiera de (i) la prevención de la infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción o eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o total del patógeno o trastorno en cuestión. Se puede llevar a cabo el tratamiento profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección).

Usada aquí, la expresión “ácido nucleico” se refiere a DNA, RNA, o quimeras formadas a partir de ellos.

Usada aquí, la expresión “oligonucleótido que comprende al menos un motivo CpG” se refiere a un polinucleótido que comprende al menos un dinucleótido CpG. Los oligonucleótidos que comprenden al menos un motivo CpG pueden comprender múltiples motivos CpG. Estos oligonucleótidos también se conocen como “oligonucleótidos CpG” en la técnica. Usada aquí, la expresión “motivo CpG” se refiere a una fracción de dinucleótido de un oligonucleótido que comprende un nucleótido de citosina seguido de un nucleótido de guanina. También se puede usar 5-metilcitosina en lugar de citosina.

Usados aquí, “replicón de vector de RNA de alfavirus”, “replicón de vector de RNA”, constructo de vector de RNA”, y “replicón” se refieren a una molécula de RNA que es capaz de dirigir su propia amplificación o auto-replicación *in vivo*, con una célula diana. Un replicón de vector de RNA derivado de alfavirus debería contener los siguientes elementos ordenados: secuencias virales 5' requeridas en cis para replicación (también referidas como CSE 5'), secuencias que, cuando se expresan, codifican para proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activos (p.ej., nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), secuencias virales 3' requeridas en cis para replicación (también referidas como CSE 3'), y un tracto de poliadenilato. Un replicón de vector de RNA derivado de alfavirus también puede contener un promotor de la “región de unión” subgenómico viral, secuencias de uno o más genes de proteínas estructurales o fracciones de los mismos, molécula(s) de ácido nucleico externo que son de un tamaño suficiente para permitir la producción de virus viables, así como la(s) secuencia(s) heteróloga(s) que se van a expresar.

Usado aquí, “Sistema de Iniciación de Vectores Estratificados Eucarióticos”, “ELVIS”, o vector ELVIS” se refiere a una unidad que es capaz de dirigir la expresión de una(s) secuencia(s) o gen(es) de interés. El sistema de iniciación de vectores estratificados eucarióticos debería contener un promotor 5' que es capaz de iniciar *in vivo* (es decir, dentro de una célula) la síntesis de RNA a partir de cDNA, y una secuencia de vector viral que es capaz de dirigir su propia replicación en una célula eucariótica y también de expresar una secuencia heteróloga. En formas de realización preferidas, la secuencia del vector de ácido nucleico es una secuencia derivada de alfavirus y se compone de una secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un RNA de alfavirus (también referida como CSE 5'), así como de secuencias que, cuando se expresan, codifican para proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activos (p.ej., nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), y de una secuencia de reconocimiento de la polimerasa de RNA de alfavirus (también referida como CSE 3'). Además, la secuencia del vector puede incluir un promotor de la “región de unión” subgenómico viral, secuencias de uno o más genes de proteínas estructurales o fracciones de los mismos, molécula(s) de ácido nucleico externo que son de un tamaño suficiente para permitir la amplificación óptima, una secuencia heteróloga para expresar, uno o más sitios de restricción para la inserción de secuencias heterólogas, así como una secuencia de poliadenilación. El sistema de iniciación de vectores estratificados eucarióticos también puede contener secuencias de reconocimiento de ensamblaje, una secuencia catalítica de procesamiento de ribozimas, una señal de exportación nuclear, y una secuencia de terminación de la transcripción.

“Constructo de vector de alfavirus” se refiere a una unidad que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. Tales constructos de vector contienen generalmente se componen de una secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un RNA de alfavirus (también referida como CSE 5'), así como de secuencias que, cuando se expresan, codifican para proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activos (p.ej., nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), y de una secuencia de reconocimiento de la polimerasa de RNA de alfavirus (también referida como CSE 3'), y un tracto de poliadenilato. Además, el constructo del vector puede incluir un promotor de la “región de unión” subgenómico viral, secuencias de uno o más genes de proteínas estructurales o fracciones de los mismos, molécula(s) de ácido nucleico externo que son de un tamaño suficiente para permitir la producción de virus viables, un promotor 5' que es capaz de iniciar la síntesis de RNA viral a partir de cDNA *in vitro* o *in vivo*, y una secuencia heteróloga para expresar, uno o más sitios de restricción para la inserción de secuencias heterólogas.

Usada aquí, la expresión “constructo de vector” generalmente se refiere a vectores ELVIS, que comprenden el complemento de cDNA de los constructos de vector de RNA, constructos de vector de RNA en sí mismos, constructos de vector de alfavirus, y similares. De acuerdo con algunas formas de realización de la presente invención, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo inmunizar profilácticamente y/o terapéuticamente, un animal receptor contra infecciones virales, fúngicas, micoplásmicas, bacterianas o protozoarias, así como contra tumores. Los procedimientos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un mamífero, preferiblemente un humano. Los procedimientos de la presente invención también se pueden practicar en mamíferos, distintos de los humanos, que incluyen aplicaciones de investigación biomédica.

B. Procedimientos generales

Los presentes inventores han hallado que se puede mejorar la adsorción de macromoléculas a micropartículas asegurando de que el detergente esté disponible para formar un complejo con las macromoléculas en el momento de la adsorción. Además, se puede absorber una gran cantidad de moléculas, que incluyen macromoléculas cargadas y/o voluminosas. Por lo tanto las composiciones de micropartícula/macromolécula de la presente invención se pueden usar como sistema de descarga para liberar los componentes biológicamente activos para tratar, prevenir y/o diagnosticar una amplia variedad de enfermedades.

La presente invención se puede usar para liberar una amplia variedad de macromoléculas que incluyen, pero sin limitarse, productos farmacéuticos tales como antibióticos y agentes antivirales, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, vasodilatadores, fármacos cardiovasculares, psicotrópicos, neurolépticos, antidepresivos, fármacos antiparkinson, bloqueadores beta, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la bradiquinina, inhibidores-

ACE, vasodilatadores, inhibidores de la prolactina, esteroides, antagonistas de hormonas, antihistamínicos, antagonistas de la serotonina, heparina, agentes quimioterapéuticos, antineoplásicos y factores de crecimiento, que incluyen pero sin limitarse a, PDGF, EGF, KGF, IGF-1 e IGF-2, FGF, polinucleótidos que codifican para proteínas inmunogénicas o terapéuticas, proteínas inmunogénicas y epítomos de las mismas para uso en vacunas, hormonas que incluyen hormonas peptídicas tales como la insulina, proinsulina, hormona del crecimiento, GHRH, LHRH, EGF, somatostatina, SNX-111, BNP, insulínotropina, ANP, FSH, LH, PSH y hCG, hormonas esteroideas gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterona), hormona estimulante del tiroides, inhibina, colecistoquinina, ACTH, CRF, dinorfinas, endorfinas, endotelina, fragmentos de fibronectina, galanina, gastrina, insulínotropina, glucagón, fragmentos de proteína de unión al GTP, guanilina, las leucoquininas, magainina, mastoparans, dermaseptina, sistemina, neuromedinas, neurotensina, pancreastatina, polipéptido pancreático, sustancia P, secretina, limosina, y similares, enzimas, mediadores de la transcripción o translación, intermediarios de rutas metabólicas, inmunomoduladores, tales como cualquiera de las diversas citokinas, incluyendo interleukina-1, interleukina-2, interleukina-3, interleukina-4, y gamma-interferón, antígenos y adyuvantes.

En una forma de realización preferida la macromolécula es un antígeno. Una ventaja particular de la presente invención es la capacidad de las micropartículas con antígeno adsorbido para generar respuestas inmunes mediadas por células en un sujeto vertebrado. La capacidad de los antígenos/micropartículas de la presente invención para provocar una respuesta inmune mediada por células contra un antígeno seleccionado proporciona una herramienta poderosa contra la infección por una amplia variedad de patógenos. En consecuencia, los antígenos/micropartículas de la presente invención se pueden incorporar en composiciones de vacunas.

La eficacia de los diversos usos de vectores de plásmidos y vectores ELVIS según se describe en la técnica se puede mejorar adsorbiendo vectores de plásmidos y ELVIS seleccionados a micropartículas con superficies adsorbentes, que facilita la introducción del vector, y de secuencias heterólogas de ácidos nucleicos contenidas en el vector, dentro de las células de un animal. Alternativamente, se pueden adsorber constructos de un vector de RNA a las micropartículas del polímero o emulsiones submicrónicas de la invención para la descarga eficaz de secuencias heterólogas de ácidos nucleicos contenidas en el vector dentro de las células de un animal. La Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. del solicitante, publicada el 28 de Septiembre de 2000 (Ex agente N° CHIR-0270; Serie N° 60/236,105) describe el uso de tales polinucleótidos adsorbidos a ciertas micropartículas. Por tanto, en una forma de realización preferida, la macromolécula es un polinucleótido, tal como un plásmido, un vector ELVIS, o un constructo de vector de RNA. Una ventaja particular de la presente invención es la capacidad de las micropartículas con vector ELVIS adsorbido para generar respuestas inmunes mediadas por células en un sujeto vertebrado. La Serie de Aplicaciones de Patentes N° 60/236,105 describe además la adsorción de antígenos polipeptídicos, incluyendo antígenos polipeptídicos de HIV, a micropartículas. La capacidad de los antígenos/micropartículas de la presente invención para provocar una respuesta inmune mediada por células contra un antígeno seleccionado proporciona una herramienta poderosa contra la infección por una amplia variedad de patógenos. En consecuencia, los antígenos/micropartículas de la presente invención se pueden incorporar en composiciones de vacunas.

