

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 054**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/705</b>	(2006.01) <b>A61P 31/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/12</b>	(2006.01) <b>A61P 33/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/02</b>	(2006.01) <b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)	
<b>A61K 35/76</b>	(2015.01)	
<b>A61K 35/74</b>	(2015.01)	
<b>A61K 33/06</b>	(2006.01)	
<b>A61K 39/04</b>	(2006.01)	
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)	
<b>A61P 31/06</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2017 PCT/US2017/032287**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.11.2017 WO17200852**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2017 E 17725451 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2022 EP 3458475**

54 Título: **Formulación que contiene un agonista de TLR y métodos de uso**

30 Prioridad:

**16.05.2016 US 201662337322 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.11.2022**

73 Titular/es:

**ACCESS TO ADVANCED HEALTH INSTITUTE  
(100.0%)  
1616 Eastlake Avenue East, Suite 400  
Seattle, WA 98102, US**

72 Inventor/es:

**FOX, CHRISTOPHER B.**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 929 054 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**

Formulación que contiene un agonista de TLR y métodos de uso

**5 Referencia a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. n.º 62/337.322, presentada el 16 de mayo de 2016.

**10 Declaración con respecto a la investigación para desarrollo con fondos federales**

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el contrato n.º HHSO100201000039C otorgado por la Autoridad de Investigación y Desarrollo Biomédico Avanzado (BARDA, por sus siglas en inglés) en la Oficina del Subsecretario de Preparación y Respuesta (ASPR, por sus siglas en inglés) en el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. El gobierno posee ciertos derechos sobre la invención.

**Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

20 La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas y vacunales. Más específicamente, las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a formulaciones acuosas estables de adyuvante que comprenden un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y un lípido auxiliar, que puede adsorberse opcionalmente en una sal de aluminio.

25 Descripción de la técnica relacionada

Desde el trabajo pionero de Glenny a principios del siglo XX (1), las sales de aluminio se han convertido en los adyuvantes más usados en vacunas humanas, generando un historial inigualable de seguridad e idoneidad con diversos antígenos vacunales. Generalmente, las sales de aluminio comprenden nanopartículas y micropartículas semicristalinas con un área superficial grande y una alta densidad de carga. Pueden ser más eficaces como adyuvantes cuando los antígenos de la vacuna se adsorben de manera óptima en la superficie de las partículas de sal de aluminio (2). Las sales de aluminio son eficaces para potenciar las respuestas de anticuerpos a los antígenos vacunales, pero hay pocos indicios de que aumenten sustancialmente la inmunidad celular contra los antígenos vacunales. La inducción de una inmunidad celular eficaz es probablemente esencial para desarrollar vacunas eficaces para varias enfermedades, incluyendo la tuberculosis, el VIH y la malaria. Por lo tanto, la adsorción de inmunoestimulantes adicionales en las sales de aluminio también debe ser una consideración primordial en el desarrollo de formulaciones vacunales. Por lo tanto, se produjo un avance en el uso clínico de adyuvantes en 2009 cuando la FDA de EE.UU. aprobó la vacuna contra el virus del papiloma humano Cervarix® de GlaxoSmithKline para uso en humanos en 2009; Cervarix® contiene AS04, un sistema adyuvante que consiste en el ligando del receptor tipo Toll 4 (TLR4) monofosforil lípido A (MPL®) adsorbido en oxihidróxido de aluminio (3). Además de los agonistas de TLR4, otros ligandos de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en desarrollo preclínico y clínico pueden beneficiarse de la adsorción en las sales de aluminio (4). Algunos ligandos de PRR, tales como el ligando de TLR4 MPL®, se adsorben en algunas sales de aluminio debido a la compatibilidad de la estructura fisicoquímica. Por lo tanto, el oxihidróxido de aluminio adsorbe dichas moléculas debido al intercambio de ligandos de fosfato y/o interacciones electrostáticas (2). Sin embargo, otros ligandos de PRR de interés, tales como las imidazoquinolinas agonistas de TLR7/8, no contienen restos estructurales que promuevan la adsorción en oxihidróxido de aluminio.

50 El documento WO2012/117377 describe la combinación de determinados agonistas de TLR7 con sales de aluminio. El documento WO 2013/139744 describe que no todos los agonistas de TLR4 (tales como MPL-A) necesitan la presencia de un lípido auxiliar para unirse a una sal de aluminio. FOX C.B. y col.: "Adsorption of a synthetic TLR7/8 ligand to aluminum oxyhydroxide for enhanced vaccine adjuvant activity: A formulation approach", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 244, 12 de noviembre de 55 2016 (12-11-2016), páginas 98-107, es la publicación científica de la presente solicitud.

**Breve resumen de la invención**

60 Según la presente invención, se proporcionan composiciones según la reivindicación 1 y la reivindicación 7 y un método para preparar una formulación acuosa según la reivindicación 19.

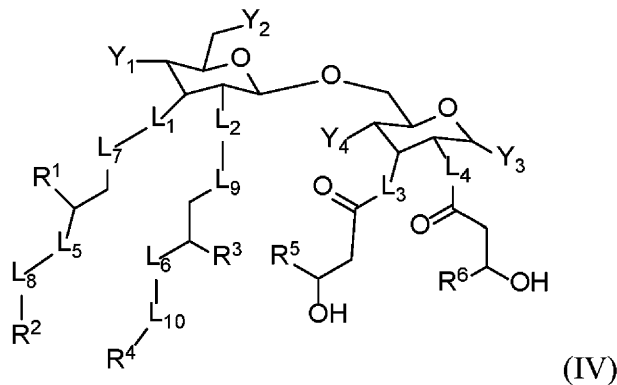
La presente descripción proporciona una formulación acuosa de TLR que comprende: (a) un agonista de TLR; y (b) un lípido auxiliar. La formulación acuosa comprende además una sal de aluminio.

La presente descripción proporciona una formulación acuosa de TLR 7/8 que comprende: (a) un agonista de TLR7/8; y (b) un lípido auxiliar. En determinadas realizaciones, la formulación acuosa es una nanosuspensión estable que tiene un tamaño de partícula de 400 nm o menos.

5 La presente descripción proporciona una composición que comprende: (a) un agonista de TLR7/8; (b) un lípido auxiliar; y (c) una sal de aluminio. En determinadas realizaciones, el agonista de TLR7/8 se adsorbe en la sal de aluminio. En determinadas realizaciones, el agonista de TLR7/8 se adsorbe en la sal de aluminio al 25 por ciento de la sal de aluminio. En determinadas realizaciones, la sal de aluminio se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, trihidrato de aluminio, oxihidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, hidroxifosfato sulfato de aluminio y sulfato de potasio y aluminio. En determinadas realizaciones, la sal de aluminio comprende Alhydrogel®. En determinadas realizaciones, la sal de aluminio comprende AdjuPhos®. En determinadas realizaciones, el agonista de TLR7/8 comprende 3M-052. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es un fosfolípido o un lípido de sal de amonio cuaternario. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar comprende una cadena de alquilo C10-20. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar se selecciona de DOPC, DSPG, DSTAP y polisorbato 80. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar se selecciona de DSPG y DSTAP. En determinadas realizaciones, la composición comprende 3M-052, Alhydrogel® y DSPG. En determinadas realizaciones, la composición comprende 3M-052, AdjuPhos® y DSTAP. En determinadas realizaciones, la composición comprende además un antígeno. En determinadas realizaciones, el antígeno se selecciona de un antígeno relacionado con la tuberculosis, un antígeno relacionado con la gripe, un antígeno relacionado con la hemaglutinina, un antígeno relacionado con el cáncer, un antígeno relacionado con un virus y un antígeno relacionado con la amebiasis. En determinadas realizaciones, el antígeno relacionado con la tuberculosis se selecciona del grupo que consiste en ID93, ID91 y BCG. En determinadas realizaciones, el antígeno relacionado con la gripe se selecciona del grupo que consiste en H5N1, gripe A, gripe B e gripe C. En determinadas realizaciones, el antígeno relacionado con la amebiasis es LecA. En determinadas realizaciones, el antígeno viral se selecciona del grupo que consiste en hepatitis B y hepatitis C. En determinadas realizaciones, la composición es estable. En determinadas realizaciones, la composición es estable durante al menos aproximadamente seis meses. En determinadas realizaciones, la composición es estable durante al menos aproximadamente un año. En determinadas realizaciones, la composición es estable a 2-8 °C durante al menos seis meses. En determinadas realizaciones, la composición es estable a 2-8 °C durante al menos un año.

En determinadas realizaciones, la formulación acuosa es una nanosuspensión estable que tiene un tamaño de partícula de 400 nm o menos.

En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 se adsorbe en la sal de aluminio. En determinadas realizaciones, el agonista de TLR7/8 se adsorbe en la sal de aluminio al 25 por ciento de la sal de aluminio. En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 se adsorbe en el fosfato de aluminio. El agonista de TLR4 comprende GLA. En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 comprende un GLA sintético de Fórmula (IV):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente -O-, -NH- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;

L<sub>7</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub> y L<sub>10</sub> son iguales o diferentes e independientemente están ausentes o son -C(=O)-;

Y<sub>1</sub> es un grupo funcional ácido;

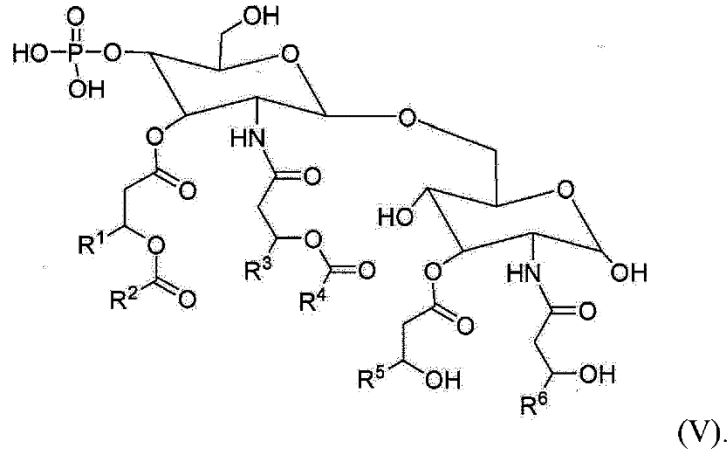
Y<sub>2</sub> e Y<sub>3</sub> son iguales o diferentes e independientemente -OH, -SH o un grupo funcional ácido;

Y<sub>4</sub> es -OH o -SH;

R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>8-13</sub>; y

R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>6-11</sub>.

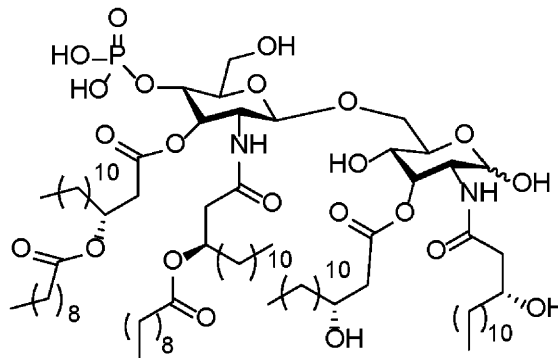
5 En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 comprende un GLA sintético de Fórmula (V):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

10 R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>11-20</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>12-20</sub>.

En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 comprende un GLA sintético de Fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En determinadas realizaciones, la composición comprende además un antígeno. En determinadas realizaciones, el antígeno se selecciona de un antígeno relacionado con la tuberculosis, un antígeno relacionado con la gripe, un antígeno relacionado con la hemaglutinina, un antígeno relacionado con el cáncer, un antígeno relacionado con un virus y un antígeno relacionado con la amebiasis. En determinadas realizaciones, el antígeno relacionado con la tuberculosis se selecciona del grupo que consiste en ID93, ID91 y BCG. En determinadas realizaciones, el antígeno relacionado con la gripe se selecciona del grupo que consiste en H5N1, gripe A, gripe B e gripe C. En determinadas realizaciones, el antígeno relacionado con la amebiasis es LecA. En determinadas realizaciones, el antígeno relacionado con un virus se selecciona del grupo que consiste en hepatitis B y hepatitis C. En determinadas realizaciones, la composición es estable. En determinadas realizaciones, la composición es estable durante al menos aproximadamente seis meses. En determinadas realizaciones, la composición es estable durante al menos aproximadamente un año. En determinadas realizaciones, la composición es estable a 2-8 °C durante al menos seis meses. En determinadas realizaciones, la composición es estable a 2-8 °C durante al menos un año.

La presente descripción describe un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar la formulación o composición descrita en el presente documento al sujeto y, de este modo, estimular una respuesta inmunitaria en el sujeto. La respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria inespecífica. La respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La respuesta inmunitaria implica la activación de linfocitos B, la activación de linfocitos T, la producción de anticuerpos o la liberación de citocinas. En determinadas realizaciones, la composición se usa para el tratamiento de una alergia, adicción, cáncer o autoinmunidad. La composición puede usarse para una vacuna. En determinadas

realizaciones, la vía de administración de la composición es oral, intravenosa, intradérmica, transdérmica, nasal, subcutánea o anal. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. En determinadas realizaciones, el mamífero no humano es un perro, una vaca o un caballo.

5 La presente descripción proporciona un método para preparar una formulación acuosa que comprende un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y un lípido auxiliar o polisorbato 80, en donde la composición que comprende el agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y el lípido auxiliar comprende partículas que se encuentran en un intervalo de 1 nm a aproximadamente 450 nm; en donde el método comprende (a) mezclar un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y un lípido auxiliar en disolvente para preparar la solución; (b) eliminar el disolvente de la solución de la etapa (a) para preparar una composición de película; y (c) rehidratar la composición de película de la etapa (c) para preparar una composición rehidratada; y (d) someter la composición rehidratada a una fuente de alta energía para preparar una composición de nanosuspensión. En determinadas realizaciones, la fuente de alta energía se genera a partir de un microfluidificador, una extrusora, un sonicador, un mezclador Silverson o un homogeneizador. En determinadas realizaciones, el método comprende además mezclar un antígeno con la composición de nanosuspensión. El método comprende además mezclar una sal de aluminio con la composición de nanosuspensión. En determinadas realizaciones, el método comprende además mezclar una sal de aluminio y un antígeno con una composición de nanosuspensión.

20 Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Además, en el presente documento se exponen diversas referencias.

### Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra estructuras de 3M-052 y diversos fosfolípidos.