Por lo tanto, además de una respuesta de anticuerpos convencional, el sistema aquí descrito puede proporcionar, p.ej., la asociación de los antígenos expresados con moléculas MHC de clase I tal que se puede formar una respuesta inmune celular *in vivo* al antígeno de interés que estimula la producción de CTLs para permitir el futuro reconocimiento del antígeno. Además, los procedimientos pueden provocar una respuesta antigénica específica por células-T ayudantes. En consecuencia, los procedimientos de la presente invención encontrarán uso con cualquier macromolécula para la que se esperen respuestas inmunes celulares y/o humorales, preferiblemente antígenos derivados de patógenos virales que puedan inducir anticuerpos, epítomos de células-T ayudantes y epítomos de células-T citotóxicas. Tales antígenos incluyen, pero sin limitarse a, aquellos codificados por virus humanos y animales y pueden corresponder a proteínas estructurales o no estructurales.

Las micropartículas de la presente invención son particularmente útiles para la inmunización contra virus intracelulares que habitualmente provocan respuestas inmunes débiles. Por ejemplo, la presente invención encontrará uso para estimular una respuesta inmune contra una amplia variedad de proteínas de la familia de los herpesvirus, que incluyen proteínas derivadas de virus simplex del herpes (HSV) de los tipos 1 y 2, tales como las glicoproteínas gB, gD y gH de HSV-1 y HSV-2.; antígenos derivados del virus zóster de la varicela (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV) y citomegalovirus (CMV) incluyendo gB y gH del CMV; y antígenos derivados de otros herpesvirus humanos tales como HHV6 y HHV7. (Ver, p.ej., Chee *et al.*, *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169, para una revisión del contenido codificador de proteína de citomegalovirus; McGeoch *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1988) 69:1531-1574, para una discusión de las diversas proteínas codificadas de HSV; La Patente de EE.UU. N° 5,171,568 para una discusión de las proteínas gB y gD de HSV-1 y HSV-2 y los genes que codifican para ellas; Baer *et al.*, *Nature* (1984) 310:207-211, para la identificación de las secuencias codificadoras de proteína en un genoma de EBV; y Davison y Scott, *J. Gen. Virol.* (1986) 67:1759-1816, para una revisión del VZV).

Los antígenos de la familia de los virus de la hepatitis, que incluyen el virus de la hepatitis A (HAV), el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la hepatitis delta (HDV), el virus de la hepatitis E (HEV) y el virus de la hepatitis G (HGV), se pueden usar también convenientemente en las técnicas aquí descritas. A modo de ejemplo, se conoce la secuencia genómica viral del HCV, puesto que son procedimientos para obtener la secuencia. Ver, p.ej., la Publicación Internacional N° WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90/14436. El genoma del HCV codifica para varias proteínas víricas, que incluyen la E1 (también conocida como E) y E2 (también conocida como E2/NSI) y para una proteína de nucleocápside N-terminal (llamada "núcleo") (ver, Houghton *et al.*, *Hepatology*

(1991) 14:381-388, para una discusión de las proteínas del HCV, que incluyen E1 y E2). Cada una de estas proteínas, así como fragmentos antigénicos de las mismas, encontrará uso en la presente composición y procedimientos.

Igualmente, se conoce la secuencia para el antígeno- δ del HDV (ver, p.ej., la Patente de EE.UU N° 5,378,814) y este antígeno puede usarse convenientemente en la presente composición y procedimientos. Adicionalmente, encontrarán uso aquí antígenos derivados del HBV, tales como el antígeno del núcleo, el antígeno de superficie, sAg, así como las secuencias presuperficie, pre-S1 y pre-S2 (anteriormente llamadas pre-S), así como combinaciones de las anteriores, tales como sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2, y pre-S1/pre-S2. Ver, p.ej., "HBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study" en Macket, M. y Williamson, J.D., *Human Vaccines and Vaccination*, pp. 159-176, para una discusión de la estructura del HBV; y las Patentes de EE.UU. N°s 4,722,840, 5,098,704, 5,324,513, incorporadas aquí mediante referencia en su totalidad; Beames *et al.*, *J. Virol.* (1995) 69:6833-6838, Birnbaum *et al.*, *J. Virol.* (1990) 64:3319-3330; y Zhou *et al.*, *J. Virol.* (1991) 65:5457-5464.

También encontrarán uso en las composiciones y procedimientos reivindicados antígenos derivados de otros virus, tal como sin limitación, proteínas de miembros de las familias Picomaviridae (p.ej., poliovirus, etc); caliciviridae; Togaviridae (p.ej., virus de la rubéola, virus del dengue, etc); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Bimaviridae; Rhabdoviridae (p.ej., virus de la rabia, etc); Filoviridae; Paramyxoviridae (p.ej., virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, etc); Orthomyxoviridae (p.ej., virus de la influenza tipos A, B y C, etc); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (p.ej., HTLV-I; HTLV-II; HIV-1 (también conocido como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc), que incluyen pero sin limitarse a aislamientos de los antígenos de HIV_{IIB}, HIV_{SF2}, HIV_{LAV}, HIV_{LAI}, HIV_{MN}); HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}; HIV-2; virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), entre otros. Adicionalmente, los antígenos también pueden derivar de papilomavirus humanos (HPV) y de los virus de la encefalitis tick-borne. Ver, p.ej., *Virology*, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2nd Edition (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus.

Más particularmente, se conocen y divulgan las proteínas de cubierta gp120 o gp140 de cualquiera de los aislamientos de HIV anteriores, que incluyen miembros de diversos subtipos genéticos de HIV (ver, p.ej., Myers *et al.*, Los Álamos Database, Los Álamos National Laboratory, Los Álamos, Nuevo México (1992); Myers *et al.*, *Human Retroviruses and Aids*, 1990, Los Álamos, Nuevo México: Los Álamos National Laboratory; y Modrow *et al.*, *J. Virol.* (1987) 61:570-578, para una comparación de las secuencias de cubierta de una variedad de aislamientos de HIV) y los antígenos derivados de cualquiera de estos aislamientos encontrará uso en los presentes procedimientos. Además, la invención es igualmente aplicable a otras proteínas inmunogénicas derivadas de cualquiera de los aislamientos de HIV, incluyendo cualquiera de las diversas proteínas de cubierta tales como gp160 y gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas derivadas de las regiones pol y tat.

El virus de la influenza es otro ejemplo de un virus para el que la presente invención será particularmente útil. Específicamente, las proteínas de cubierta HA y NA de la influenza A son de particular interés para generar una respuesta inmune. Se han identificado numerosos subtipos de HA de la influenza A (Kawaoka *et al.*, *Virology* (1990) 179:759-767; Webster *et al.*, "Antigenic variation among type A influenza viruses" p. 127-168. En: P. Palese y D.W.Kingsbury (ed.), *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, Nueva York). Por tanto, también se pueden usar proteínas derivadas de cualquiera de estos aislamientos en las composiciones y procedimientos descritos aquí.

Las composiciones y procedimientos descritos aquí también encontrarán uso con numerosos antígenos bacterianos, tales como aquellos derivados de organismos que provocan difteria, cólera, tuberculosis, tétanos, tos ferina, meningitis, y otros estados patogénicos, que incluyen, sin limitación, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, (A, B, C, Y), *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, y *Haemophilus influenza*, *Haemophilus influenza* de tipo B (HIB), *Helicobacter pylori*, y combinaciones de los mismos. En las siguientes solicitudes de patentes de propiedad compartida se describen ejemplos de antígenos de *Neisseria meningitidis* B: PCT/US99/09346; PCT IB98/01665; y PCT IB99/00103. Los ejemplos de antígenos parasíticos incluyen aquellos derivados de organismos que provocan malaria y la enfermedad de Lyme.

Los antígenos adicionales para uso con la invención, algunos de los cuales también se enumeran en otra parte de esta solicitud, incluyen los siguientes (las referencias se enumeran inmediatamente después):

- Un antígeno proteínico del serogrupo B de *N. meningitidis*, tales como los de las Refs. 1 a 7, a continuación.
- una preparación de vesícula de membrana externa (VME) del serogrupo B de *N. meningitidis*, tal como las reveladas en las Refs. 8, 9, 10, 11, etc, a continuación.
- un antígeno de sacárido del serogrupo A, C, W135 y/o Y de *N. meningitidis*, tal como el oligosacárido descrito en la Ref. 12 del serogrupo C a continuación (ver también la Ref. 13).
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [p.ej. Refs. 14, 15, 16].
- un antígeno de *N. gonorrhoeae* [p.ej. Refs. 1, 2, 3].
- un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [p.ej. Refs. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23].

ES 2 278 786 T3

- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [p.ej. 24].
- un antígeno del virus de la hepatitis A, tal como virus inactivado [p.ej. Refs. 25, 26].
- 5 - un antígeno del virus de la hepatitis B, tal como los antígenos de superficie y/o del núcleo [p.ej. Refs. 26, 27].
- un antígeno del virus de la hepatitis C [p.ej. Refs. 28].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de tos ferina (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [p.ej. Refs. 29 y 30].
- 10 - un antígeno de la difteria, tal como toxoide de difteria [p.ej. capítulo 3 de la Ref. 31] p.ej. el mutante CRM₁₉₇ [p.ej. Ref. 32].
- 15 - un antígeno del tétanos, tal como toxoide del tétanos [p.ej. capítulo 4 de la Ref. 31].
- un antígeno proteínico de *Helicobacter pylori* tal como CagA [p.ej. Ref. 33], VacA [p.ej. Ref. 33], NAP [p.ej. Ref. 34], HopX [p.ej. Ref. 35], HopY [p.ej. Ref. 35] y/o ureasa.
- 20 - un antígeno sacárido de *Haemophilus influenzae* B [p.ej. Ref. 13].
- un antígeno de *Porphyramonas gingivalis* [p.ej. Ref. 36].
- antígeno(s) de la polio [p.ej. Ref. 37, 38] tal como IPV u OPV.
- 25 - antígeno(s) de la rabia [p.ej. Ref. 39] tal como virus inactivado liofilizado [p.ej. Ref. 40, Rabavert^{MC}].
- antígenos del sarampión, paperas y/o rubéola [p.ej. capítulos 9, 10 y 11 de la Ref. 31].
- 30 - antígeno(s) de la influenza [p.ej. capítulo 19 de la Ref. 31], tales como las proteínas de superficie de la hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [p.ej. tiempo 41].
- 35 - un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) [p.ej. Refs. 42, 43].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A) [p.ej. Refs. 43, 44, 45].
- un antígeno de *Staphylococcus aureus* [p.ej. Ref. 46].
- 40 - Composiciones que comprendan uno o más de estos antígenos.

Donde se use un antígeno sacárido o de carbohidrato, se conjuga preferiblemente con una proteína transportadora para mejorar la inmunogenicidad [p.ej. Refs. 47 a 56]. Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como los toxoides de la difteria y el tétanos. Se prefiere particularmente el toxoide CRM₁₉₇ de la difteria. Otras proteínas transportadoras adecuadas incluyen la proteína de membrana externa de *N. meningitidis* [p.ej. Ref. 57], péptidos sintéticos [p.ej. Refs. 58, 59], proteínas de choque de calor [p.ej. Ref. 60], proteínas de tos ferina [p.ej. Refs. 61, 62], proteína D de *H. influenzae* [p.ej. Ref. 63], toxina A o B de *C. difficile* [p.ej. Ref. 64], etc. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, se prefiere que la relación (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC sea mayor de 1 (p.ej., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o superior). Se pueden conjugar sacáridos de distintos serogrupos de *N. meningitidis* con las mismas o distintas proteínas.

Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier conector cuando sea necesario.

55 Los antígenos de proteínas tóxicas deben detoxificarse cuando sea necesario (p.ej., detoxificación de la toxina de tos ferina mediante medios químicos [Ref. 30]).

60 Cuando el antígeno de la difteria esté incluido en la composición se prefiere incluir también el antígeno del tétanos y los antígenos de la tos ferina. Igualmente, cuando se incluya un antígeno del tétanos se prefiere incluir también el antígeno de la difteria y los antígenos de la tos ferina. Igualmente, cuando se incluya un antígeno de la tos ferina se prefiere incluir también el antígeno de la difteria y los antígenos del tétanos.

65 Resulta fácilmente aparente que la invención sujeto se puede usar para descargar una amplia variedad de macromoléculas y por consiguiente tratar y/o diagnosticar un gran número de enfermedades. En algunas formas de realización, las composiciones de macromolécula/micropartícula de la presente invención se pueden usar para la descarga seleccionada en sitios específicos. Por ejemplo, la administración intravenosa de las composiciones de macromolécula/micropartícula se puede usar para seleccionar el pulmón, hígado, bazo, circulación sanguínea, o médula ósea.

La adsorción de macromoléculas a la superficie de las micropartículas adsorbentes tiene lugar vía cualquier mecanismo de interacción, incluyendo, pero sin limitarse, enlace iónico, puentes de hidrógeno, enlace covalente, fuerzas de Van der Waals, y unión mediante interacciones hidrófilas/hidrófobas. Los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente detergentes apropiados para el tipo de molécula que se va a adsorber.

Por ejemplo, micropartículas fabricadas en presencia de detergentes cargados, tales como detergentes aniónicos o catiónicos, pueden producir micropartículas con una superficie que tenga una carga neta negativa o positiva, que pueden adsorber una amplia variedad de moléculas. Por ejemplo, micropartículas fabricadas con detergentes aniónicos, tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), p.ej., las micropartículas SDS-PLG, adsorben antígenos cargados positivamente, tales como proteínas. Igualmente, micropartículas fabricadas con detergentes catiónicos, tales como CTAB, p.ej., las micropartículas PLG/CTAB, adsorben macromoléculas cargadas negativamente, tales como DNA. Donde las macromoléculas que se van a adsorber tienen regiones de carga positiva y negativa, pueden ser apropiados detergentes catiónicos o aniónicos o no iónicos.

Los polímeros biodegradables para fabricar micropartículas para uso con la presente invención están fácilmente disponibles comercialmente de, p.ej., Boehringer Ingelheim, Germany and Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL; por ejemplo, los polímeros útiles para formar las micropartículas de aquí incluyen homopolímeros, copolímeros y combinaciones de polímeros derivados de los siguientes: polihidroxi ácido butírico (también conocido como polihidroxibutirato); polihidroxi ácido valérico (también conocido como polihidroxivalerato); ácido poliglicólico (PGA) (también conocido como poliglicolido); ácido poliláctico (PLA) (también conocido como polilactido); polidioxanona; policaprolactona; poliortoéster; y polianhidrido. Son más preferidos el poli(α -hidroxi ácido), tal como poli(L-lactido), poli(D,L-lactido) (ambos conocidos aquí como "PLA"), poli(hidroxibutirato), copolímeros de D,L-lactido y glicolido, tales como poli(D,L-lactido-co-glicolido) (designado aquí como "PLG" o "PLGA") o un copolímero de D,L-lactido y caprolactona. Son polímeros particularmente preferidos para uso aquí los polímeros PLA y PLG. Estos polímeros están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y el peso molecular apropiado para un uso dado se determina fácilmente por alguien experto en la técnica. Por tanto, p.ej., para el PLA, un peso molecular adecuado estará en el orden de aproximadamente 2.000 a 5.000. Para el PLG, los pesos moleculares adecuados variarán generalmente desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 200.000, preferiblemente desde aproximadamente 15.000 hasta aproximadamente 150.000.

Si se usa un copolímero tal como el PLG para formar las micropartículas, una variedad de relaciones lactido:glicolido hallarán uso aquí y la relación es en gran medida una cuestión de elección, dependiendo en parte de la macromolécula coadministrada y de la tasa de degradación deseada. Por ejemplo, un polímero PLG 50:50, que contiene un 50% de D,L-lactido y un 50% de glicolido, proporcionará un copolímero de readsorción rápida mientras un PLG 75:25 se degrada más lentamente, y un 85:15 y 90:10, aún más lentamente, debido al componente lactido aumentado. Enseguida resulta aparente que una relación de lactido:glicolido adecuada se determina fácilmente por alguien experto en la técnica en base, por ejemplo, a la naturaleza del antígeno y trastorno en cuestión. Es más, las mezclas de micropartículas con relaciones lactido:glicolido variables encontrarán aquí uso para conseguir la cinética de liberación deseada para una macromolécula dada y para proporcionar una respuesta inmune primaria y secundaria. También se puede controlar la tasa de degradación de las micropartículas de la presente invención mediante factores tales como el peso molecular del polímero y la cristalinidad del polímero. Los copolímeros PLG con relaciones lactido:glicolido y pesos moleculares variables está fácilmente disponibles comercialmente a partir de un número de fuentes que incluyen a Boehringer Ingelheim, Germany and Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. Estos polímeros también se pueden sintetizar mediante policondensación simple del componente de ácido láctico usando técnicas bien conocidas en la técnica, tal como se describe en Tabata *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* (1988) 22:837-858.

Las micropartículas se preparan usando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se pueden usar técnicas de evaporación doble de emulsión/disolvente, tales como aquellas descritas en la Patente de EE.UU. N° 3,523,907 y en Ogawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (1988) 36:1095-1103, para fabricar las micropartículas. Estas técnicas implican la formación de una emulsión primaria constituida por gotitas de solución de polímero, que se mezcla subsiguientemente con una fase acuosa continua que contiene y estabilizante/tensioactivo de partículas.

En otras formas de realización también se pueden formar las micropartículas usando un secado por pulverización y coacervado como se describe en, p.ej., Thomasin *et al.*, *J. Controlled Release* (1996) 41:131; la Patente de EE.UU N° 2,800,457; Masters, K (1976) *Spray Drying* 2nd Ed. Wiley, Nueva York; técnicas de revestimiento en suspensión aérea, tales como revestimiento en bandeja y revestimiento Wurster, como se describe en Hall *et al.* (1980) The "Wurster Process" en *Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications* (AF. Kydonieus, ed.), Vol. 2, pp. 133-154 CRC Press, Boca Raton, Florida y Deasy, P.B., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1988) S(2):99-139; y gelificación iónica como se describe en, p.ej., Lim *et al.*, *Science* (1980) 210:908-910.

En formas de realización preferidas, se puede usar un sistema de evaporación de disolvente de agua-en-aceite-en-agua (a/a/a) para formar las micropartículas, según las líneas descritas por O'Hagan *et al.*, *Vaccine* (1993) 11:965-969, PCT/US99/17308 (WO 00/06123) para O'Hagan *et al.* y Jeffery *et al.*, *Pharm. Res.* (1993) 10:362.

En general, el polímero particular se disuelve en un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, dimetilcloruro (también llamado cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo, y similares. El polímero se proporcionará en una solución aproximadamente al 1-30%, preferiblemente aproximadamente al 2-15%, más preferi-

blemente aproximadamente al 3-10% y aún más preferiblemente aproximadamente al 4-6%, en disolvente orgánico. Después se combina la solución de polímero con una solución acuosa y se emulsiona para formar una emulsión de aceite/agua. La solución acuosa puede ser, por ejemplo, agua desionizada, tampón salino normal, o una solución tamponada tal como tampón fosfato salino (PBS) o una solución tampón de citrato sódico/ácido etilendiaminotetracético (citrato sódico/EDTA). Preferiblemente, la relación de volumen de la solución de polímero respecto al líquido acuoso varía desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 20:1, más preferiblemente aproximadamente 10:1. La emulsificación se lleva a cabo usando cualquier equipamiento apropiado para esta tarea, y típicamente es un aparato de corte elevado tal como, p.ej., un homogeneizador.