Las figuras 2A-2E muestran las propiedades físicas de las suspensiones acuosas de 3M-052 y la adsorción en las sales de aluminio. La figura 2A muestra el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de las suspensiones acuosas de 3M-052 en el momento de la fabricación (se muestra el promedio +/- d.e. de tres mediciones de la misma muestra). La figura 2B muestra la estabilidad del tamaño de partículas durante 2 semanas para suspensiones de 3M-052 seleccionadas (se muestra el promedio +/- d.e. de tres mediciones de la misma muestra). La figura 2C muestra el potencial zeta de suspensiones de 3M-052 seleccionadas (se muestra el promedio +/- d.e. de nueve mediciones de la misma muestra para el potencial zeta). La figura 2D muestra la adsorción de suspensiones acuosas de 3M-052 en Alhydrogel® o AdjuPhos® que se evaluaron mediante el control de la concentración de 3M-052 en el sobrenadante centrifugado de muestras que contenían sal de aluminio en comparación con muestras que no contenían sal de aluminio. Los valores representan el promedio +/- d.e. de muestras duplicadas, excepto para las formulaciones de DSPG-Alhydrogel y DSTAP-AdjuPhos, en donde el 3M-052 en el sobrenadante estaba por debajo del valor más bajo de la curva patrón, por lo que la adsorción real puede ser mayor que la que se muestra. La figura 2E muestra la cinética de adsorción de la nanosuspensión de 3M-052-DSPG en Alhydrogel® y AdjuPhos®. Las muestras se centrifugaron durante 2 min a 2000 x g. Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos separados usando lotes separados de 3M-052, en donde cada muestra de cada experimento se realizó por duplicado.

45 Las figuras 3A-3E muestran las características del tamaño de partícula y la morfología de 3M-052-AF solo o en presencia de oxihidróxido de aluminio. La figura 3A muestra una imagen de cryo-TEM. La figura 3B muestra la distribución de tamaño de la dispersión de luz basada en la intensidad. La figura 3C muestra la distribución de tamaño de la dispersión de luz basada en el volumen. La figura 3D muestra una imagen de cryo-TEM de partículas de oxihidróxido de aluminio. La figura 3E muestra una imagen de cryo-TEM de partículas de oxihidróxido de aluminio con 3M-052-AF.

50 La figura 4 muestra la isoterma de adsorción de 3M-052-AF en Alhydrogel® según lo medido por la absorbancia UV del sobrenadante. Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos separados usando lotes separados de 3M-052, en donde cada muestra de cada experimento se realizó por duplicado.

55 Las figuras 5A-5B muestran que el alumbre y 3M052 inducen inmunogenicidad específica de antígeno sinérgica. Se inmunizaron tres veces ratones C57BL/6, con tres semanas de diferencia, mediante inyección intramuscular con ID93 (0,5 µg) solo o adyuvado con 3M-052-AF (0,5 µg), Alhydrogel® o 3M-052-AF (0,5 µg) unido a Alhydrogel®. En la figura 5A, tres semanas después de la primera inmunización, se determinaron mediante ELISA los valores volumétricos séricos de IgG1, IgG2c e IgG total (IgGT) específicos de ID93 como criterios de valoración. N = 4-5 ratones/grupo. En la figura 5B, cuatro semanas después de la inmunización final, los esplenocitos se estimularon de nuevo con medios o ID93 en presencia de Brefeldina A durante ocho horas y se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4 productores de citocinas restando la respuesta de los medios de la respuesta específica de ID93. Los datos son representativos de dos experimentos con resultados similares con 4-5 animales por grupo. Se muestra la media +/- s.e.m. \*p<0,05 frente a ID93, #p<0,05 frente a ID93+3M-052-AF, †p<0,05 frente a ID93+3M-052-Alumbre.

Las figuras 6A-6B muestran la valoración volumétrica de la dosis de 3M-052. Se inmunizaron dos veces ratones C57BL/6 con tres semanas de diferencia mediante inyección intramuscular con ID93 (0,5 ug) solo o adyuvado con 3M-052-AF (0,1, 0,5, 1 o 10 µg), Alhydrogel® o 3M-052-AF (0,1, 0,5, 1 o 10 µg) unido a Alhydrogel®. En la figura 6A, tres semanas después de la primera inmunización, se determinaron mediante ELISA los valores volumétricos séricos de IgG1, IgG2c e IgG total específicos de ID93 como criterio de valoración. N = 5 ratones/grupo. En la figura 6B, una semana después de la inmunización final, los esplenocitos se estimularon de nuevo con medios o ID93 en presencia de Brefeldina A durante ocho horas y se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4 productores de citocinas restando la respuesta de los medios de la respuesta específica de ID93. Los datos son representativos de dos experimentos con resultados similares con 5 animales por grupo. Se muestra la media +/- s.e.m.

Las figuras 7A-7B muestran que se usa TLR7 para determinar la actividad adyuvante inductora de TH1 de 3M-052. Se inmunizaron dos veces ratones de tipo natural C57BL/6 o B6.129S1-TLR7<sup>tm1Flv</sup> (TLR7<sup>-/-</sup>) con tres semanas de diferencia mediante inyección intramuscular con ID93 (0,5 µg) adyuvado con Alhydrogel®, 3M-052-AF (1 µg) unido a Alhydrogel® o GLA-AF (5 µg) unido a Alhydrogel®. En la figura 7A, tres semanas después de la primera inmunización, se determinaron los valores volumétricos séricos de anticuerpos IgG1 e IgG2c específicos de ID93 como criterio de valoración. La figura 7B muestra linfocitos T CD4 específicos de ID93 que se cuantificaron después de la estimulación *ex vivo* de esplenocitos con ID93 una semana después de la segunda inmunización. N = 5 ratones/grupo. Los datos son representativos de dos experimentos con resultados similares con 5 animales por grupo. Las barras indican la media +/- s.e.m. \*p<0,05.

Las figuras 8A-8D muestran que el antígeno gp120 del VIH formulado con 3M-052-Alhydrogel induce respuestas celulares mejoradas de anticuerpos y de tipo TH1 en comparación con el antígeno gp120 del VIH formulado con 3M-052-AdjuPhos®, 3M-052 solo o cualquier tipo de alumbre solo. Se inmunizaron tres veces ratones C57BL/6, con tres semanas de diferencia, mediante inyección intramuscular con antígeno gp120 del VIH (10 µg) solo o adyuvado con 3M-052-AF (1 µg), Alhydrogel®, AdjuPhos®, 3M-052-Alhydrogel® o 3M-052-AdjuPhos®. La figura 8A muestra un protocolo de un experimento. La figura 8B muestra los resultados, tres semanas después de la primera inmunización, de los valores volumétricos séricos de IgG1, IgG2c e IgG total (IgG) específicos del antígeno gp120 del VIH, como criterio de valoración, que se determinaron mediante ELISA. N = 5 ratones/grupo, las barras indican la media + d.e. En la figura 8C, una semana después de la segunda inmunización, se estimularon de nuevo los esplenocitos con el antígeno gp120 del VIH y se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4 productores de citocinas mediante citometría de flujo. N = 5 ratones/grupo, las barras indican la media +/- d.e. En la figura 8D, tres semanas después de la segunda y tercera inmunizaciones, las células secretoras de anticuerpos de la médula ósea específicas del antígeno gp120 del VIH se midieron mediante ELISPOT. N = 5 ratones/grupo, las barras indican la media +/- s.e.m. \*p<0,05 frente al antígeno gp120 del VIH, #p<0,05 frente a 3M-052-AF, †p<0,05 frente a la Alumbre correspondiente (Alhydrogel® o AdjuPhos®), ‡p<0,05 frente a 3M-052-AdjuPhos®.

Las figuras 9A-9D muestran que 3M-052 y el alumbre se sinergizan para aumentar las respuestas innatas tras la inmunización. Se inmunizaron ratones C57BL/6 de tipo natural por vía intramuscular con 3M-052-AF (1 µg), Alhydrogel®, AdjuPhos®, 3M-052-Alhydrogel® o 3M-052-AdjuPhos®. Dieciocho horas más tarde, se recogieron los ganglios linfáticos inguinales drenantes y analizaron (figura 9A) para determinar la entrada de monocitos inflamatorios CD11b+ Ly6C+, (figura 9B) la expresión de la molécula coestimuladora CD86 en los linfocitos B, los monocitos inflamatorios o las DC (figura 9C), la expresión de CD69 en los linfocitos y (figura 9D) la expresión de IFN-γ o IL-1b por los linfocitos NK y los neutrófilos, respectivamente. N = 5 ratones/grupo. Los datos son representativos de dos experimentos con resultados similares con 5 animales por grupo. Las barras indican la media+s.e.m. \*p<0,05 frente a ninguno, #p<0,05 frente a 3M-052-AF, †p<0,05 frente al Alumbre correspondiente (Alhydrogel® o AdjuPhos®), ‡p<0,05 frente a 3M-052-AdjuPhos®.

La figura 10 muestra el tamaño de partícula de la nanosuspensión de 3M-052-DSPG y la polidispersidad de tamaño durante 6 meses (n = 6 lotes, se muestra el promedio +/- d.e.).

Las figuras 11A-11C muestran que el antígeno gp120 del VIH formulado con 3M-052-Alhydrogel induce respuestas celulares vaginales y de tipo TH1 mejoradas. Se inmunizaron tres veces ratones C57BL/6, con tres semanas de diferencia, mediante inyección intramuscular con antígeno gp120 del VIH (10 µg) solo o adyuvado con 3M-052-AF (1 µg), Alhydrogel®, AdjuPhos®, 3M-052-Alhydrogel® o 3M-052-AdjuPhos®. La figura 11A muestra un protocolo de un experimento. En la figura 11B, tres semanas después de la tercera inmunización, se determinaron mediante ELISA los valores volumétricos del lavado vaginal de IgG1, IgG2c e IgG total específicos del antígeno gp120 del VIH como criterio de valoración. N = 9-10 ratones/grupo, las barras indican la media +/- d.e. En la figura 11C, una semana después de cada inmunización, se estimularon de nuevo los esplenocitos con el antígeno gp120 del VIH y se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4 productores de citocinas mediante citometría de flujo. N = 5 ratones/grupo, las barras indican la media +/- s.e.m. \*p<0,05 frente al antígeno gp120 del VIH, #p<0,05 frente a 3M-052-AF, †p<0,05 frente a la Alumbre correspondiente (Alhydrogel® o AdjuPhos®), ‡p<0,05 frente a 3M-052-AdjuPhos®.

### Descripción detallada de la invención

La presente descripción se refiere a una composición que comprende un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR 4 y un lípido auxiliar, en donde la composición es adecuada para unirse con una sal de aluminio en una solución acuosa. La

presente descripción proporciona una formulación acuosa que comprende un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y un lípido auxiliar. La presente descripción también proporciona una composición acuosa estable de adyuvante que comprende un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 con un lípido auxiliar que se adsorbe en una sal de aluminio.

5 La absorción de ligandos de TLR en sales de aluminio puede dar como resultado un suministro más localizado y facilitar una actividad adyuvante mejorada. Sin embargo, la estructura de determinados agonistas de TLR puede no permitir una adsorción eficaz en el alumbre. La presente descripción se refiere a una composición de una composición a base de lípidos que comprende un agonista de TLR que facilita la adsorción en una sal de aluminio a través de un lípido auxiliar.

10 La presente descripción proporciona la potenciación de la compatibilidad estructural fisicoquímica de los agonistas de TLR con alumbre y/o antígenos a través de la formulación de un agonista de TLR con un lípido auxiliar para producir una formulación acuosa estable. La preparación de una formulación acuosa estable o nanosuspensión se facilita a través de una entrada de energía (por ejemplo, sonicación o microfluidización) a través de la cual las partículas del  
15 agonista de TLR y el lípido auxiliar pueden dimensionarse a aproximadamente 450 nm o menos. La formulación acuosa o nanosuspensión es estable a aproximadamente 2-8 °C durante al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 1 año. Una formulación acuosa o nanosuspensión es una composición de un agonista de TLR y un lípido auxiliar, en la que la composición es una dispersión de un agonista de TLR y un lípido auxiliar que es estable durante un período de tiempo predeterminado, como se describe en el presente documento.

20 También se describen composiciones (tales como composiciones vacunales, composiciones farmacéuticas) que comprenden la formulación acuosa descrita en el presente documento. Las composiciones son útiles para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunas realizaciones, la composición descrita en el presente documento comprende además uno o más antígenos.

25 En la presente descripción, el término “aproximadamente” y la expresión “que consiste esencialmente en” significan  $\pm 20\%$  del intervalo, valor o estructura indicados, a menos que se indique lo contrario. Como se usa en el presente documento, debe entenderse que los términos “un” y “una” se refieren a “uno o más” de los componentes enumerados. El uso de la alternativa (por ejemplo, “o”) debe entenderse como uno/a, ambos/as o cualquier  
30 combinación de las alternativas. Como se usa en el presente documento, los términos “incluir”, “tener” y “comprender” se usan como sinónimos, pretendiendo interpretarse dichos términos y variantes de los mismos como no limitativos.

35 Los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario. Cualquier término no definido tiene sus significados reconocidos en la técnica.

“Alquilo” significa un hidrocarburo alifático, insaturado o saturado, de cadena lineal o ramificada, no cíclico o cíclico, que contiene de 1 a 20 átomos de carbono, y preferiblemente que contiene de 11 a 20 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares, incluyendo undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, etc.; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclohexenilo y ciclohexenilo y similares. Los alquilos cíclicos se denominan también en el presente documento  
45 “homociclos” o “anillos homocíclicos”.

Los alquilos insaturados contienen al menos un doble o triple enlace entre átomos de carbono adyacentes (denominados “alqueniilo” o “alquinilo”, respectivamente). Los alqueniilos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares; mientras que los alquinilos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 3-metil-1-butinilo y similares.

55 “Halo” o “halógeno” se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

“Hidroxi” o “hidroxilo” se refiere al grupo -OH.

60 “Alcoxi” se refiere al grupo -O-alquilo, en donde alquilo es como se define en el presente documento. Alcoxi incluye, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, t-butoxi, *sec*-butoxi, n-pentoxi y similares.

65 “Acilamino” se refiere a los grupos  $-NR^{20}C(O)R^{21}$ , en donde  $R^{20}$  y  $R^{21}$  se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo y arilo.

“Grupo funcional ácido” significa un grupo funcional capaz de donar un protón en medios acuosos (es decir, un ácido de Brønsted-Lowry). Después de donar un protón, el grupo funcional ácido se convierte en una especie cargada negativamente (es decir, la base conjugada del grupo funcional ácido). Los ejemplos de grupos funcionales ácidos

incluyen, pero sin limitación:  $-OP(=O)(OH)_2$  (fosfato),  $-OS(=O)(OH)_2$  (sulfato),  $-OS(OH)_2$  (sulfito),  $-C(=O)OH$  (carboxilato),  $-OC(=O)CH(NH_2)CH_2C(=O)OH$  (aspartato),  $-OC(=O)CH_2CH_2C(=O)OH$  (succinato) y  $-OC(=O)CH_2OP(=O)(OH)_2$  (carboximetilfosfato).

## 5 Composiciones

La presente descripción proporciona una formulación acuosa que comprende un agonista de TLR y un lípido auxiliar. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender además uno o más agentes o antígenos.

10 La presente descripción proporciona una formulación acuosa que comprende (1) un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y (2) un lípido auxiliar. En determinadas realizaciones, una composición que comprende el agonista de TLR7/8 y el lípido auxiliar se somete a una fuente de alta energía para producir una formulación acuosa o una composición de nanosuspensión. En determinadas realizaciones, una composición que comprende el agonista de TLR4 y el lípido auxiliar se somete a una fuente de alta energía para producir una formulación acuosa o una composición de nanosuspensión. En determinadas realizaciones, la formulación acuosa o composición de nanosuspensión comprende partículas que varían de tamaño de aproximadamente 1 nm a 450 nm, tal como menos de aproximadamente 400 nm o menos de aproximadamente 200 nm.