Después se combina preferiblemente un volumen de la emulsión de aceite/agua con un volumen mayor de una solución acuosa, que contiene preferiblemente un detergente catiónico, aniónico o no iónico. La relación de volumen de la solución acuosa sobre la emulsión de aceite/agua varía típicamente desde aproximadamente 2:1 hasta 10:1, más típicamente 4:1. Los ejemplos de detergentes aniónicos catiónicos y no iónicos apropiados para la práctica de la invención se enumeran anteriormente e incluyen SDS, CTAB y PVA, respectivamente. Ciertas macromoléculas pueden adsorberse más rápidamente a micropartículas que tengan una combinación de detergentes, por ejemplo una combinación de PVA y DOTAP. Además, en algunos casos, puede ser deseable añadir detergente a la solución orgánica anterior. Donde se use un detergente no iónico tal como PVA, se proporciona típicamente en una solución aproximadamente al 2-15%, más típicamente aproximadamente al 4-10%. Donde se use un detergente catiónico o aniónico, se proporciona típicamente en una solución aproximadamente al 0,05-5%, más típicamente una solución aproximadamente al 0,25-1%. Generalmente, se usará una relación de peso a peso del detergente respecto al polímero en el intervalo desde aproximadamente 0,00001:1 hasta aproximadamente 0,5:1, más preferiblemente desde aproximadamente 0,0001:1 hasta aproximadamente 0,5:1, desde aproximadamente 0,001:1 hasta aproximadamente 0,5:1, y aún más preferiblemente desde aproximadamente 0,005:1 hasta aproximadamente 0,5:1.

La mezcla se homogeneiza entonces para producir una emulsión doble estable de agua/aceite/agua. Después se evaporan los disolventes orgánicos. Se pueden manipular los parámetros de la formulación para permitir la preparación de pequeñas micropartículas del orden de 0,05 μm (50 nm) hasta micropartículas mayores, de 50 μm o incluso mayores. Ver, p.ej., Jeffery *et al.*, *Pharm. Res.* (1993) 10:362-368; McGee *et al.*, *J. Microencap.* (1996). Por ejemplo, la agitación reducida provoca micropartículas mayores, ya que produce un aumento del volumen de fase interna. Las partículas pequeñas se producen por bajos volúmenes de fase acuosa con altas concentraciones de estabilizantes de la emulsión.

Un aparato preferido para realizar los pasos anteriores se ilustra esquemáticamente en la Fig. 1. Remitiéndonos ahora a la Fig. 1, se muestra una unidad de depósito de fabricación, generalmente designada por el número 102. La unidad de depósito 102 está diseñada para ser un "sistema cerrado", tal que se mantiene un ambiente aséptico durante el procesamiento. Todas las piezas del equipamiento y las partes se seleccionan preferiblemente para que se puedan limpiar *in situ* y esterilizar en autoclave. Todos los filtros 104a-d son preferiblemente filtros de fluoropolímero tales como filtros de fluoropolímero-total Super-Cheminert^{MC} de Pall Corporation. Inicialmente, se filtran una solución acuosa, tal como un sistema tampón 106 de citrato sódico/EDTA y una solución de polímero orgánico, tal como una solución de PLG en cloruro de metileno 108 y se suministran al depósito 110 donde se mezclan continuamente con el mezclador 112. Entonces se suministra la mezcla mediante un homogeneizador en línea 114 (p.ej., un homogeneizador en línea de alta velocidad y elevado corte esterilizable en autoclave tal como el cinemática MT 5000), formando una emulsión de aceite/agua. La emulsión se enfría, por ejemplo mediante un condensador de agua refrigerada 116, después de salir del homogeneizador en línea 114, con lo cual retorna al depósito 110. Después de que se hayan emulsionado los contenidos hasta el punto deseado, se añade una solución acuosa de detergente, por ejemplo una solución de CTAB en agua 118, al depósito 110, con lo que se forma una emulsión de agua/aceite/agua suministrando de nuevo los contenidos mediante el mezclador en línea 114. Tras la suficiente emulsificación, la emulsión resultante de agua/aceite/agua se purga con nitrógeno vía distribuidor 119 para eliminar el disolvente orgánico. El vapor del disolvente cargado de nitrógeno se filtra y enfría en un condensador 120, capturando el disolvente en el contenedor 122.

En formas de realización en las que se usa una relación relativamente grande de peso a peso del detergente respecto a polímero (p.ej., relaciones de detergente a polímero de aproximadamente 0,05:1 hasta aproximadamente 0,5:1, más preferiblemente de aproximadamente 0,10:1 hasta aproximadamente 0,50:1, y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,2:1 hasta aproximadamente 0,4:1), es deseable lavar las partículas para eliminar las cantidades de detergente en exceso. Típicamente, este pasote lavado se realiza después de que se haya eliminado el disolvente orgánico de la emulsión final, por ejemplo, mediante evaporación del disolvente (como la realizada en relación con la Fig. 1), mediante extracción del disolvente, o ambos.

En algunas formas de realización, las micropartículas se lavan mediante centrifugación. Este proceso reduce la cantidad total de detergente y conduce a una composición final que contiene cantidades relativamente pequeñas de detergente no unido en relación al detergente unido. Por ejemplo, en el Ejemplo 2 que sigue, los pasos de lavado que se realizan (es decir, lavar con agua mediante centrifugación cuatro veces) produce micropartículas que tienen aproximadamente una relación p/p de CTAB del 1%, del que más del 99% está unido a las micropartículas, y menos del 1% se encuentra en forma no unida.

En otras formas de realización más preferidas, las micropartículas están sujetas a un proceso de reducción de detergente que sin embargo conserva cantidades significativas del detergente en forma no unida. Por ejemplo, se puede

realizar un paso de filtración de flujo transversal para conservar una cantidad sustancial de detergente no unido. Típicamente, un paso de filtración de este tipo produce micropartículas que contienen aproximadamente una relación p/p de detergente total aproximadamente del 0,2 al 5%, del que aproximadamente del 10 al 60% está unido a las micropartículas, y aproximadamente el 40-90% se encuentra en forma no unida. Más preferiblemente, aproximadamente del 25 al 40% está unido a las micropartículas, y aproximadamente el 60-75% no está unido. Por ejemplo, en el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 en lo que sigue, se producen micropartículas que tienen una relación p/p de CTAB total aproximadamente del 1%, del que aproximadamente el 30% está unido a las micropartículas, y aproximadamente el 70% no está unido.

En formas de realización en las que se usa una relación de detergente respecto al polímero suficientemente pequeña (p.ej., relaciones de detergente a polímero de aproximadamente 0,001:1 hasta aproximadamente 0,05:1, más preferiblemente de aproximadamente 0,002:1 hasta aproximadamente 0,04:1, y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,006:1 hasta aproximadamente 0,02:1), no es necesario lavar las partículas para eliminar las cantidades de detergente en exceso. Típicamente, un proceso de este tipo produce micropartículas que tienen aproximadamente una relación p/p de detergente total aproximadamente del 0,2 al 5%, del que aproximadamente del 10 al 60% está unido a las micropartículas, y aproximadamente el 40-90% se encuentra en forma no unida. Más preferiblemente, aproximadamente del 25 al 40% está unido a las micropartículas, y aproximadamente el 60-75% se encuentra en forma no unida. Por ejemplo, en el procedimiento descrito en el Ejemplo 6 en lo que sigue, se producen micropartículas que tienen una relación p/p de CTAB aproximadamente del 1%, del que aproximadamente el 30% está unido a las micropartículas, y aproximadamente el 70% no está unido.

El tamaño de partícula se puede determinar mediante, p.ej., barrido con luz láser, usando por ejemplo, un espectrómetro que incorpora un láser de helio-neón. Generalmente, el tamaño de partícula se determina a temperatura ambiente e implica análisis múltiples de la muestra en cuestión (p.ej., 5-10 veces) para producir un valor medio para el diámetro de partícula. El tamaño de partícula se determina también fácilmente usando microscopía electrónica de barrido (MEB). Después de la preparación, las micropartículas se pueden almacenar como están o liofilizadas para un uso futuro. Para adsorber macromoléculas a las micropartículas, la preparación de micropartículas sencillamente se puede mezclar con la macromolécula de interés y la formulación resultante puede liofilizarse de nuevo antes de su uso. No obstante, como se apunta anteriormente, los presentes inventores han hallado que la adsorción de macromoléculas a las micropartículas del polímero se puede mejorar asegurando que una cantidad sustancial de detergente en forma no unida esté presente en el momento de la adsorción de las macromoléculas. En caso de que esté presente muy poco detergente en la composición de partículas preparada en forma no unida (p.ej., aproximadamente el 5% o menos), se prefiere incubar las micropartículas con las macromoléculas y una cantidad adicional de detergente. Preferiblemente, se usa una relación de peso a peso de detergente respecto a la macromolécula de aproximadamente 0,002:1 hasta aproximadamente 0,05:1, más preferiblemente de aproximadamente 0,005:1 hasta aproximadamente 0,02:1.

Por otro lado, donde están presentes cantidades sustanciales del detergente en forma no unida en la composición preparada de micropartículas (p.ej., aproximadamente el 50-90% no unido, más preferiblemente del aproximadamente 60-75%), se pueden lograr buenos resultados simplemente incubando las micropartículas con la macromolécula de interés, siendo opcional el uso de detergente adicional).