20 En determinadas realizaciones, la formulación acuosa o nanosuspensión que comprende un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y un lípido auxiliar se mezcla con una sal de aluminio. La presente descripción proporciona una composición que comprende (1) un agonista de TLR7/8; (2) un lípido auxiliar; y (3) una sal de aluminio. La presente descripción proporciona una composición que comprende (1) un agonista de TLR4; (2) un lípido auxiliar; y (3) una sal de aluminio.

25 En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender además uno o más agentes o antígenos. La presente descripción proporciona una formulación acuosa que comprende (1) un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y (2) un lípido auxiliar, que comprende además uno o más agentes o antígenos. La presente descripción proporciona una composición acuosa que comprende (1) un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4; (2) un lípido auxiliar; y (3) una sal de aluminio, que comprende además uno o más agentes o antígenos. La presente descripción proporciona una composición acuosa que comprende (1) un agonista de TLR7/8; (2) un lípido auxiliar; y (3) una sal de aluminio, que comprende además uno o más agentes o antígenos. La presente descripción proporciona una composición acuosa que comprende (1) un agonista de TLR4; (2) un lípido auxiliar; y (3) una sal de aluminio, que comprende además uno o más agentes o antígenos.

35 A continuación se proporciona una descripción de los componentes de la composición acuosa.

### Agonistas de TLR

40 Los agonistas de TLR descritos en el presente documento son hidrófobos o relativamente hidrófobos y, en ausencia de un lípido auxiliar, no forman sustancialmente nanosuspensiones acuosas estables de la presente descripción cuando se mezclan con agua en presencia o ausencia de una entrada de una fuente de alta energía. Los agonistas de TLR de la presente descripción contienen restos no polares tales como cadenas hidrocarburo. Los agonistas de TLR de la presente descripción son solubles en los disolventes orgánicos pero son poco solubles o insolubles en agua y tienen tendencia a formar grandes agregados en soluciones acuosas en ausencia de los lípidos auxiliares de la presente descripción. Las propiedades fisicoquímicas de los agonistas de TLR se describen en *Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations* by Mary Luckey, Cambridge University Press, Nueva York, 2014.

50 Como se usa en el presente documento, “insoluble en agua” se refiere a un compuesto que no se disuelve cuando el compuesto se mezcla con agua, por ejemplo, cuando se mezcla con agua a temperatura ambiente, por ejemplo, entre o entre aproximadamente 25 °C y 50 °C. Como se usa en el presente documento, “baja solubilidad en agua” se refiere a un compuesto que tiene una solubilidad en agua de menos de o aproximadamente 30 mg/ml, por ejemplo, cuando se mezcla con agua a temperatura ambiente, tal como entre o entre aproximadamente 25 °C y 50 °C. Como se usa en el presente documento, “poco soluble en agua” se puede usar para referirse a compuestos, por ejemplo, compuestos no polares, que son insolubles en agua o tienen baja solubilidad en agua.

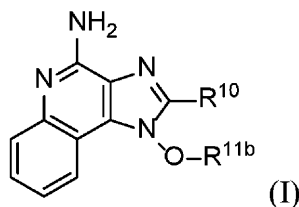
### Agonistas de TLR7/8

60 En las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar agonistas de TLR7/8. Como se usa en el presente documento, un “agonista de TLR7/8” se refiere a un agonista que afecta a sus actividades biológicas a través de su interacción con TLR7, TLR8 o ambos. Dichas actividades biológicas incluyen, pero sin limitación, la inducción de la transducción de señales mediada por TLR7 y/o TLR8 para potenciar las respuestas inmunitarias a través del sistema inmunitario innato. En algunas realizaciones, el TLR es un derivado de amina de imidazoquinolina (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 4.689.338 (Gerster)), pero también se conocen otras clases de compuestos (véase, por

ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5.446.153 (Lindstrom y col.); la Pat. de EE.UU. N.º 6.194.425 (Gerster y col.); y la Pat. de EE.UU. N.º 6.110.929 (Gerster y col.); y la Publicación Internacional Número WO2005/079195 (Hays y col.).

En determinadas realizaciones, el agonista de TLR7/8 es un compuesto de la siguiente estructura de Fórmula (I):

5



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

10  $R^{10}$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo  $C_{1-6}$ ; y

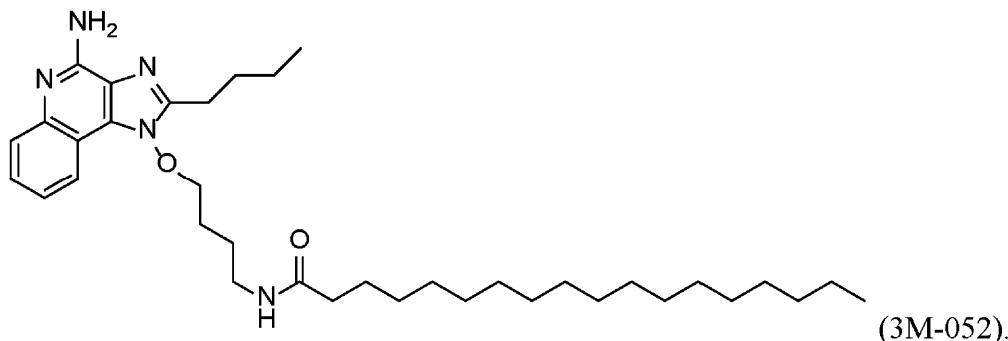
$R^{11b}$  es alquilo  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alcoxi  $C_{1-6}$  y acilamino.

15 En algunas realizaciones de Fórmula (I),  $R^{10}$  es hidrógeno. En algunas realizaciones,  $R^{10}$  es alquilo  $C_{1-6}$ . En algunas realizaciones,  $R^{10}$  es metilo, etilo, n-propilo o n-butilo. En algunas realizaciones,  $R^{10}$  es n-butilo.

En algunas realizaciones de Fórmula (I),  $R^{11b}$  es alquilo  $C_{2-4}$ , que está sustituido con acilamino. En algunas realizaciones,  $R^{11b}$  es  $-(CH_2)_4$ -acilamino. En algunas realizaciones,  $R^{11b}$  es  $-(CH_2)_4$ -NH-C(O)-alquilo  $C_{1-25}$ . En algunas realizaciones,  $R^{11b}$  es  $-(CH_2)_4$ -NH-C(O)-alquilo  $C_{15-25}$ . En algunas realizaciones,  $R^{11b}$  es  $-(CH_2)_4$ -NH-C(O)-alquilo  $C_{15-20}$ . En algunas realizaciones,  $R^{11b}$  es  $-(CH_2)_4$ -NH-C(O)-alquilo  $C_{17}$ .

En determinadas realizaciones, el agonista de TLR7/8 es un compuesto de la siguiente estructura o sales farmacéuticamente aceptables del mismo:

25



En determinadas realizaciones preferidas, un agonista de TLR7/8 usado en las composiciones del presente documento comprende una N-(4-[[4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]oxi]butil)octadecanamida, 3M-052 como se describe en la Pat. de EE.UU. N.º 9.242.980.

30

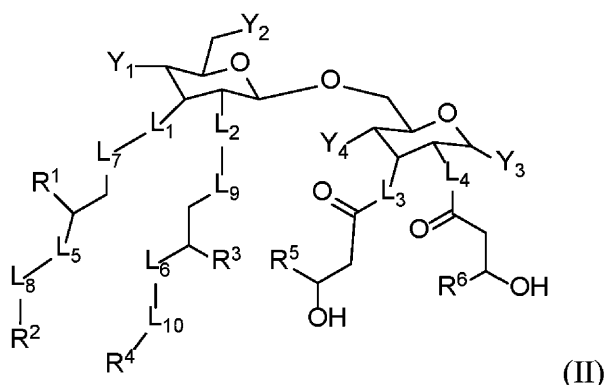
#### Agonistas de TLR4

Un agonista de TLR4 usado en las composiciones del presente documento comprende un adyuvante lipídico de glucopiranosilo (GLA), tal como los descritos en las Publicaciones de Patente de EE.UU. n.º US2007/021017, US2009/045033, US2010/037466 y US 2010/0310602.

35

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante de GLA sintético que tiene la siguiente estructura de Fórmula (II):

40



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

5 L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente -O-, -NH- o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>;

L<sub>7</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub> y L<sub>10</sub> son iguales o diferentes e independientemente están ausentes o son -C(=O)-;

Y<sub>1</sub> es un grupo funcional ácido;

10

Y<sub>2</sub> e Y<sub>3</sub> son iguales o diferentes e independientemente -OH, -SH o un grupo funcional ácido;

Y<sub>4</sub> es -OH o -SH;

15

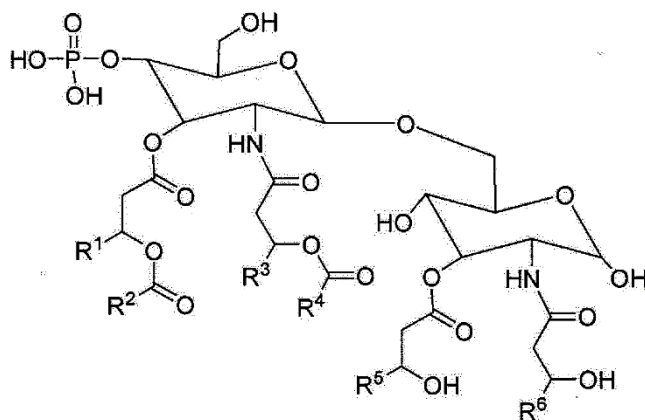
R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>8-13</sub>; y

R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>6-11</sub>.

20

En algunas realizaciones de la estructura de GLA sintético, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>10</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>8</sub>. En determinadas realizaciones, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>9</sub>.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante de GLA sintético que tiene la siguiente estructura de Fórmula (III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(III).

25

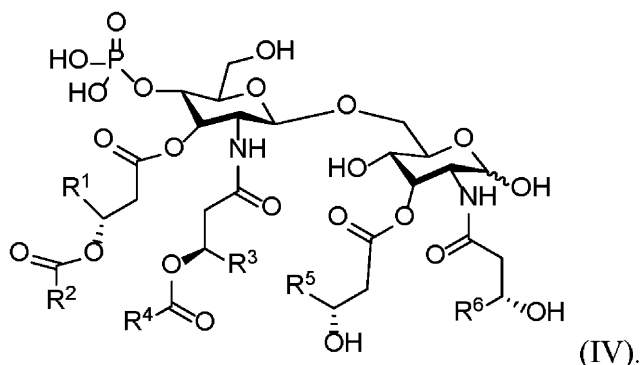
En determinadas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>11-20</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>12-20</sub>. En otra realización específica, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente, en donde R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>13</sub>. En otra realización específica, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente, en donde R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>10</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>8</sub>.

30

En otra realización específica, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente, en donde R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>11-20</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>9-20</sub>. En determinadas realizaciones, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo C<sub>9</sub>.

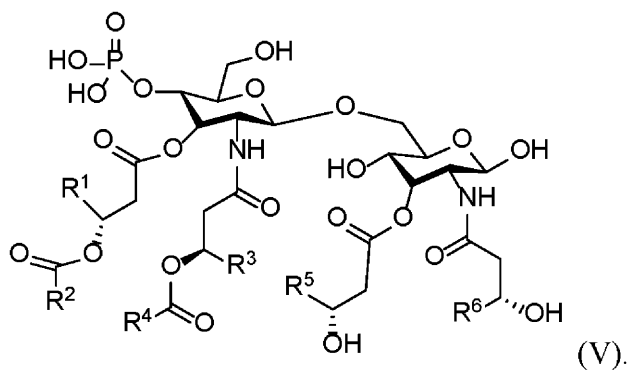
35

En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante de GLA sintético que tiene la siguiente estructura de Fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



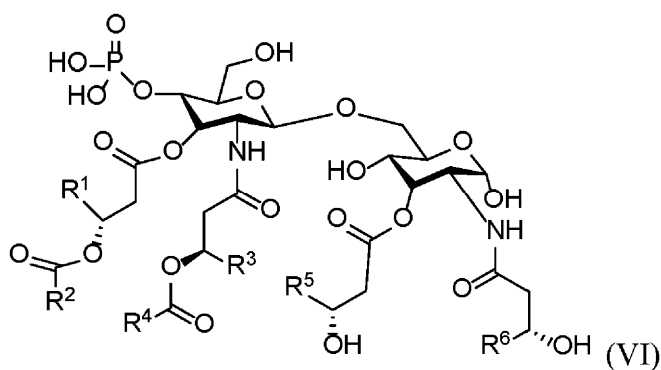
5 En determinadas realizaciones de la estructura de GLA anterior,  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son alquilo  $C_{11}$ - $C_{20}$ ; y  $R^2$  y  $R^4$  son alquilo  $C_9$ - $C_{20}$ . En determinadas realizaciones,  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son alquilo  $C_{11}$ ; y  $R^2$  y  $R^4$  son alquilo  $C_9$ .

En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante de GLA sintético que tiene la siguiente estructura de Fórmula (V):



10 En determinadas realizaciones de la estructura de GLA anterior,  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son alquilo  $C_{11}$ - $C_{20}$ ; y  $R^2$  y  $R^4$  son alquilo  $C_9$ - $C_{20}$ . En determinadas realizaciones,  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son alquilo  $C_{11}$ ; y  $R^2$  y  $R^4$  son alquilo  $C_9$ .

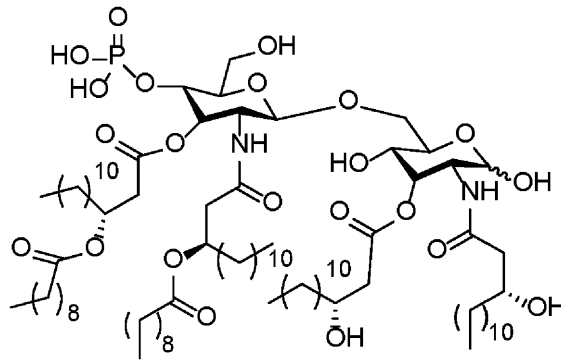
15 En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante de GLA sintético que tiene la siguiente estructura de Fórmula (VI) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



20 En determinadas realizaciones de la estructura de GLA anterior,  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son alquilo  $C_{11}$ - $C_{20}$ ; y  $R^2$  y  $R^4$  son alquilo  $C_9$ - $C_{20}$ . En determinadas realizaciones,  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son alquilo  $C_{11}$ ; y  $R^2$  y  $R^4$  son alquilo  $C_9$ .

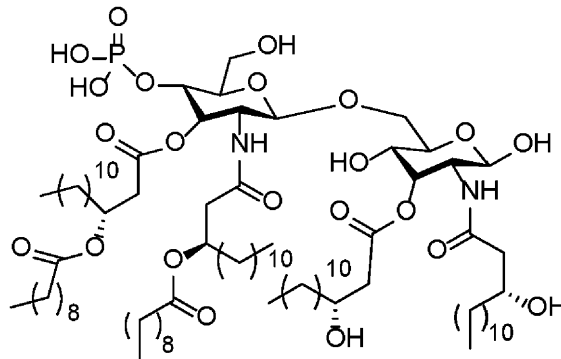
En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante de GLA sintético que tiene la siguiente estructura o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

25



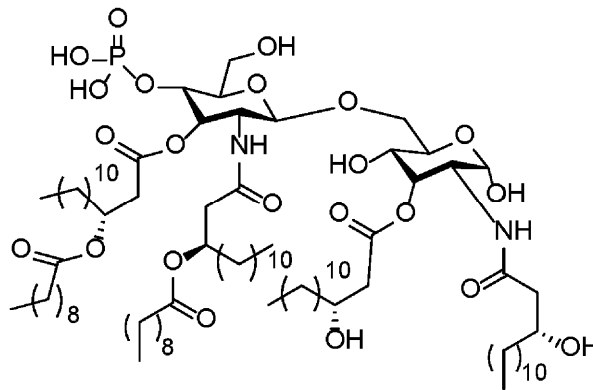
En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante de GLA sintético que tiene la siguiente estructura o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

5



En determinadas realizaciones, el agonista de TLR4 es un adyuvante de GLA sintético que tiene la siguiente estructura o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

10



Se puede incorporar un derivado de lípido A atenuado (ALD, por sus siglas en inglés) en las composiciones descritas en el presente documento. Los ALD son moléculas de tipo lípido A que se han alterado o construido para que la molécula muestre menos o diferentes efectos adversos del lípido A. Estos efectos adversos incluyen pirogenicidad, reactividad local de Shwarzman y toxicidad según se evaluó en el ensayo de dosis letal al 50 % de embrión de pollo (DLEP<sub>50</sub>). Los ALD útiles según la presente descripción incluyen monofosforil lípido A (MLA o MPL) y monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MLA o 3D-MPL). MLA (MPL) y 3D-MLA (3D-MPL) se conocen y no es necesario describirlos en detalle en el presente documento. Véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 4.436.727, expedida el 13 de marzo de 1984, asignada a Ribi ImmunoChem Research, Inc., que describe el monofosforil lípido A y su fabricación. La Pat. de EE.UU. N.º 4.912.094 y certificado de reexamen B1 la Pat. de EE.UU. N.º 4.912.094 cedida a Myers, y col., también asignada a Ribi ImmunoChem Research, Inc., incluye el monofosforil lípido A 3-desacilado y un método para su fabricación. Véanse también, por ejemplo, los documentos GB 2220211 y WO 92/116556. El monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se conoce a partir del documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas y lo fabrica Ribi Immunochem Montana. En la Solicitud de Patente Internacional N.º WO 92/116556 se describe una forma determinada de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado.

15

20

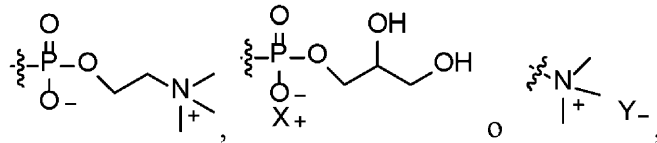
25

En los compuestos agonistas de TLR4 anteriores, la carga global se puede determinar según los grupos funcionales en la molécula. Por ejemplo, un grupo fosfato puede tener carga negativa o ser neutro, dependiendo del estado de ionización del grupo fosfato.

5 El agonista de TLR4 puede ser un adyuvante de GLA sintético que tiene la estructura de Fórmula (III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>13</sub>.

Lípido auxiliar

10 En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es un fosfolípido o un lípido de sal de amonio cuaternario. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es un fosfolípido que es una fosfatidilcolina o un fosfoglicérido. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar comprende cualquiera de los siguientes restos:



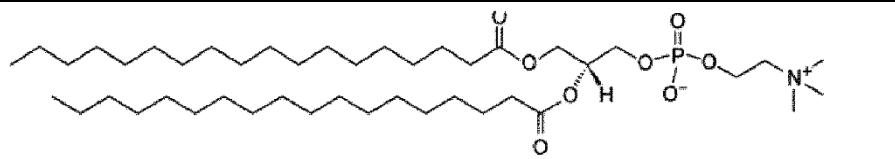
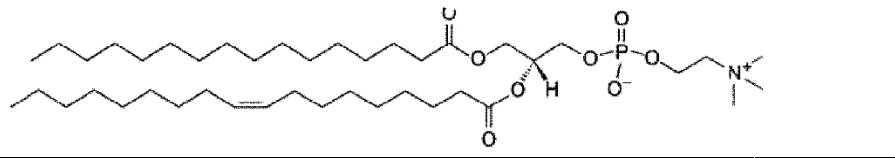
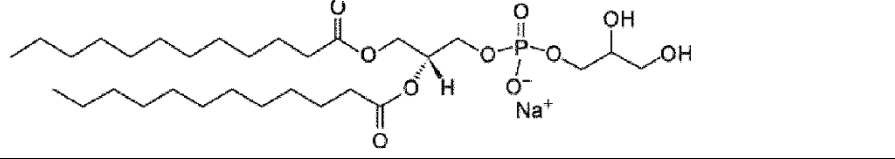
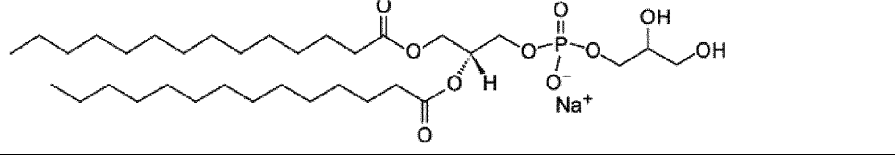
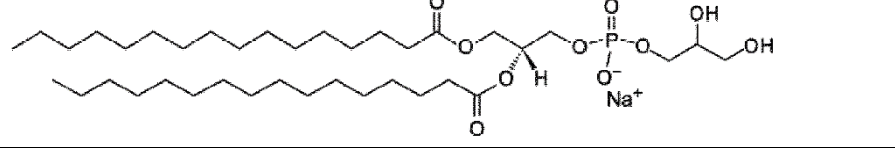
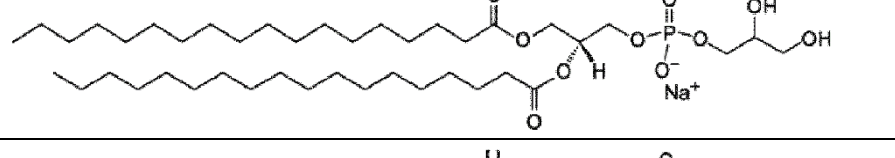
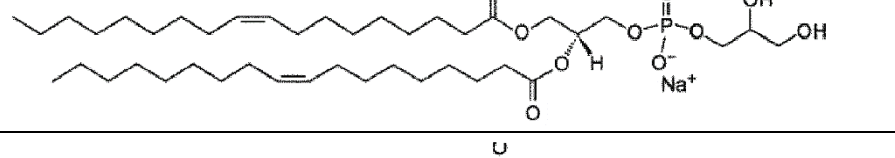
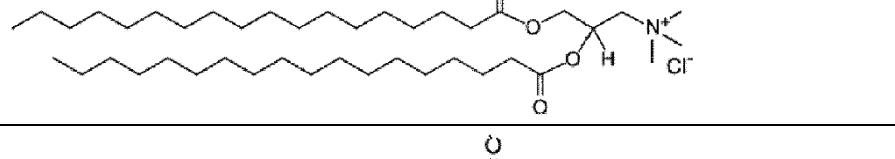
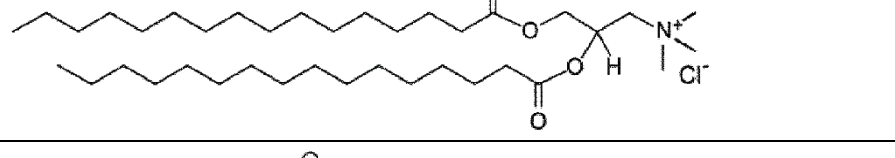
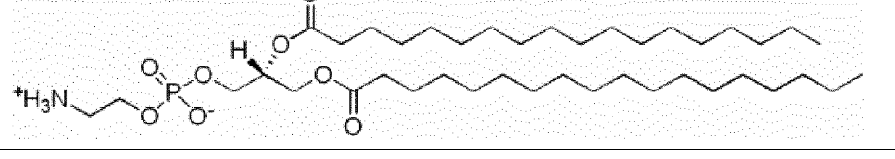
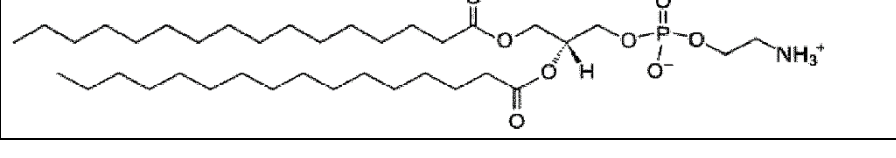
en donde X<sup>-</sup> es un contraión de metal alcalino e Y<sup>+</sup> es un contraión de haluro.

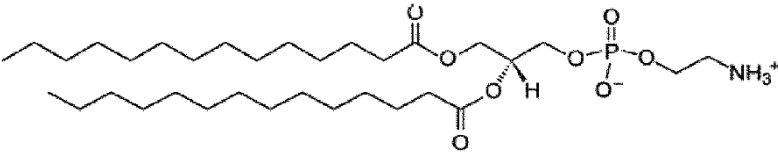
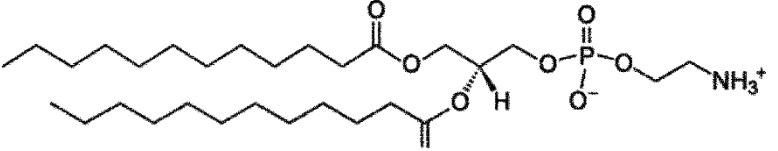
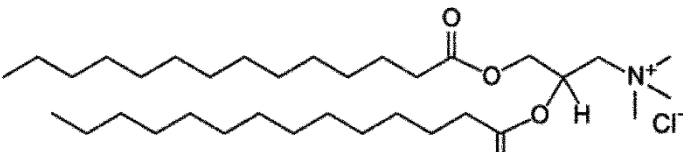
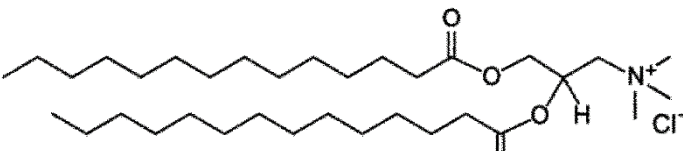
20 En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar comprende una cadena de alquilo C<sub>10-20</sub>. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar comprende una cadena de alquilo C<sub>12-18</sub>.

25 En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es aniónico. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es catiónico. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar está globalmente cargado de forma neutra. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es un zwitterión.

A continuación se muestran lípidos auxiliares.

Polisorbato 80	<p style="text-align: center;"><math>w+x+y+z=20</math></p>
DLPC	
DMPC	
DPPC	
DSPC	

DOPC	
POPC	
DLPG	
DMPG	
DPPG	
DSPG	
DOPG	
DSTAP	
DPTAP	
DSPE	
DPPE	

DMPE	
DLPE	
DMTAP	
DTAP	

En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar se selecciona de DOPG, DSTAP y DPTAP. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar se selecciona de DSTAP y DPTAP.

- 5 El lípido auxiliar es DSPG. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es DSTAP. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es DPTAP.

Sal de aluminio

- 10 Las sales de aluminio adecuadas incluyen hidróxido de aluminio, trihidrato de aluminio, oxihidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, hidroxifosfato sulfato de aluminio y sulfato de potasio y aluminio. También puede hacerse referencia a las sales de aluminio mediante las Fórmulas:  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{AlH}_3\text{O}_3$ ,  $\text{AlH}_6\text{O}_3$ ,  $\text{AlO}(\text{OH})$ ,  $\text{Al}(\text{OH})(\text{PO}_4)$  y  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ . Las sales de aluminio usadas como coadyuvantes son ventajosas porque tienen un buen historial de seguridad, aumentan las respuestas de anticuerpos, estabilizan los antígenos y son relativamente sencillas para la producción a gran escala. (Edelman 2002 Mol. Biotechnol. 21:129-148; Edelman, R. 1980 Rev. Infect. Dis. 2:370-383.)

- 15 En determinadas realizaciones, la sal de aluminio es Alhydrogel®, un hidróxido de aluminio u oxihidróxido de aluminio. Alhydrogel® tiene una carga positiva global y puede adsorber fácilmente restos cargados negativamente. Alhydrogel® también puede denominarse Amphojel; gel de hidróxido de aluminio; alúmina hidratada; trihidróxido de aluminio; o Alugelibe.

- 20 En determinadas realizaciones, la sal de aluminio es AdjuPhos®, un fosfato de aluminio. AdjuPhos® tiene una carga negativa global y puede adsorber fácilmente restos cargados positivamente.

- 25 Formulación acuosa de agonista de TLR y lípido auxiliar

Tamaño

- 30 En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 50 nm a 75 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 50 nm a 100 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 50 nm a 150 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 50 nm a 200 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 20 nm a 100 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 20 nm a 50 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 10 nm a 200 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 10 nm a 100 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 10 nm a 50 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión es aproximadamente 1 nm, es aproximadamente

5 nm, es aproximadamente 10 nm, es aproximadamente 15 nm, es aproximadamente 20 nm, es aproximadamente 25 nm, es aproximadamente 30 nm, es aproximadamente 35 nm, es aproximadamente 40 nm, es aproximadamente 45 nm, es aproximadamente 50 nm, es aproximadamente 55 nm, es aproximadamente 60 nm, es aproximadamente 65 nm, es aproximadamente 70 nm, es aproximadamente 75 nm, es aproximadamente 80 nm, es aproximadamente 85 nm, es aproximadamente 90 nm, es aproximadamente 95 nm, es aproximadamente 100 nm, es aproximadamente 105 nm, es aproximadamente 110 nm, es aproximadamente 115 nm, es aproximadamente 120 nm, es aproximadamente 125 nm, es aproximadamente 130 nm, es aproximadamente 135 nm, es aproximadamente 140 nm, es aproximadamente 145 nm, es aproximadamente 150 nm, es aproximadamente 155 nm, es aproximadamente 160 nm, es aproximadamente 165 nm, es aproximadamente 170 nm, es aproximadamente 175 nm, es aproximadamente 180 nm, es aproximadamente 185 nm, es aproximadamente 190 nm, es aproximadamente 195 nm o es aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión es no superior a aproximadamente 1 nm, no superior a aproximadamente 5 nm, no superior a aproximadamente 10 nm, no superior a aproximadamente 15 nm, no superior a aproximadamente 20 nm, no superior a aproximadamente 25 nm, no superior a aproximadamente 30 nm, no superior a aproximadamente 35 nm, no superior a aproximadamente 40 nm, no superior a aproximadamente 45 nm, no superior a aproximadamente 50 nm, no superior a aproximadamente 55 nm, no superior a aproximadamente 60 nm, no superior a aproximadamente 65 nm, no superior a aproximadamente 70 nm, no superior a aproximadamente 75 nm, no superior a aproximadamente 80 nm, no superior a aproximadamente 85 nm, no superior a aproximadamente 90 nm, no superior a aproximadamente 95 nm, no superior a aproximadamente 100 nm, no superior a aproximadamente 105 nm, no superior a aproximadamente 110 nm, no superior a aproximadamente 115 nm, no superior a aproximadamente 120 nm, no superior a aproximadamente 125 nm, no superior a aproximadamente 130 nm, no superior a aproximadamente 135 nm, no superior a aproximadamente 140 nm, no superior a aproximadamente 145 nm, no superior a aproximadamente 150 nm, no superior a aproximadamente 155 nm, no superior a aproximadamente 160 nm, no superior a aproximadamente 165 nm, no superior a aproximadamente 170 nm, no superior a aproximadamente 175 nm, no superior a aproximadamente 180 nm, no superior a aproximadamente 185 nm, no superior a aproximadamente 190 nm, no superior a aproximadamente 195 nm o no superior a aproximadamente 199 nm.