Sin querer estar ligados a teoría alguna, en los dos casos anteriores se cree que el detergente no unido está disponible para formar complejos con la macromolécula de interés, volviendo a la macromolécula más dispuesta para la adsorción a una micropartícula.

Generalmente, las macromoléculas se añaden a las micropartículas para producir micropartículas con macromoléculas adsorbidas que tienen una relación de peso a peso de macromoléculas respecto a micropartículas de aproximadamente 0,0001:1 hasta 0,25:1, preferiblemente, de 0,001:1 a 0,1:1, más preferiblemente de 0,01:1 a 0,05:1. El contenido en macromoléculas de las micropartículas se puede determinar usando técnicas estándar.

Las micropartículas de la presente invención pueden tener macromoléculas capturadas o encapsuladas dentro de ellas, así como tener macromoléculas adsorbidas sobre ellas. Así, por ejemplo, alguien experto en la técnica puede preparar de acuerdo con la invención micropartículas que tengan adyuvantes encapsulados con proteínas adsorbidas sobre ellos, o micropartículas que tengan proteínas encapsuladas con adyuvantes adsorbidos sobre ellas. Alguien experto en la técnica puede asimismo preparar de acuerdo con la invención micropartículas que tengan adyuvantes encapsulados con complejos de vectores ELVIS adsorbidos sobre ellos, o micropartículas que tengan antígeno encapsulado con plásmidos de ácido nucleico adsorbidos sobre ellos. La invención contempla una variedad de combinaciones de complejos de macromoléculas adsorbidos sobre y capturados dentro de micropartículas, junto con otras macromoléculas tales como moléculas antigénicas.

Una vez que se han producido las micropartículas con macromoléculas adsorbidas, se formulan en composiciones farmacéuticas, que incluyen vacunas, para tratar y/o diagnosticar una amplia variedad de trastornos, como se describe anteriormente. Las composiciones incluirán generalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se pueden usar vehículos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilen glicol, ácido hialurónico, etanol, etc. Otros excipientes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras biológicas, y similares, pueden estar presentes en tales vehículos. Un tampón biológico puede ser virtualmente cualquier solución que sea farmacológicamente aceptable y que proporcione a la formulación el pH deseado, es decir, un pH en el intervalo fisiológico. Los ejemplos de soluciones tampón incluyen solución salina, tampón fosfato salino, tampón Tris

salino, tampón salino de Hank, y similares. También se pueden introducir otros excipientes conocidos en la técnica en la forma de dosificación final, incluyendo ligantes, desintegrantes, rellenos (diluyentes), lubricantes, deslizantes (mejorantes de flujo), ayudantes de compresión, colores, endulzantes, conservantes, agentes suspensivos/dispersivos, formadores/revestidores de películas, aromas y tintas de impresión.

5

Los adyuvantes pueden usarse para mejorar la eficacia de las composiciones farmacéuticas. Los adyuvantes se pueden administrar simultáneamente con las micropartículas de la presente invención, p.ej., en la misma composición o en composiciones distintas. Alternativamente, se puede administrar un adyuvante antes o después de las micropartículas de la presente invención. En otra forma de realización, el adyuvante, tal como un adyuvante inmunológico, puede encapsularse en la micropartícula. Los adyuvantes, como cualquier macromolécula, pueden encapsularse dentro de micropartículas usando cualquiera de los diversos procedimientos conocidos en la técnica. Ver, p.ej., la Patente de EE.UU. N° 3,523,907; Ogawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (1988) 36:1095-1103; O'Hagan *et al.*, *Vaccine* (1993) 11:965-969 y Jefferey *et al.*, *Pharm. Res.* (1993) 10:362. Alternativamente, los adyuvantes se pueden adsorber sobre la micropartícula como se describe anteriormente para cualquier macromolécula.

15

Los adyuvantes inmunológicos incluyen, pero sin limitarse a: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) otras formulaciones de emulsiones de agua en aceite (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como muramil péptidos (ver más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59 (Publicación Internacional N° WO90/14837; Capítulo 10 en *Vaccine design: the subunit an adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, y Span 85 al 0,5% (que opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE (ver más adelante), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrónicas usando un microfluidificador tal como el fluidificante de Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 con plurónico bloqueado, y thr-MDP (ver más adelante) microfluidificado en una emulsión micrónica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (c) sistema de adyuvante Ribim^{MC} (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2%, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo constituido por monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox^{MC}) (para una discusión más a fondo de las emulsiones submicrónicas de agua en aceite adecuadas para uso aquí, ver la solicitud de patente N° 09/015,736, del solicitante, publicada el 29 de Enero de 1998); (3) se pueden usar adyuvantes de saponina, tales como Quil A, o QS21 (p.ej., Stimulon^{MC} (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)) o generar partículas de los mismos tales como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores), pudiendo los ICOMS carecer de detergente adicional, p.ej., WO00/07621; (4) Adyuvante Completo de Freund's (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund's (IFA); (5) citokinas, tales como interleukinas (p.ej. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636), etc.), interferones (p.ej., gamma interferón), factor estimulador de la colonia de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacetilado (3dMPL), p.ej. GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos de neumococos, p.ej. WO00/56358; (7) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de agua en aceite, p.ej., EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (8) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol.* 1988, 160, 870-876; Chu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224; Krieg *et al.*, *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, *Cell. Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; y Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906; las solicitudes de patentes internacionales WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581) es decir, que contienen al menos un dinucleótido de CG, usando opcionalmente 5-metilcitosina en lugar de citosina; (9) un polioxietilén éter o un polioxietilén éster, p.ej., WO99/52549; (10) un tensioactivo de polioxietilén sorbitán éster en combinación con un octoxinol (WO01/21207) o un tensioactivo de polioxietilén alquil éter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (WO01/21152); (11) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante (p.ej., un oligonucleótido CpG) (WO00/62800); (12) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica, p.ej., WO00/23105; (13) una saponina y una emulsión de agua en aceite, p.ej., WO99/11241; (14) una saponina (p.ej., QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroil) p.ej. WO98/57659; (15) mutantes detoxificados de una toxina ribosilante de ADP bacteriana tal como una toxina del cólera (CT), una toxina de la tos ferina (PT), o una toxina termolábil de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63 (donde la lisina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 63), LT-R72 (donde la arginina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 72), CT-S109 (donde la serina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 109), y PT-K9/G129 donde la lisina se sustituye por el aminoácido de tipo salvaje en la posición 9 y la glicina se sustituye en la posición 129) (ver, p.ej., las Publicaciones Internacionales N°s WO93/13202 y WO92/19265); y (16) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición. Se prefieren el alumbre (especialmente el fosfato y/o hidróxido de aluminio) y MF59.

Los muramil péptidos incluyen, pero sin limitarse a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-di-palmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

65

Para ejemplos adicionales de adyuvantes, ver *Vaccine design: the subunit an adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995).

Las composiciones comprenderán una “cantidad terapéuticamente eficaz” de la macromolécula de interés. Esto es, se incluirá en las composiciones una cantidad de macromolécula/micropartícula que provocará que el sujeto produzca una respuesta suficiente, para prevenir, reducir, eliminar o diagnosticar síntomas. La cantidad exacta necesaria variará, por ejemplo, dependiendo del sujeto que esté siendo tratado; la edad y condición general del sujeto que esté siendo tratado; la gravedad de la afección que esté siendo tratada; en el caso de una respuesta inmunológica, la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos; el grado de protección deseado y el antígeno particular seleccionado y su modo de administración, entre otros factores. Una cantidad eficaz apropiada puede ser determinada fácilmente por alguien experto en la técnica. Por lo tanto, una “cantidad terapéuticamente eficaz” típicamente caerá en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. Por ejemplo, para objetos de la presente invención, donde la macromolécula sea un polinucleótido, una dosis eficaz variará típicamente desde aproximadamente 1 ng hasta aproximadamente 1 mg, más preferiblemente desde aproximadamente 10 ng hasta aproximadamente 1 μ g, y aún más preferiblemente desde aproximadamente 50 ng hasta aproximadamente 500 ng de la macromolécula liberada por dosis. Donde la macromolécula sea un antígeno, una dosis eficaz variará típicamente desde aproximadamente 1 μ g hasta aproximadamente 100 mg, más preferiblemente desde aproximadamente 10 μ g hasta aproximadamente 1 mg, y aún más preferiblemente desde aproximadamente 50 μ g hasta aproximadamente 500 μ g de la macromolécula liberada por dosis.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar parenteralmente, p.ej., mediante inyección. Las composiciones se pueden inyectar subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente. Otros modos de administración incluyen la administración nasal, mucósica, rectal, vaginal, oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas.

El tratamiento de dosificación puede ser un único programa de dosificación o un programa de dosificación múltiple. Un programa de dosificación múltiple es uno en el que un ciclo principal de administración puede ser con 1-10 dosis diferentes, seguido por otras dosis dadas a intervalos de tiempo subsiguientes, elegidos para mantener y/o reforzar la respuesta terapéutica, por ejemplo a 1-4 meses para una segunda dosis, y si fuera necesario, dosis subsiguiente(s) después de varios meses. El régimen de dosificación también estará, al menos en parte, determinado por la necesidad del sujeto y dependerá de la opinión del médico.

Además, si se desea la prevención de la enfermedad, las macromoléculas en las vacunas se administran generalmente antes de la infección principal con el patógeno de interés. Si se desea tratamiento, p.ej., la reducción de síntomas o recurrencias, las macromoléculas se administran generalmente después de la infección principal.

Parte experimental

A continuación se dan ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos solamente se ofrecen con objetos ilustrativos, y no tratan de ninguna manera de limitar el alcance de la presente invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a las cifras usadas (p.ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero se debería permitir algún error y desviación experimental.