En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión del agonista de TLR y el lípido auxiliar es no superior a aproximadamente 200 nm, no superior a aproximadamente 205 nm, no superior a aproximadamente 10 nm, no superior a aproximadamente 215 nm, no superior a aproximadamente 220 nm, no superior a aproximadamente 225 nm, no superior a aproximadamente 230 nm, no superior a aproximadamente 235 nm, no superior a aproximadamente 240 nm, no superior a aproximadamente 245 nm, no superior a aproximadamente 250 nm, no superior a aproximadamente 255 nm, no superior a aproximadamente 260 nm, no superior a aproximadamente 265 nm, no superior a aproximadamente 270 nm, no superior a aproximadamente 275 nm, no superior a aproximadamente 280 nm, no superior a aproximadamente 285 nm, no superior a aproximadamente 90 nm, no superior a aproximadamente 295 nm, no superior a aproximadamente 300 nm, no superior a aproximadamente 305 nm, no superior a aproximadamente 310 nm, no superior a aproximadamente 315 nm, no superior a aproximadamente 320 nm, no superior a aproximadamente 325 nm, no superior a aproximadamente 130 nm, no superior a aproximadamente 335 nm, no superior a aproximadamente 140 nm, no superior a aproximadamente 145 nm, no superior a aproximadamente 150 nm, no superior a aproximadamente 355 nm, no superior a aproximadamente 360 nm, no superior a aproximadamente 365 nm, no superior a aproximadamente 370 nm, no superior a aproximadamente 375 nm, no superior a aproximadamente 380 nm, no superior a aproximadamente 385 nm, no superior a aproximadamente 390 nm, no superior a aproximadamente 395 nm, o no superior a aproximadamente 399 nm, no superior a aproximadamente 400 nm; no superior a aproximadamente 405 nm, no superior a aproximadamente 410 nm no superior a aproximadamente 415 nm, no superior a aproximadamente 420 nm, no superior a aproximadamente 425 nm, no superior a aproximadamente 430 nm, no superior a aproximadamente 435 nm, no superior a aproximadamente 440 nm, no superior a aproximadamente 440 nm no superior a aproximadamente 445 nm o no superior a aproximadamente 450 nm.

En algunas realizaciones, la partícula de nanosuspensión puede filtrarse a través de al menos un filtro de 45 micrómetros. En algunas realizaciones, la partícula de nanosuspensión puede filtrarse a través de un filtro de tamaño de poro de 45 micrómetros o menor. En algunas realizaciones, la partícula de nanosuspensión puede filtrarse a través de un filtro de 45 micrómetros. En algunas realizaciones, la partícula de nanosuspensión puede filtrarse a través de un filtro de 20 micrómetros. En algunas realizaciones, la partícula de nanosuspensión puede filtrarse a través de un filtro de 22 micrómetros.

#### Estabilidad

En algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento, el tamaño de 1-450 nm de la partícula de nanosuspensión acuosa que comprende el agonista de TLR (por ejemplo, el agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4) y un lípido auxiliar es estable, ya que se mantiene el tamaño de la partícula de nanosuspensión de menos de 450 nm, y porque la partícula presenta agregación reducida, o ninguna agregación, en comparación con un agonista de TLR en ausencia de un lípido auxiliar de la presente descripción.

“Estable” se refiere a una formulación o composición compuesta por partículas de nanosuspensión que muestra poca o ninguna agregación, o agregación reducida, o demuestra poco o ningún aumento global en el tamaño de

partícula promedio o la polidispersidad) de la formulación en el tiempo en comparación con el tamaño de partícula inicial.

5 La estabilidad de la partícula en nanosuspensión se puede medir mediante técnicas familiares para los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la estabilidad se observa visualmente. La inspección visual puede incluir la inspección de partículas, floculencia o agregados. En algunas realizaciones, la estabilidad está determinada por el tamaño de la partícula de nanosuspensión. Por ejemplo, el tamaño puede evaluarse mediante técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, difracción de rayos X y láser, dispersión de luz dinámica (DLS), CryoEM o Malvern Zetasize. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión se refiere al diámetro Z promedio. La estabilidad se puede evaluar por la capacidad de la partícula de nanosuspensión para pasar a través de un filtro de un tamaño particular, por ejemplo, a través de un filtro de 20, 22 o 45 micrómetros. La estabilidad también se puede determinar por el pH. Como alternativa, la estabilidad se puede determinar mediante la medición del índice de polidispersidad (Pdl), por ejemplo, con el uso de la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS).

15 En algunas realizaciones, el diámetro Z promedio de la partícula de nanosuspensión aumenta menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 12 %, menos del 10 %, menos del 7 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 % durante el período de tiempo ensayado.

20 En algunas realizaciones, la partícula de nanosuspensión es estable a 2-8 °C. En algunas realizaciones, la partícula de nanosuspensión es estable durante al menos 6 meses, durante al menos 7 meses, durante al menos 8 meses, durante al menos 9 meses, durante al menos 10 meses, durante al menos 11 meses, durante al menos 1 año, durante al menos 2 años o durante al menos 5 años.

25 Combinación de agonista de TLR, lípido auxiliar y sal de aluminio

30 Como se ha indicado anteriormente, se proporciona una formulación acuosa estable de adyuvante que comprende un agonista de TLR con un lípido auxiliar que se adsorbe en una sal de aluminio. La presente descripción proporciona una formulación acuosa estable de adyuvante que comprende un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 con un lípido auxiliar que se adsorbe en una sal de aluminio.

35 Los factores que se relacionan con la selección de cada uno de los componentes incluyen, pero sin limitación, las cargas de los componentes y la presencia de ligandos intercambiables. Con una selección adecuada de los componentes, el agonista de TLR y el lípido auxiliar son adecuados para ser adsorbidos en la sal de aluminio. En determinadas realizaciones, la adsorción se produce en condiciones *in vitro*.

40 La unión o adsorción se refiere a una interacción entre moléculas o partes de las mismas que presentan afinidad mutua o capacidad de unión, típicamente debido a una unión o interacción específica o inespecífica, incluyendo, pero sin limitación, interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o químicas. En determinadas realizaciones, la unión a una sal de aluminio puede determinarse mediante estudios de espectroscopía UV, SDS-PAGE o centrifugación.

45 En algunas realizaciones, al menos el 25 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 %, del agonista de TLR con el lípido auxiliar presente en la composición se asocia con partículas de alumbre. En el Ejemplo 1 se demuestra un método ilustrativo para determinar el porcentaje de asociación.

50 La adsorción sobre una sal de aluminio puede tener lugar generalmente, pero sin limitación, mediante los siguientes mecanismos: interacción electrostática e intercambio de ligandos. La interacción electrostática usa la presencia de cargas opuestas en los componentes bajo una determinada condición de solución. El intercambio de ligandos usa un grupo fosfato en uno de los componentes para el intercambiarlo con un grupo hidroxilo de otro componente. Para el intercambio de ligandos, se usan grupos fosfato accesibles y grupos hidroxilo en los componentes. Para preparar una composición vacunal con un antígeno en combinación con la composición adyuvante que comprende un agonista de TLR, un lípido auxiliar y una sal de aluminio, se tiene en cuenta la carga y la presencia de grupos fosfato e hidroxilo en el antígeno.

55 Intercambio de ligandos

Con respecto al mecanismo de intercambio de ligandos, puede haber intercambio de ligandos entre el antígeno y la composición adyuvante que comprende agonista de TLR, el lípido auxiliar y la sal de aluminio.

60 Puede haber intercambio de ligandos entre los componentes de la composición adyuvante (por ejemplo, agonista de TLR, lípido auxiliar y sal de aluminio). Como se ha indicado anteriormente, determinados componentes en la composición adyuvante comprenden grupos fosfato, mientras que otros determinados componentes comprenden grupos hidroxilo, lo que permite el intercambio de ligandos. Por ejemplo, determinados agonistas de TLR4 comprenden grupos fosfato. Además, determinados lípidos auxiliares comprenden grupos fosfato. Además, AdjuPhos® comprende grupos fosfato. Los grupos hidroxilo están presentes en los siguientes componentes: antígenos, agonistas de TLR, lípido auxiliar y Alhydrogel®.

Interacción electrostática

5 Con respecto al mecanismo de interacción electrostática, una composición vacunal se carga sustancialmente de forma neutra a un pH aproximadamente fisiológico.

10 Si se carga el antígeno para una composición vacunal, los componentes para la composición adyuvante (por ejemplo, agonista de TLR, lípido auxiliar y sal de aluminio) se pueden seleccionar para neutralizar la carga del antígeno para proporcionar una composición de vacuna con carga sustancialmente neutra. Si el antígeno para la composición vacunal tiene una carga sustancialmente neutra, los componentes de la composición adyuvante (por ejemplo, agonista de TLR, lípido auxiliar y sal de aluminio) se pueden seleccionar para mantener la carga sustancialmente neutra del antígeno para proporcionar una composición vacunal con carga sustancialmente neutra. Como se ha indicado anteriormente, cada uno de los componentes de la composición adyuvante se puede caracterizar por tener carga negativa, carga positiva o carga neutra.

15 Una composición de formulación comprende un agonista de TLR, un lípido auxiliar y una sal de aluminio, en donde los componentes se seleccionan con las características de la siguiente tabla.

Agonista de TLR	Lípido auxiliar	Sal de aluminio	Antígeno
Carga sustancialmente neutra	Suficiente para solubilizar el agonista de TLR	Comprende carga para neutralizar la carga del antígeno	Comprende carga para neutralizar la carga de la sal de aluminio
Carga positiva	Suficiente para solubilizar la composición	Comprende carga para neutralizar la carga del agonista de TLR y el antígeno	Comprende carga

20 Una composición de formulación comprende un agonista de TLR, un lípido auxiliar y una sal de aluminio, en donde los componentes se seleccionan de la siguiente tabla.

Agonista de TLR	Lípido auxiliar	Sal de aluminio
Agonista de TLR7/8 (por ejemplo, 3M-052)	DSPG	Alhydrogel®
	DLPG	
	DMPG	
	DPPG	
	DOPG	
Agonista de TLR7/8 (por ejemplo, 3M-052)	DSPG	Alhydrogel®
Agonista de TLR7/8 (por ejemplo, 3M-052)	DSTAP	AdjuPhos®
Agonista de TLR4 (por ejemplo, GLA)	DPPC	Alhydrogel®
	DPTAP	
Agonista de TLR4 (por ejemplo, GLA)	DPTAP	AdjuPhos®
Agonista de TLR4 (por ejemplo, GLA)	DSTAP, DMTAP, DTAP	AdjuPhos®

25 Proceso de fabricación de composiciones

La presente descripción proporciona un proceso para preparar una formulación acuosa o polisorbato 80 que comprende un agonista de TLR (por ejemplo, un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4) y un lípido auxiliar; en donde el método comprende

- 30 (a) mezclar un agonista de TLR (por ejemplo, un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4) y un lípido auxiliar en disolvente para preparar la solución;
- 35 (b) eliminar el disolvente de la solución de la etapa (a) para preparar una composición de película; y
- (c) rehidratar la composición de película de la etapa (c) para preparar una composición rehidratada; y
- (d) someter la composición rehidratada a una fuente de alta energía para preparar una composición de nanosuspensión.

40

(e) comprendiendo además mezclar una sal de aluminio con la nanosuspensión

El disolvente puede tener un punto de ebullición bajo. Los disolventes que son adecuados para el proceso incluyen, pero sin limitación, cloroformo, cloruro de metileno, metanol y agua. El disolvente puede ser cloroformo, o el disolvente comprende cloroformo, metanol y agua.

La mezcla de un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y un lípido auxiliar puede estar en una relación de aproximadamente 1:2 del agonista de TLR7/8 o del agonista de TLR4 con respecto al lípido auxiliar.

La mezcla de los componentes en la etapa (a) se puede realizar a temperatura ambiente o con un ligero calentamiento. El calentamiento ligero puede ser un calentamiento hasta 30, 35 o 40 °C.

En la etapa (b) del proceso, el disolvente se elimina con un ligero calentamiento o presión reducida. El disolvente se puede eliminar con presión reducida. La presión reducida es una presión que es más baja que la presión atmosférica.

En la etapa (c), la composición de la película se rehidrata. Un disolvente adecuado para la rehidratación es el agua. El agua puede ser agua ultrapura.

En la etapa (d), la composición rehidratada se somete a una fuente de alta energía para preparar una composición de nanosuspensión. La composición rehidratada se agita. Un método de agitación es la sonicación. La sonicación puede tener lugar hasta durante varias horas. Se continúa la agitación hasta que la composición es translúcida. La agitación se continúa hasta que la composición prácticamente no tiene partículas visibles. Una solución es translúcida como lo demuestra una lectura por espectroscopía UV, un turbidímetro o dispersión de luz dinámica.

En la etapa (d), la composición rehidratada se puede procesar o moler. El procesamiento o la molienda se producen usando técnicas estándar conocidas en la técnica incluyendo sonicación, mezcla de Silverson y microfluidización.

En algunas realizaciones, la fuente de alta energía proporciona al menos 2.000 PSI, al menos 3.000, 5.000 PSI, al menos 10.000 PSI, al menos 15.000 PSI, al menos 20.000 PSI, al menos 25.000 PSI, al menos 30.000 PSI, al menos 35.000 PSI, al menos 40.000 PSI, al menos 45.000 PSI o al menos 50.000 PSI. En algunas realizaciones, la fuente de alta energía proporciona de aproximadamente 5.000 a 50.000; de 5.000 a 10.000; de 5.000 a 15.000; de 5.000 a 20.000; de 5.000 a 25.000; de 5.000 a 30.000; de 5.000 a 35.000; de 5.000 a 40.000; de 5.000 a 45.000; o de 5.000 a 50.000 PSI. En algunas realizaciones, la fuente de alta energía proporciona de aproximadamente 45.000 a 50.000; de 40.000 a 50.000; de 35.000 a 50.000; de 30.000 a 50.000; de 25.000 a 50.000; de 20.000 a 50.000; de 15.000 a 50.000; de 10.000 a 50.000; o de 5.000 a 50.000 PSI. En algunas realizaciones, la fuente de alta energía proporciona de aproximadamente 25.000 a 35.000; de 25.000 a 30.000; o de 30.000 a 35.000 PSI. En algunas realizaciones, la fuente de alta energía proporciona aproximadamente 30.000 PSI.

En algunas realizaciones, la fuente de alta energía es una fuente de alto cizallamiento.

En algunas realizaciones, la fuente de alta energía es un microfluidificador. Se usa microfluidización para describir un proceso en el que las composiciones se exponen a una alta fuerza de cizallamiento. En algunas realizaciones, las composiciones se procesan mediante un instrumento o un dispositivo conocido como MICROFLUIDIZER®.

En algunas realizaciones, la fuente de alta energía es una extrusora.

En algunas realizaciones, la fuente de alta energía es un sonicador.

En algunas realizaciones, la fuente de alta energía es un homogeneizador.

En algunas realizaciones, la composición se somete al menos a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 50 o 100 pasadas de la alta fuerza de cizallamiento. En algunas realizaciones, la composición se somete a 1-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 o 91-100 pasadas de la alta fuerza de cizallamiento. En algunas realizaciones, la composición se somete a 3, 6 o 10 pasadas de la alta fuerza de cizallamiento.

En determinadas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de tamaño desde aproximadamente 1 nm a 450 nm, tal como menos de aproximadamente 400 nm o menos de aproximadamente 200 nm.

En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 50 nm a 75 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 50 nm a 100 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 50 nm a 150 nm. En

5 algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 50 nm a 200 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 20 nm a 100 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 20 nm a 50 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 10 nm a 200 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 10 nm a 100 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión varía de aproximadamente 10 nm a 50 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión es aproximadamente 1 nm, es aproximadamente 5 nm, es aproximadamente 10 nm, es aproximadamente 15 nm, es aproximadamente 20 nm, es aproximadamente 25 nm, es aproximadamente 30 nm, es aproximadamente 35 nm, es aproximadamente 40 nm, es aproximadamente 45 nm, es aproximadamente 50 nm, es aproximadamente 55 nm, es aproximadamente 60 nm, es aproximadamente 65 nm, es aproximadamente 70 nm, es aproximadamente 75 nm, es aproximadamente 80 nm, es aproximadamente 85 nm, es aproximadamente 90 nm, es aproximadamente 95 nm, es aproximadamente 100 nm, es aproximadamente 105 nm, es aproximadamente 110 nm, es aproximadamente 115 nm, es aproximadamente 120 nm, es aproximadamente 125 nm, es aproximadamente 130 nm, es aproximadamente 135 nm, es aproximadamente 140 nm, es aproximadamente 145 nm, es aproximadamente 150 nm, es aproximadamente 155 nm, es aproximadamente 160 nm, es aproximadamente 165 nm, es aproximadamente 170 nm, es aproximadamente 175 nm, es aproximadamente 180 nm, es aproximadamente 185 nm, es aproximadamente 190 nm, es aproximadamente 195 nm o es aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula de nanosuspensión es no superior a aproximadamente 1 nm, no superior a aproximadamente 5 nm, no superior a aproximadamente 10 nm, no superior a aproximadamente 15 nm, no superior a aproximadamente 20 nm, no superior a aproximadamente 25 nm, no superior a aproximadamente 30 nm, no superior a aproximadamente 35 nm, no superior a aproximadamente 40 nm, no superior a aproximadamente 45 nm, no superior a aproximadamente 50 nm, no superior a aproximadamente 55 nm, no superior a aproximadamente 60 nm, no superior a aproximadamente 65 nm, no superior a aproximadamente 70 nm, no superior a aproximadamente 75 nm, no superior a aproximadamente 80 nm, no superior a aproximadamente 85 nm, no superior a aproximadamente 90 nm, no superior a aproximadamente 95 nm, no superior a aproximadamente 100 nm, no superior a aproximadamente 105 nm, no superior a aproximadamente 110 nm, no superior a aproximadamente 115 nm, no superior a aproximadamente 120 nm, no superior a aproximadamente 125 nm, no superior a aproximadamente 130 nm, no superior a aproximadamente 135 nm, no superior a aproximadamente 140 nm, no superior a aproximadamente 145 nm, no superior a aproximadamente 150 nm, no superior a aproximadamente 155 nm, no superior a aproximadamente 160 nm, no superior a aproximadamente 165 nm, no superior a aproximadamente 170 nm, no superior a aproximadamente 175 nm, no superior a aproximadamente 180 nm, no superior a aproximadamente 185 nm, no superior a aproximadamente 190 nm, no superior a aproximadamente 195 nm o no superior a aproximadamente 199 nm.

35 La formulación acuosa se puede mezclar adicionalmente con una sal de aluminio, como se describe en el presente documento.

La formulación acuosa se puede mezclar adicionalmente con un antígeno, como se describe en el presente documento.

40 La formulación acuosa se puede mezclar adicionalmente con una sal de aluminio y un antígeno, como se describe en el presente documento.

La presente descripción proporciona productos fabricados mediante cualquiera de los procesos anteriores.

45 Agentes

La formulación acuosa proporcionada en el presente documento puede comprender además uno o más agentes, en donde el agente puede ser un polipéptido, un polinucleótido, un antígeno, un adyuvante, un agente de diagnóstico, un agente terapéutico, un organismo, un genoma o un virus. En algunas realizaciones, la formulación acuosa comprende dos o más agentes. En algunas realizaciones, el agente se asocia con la formulación acuosa. En algunas realizaciones, el agente se asocia con la formulación acuosa mediante intercambio de ligandos y/o mediante una interacción electrostática (basada en la carga).

Polipéptidos

55 En algunas realizaciones, el agente es un polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido es una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, el polipéptido es un péptido. En algunas realizaciones, el polipéptido es una proteína de fusión. En algunas realizaciones particulares, la proteína de fusión es capaz de provocar una respuesta inmunitaria tras la administración a un individuo. En algunas realizaciones, el polipéptido es un antígeno, como se describe más adelante.

60 Antígenos

En una realización, el agente comprende un antígeno.

65 En algunas realizaciones, el antígeno polipeptídico está implicado en, o se obtiene de, una alergia, cáncer o enfermedad infecciosa.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son útiles para fines de vacunación y se proporcionan como formulaciones vacunales (composiciones vacunales).

5 Un antígeno puede ser cualquier epítipo diana, molécula (incluida una biomolécula), complejo molecular (incluidos los complejos moleculares que contienen biomoléculas), ensamblaje subcelular, célula o tejido contra el que se desea provocar o potenciar la inmunorreactividad en un sujeto. Con frecuencia, el término antígeno se referirá a un antígeno polipeptídico de interés. Sin embargo, como se usa en el presente documento, antígeno también puede referirse a una construcción recombinante que codifica un antígeno polipeptídico de interés (por ejemplo, una construcción de expresión). En determinadas realizaciones, el antígeno puede ser, o puede derivar de, o puede tener reacción cruzada inmunológica con un patógeno infeccioso y/o un epítipo, biomolécula, célula o tejido que está asociado con una infección, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, alergia, asma, o cualquier otra afección en donde sería deseable o beneficiosa la estimulación de una respuesta inmunitaria específica de antígeno.

15 Determinadas realizaciones contemplan un antígeno que se obtiene de al menos un patógeno infeccioso tal como una bacteria, un virus o un hongo, incluyendo una *Actinobacterium* tal como *M. tuberculosis* o *M. leprae* u otra micobacteria; una bacteria tal como un miembro del género *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Chlamydia* o *Bordetella*; un virus tal como un virus del herpes simple, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), citomegalovirus, virus de la varicela zoster, virus de la hepatitis, virus de Epstein Barr (VEB), virus respiratorio sincitial, virus del papiloma humano (VPH) y un citomegalovirus; VIH tal como VIH-1 o VIH-2; un hongo, tal como *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* y *Pneumocysti* o una levadura, incluyendo especies de *Candida* tales como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*; un parásito tal como un protozoo, por ejemplo, una especie de *Plasmodium*, incluyendo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; u otro parásito tal como uno o más de *Acanthamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Angiostrongylus*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Cryptosporidium*, *Ancylostoma*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Wuchereria bancrofti*, *Giardia* y *Leishmania*. En realizaciones específicas, el antígeno puede provenir de o estar relacionado con antígenos implicados en tuberculosis, gripe, amebiasis, VIH, hepatitis o leishmaniasis.

30 En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno relacionado con la amebiasis. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno que provoca amebiasis. En algunas realizaciones, el antígeno procede de un organismo que provoca amebiasis. En algunas realizaciones, el antígeno es de *Entamoeba histolytica*. En una realización, el antígeno comprende LecA. En una realización, el antígeno es LecA.

35 En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno relacionado con la gripe. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno que provoca la gripe. En algunas realizaciones, el antígeno es de un virus que provoca la gripe. En una realización, el antígeno comprende H5N1. En una realización, el antígeno comprende H5N1.

40 Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los antígenos se obtienen de *Borrelia sp.*, los antígenos pueden incluir ácido nucleico, antígenos o preparaciones antigénicas procedentes de patógenos, proteínas o péptidos producidos de forma recombinante y proteínas de fusión quiméricas. Uno de tales antígenos es OspA. OspA puede ser una proteína completamente madura en forma lipídica en virtud de su biosíntesis en una célula huésped (Lipo-OspA) o, como alternativa, puede ser un derivado no lipídico. Dichos derivados no lipídicos incluyen la proteína de fusión NS1-OspA no lipídica que tiene los primeros 81 aminoácidos del extremo N de la proteína no estructural (NS1) del virus de la gripe, y la proteína OspA completa, y otra, MDP-OspA es una forma no lipídica de OspA que lleva 3 aminoácidos del extremo N adicionales.

50 En determinadas realizaciones, el antígeno se obtiene de un virus tal como VIH-1 (tal como tat, nef, gp120 o gp160), virus del herpes humano, tal como gD o derivados del mismo, o una proteína temprana inmediata tal como ICP27 de HSV1 o HSV2, citomegalovirus (esp. humana) (tal como gB o derivados del mismo), rotavirus (incluyendo virus vivos atenuados), virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), virus de la varicela zóster (tal como gpl, II e IE63), o de un virus de la hepatitis tal como virus de la hepatitis B (por ejemplo, el antígeno de superficie de la hepatitis B o un derivado del mismo), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E, o de otros patógenos virales, tales como paramixovirus: Virus sincitial respiratorio (tal como las proteínas F y G o derivados de las mismas), virus paragrafiales, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo, VPH6, 11, 16, 18, etc.), flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la gripe (virus entero vivo o inactivado, virus de la gripe dividido, cultivado en huevos o células MDCK, o virosomas enteros de la gripe (según lo descrito por Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas).

65 En determinadas realizaciones diferentes, el antígeno se obtiene de uno o más patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*;

5 *Moraxella* spp, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella* spp, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina de la tos ferina o derivados de la misma, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclase, fimbrias), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium* spp., incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo, ESAT6, antígeno 85A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella* spp, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia* spp, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo, factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena (por ejemplo, toxina similar a la toxina shiga o derivados de la misma); *Vibrio* spp, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo, toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella* spp, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter* spp, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella* spp, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria* spp., incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter* spp, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); *Pseudomonas* spp, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus* spp., incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus* spp., incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium* spp., incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina tetánica y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas A o B de clostridium y derivados de las mismas); *Bacillus* spp., incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium* spp., incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina diftérica y derivados de la misma); *Borrelia* spp., incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis monocítica humana; *Rickettsia* spp, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp. incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira* spp., incluyendo *L. interrogans*; *Treponema* spp., incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo, las raras proteínas de la membrana externa), *T. denticola*, *T. hydovysenteriae*; u otros patógenos bacterianos.

25 En determinadas realizaciones diferentes, el antígeno se obtiene de uno o más parásitos (véanse, por ejemplo, John, D.T. y Petri, W.A., Markell y Voge's Medical Parasitology-9ª Ed., 2006, WB Saunders, Filadelfia; Bowman, D.D., Georgis' Parasitology for Veterinarians-8ª Ed., 2002, WB Saunders, Filadelfia), tal como *Plasmodium* spp., incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma* spp., incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba* spp., incluyendo *E. histolytica*; *Babesia* spp., incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma* spp., incluyendo *T. cruzi*; *Giardia* spp., incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania* spp., incluyendo *L. major*; *Pneumocystis* spp., incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas* spp., incluyendo *T. vaginalis*; o de un helminto capaz de infectar a un mamífero, tal como: (i) infecciones por nematodos (incluyendo, pero sin limitación, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Dracanculus medinensis*, *Trichinella spiralis* y *Strongyloides stercoralis*); (ii) infecciones por trematodos (incluyendo, pero sin limitación, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Opisthorchis sinensis*, *Paragonimus sp*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola magna*, *Fasciola gigantica*); y (iii) infecciones por cestodos (incluyendo, pero sin limitación, *Taenia saginata* y *Taenia solium*). En determinadas realizaciones, el antígeno se obtiene de *Schistosoma* spp., *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* y/o *Schistosoma japonicum*, o se obtiene de levadura, tal como *Candida* spp., incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus* spp., incluyendo *C. neoformans*.

45 Otros antígenos específicos se obtienen de *M. tuberculosis*, por ejemplo, Th Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (documento WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas en donde al menos dos, tres o cuatro o más polipéptidos de *M. tuberculosis* se fusionan en una proteína más grande. Determinadas fusiones incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99151748). Otros antígenos que pueden usarse incluyen antígenos, combinación de antígenos y proteínas de fusión descritos en los documentos US 2010/0129391 y WO 2008/124647. En una realización ilustrativa, la proteína de fusión es ID93. En una realización ilustrativa, la proteína de fusión es ID91.

50 Otros antígenos específicos se obtienen de Chlamydia e incluyen, por ejemplo, la proteína de alto peso molecular (HWMP, por sus siglas en inglés) (documento WO 99/17741), ORF3 (EP 366 412) y proteínas de membrana putativas (Pmps). Se pueden seleccionar otros antígenos de Chlamydia del grupo descrito en el documento WO 99128475. Determinados antígenos pueden obtenerse de *Streptococcus* spp, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y el antígeno proteico neumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins y col., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y derivados mutantes destoxificados del mismo (documento WO 90/06951; documento WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas comprenden antígenos obtenidos de *Haemophilus* spp., incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo, PRP y conjugados del mismo), *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria (Pat. de EE.UU. N.º 5.843.464) o variantes de múltiples copias o proteínas de fusión de los mismos.

65 Otros antígenos específicos se obtienen de la hepatitis B. Los derivados del antígeno de superficie de la hepatitis B se conocen bien en la técnica e incluyen, entre otros, los antígenos S PreS1, Pars2 expuestos y descritos en

las Solicitudes de Patente Europea EP-A414 374; EP-A-0304 578 y EP 198474. En un aspecto, el antígeno es gp120 del VIH-1, especialmente cuando se expresa en células CHO. En otra realización, el antígeno es gD2t.