Ejemplo 1

Preparación de Micropartículas en Bruto usando PVA

Se construyeron micropartículas en bruto (p.ej., sin macromoléculas adsorbidas o capturadas) usando alcohol de polivinilo (PVA) como sigue. Soluciones usadas:

- (1) RG 504 PLG al 6% (Boehringer Ingelheim) en diclorometano.
- (2) alcohol de polivinilo (PVA) (ICN) al 10% en agua.

En particular, las micropartículas se construyeron combinando 10 ml de solución de polímero con 1,0 ml de agua destilada y homogeneizando durante 3 minutos usando un homogeneizador de mesa Omni con una sonda de 10 mm a 10K rpm para formar una emulsión de agua/aceite. Se añadió la emulsión de agua/aceite a 40 ml de la solución de PVA al 10%, y se homogeneizó durante 3 minutos, para formar una emulsión de agua/aceite/agua. La emulsión de agua/aceite/agua se dejó agitar toda la noche para la evaporación del disolvente, formando micropartículas. Se lavaron las micropartículas formadas con agua mediante centrifugación 4 veces, y se liofilizaron. Después se tallaron las micropartículas en un tallador Malvern Master para uso futuro.

ES 2 278 786 T3

Ejemplo 2

Preparación de Micropartículas en Bruto usando CTB

5 Se produjeron micropartículas en bruto usando CTAB como sigue. Soluciones usadas:

(1) RG 504 PLG al 4% (Boehringer Ingelheim) en cloruro de dimetilo.

10 (2) CTAB al 0,5% (Sigma Chemical Co., San Luis, MO) en agua.

En particular, las micropartículas se construyeron combinando 12,5 ml de solución de polímero con 1,25 ml de agua destilada y homogeneizando durante 3 minutos usando un homogeneizador de mesa Omni con una sonda de 10 mm a 10K rpm para formar una emulsión de agua/aceite. Se añadió la emulsión de agua/aceite a 50 ml de la solución de CTAB al 0,5%, y se homogeneizó durante 3 minutos, para formar una emulsión de agua/aceite/agua. La emulsión de agua/aceite/agua se dejó agitar toda la noche para la evaporación del disolvente, formando micropartículas. Después se filtraron las micropartículas formadas a través de una malla de 38 μ , se lavaron con agua mediante centrifugación 4 veces, y se liofilizaron. Después se tallaron las micropartículas en un tallador Malvern Master para uso futuro.

Ejemplo 3

20

Preparación de Micropartículas en Bruto usando SDS

Se construyeron micropartículas en bruto usando SDS como sigue. Soluciones usadas:

25 (1) RG 504 PLG al 6% (Boehringer Ingelheim) en cloruro de dimetilo.

(2) SDS al 1% (Sigma Chemical Co., San Luis, MO) en agua.

En particular, las micropartículas se construyeron combinando 12,5 ml de solución de polímero con 50 ml de solución de SDS y homogeneizando durante 3 minutos usando un homogeneizador de mesa Omni con una sonda de 10 mm a 10K rpm. La emulsión se dejó agitar toda la noche para la evaporación del disolvente. Se filtraron las micropartículas formadas a través de una malla de 38 μ , se lavaron con agua mediante centrifugación 4 veces, y se liofilizaron para uso futuro. Después se tallaron las micropartículas en un tallador Malvern Master para uso futuro.

Ejemplo 4

Micropartículas con complejos de DNA/CTAB adsorbidos

Se preformaron micropartículas en bruto de PLG/PVA usando el procedimiento de evaporación de disolvente estándar. Para un tamaño de serie de 1 g, se homogeneizaron 2 ml de agua desionizada (DI) con un volumen de 16 ml de solución de RG 504 (Polímero PLG) al 6% en peso/volumen en diclorometano (DCM). Esta emulsión se homogeneizó durante 2 minutos y a esta mezcla se añadieron 60 ml de una solución de alcohol de polivinilo (PVA) al 10% en peso/volumen. La emulsión múltiple se homogeneizó además durante 3 minutos y después se colocó en un agitador magnético para la evaporación del disolvente toda la noche. Las micropartículas resultantes se lavaron dos veces con agua desionizada y se congelaron en seco. Las micropartículas se tallaron y se encontró que tenían un tamaño de alrededor de 1 μ m.

Para preparar la formulación de DNA, se incubaron 100 mg de micropartículas PLG/PVA con 1 mg de CTAB y 1 mg de DNA (pCMV-p55gag) en un volumen de 5 ml de tampón TE. Se agitó la suspensión suavemente toda la noche a 4°C para una completa adsorción. Las micropartículas se centrifugaron una vez a 5.000 rpm y se lavó el sedimento una vez con 50 ml de tampón TE. El sedimento resultante se suspendió en 3 ml de agua desionizada y las micropartículas se congelaron en seco.

Se estimó el DNA real adsorbido mediante agotamiento (medida del sobrenadante) e hidrólisis básica de las micropartículas. Se encontró que la carga de DNA fue del 0,91% en peso/peso y la eficacia de carga del 91%.

10 mg de la formulación no liberaron ningún DNA libre *in vitro* en 1 ml de tampón TE en el día 1.

Ejemplo 5

60

Preparación de Micropartículas en Bruto usando CTAB

Técnica de filtración en flujo transversal

65 Las micropartículas en bruto se producen usando CTAB como sigue. Soluciones usadas: (1) RG 504 PLG al 6% (Boehringer Ingelheim) en cloruro de metileno, (2) CTAB al 0,5% (Sigma Chemical Co., San Luis, MO) en agua, (3) citrato sódico/EDTA en agua. Las micropartículas se construyen en un aparato como el ilustrado en la Fig. 1 combinando 80 ml de solución de polímero con 10 ml de solución de citrato sódico/EDTA en el depósito con mezclado

ES 2 278 786 T3

constante. Después se homogeneiza la mezcla en el homogeneizador en línea hasta que se consiga una emulsión de aceite/agua con una fase dispersa (fase de agua) que tenga un tamaño medio de partícula de 1-2 micras. En este punto se añaden 310 ml de solución de CTAB al tanque con mezclado constante. Después se homogeneiza la mezcla en el homogeneizador en línea hasta que se consiga una emulsión estable de agua/aceite/agua con una fase dispersa (fase de aceite/agua) que tenga un tamaño medio de partícula de 1 micra. La emulsión resultante de agua/aceite/agua se purga con nitrógeno para eliminar el disolvente orgánico, y las micropartículas formadas se filtran usando un casete de filtro en flujo transversal de 0,1 micras de Millipore, usando un total de 4,0 litros de agua desionizada para eliminar el exceso de CTAB. Tras la filtración en flujo transversal final, se recoge la suspensión, que comprende CTAB aproximadamente al 1%, del cual el 30% está presente en forma unida y el 70% está presente en forma no unida.

Ejemplo 6

Preparación de Micropartículas en Bruto usando la técnica de no lavar el CTAB

Las micropartículas en bruto se producen usando CTAB como sigue. Soluciones usadas: (1) RG 504 PLG al 6% (Boehringer Ingelheim) en cloruro de metileno, (2) CTAB al 0,01825% (Sigma Chemical Co., San Luis, MO) en agua, (3) citrato sódico/EDTA en agua. Las micropartículas se construyen en un aparato como el ilustrado en la Fig. 1 combinando 300 ml de solución de polímero con 60 ml de solución de citrato sódico/EDTA en el depósito con mezclado constante. Después se homogeneiza la mezcla en el homogeneizador en línea hasta que se consiga una emulsión de aceite/agua con una fase dispersa (fase de agua) que tenga un tamaño medio de partícula de 1 micra. En este punto se añaden 1,8 l de solución de CTAB al tanque con mezclado constante. Después se homogeneiza la mezcla en el homogeneizador en línea hasta que se consiga una emulsión estable de agua/aceite/agua con una fase dispersa (fase de aceite/agua) que tenga un tamaño medio de partícula de 1 micra. La emulsión resultante de agua/aceite/agua se purga con nitrógeno para eliminar el disolvente orgánico. La suspensión de micropartículas se mide en un tallador Malvern Master para uso futuro. Estas micropartículas comprenden CTAB aproximadamente al 1%, del cual el 30% está presente en forma unida y el 70% está presente en forma no unida.

Ejemplo 7

Inmunogenicidad de Micropartículas con DNA p55 Adsorbido

Se prepara una formulación de DNA incubando 100 mg de la suspensión de micropartículas (en un volumen de 10 ml) formadas en el Ejemplo 6 con 1,0 mg de DNA (un plásmido pCMVgag que codifica para una proteína p55gag del HIV bajo el control del promotor temprano del citomegalovirus) en un volumen de 0,5 ml de tampón Tris-EDTA. Se incubaba la suspensión a 4°C durante 12 horas. Después de la incubación, se centrifugan las micropartículas cargadas con DNA, se lavan con tampón Tris-EDTA, se suspenden en agua desionizada y se congelan en seco (se liofilizan). La carga de DNA de las micropartículas resultantes es de aproximadamente un 1% en peso/peso.

Las micropartículas cargadas con DNA se inyectan después intramuscularmente en ratones en dos niveles totales de DNA. También se inyecta DNA aislado a los mismos dos niveles como control. Cada formulación se inyecta a diez ratones. El número de ratones se elevó después de 28 días. Dos semanas después de la segunda inmunización, se recoge suero y se mide el valor medio geométrico (VMG) de cada suero, junto con su error estándar (ES). Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Formulación	VMG	ES
PLG-CTAB p55 DNA (1% en p/p de carga, 1 µg)	15.565	4.764
PLG-CTAB p55 DNA (1% en p/p de carga, 10 µg)	27.277	5.693
1 µg p55 DNA	367	1.572
10 µg p55 DNA	2.185	1.652

Referencias

- Ref.1 - Solicitud de la Patente Internacional WO99/24578.
Ref.2 - Solicitud de la Patente Internacional WO99/36544.
Ref.3 - Solicitud de la Patente Internacional WO99/57280.
Ref.4 - Solicitud de la Patente Internacional WO00/22430.
Ref.5 - **Tettelin** *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.