En otras realizaciones, el antígeno se obtiene del virus del papiloma humano (VPH) que se considera responsable de las verrugas genitales (VPH 6 o VPH 11 y otros), y los virus VPH responsables del cáncer de cuello del útero (VPH16, VPH18 y otros). Los antígenos particulares incluyen partículas L1 o capsómeros y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de las proteínas E6, E7, L1 y L2 de VPH 6 y VPH 11. Determinadas formas de proteína de fusión incluyen L2E7, como se describe en el documento WO 96/26277, y la proteína D(1/3)-E7, que se describe en el documento GB 9717953.5 (documento PCT/EP98/05285). Los posibles antígenos adicionales incluyen los antígenos VPH 16 o 18. Por ejemplo, los monómeros de antígeno L1 o L2, o los antígenos L1 o L2 presentados juntos como una partícula de tipo virus (VLP, por sus siglas en inglés) o la proteína L1 sola presentada sola en una VLP o estructura de capsómero. Dichos antígenos, partículas de tipo virus y capsómeros son conocidos *per se*. Véanse, por ejemplo, los documentos WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792 y WO93/02184.

En otras realizaciones, el antígeno es una proteína de fusión. Las proteínas de fusión pueden incluirse solas o como proteínas de fusión tales como E7, E2 o F5, por ejemplo; las realizaciones particulares incluyen una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (documento WO 96/11272). Los antígenos de VPH 16 particulares comprenden las proteínas tempranas E6 o F7 en fusión con un portador de proteína D para formar fusiones de Proteína D-E6 o E7 a partir del VPH 16, o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (documento WO 96/26277). Como alternativa, las proteínas tempranas E6 y E7 de VPH 16 o 18 pueden presentarse en una sola molécula, por ejemplo, una fusión de proteína D-E6/E7. Las composiciones pueden contener opcionalmente una o ambas proteínas E6 y E7 frente al VPH 18, por ejemplo, en forma de la proteína de fusión proteína D-E6 o proteína D-E7 o la proteína de fusión proteína D E6/E7. Las composiciones pueden comprender adicionalmente antígenos de otras cepas del VPH, por ejemplo, de las cepas VPH 31 o 33.

Los antígenos también pueden obtenerse de parásitos que causan malaria. Por ejemplo, los antígenos de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS,S y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la porción del extremo C de la proteína circumsporozoite (CS) de *P. falciparum* unida a través de cuatro aminoácidos de la porción preS2 del antígeno de superficie de la hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de la hepatitis B. Su estructura completa se describe en la Solicitud de Patente Internacional n.º PCT/EP92/02591, publicada como documento WO 93/10152, que reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente del Reino Unido n.º 9124390.7. Cuando se expresa en levadura, RTS se produce como una partícula de lipoproteína, y cuando se expresa conjuntamente con el antígeno S del VHB, produce una partícula mixta conocida como RTS,S.

Los antígenos TRAP se describen en la Solicitud de Patente Internacional n.º PCT/GB89/00895, publicada como documento WO 90/01496. Una realización de la presente invención es una vacuna contra la malaria en donde la preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS, S y TRAP. Otros antígenos de plasmodios que son candidatos probables para ser componentes de una vacuna contra la malaria en múltiples etapas son MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, sequestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 de *P. faciparum* y sus análogos en *Plasmodium spp.*

En una realización, el antígeno se obtiene de una célula cancerosa, ya que puede ser útil para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, el antígeno puede ser un antígeno de rechazo tumoral tal como los de los cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, páncreas, riñón o melanoma. Los antígenos cancerosos o procedentes de células cancerosas ilustrativos incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 u otros antígenos MAGE tales como los descritos en el documento WO99/40188, PRAME, BAGE, Lage (también conocido como NY Eos 1) SAGE y HAGE (documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996 Current Opinions in Immunology 8, págs. 628-636; Van den Eynde y col., International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997 & 1998); Correale y col. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, pág. 293. Estos ejemplos no limitativos de antígenos de cáncer se expresan en una amplia gama de tipos de tumores tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 6.544.518.

Otros antígenos específicos de tumor incluyen, pero sin limitación, gangliósidos específicos de tumor o asociados a tumor tales como GM<sub>2</sub> y GM<sub>3</sub> o conjugados de los mismos con proteínas portadoras; o una hormona peptídica propia tal como la hormona liberadora de la hormona gonadotropina de longitud completa (GnRH, documento WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, útil en el tratamiento de muchos cánceres. En otra realización, se usan antígenos prostáticos, tales como el antígeno específico de próstata (PSA), PAP, PSCA (por ejemplo, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95(4) 1735-1740 1998), PSMA o, en una realización, un antígeno conocido como prostasa. (por ejemplo, Nelson, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 3114-3119; Ferguson, y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999. 96, 3114-3119; documento WO 98/12302; Pat. de EE.UU. N.º 5.955.306; documento WO 98/20117; Pat. de EE.UU. n.º 5.840.871 y 5.786.148; documento WO 00/04149. Se conocen otros antígenos específicos de próstata a partir de los documentos WO 98/137418 y WO/004149. Otro es STEAP (PNAS 96 14523 14528 7-12 1999).

Otros antígenos asociados a tumor útiles en el contexto de la presente invención incluyen: Plu-1 (JBiol. Chem 274 (22) 15633-15645, 1999), HASH-1, HasH-2, cripto (Salomon y col. Bioessays 199, 21:61-70, Pat. de EE.UU. N.º 5.654.140) y criptina (Pat. de EE.UU. n.º 5.981.215). Además, los antígenos particularmente relevantes para las vacunas en la terapia del cáncer también comprenden tirosinasa y survivina.

Las composiciones de la presente descripción serán particularmente aplicables en el tratamiento de ancianos y/o sujetos inmunosuprimidos, incluyendo sujetos en diálisis renal, sujetos en quimioterapia y/o radioterapia, receptores de trasplantes y similares. Dichos individuos generalmente presentan respuestas inmunitarias disminuidas a las vacunas y, por lo tanto, el uso de las composiciones de la presente descripción puede mejorar las respuestas inmunitarias logradas en estos sujetos.

Los agentes usados en las composiciones de la invención incluyen antígenos asociados con enfermedades respiratorias, tales como las causadas o exacerbadas por una infección bacteriana (por ejemplo, neumocócica), para la profilaxis y terapia de afecciones tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC se define fisiológicamente por la presencia de obstrucción irreversible o parcialmente reversible de las vías respiratorias en pacientes con bronquitis crónica y/o enfisema (Am J Respir Crit Care Med. noviembre de 1995; 152(5 Pt 2):S77-121). Las exacerbaciones de la EPOC a menudo son causadas por una infección bacteriana (por ejemplo, neumocócica) (Clin Microbiol Rev. abril de 2001; 14(2):336-63).

#### Polinucleótidos

En algunas realizaciones, el agente es un polinucleótido. Un polinucleótido incluye, pero sin limitación, un ADN, un ARN, un aptámero y un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido es ADN. En algunas realizaciones, el polinucleótido es ARN. En algunas realizaciones, el ADN o el ARN es monocatenario o bicatenario. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un ARN no codificante. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un ARN codificante. En algunas realizaciones, el ARN se selecciona del grupo que consiste en replicón de ARN, ARNm, ARNt, ARNip, ARNhc y microARN.

En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica un polipéptido que es un antígeno o comprende un antígeno. En algunas realizaciones, el polipéptido codificado por el polinucleótido es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, el polipéptido codificado por el polinucleótido es LecA. En algunas realizaciones, el polipéptido codificado por el polinucleótido es H5N1. En algunas realizaciones, el polipéptido codificado por el polinucleótido es ID93.

En algunas realizaciones, el polinucleótido es un replicón. En algunas realizaciones, el replicón es un plásmido, cósmido, bácmido, fago o virus, que es capaz de replicarse en gran parte bajo su propio control. En algunas realizaciones, el replicón es ARN o ADN. En algunas realizaciones, el replicón es monocatenario o bicatenario. En algunas realizaciones, el replicón se obtiene de un virus de ARN.

#### Adyuvantes

En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento comprenden además un adyuvante, distinto del agonista de TLR. En algunas realizaciones, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en un AS-2, monofosforil lípido A, monofosforil lípido A 3-des-O-aciado, IFA, QS21, CWS, TOM, AGP, oligonucleótidos que contienen CpG, agonistas del receptor tipo Toll (TLR), Leif, saponinas, miméticos de saponinas, lípido A biológico y sintético, imiquimod, gardiquimod, resiquimod, polil:C, flagelina, GLA, SLA, estingina y combinaciones de los mismos.

#### Organismos

Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender un microorganismo, por ejemplo, *Entamoeba histolytica*, un virus que provoca la gripe o la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que provoca la tuberculosis (TB). Actualmente, la vacunación con bacterias vivas es el método más eficaz para inducir inmunidad protectora frente a la tuberculosis. La *Mycobacterium* más común empleada para este propósito es el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), una cepa avirulenta de *Mycobacterium bovis*. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición comprende una *Mycobacterium*.

El agente puede ser un virus o un genoma viral. Por lo tanto, las composiciones comprenden un virus o genoma viral.

#### Agonistas de TLR

Como se describe en el presente documento, determinadas composiciones y composiciones adyuvantes inmunológicas incluyen composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más agonistas del receptor tipo Toll (agonistas de TLR). Los receptores tipo Toll (TLR) incluyen receptores transmembrana de la superficie celular del sistema inmunitario innato que confieren capacidad de reconocimiento en fase temprana a las células huésped para una diversidad de estructuras moleculares microbianas conservadas, tales como las que pueden estar presentes en una gran cantidad de patógenos

infecciosos. (por ejemplo, Armant y col., 2002 Genome Biol. 3(8):reviews3011.1-3011.6; Fearon y col., 1996 Science 272:50; Medzhitov y col., 1997 Curr. Opin. Immunol. 9:4; Luster 2002 Curr. Opin. Immunol. 14:129; Lien y col. 2003 Nat. Immunol. 4:1162; Medzhitov, 2001 Nat. Rev. Immunol. 1:135; Takeda y col., 2003 Ann Rev Immunol. 21:335; Takeda y col. 2005 Int. Immunol. 17:1; Kaisho y col., 2004 Microbes Infect. 6:1388; Datta y col., 2003 J. Immunol. 170:4102).

La inducción de la transducción de señales mediada por TLR para potenciar el inicio de respuestas inmunitarias a través del sistema inmunitario innato puede realizarse mediante agonistas de TLR, que se acoplan al TLR de la superficie celular. Por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS) puede ser un agonista de TLR a través de TLR2 o TLR4 (Tsan y col., 2004 J. Leuk. Biol. 76:514; Tsan y col., 2004 Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286:C739; Lin y col., 2005 Shock 24:206); poli(inosina-citidina) (poliI:C) puede ser un agonista de TLR a través de TLR3 (Salem y col., 2006 Vaccine 24:5119); los peptidoglicanos pueden ser agonistas de TLR2 y/o TLR6 (Soboll y col., 2006 Biol. Reprod. 75:131; Nakao y col., 2005 J. Immunol. 174:1566); 3M003 (4-amino-2-(etoximetil)- $\alpha,\alpha$ -dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol hidrato, peso mol. 318 Da de 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, que también es una fuente de los compuestos relacionados 3M001 y 3M002; Gorden y col., 2005 J. Immunol. 174:1259) puede ser un agonista de TLR7 (Johansen 2005 Clin. Exp. Allerg. 35:1591) y/o un agonista de TLR8 (Johansen 2005); la flagelina puede ser un agonista de TLR5 (Feuillet y col., 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:12487); y los antígenos de la hepatitis C pueden actuar como agonistas de TLR a través de TLR7 y/o TLR9 (Lee y col., 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:1828; Horsmans y col., 2005 Hepatol. 42:724). Se conocen otros agonistas de TLR (por ejemplo, Schirmbeck y col., 2003 J. Immunol. 171:5198).

#### Constructo de expresión recombinante

Las composiciones descritas en el presente documento pueden contener al menos un constructo de expresión recombinante que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno. En determinadas realizaciones adicionales, el constructor de expresión recombinante está presente en un vector viral, tal como un vector de adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, lentivirus, poxvirus o retrovirus. Se conocen en la técnica composiciones y métodos para elaborar y usar dichas construcciones de expresión y vectores, para la expresión de antígenos polipeptídicos como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, según Ausubel y col. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 2006 John Wiley & Sons, NY. Generalmente, se pueden encontrar ejemplos no limitativos de constructos de expresión recombinante, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 6.844.192; 7.037.712; 7.052.904; 7.001.770; 6.106.824; 5.693.531; 6.613.892; 6.875.610; 7.067.310; 6.218.186; 6.783.981; 7.052.904; 6.783.981; 6.734.172; 6.713.068; 5.795.577 y 6.770.445 y en otros sitios, con enseñanzas que se pueden adaptar a la expresión de antígenos polipeptídicos como se proporciona en el presente documento, para su uso en determinadas realizaciones descritas en el presente documento.

#### Respuesta inmunitaria

La presente descripción describe composiciones para alterar (es decir, aumentar o disminuir de una manera estadísticamente significativa, por ejemplo, en relación con un control apropiado como resultará familiar para los expertos en la materia) respuestas inmunitarias en un huésped capaz de crear una respuesta inmunitaria. Como sabrán los expertos en la materia, una respuesta inmunitaria puede ser cualquier alteración activa del estado inmunitario de un huésped, que puede incluir cualquier alteración en la estructura o función de uno o más tejidos, órganos, células o moléculas que participan en el mantenimiento y/o regulación del estado inmunitario del huésped. Típicamente, las respuestas inmunitarias pueden detectarse mediante cualquiera de una diversidad de parámetros bien conocidos, incluyendo, pero sin limitación, la determinación *in vivo* o *in vitro* de: inmunoglobulinas o anticuerpos solubles; mediadores solubles tales como citocinas, linfocinas, quimiocinas, hormonas, factores de crecimiento y similares, así como otros mediadores solubles de péptidos pequeños, carbohidratos, nucleótidos y/o lípidos; cambios en el estado de activación celular como se determina por las propiedades funcionales o estructurales alteradas de las células del sistema inmunitario, por ejemplo, proliferación celular, motilidad alterada, inducción de actividades especializadas tales como expresión génica específica o comportamiento citolítico; diferenciación celular por células del sistema inmunitario, incluyendo perfiles de expresión de antígenos de superficie alterados o el inicio de la apoptosis (muerte celular programada); o cualquier otro criterio por el cual se pueda detectar la presencia de una respuesta inmunitaria.