ES 2 278 786 T3

Ref.6 - Solicitud de la Patente Internacional WO96/29412.

Ref.7 - **Pizza et al.** (2000) *Science* 287:1816-1820.

5 Ref.8 - Solicitud de la Patente Internacional PCT/IB01/00166.

Ref.9 - **Bjune et al.** (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.

Ref.10 - **Fukasawa et al.** (1990) *Vaccine* 17:2951-2958.

10

Ref.11 - **Rosenqvist et al.** (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.

Ref.12 - **Costantino et al.** (1992) *Vaccine* 10:691-698.

15

Ref.13 - **Costantino et al.** (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.

Ref.14 - **Watson** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.

Ref.15 - **Rubin** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.

20

Ref.16 - **Jedrzejak** (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.

Ref.17 - Solicitud de la Patente Internacional publicada el 3 de Julio de 2001, que reivindica prioridad de GB-0016363.4.

25

Ref.18 - **Kalman et al.** (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.

Ref.19 - **Read et al.** (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.

30

Ref.20 - **Shirai et al.** (2000) *J. Infect. Dis.* 181 (Suplem 3):S524-S527.

Ref.21 - Solicitud de la Patente Internacional WO99/27105.

Ref.22 - Solicitud de la Patente Internacional WO00/27994.

35

Ref.23 - Solicitud de la Patente Internacional WO00/37494.

Ref.24 - Solicitud de la Patente Internacional WO99/28475.

40

Ref.25 - **Bell** (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.

Ref.26 - **Iwarson** (1995) *APMIS* 103:321-326.

Ref.27 - **Gerlich et al.** (1990) *Vaccine* 8 Suplem:S63-68 y 79-80.

45

Ref.28 - **Hsu et al.** (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.

Ref.29 - **Gustafsson et al.** (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.

50

Ref.30 - **Rappuoli et al.** (1991) *TIBTECH* 9:232-238.

Ref.31 - *Vaccines* (1998) eds. Plotkin y Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.

Ref.32 - Del **Guidice et al.** (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.

55

Ref.33 - Solicitud de la Patente Internacional WO93/18150.

Ref.34 - Solicitud de la Patente Internacional WO99/53310.

60

Ref.35 - Solicitud de la Patente Internacional WO98/04702.

Ref.36 - **Ross et al.** (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.

Ref.37 - **Sutter et al.** (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.

65

Ref.38 - **Zimmerman y Spann** (1999) *m Fam Physician* 59:113-118, 125-126.

Ref.39 - **Dreesen** (1997) *Vaccine* 15 Suplem:S2-6.

ES 2 278 786 T3

Ref.40 - *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 16 Ene; 47(1):12, 19.

Ref.41 - **McMichael** (2000) *Vaccine* 19 Suplem 1:S101-107.

5 Ref.42 - **Schuchat** (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.

Ref.43 - Solicitudes de las Patentes de GB 002633.5, 0028727.6 y 0105640.7.

Ref.44 - **Dale** (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.

10

Ref.45 - **Ferretti et al.** (2001) *PNAS USA* 98:4658-4663.

Ref.46 - **Kuroda et al.** (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; ver también las páginas 1218-1219.

15

Ref.47 - **Ramsay et al.** (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.

Ref.48 - **Lindberg** (1999) *Vaccine* 17 Suplem 2:S28-36.

Ref.49 - **Buttery y Moxon** (2000) *J R Coll Physicians London* 34:163-168.

20

Ref.50 - **Ahmad y Chapnick** (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.

Ref.51 - **Goldblatt** (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.

25

Ref.52 - Patente Europea 0 477 508.

Ref.53 - Patente de EE.UU. N° 5,306,492.

Ref.54 - Solicitud de la Patente Internacional WO98/42721.

30

Ref.55 - *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114.

Ref.56 - **Hermanson** (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 y 012342335X.

35

Ref.57 - Solicitud de la Patente Europea 0372501.

Ref.58 - Solicitud de la Patente Europea 0378881.

Ref.59 - Solicitud de la Patente Europea 0427347.

40

Ref.60 - Solicitud de la Patente Internacional WO93/17712.

Ref.61 - Solicitud de la Patente Internacional WO98/58668.

45

Ref.62 - Solicitud de la Patente Europea 0471177.

Ref.63 - Solicitud de la Patente Internacional WO00/56360.

Ref.64 - Solicitud de la Patente Internacional WO00/61761.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición de micropartículas biológicamente activas que comprende:

5 micropartículas que comprenden (a) un polímero seleccionado entre el grupo constituido por un poli(alfa-hidroxi ácido), un polihidroxi ácido butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, y un policianoacrilato; y (b) una primera fracción de detergente que está unida al polímero; y

10 un complejo adsorbido sobre la superficie de las micropartículas, comprendiendo dicho complejo (a) una primera macromolécula biológicamente activa y (b) una segunda fracción de detergente,

15 en la que la primera fracción de detergente y la segunda fracción de detergente pueden comprender el mismo detergente o detergentes distintos, y en la que la primera macromolécula biológicamente activa se selecciona entre el grupo constituido por un polipéptido, un polinucleótido, un polinucleósido, un antígeno, un producto farmacéutico, una hormona, una enzima, un mediador de transcripción o de traducción, un intermediario de una ruta metabólica, un inmunomodulador, y un adyuvante.

20 2. La composición de micropartículas de la reivindicación 1, en la que el polímero comprende un poli(α -hidroxi ácido) seleccionado entre el grupo constituido por poli(L-lactido), poli(D,L-lactido) y poli(D,L-lactido-co-glicolido).

3. La composición de micropartículas de la reivindicación 2, en la que el polímero comprende un poli(D,L-lactido-co-glicolido) que tiene:

25 (a) una relación molar lactido/glicolido que varía entre 30:70 y 70:30 y un intervalo de peso molecular de entre 10.000 y 100.000 Daltons; o

(b) una relación molar lactido/glicolido que varía entre 40:60 y 60:40 y un intervalo de peso molecular de entre 30.000 y 70.000 Daltons.

30 4. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la primera y segunda fracciones de detergente comprenden el mismo detergente.

35 5. La composición de micropartículas de la reivindicación 4, en la que la primera y segunda fracciones de detergente comprenden un detergente catiónico.

6. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la primera y segunda fracciones de detergente comprenden detergentes distintos.

40 7. La composición de micropartículas de la reivindicación 6, en la que la primera fracción de detergente comprende un detergente no iónico y la segunda fracción de detergente comprende un detergente catiónico.

8. La composición de micropartículas de la reivindicación 7, en la que la primera fracción de detergente comprende PVA y la segunda fracción de detergente comprende CTAB.

45 9. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la primera macromolécula biológicamente activa es un polinucleótido que codifica para un antígeno seleccionado entre el grupo constituido por un antígeno del HIV tal como gp120, gp140, p24gag, p55gag, antígeno de la meningitis B, un antígeno de estreptococos B, y antígeno de la hemaglutinina A de la influenza.

50 10. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la primera macromolécula biológicamente activa es un miembro seleccionado entre el grupo constituido por un plásmido, un vector ELVIS, y un constructo de vector de RNA.

55 11. La composición de micropartículas de la reivindicación 10, en la que la primera macromolécula biológicamente activa es pCMV-p55gag.

60 12. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la primera macromolécula biológicamente activa es un antígeno seleccionado entre el grupo constituido por antígenos del HIV, antígenos de la meningitis B, antígenos de estreptococos B y antígenos de la hemaglutinina A de la influenza.

13. La composición de micropartículas de la reivindicación 12, en la que el antígeno del HIV se selecciona entre el grupo constituido por gp120, gp140, p24gag, p55gag.

65 14. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una segunda macromolécula biológicamente activa seleccionada entre el grupo constituido por un polipéptido, un polinucleótido, un polinucleósido, un antígeno, un producto farmacéutico, una hormona, una enzima, un mediador de transcripción o de traducción, un intermediario de una ruta metabólica, un inmunomodulador, y un adyuvante.

ES 2 278 786 T3

15. La composición de micropartículas de la reivindicación 14, en la que la primera macromolécula biológicamente activa es un adyuvante seleccionado entre el grupo constituido por oligonucleótidos CpG, LTK63, LTR72, MPL y una sal de aluminio.
- 5 16. La composición de micropartículas de la reivindicación 15, en la que la sal de aluminio es fosfato de aluminio.
17. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 16, en la que la primera fracción de detergente que está unida al polímero comprende aproximadamente el 10-90% del detergente total en la composición.
- 10 18. La composición de micropartículas de la reivindicación 17, en la que la primera fracción de detergente que está unida al polímero comprende aproximadamente el 10-60% del detergente total en la composición.
- 15 19. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 18, en la que el detergente catiónico es CTAB.
- 20 20. La composición de micropartículas de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
21. La composición de micropartículas de la reivindicación 20 para uso en un procedimiento de diagnóstico o como medicamento para el tratamiento de una enfermedad.
22. La composición de micropartículas de la reivindicación 20 para uso como vacuna y/o para aumentar una respuesta inmune.
- 25 23. Uso de la composición de micropartículas de las reivindicaciones 21 ó 22 para la fabricación de un medicamento para un sujeto vertebrado.
24. Un procedimiento para producir una composición de micropartículas, comprendiendo dicho procedimiento:
- 30 (a) formar una emulsión que comprende (i) un polímero seleccionado entre el grupo constituido por un poli(α -hidroxi ácido), un polihidroxi ácido butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, y un policianoacrilato, (ii) un disolvente orgánico, (iii) un detergente y (iv) agua; y
- 35 (b) eliminar el disolvente orgánico de la emulsión para formar micropartículas; en la que aproximadamente el 10-90% del detergente total en la composición de micropartículas está unido a micropartículas y el resto no está unido, y en el que dichas micropartículas no están sujetas a un paso de lavado.
- 40 25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que la emulsión es una emulsión de agua-en-aceite-en-agua que se forma mediante un proceso que comprende:
- (a) emulsionar una fase orgánica que comprende el polímero y el disolvente orgánico con una primera fase acuosa que comprende agua para formar una emulsión de agua-en-aceite; y
- 45 (b) emulsionar una segunda fase acuosa que comprende el detergente catiónico y agua con la emulsión formada en el paso (a) para formar una emulsión de agua-en-aceite-en-agua.
26. El procedimiento de las reivindicaciones 24 ó 25, en el que se lleva a cabo un paso de filtración en flujo transversal después de eliminar el disolvente orgánico.
- 50 27. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que el detergente es un detergente catiónico proporcionado en la emulsión en una relación de peso a peso del detergente respecto al polímero (a) desde aproximadamente 0,001:1 hasta aproximadamente 0,05:1 o (b) desde aproximadamente 0,05:1 hasta aproximadamente 0,5:1.
- 55 28. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que el detergente catiónico del paso (b) es proporcionado en la emulsión en una relación de peso a peso del detergente respecto al polímero desde aproximadamente 0,1:1 hasta aproximadamente 0,5:1, en el que el polímero es poli(D,L-lactido-co-glicolido) y en el que el detergente catiónico es CTAB.
- 60 29. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que el detergente catiónico del paso (a) es proporcionado en la emulsión en una relación de peso a peso del detergente respecto al polímero desde aproximadamente 0,002:1 hasta aproximadamente 0,04:1, en el que el detergente catiónico es CTAB, en el que el polímero es poli(D,L-lactido-co-glicolido), y en el que las micropartículas no están sujetas a un paso para eliminar el exceso de CTAB de la composición.
- 65 30. Un procedimiento para producir una composición de micropartículas biológicamente activas, comprendiendo dicho procedimiento:

ES 2 278 786 T3

(a) proporcionar una composición de micropartículas mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29; y

(b) incubar la composición de micropartículas con una macromolécula biológicamente activa.

31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que la macromolécula biológicamente activa es un polinucleótido.

32. Un procedimiento para producir una composición de micropartículas, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar una micropartícula mediante un proceso de emulsificación, cuya micropartícula comprende: (a) un polímero seleccionado entre el grupo constituido por un poli(α -hidroxi ácido), un polihidroxi ácido butírico, una policaprolactona, un poliortoéster, un polianhidrido, y un policianoacrilato; y (b) una primera fracción de detergente que está unida al polímero; y

adsorber un complejo de una macromolécula biológicamente activa y una segunda fracción de detergente sobre la superficie de la micropartícula;

en la que la primera fracción de detergente y la segunda fracción de detergente comprenden el mismo detergente o detergentes distintos, y en la que la macromolécula biológicamente activa se selecciona entre el grupo constituido por un polipéptido, un polinucleótido, un polinucleósido, un antígeno, un producto farmacéutico, una hormona, una enzima, un mediador de transcripción o de translación, un intermediario de una ruta metabólica, un inmunomodulador, y un adyuvante.

33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que la primera y segunda fracciones de detergente comprenden el mismo detergente catiónico y el polímero comprende un poli(α -hidroxi ácido), seleccionado entre el grupo constituido por poli(L-lactido), poli(D,L-actido) y poli(D,L-lactido-co-glicolido) y en el que la macromolécula biológicamente activa es un polinucleótido.

34. El procedimiento de la reivindicación 33, en el que la primera fracción de detergente que está unida al polímero comprende aproximadamente el 10-90% del detergente total en la composición, y en el que el detergente que corresponde a la primera y segunda fracciones de detergente se añade en el transcurso del proceso de emulsificación.

35. El procedimiento de la reivindicación 34, en el que la primera fracción de detergente que está unida al polímero comprende aproximadamente el 10-60% del detergente total en la composición.

36. El procedimiento de la reivindicación 34 ó 35, en el que el proceso de emulsificación comprende:

(a) emulsionar una fase orgánica que comprende el polímero y el disolvente orgánico con una primera fase acuosa que comprende agua para formar una emulsión de agua-en-aceite; y

(b) emulsionar una segunda fase acuosa que comprende el detergente y agua con la emulsión formada en el paso (a) para formar una emulsión de agua-en-aceite-en-agua.

37. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en el que el detergente catiónico es CTAB.

38. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que la primera fracción de detergente comprende un primer detergente y la segunda fracción de detergente comprende un segundo detergente que difiere del primer detergente.

39. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que el primer detergente se añade en el transcurso del proceso de emulsificación y el segundo detergente se añade después del proceso de emulsificación.

40. El procedimiento de la reivindicación 39, en el que el segundo detergente se añade en concurrencia con la macromolécula biológicamente activa.

41. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, en el que el polímero comprende un poli(α -hidroxi ácido) seleccionado entre el grupo constituido por poli(L-lactido), poli(D,L-actido) y poli(D,L-lactido-co-glicolido), en el que el primer detergente comprende un detergente no iónico y el segundo detergente comprende un detergente catiónico, y en el que la macromolécula biológicamente activa es un polinucleótido.

42. El procedimiento de la reivindicación 41, en el que el primer detergente es PVA y el segundo detergente es CTAB.

43. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 42, en el que el polímero es un poli(D,L-lactido-co-glicolido) que tiene una relación molar lactido/glicolido que varía de 40:60 a 60:40 y un peso molecular que varía de 30.000 Daltons a 70.000 Daltons.

44. Una composición de micropartículas formada por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 43.

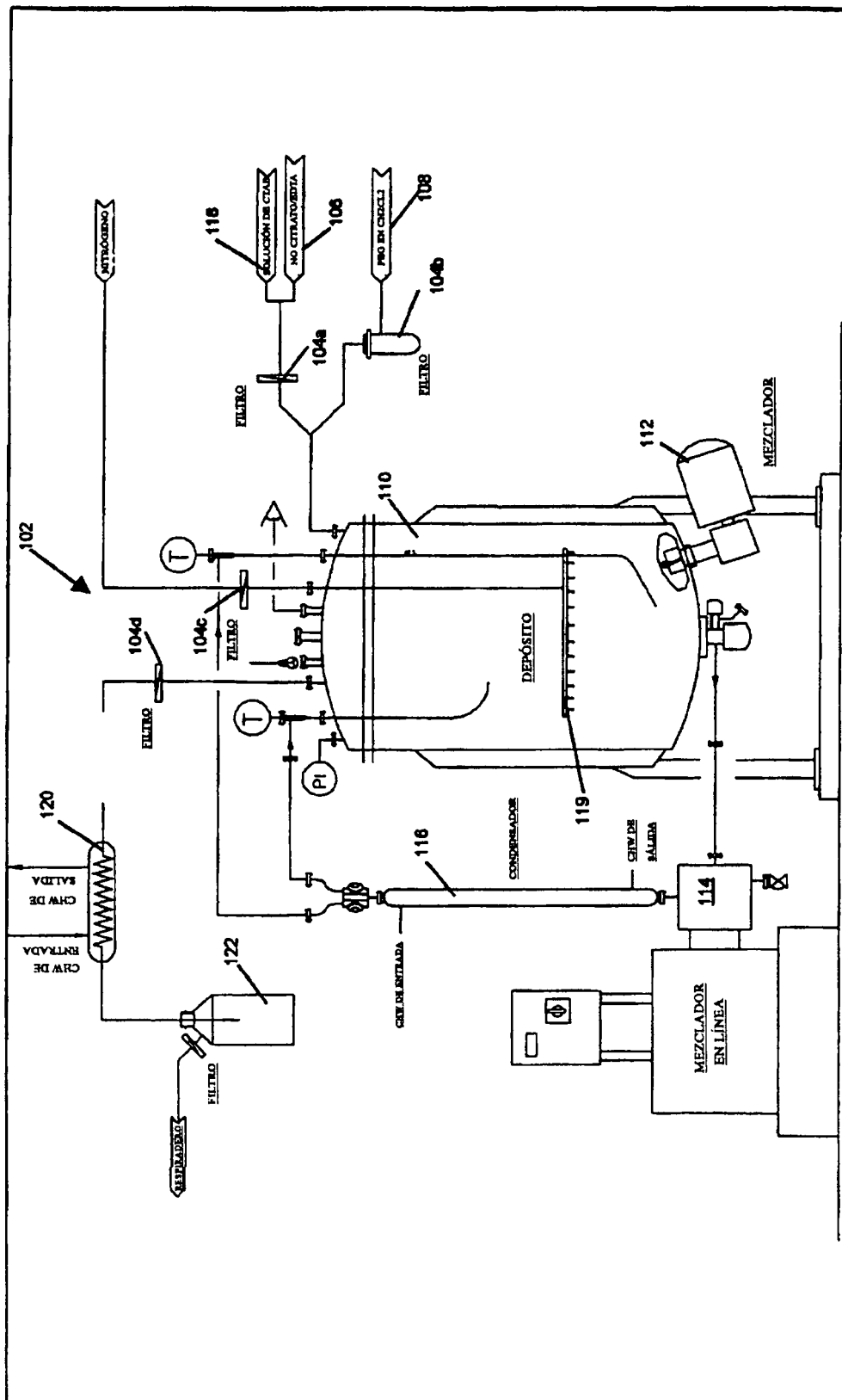


Fig. 1