Las respuestas inmunitarias a menudo pueden considerarse, por ejemplo, una discriminación entre estructuras propias y ajenas por parte de las células y tejidos del sistema inmunitario de un huésped a nivel molecular y celular, pero la presente descripción no debe considerarse limitada a esto. Por ejemplo, las respuestas inmunitarias también pueden incluir cambios en el estado del sistema inmunitario resultantes del reconocimiento inmunitario de moléculas, células o tejidos propios, que pueden acompañar a cualquier número de condiciones normales, tales como la regulación típica de los componentes del sistema inmunitario, o que pueden estar presentes en condiciones patológicas, tales como las respuestas autoinmunitarias inapropiadas observadas en enfermedades autoinmunitarias y degenerativas. Como otro ejemplo, además de la inducción por regulación positiva de actividades particulares del sistema inmunitario (tal como la producción de anticuerpos y/o citocinas, o la activación de la inmunidad mediada por células), las respuestas inmunitarias también pueden incluir supresión, atenuación o cualquier otra regulación negativa de la inmunidad detectable, que puede ser consecuencia del antígeno seleccionado, la vía de administración del antígeno, la inducción de tolerancia específica u otros factores.

La determinación de la inducción de una respuesta inmunitaria por las vacunas de la presente descripción puede establecerse mediante cualquiera de una serie de ensayos inmunológicos bien conocidos con los que los expertos en la materia estarán fácilmente familiarizados. Tales ensayos incluyen, pero sin limitarse a estos necesariamente, determinación *in vivo* o *in vitro* de: anticuerpos solubles; mediadores solubles tales como citocinas, linfocinas, quimiocinas, hormonas, factores de crecimiento y similares, así como otros mediadores solubles de péptidos pequeños, carbohidratos, nucleótidos y/o lípidos; cambios en el estado de activación celular como se determina por las propiedades funcionales o estructurales alteradas de las células del sistema inmunitario, por ejemplo, proliferación celular, motilidad alterada, inducción de actividades especializadas tales como expresión génica específica o comportamiento citolítico; diferenciación celular por células del sistema inmunitario, incluyendo perfiles de expresión de antígenos de superficie alterados o el inicio de la apoptosis (muerte celular programada). Los procedimientos para realizar estos y otros ensayos similares son ampliamente conocidos y pueden encontrarse, por ejemplo, en Lefkowitz (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998; véase también Current Protocols in Immunology; véase también, por ejemplo, Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986 Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell y Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, 1979 Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green y Reed, 1998 Science 281:1309 y las referencias citadas en el mismo).

La detección de la proliferación de linfocitos T reactivos a antígeno se puede lograr mediante una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de linfocitos T se puede detectar midiendo la tasa de síntesis de ADN, y la especificidad del antígeno se puede determinar controlando los estímulos (tales como, por ejemplo, células presentadoras de un antígeno deseado específico o impulsadas con antígeno de control) a los que los linfocitos T candidatos reactivos a antígeno están expuestos. Los linfocitos T que se han estimulado para proliferar presentan una mayor tasa de síntesis de ADN. Una forma típica de medir la tasa de síntesis de ADN es, por ejemplo, mediante cultivos marcados por pulsos de linfocitos T con timidina ajustada, un precursor de nucleósido que se incorpora al ADN recién sintetizado. La cantidad de timidina ajustada incorporada se puede determinar usando un espectrofotómetro de centelleo líquido. Otras formas de detectar la proliferación de linfocitos T incluyen medir los aumentos en la producción de interleucina-2 (IL-2), el flujo de  $Ca^{2+}$ , o la absorción de colorantes, tales como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio. Como alternativa, se puede medir la síntesis de linfocinas (tales como interferón-gamma) o puede cuantificarse el número relativo de linfocitos T que pueden responder a un antígeno particular.

La detección de la producción de anticuerpos específicos de antígeno se puede lograr, por ejemplo, ensayando una muestra (por ejemplo, una muestra que contiene inmunoglobulina, tal como suero, plasma o sangre) de un huésped tratado con una vacuna según la presente descripción usando en metodologías *in vitro* tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), diálisis de equilibrio o inmunotransferencia en fase sólida, incluyendo transferencia de Western. Los ensayos ELISA pueden incluir además la inmovilización de captura de antígeno del antígeno diana con un anticuerpo monoclonal en fase sólida específico para el antígeno, por ejemplo, para mejorar la sensibilidad del ensayo. La elaboración de mediadores solubles (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, linfocinas, prostaglandinas, etc.) también puede determinarse fácilmente mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), por ejemplo, usando métodos, aparatos y reactivos que están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma, St. Louis, MO; véase también el catálogo de R & D Systems 2006, R & D Systems, Minneapolis, MN).

Cualquier número de parámetros inmunológicos diferentes puede controlarse usando ensayos de rutina que son bien conocidos en la técnica. Estos pueden incluir, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), respuestas de anticuerpos secundarios *in vitro*, análisis inmunocitofluorimétrico de flujo de diversas subpoblaciones de células mononucleares linfoides o de sangre periférica usando sistemas de antígenos marcadores bien establecidos, inmunohistoquímica u otros ensayos relevantes. Estos y otros ensayos pueden encontrarse, por ejemplo, en Rose y col. (Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5ª Ed., 1997 American Society of Microbiology, Washington, DC.

Las composiciones vacunales y adyuvantes del presente documento serán capaces de provocar o potenciar en un huésped al menos una respuesta inmunitaria que se selecciona de una respuesta de linfocitos T de tipo  $T_H1$ , una respuesta de linfocitos T de tipo  $T_H2$ , una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), una respuesta de anticuerpos, una respuesta de citocinas, una respuesta de linfocinas, una respuesta de quimiocinas y una respuesta inflamatoria. La respuesta inmunitaria puede comprender al menos uno de la producción de una o una pluralidad de citocinas, en donde la citocina se selecciona de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), producción de una o una pluralidad de interleucinas, en donde la interleucina se selecciona de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e IL-23, producción de una o una pluralidad de quimiocinas, en donde la quimiocina se selecciona de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, CCL4 y CCL5, y una respuesta de linfocitos que se selecciona de una respuesta de linfocitos T de memoria, una respuesta de linfocitos B de memoria, una respuesta de linfocitos T efectoras, una respuesta de linfocitos T citotóxicos y una respuesta de linfocitos B efectoras. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/00153; WO 95/17209; WO 96/02555; U.S. 6.692.752; U.S. 7.084.256; U.S. 6.977.073; U.S. 6.749.856; U.S. 6.733.763; U.S. 6.797.276; U.S. 6.752.995; U.S. 6.057.427; U.S. 6.472.515; U.S. 6.309.847; U.S. 6.969.704; U.S. 6.120.769; U.S. 5.993.800; U.S. 5.595.888; Smith y col., 1987 J Biol Chem. 262:6951; Krieglner y col., 1988 Cell 53:45 53; Beutler y col., 1986 Nature 320:584; los documentos U.S. 6.991.791; U.S. 6.654.462; U.S. 6.375.944.

## Composiciones farmacéuticas

En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas. La composición puede comprender además un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser una composición vacunal. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un sujeto para estimular una respuesta inmunitaria en el sujeto (incluyendo una respuesta inespecífica y una respuesta específica de antígeno). El sujeto puede ser un mamífero (por ejemplo, un animal, incluyendo animales de granja (vacas, cerdos, cabras, caballos, etc.) y mascotas (gatos, perros, etc.), o un ser humano). El sujeto puede ser un mamífero no humano. El mamífero no humano puede ser un perro, una vaca o un caballo. El sujeto puede ser un animal de sangre caliente.

Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden composiciones descritas en el presente documento y pueden comprender además uno o más componentes como se proporciona en el presente documento que se seleccionan de antígeno, agonistas de TLR adicionales o un constructo de expresión recombinante, en combinación con un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los portadores ilustrativos no serán tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. Para las vacunas que comprenden un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 más un antígeno, se administrarán de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, típicamente por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, o por otras vías.

Una dosificación preferida es de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, siendo particularmente preferida de aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 200 µg/kg. Será evidente para los expertos en la materia que el número y la frecuencia de la administración dependerán de la respuesta del huésped. Los “portadores farmacéuticamente aceptables” para uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, puede usarse una solución salina estéril y una solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes saborizantes. Por ejemplo, se pueden añadir como conservantes benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. *Id.* en 1449. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. *Id.*

“Sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a sales de las composiciones reivindicadas obtenidas de la combinación de tales compuestos y un ácido orgánico o inorgánico (sales de adición de ácidos) o una base orgánica o inorgánica (sales de adición de bases). Las composiciones reivindicadas pueden usarse en forma de base libre o de sal.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa (aerosol). Las vías típicas de administración incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral (por ejemplo, sublingual o bucal), sublingual, rectal, vaginal e intranasal (por ejemplo, como un aerosol). Como se usa en el presente documento, el término parenteral incluye administración iontoforética (por ejemplo, documentos U.S. 7.033.598; 7.018.345; 6.970.739), sonoforética (por ejemplo, documentos U.S. 4.780.212; 4.767.402; 4.948.587; 5.618.275; 5.656.016; 5.722.397; 6.322.532; 6.018.678), térmica (por ejemplo, documentos U.S. 5.885.211; 6.685.699), transdérmica pasiva (por ejemplo, documentos U.S. 3.598.122; 3.598.123; 4.286.592; 4.314.557; 4.379.454; 4.568.343; 5.464.387; Memoria desc. de Pat. de Reino Unido N.º 2232892; U.S. 6.871.477; 6.974.588; 6.676.961), con microagujas (por ejemplo, documentos U.S. 6.908.453; 5.457.041; 5.591.139; 6.033.928) y también inyecciones subcutáneas, intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral o técnicas de infusión. Una composición como se describe en el presente documento (incluyendo composiciones vacunales y farmacéuticas) puede administrarse por vía intradérmica mediante una técnica seleccionada de iontoforesis, microcavitación, sonoforesis o microagujas.

La composición farmacéutica se formula para permitir que los principios activos contenidos en la misma estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un paciente adoptan la forma de una o más unidades de dosificación, en donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una sola unidad de dosificación, y un recipiente de uno o más compuestos de la presente descripción en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Para la administración oral, puede estar presente un excipiente y/o un aglutinante. Son ejemplos sacarosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato de sodio, carboximetilcelulosa y etilcelulosa. Pueden estar presentes agentes colorantes y/o saporíferos. Puede emplearse una cubierta de revestimiento.

La composición puede estar en forma de líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para suministro por inyección, como dos ejemplos. Cuando están destinadas a la administración oral, las composiciones preferidas contienen uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición destinada a administrarse por inyección,

se pueden incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

Como se usa en el presente documento, una composición farmacéutica líquida, ya sea en forma de solución, suspensión u otra forma similar, puede incluir uno o más de los siguientes portadores o excipientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como escualeno, escualano, aceite mineral, monooleato de manida, colesterol y/o mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

También puede ser deseable incluir otros componentes en una composición vacunal o farmacéutica, tales como vehículos de suministro, incluyendo, pero sin limitación, sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, vehículos de aceite biodegradables, emulsiones de aceite en agua, microcápsulas biodegradables y liposomas. Los ejemplos de sustancias inmunoestimuladoras adicionales (coadyuvantes) para su uso en dichos vehículos también se han descrito anteriormente y pueden incluir N-acetilmuramyl-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, interferón gamma e IL-12.

Aunque se puede emplear cualquier portador adecuado conocido por los expertos en la materia en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, el tipo de portador variará dependiendo del modo de administración y de si se desea una liberación sostenida. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el portador comprende preferiblemente agua, una solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede emplear cualquiera de los portadores anteriores o un portador sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También pueden emplearse microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica) como portadores para las composiciones farmacéuticas. Se describen microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 4.897.268 y 5.075.109. A este respecto, es preferible que la microesfera sea mayor de aproximadamente 25 micrómetros.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener diluyentes tales como tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos que incluyen glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión, y otros estabilizadores y excipientes. Son ejemplos de diluyentes apropiados una solución salina tamponada neutra o una solución salina mezclada con albúmina sérica no específica. Preferiblemente, el producto puede formularse como un liofilizado usando soluciones de excipientes apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes.

La presente descripción describe composiciones capaces de administrar moléculas de ácido nucleico que codifican los antígenos deseados. Tales composiciones incluyen vectores virales recombinantes (por ejemplo, retrovirus (véanse los documentos WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 y WO 94/03622), adenovirus (véanse Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Li y col., *Hum. Gene Ther.* 4:403-409, 1993; Vincent y col., *Nat. Genet.* 5:130-134, 1993; y Kolls y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994), virus de la viruela (véanse la Patente de EE.UU. n.º 4.769.330; la Patente de EE.UU. n.º 5.017.487; y el documento WO 89/01973)), moléculas de ácido nucleico de construcción de expresión recombinante en complejo con una molécula policatiónica (véase el documento WO 93/03709), y ácidos nucleicos asociados con liposomas (véase Wang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851, 1987). En determinadas realizaciones, el ADN puede estar unido a adenovirus muertos o inactivados (véanse Curiel y col., *Hum. Gene Ther.* 3:147-154, 1992; Cotton y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6094, 1992). Otras composiciones adecuadas incluyen ADN-ligando (véase Wu y col., *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987, 1989) y combinaciones de lípido-ADN (véase Feigner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989).

Además de los procedimientos *in vivo* directos, se pueden usar procedimientos *ex vivo* en los que las células se extraen de un huésped, se modifican y se colocan en el mismo u otro animal huésped. Será evidente que se puede utilizar cualquiera de las composiciones indicadas anteriormente para la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican antígenos en células tisulares en un contexto *ex vivo*. Los protocolos para los métodos de captación virales, físicos y químicos se conocen bien en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente un ser humano. Un paciente puede estar afectado por una enfermedad infecciosa, un cáncer, tal como cáncer de mama, o una enfermedad autoinmunitaria, o puede ser normal (es decir, libre de enfermedad y/o infección detectable). Un "cultivo celular" es cualquier preparación que contenga células inmunocompetentes o células aisladas del sistema inmunitario (incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T, macrófagos, monocitos, linfocitos B y células dendríticas). Dichas células pueden aislarse mediante cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas por los expertos en la

materia (por ejemplo, centrifugación de densidad Ficoll-hypaque). Las células pueden haberse aislado (pero no necesariamente) de un paciente afectado por cáncer, y pueden reintroducirse en un paciente después del tratamiento.

Una composición líquida destinada a la administración parenteral u oral debe contener una cantidad de composición vacunal tal que se obtenga una dosificación adecuada. Típicamente, esta cantidad es al menos 0,01 % en peso de un antígeno en la composición. Cuando esta destinada a administración oral, esta cantidad puede variar entre el 0,1 y aproximadamente el 70 % del peso de la composición. Las composiciones orales preferidas contienen entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 50 % del antígeno. Las composiciones y preparaciones preferidas se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga entre el 0,01 y el 1 % en peso de composición activa.

La composición farmacéutica puede estar destinada a la administración tópica, en cuyo caso el portador puede comprender adecuadamente una base de solución, emulsión, ungüento o gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizadores. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si está destinada a la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del antígeno (por ejemplo, composición vacunal de antígeno GLA) o GLA (por ejemplo, composición de adyuvante inmunológico; GLA está disponible en Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; por ejemplo, número de producto 699800) de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % p/v (peso por unidad de volumen).

La composición puede estar destinada a la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio que se derretirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol. En los métodos de la presente descripción, las composiciones/adyuvantes vacunales pueden administrarse mediante el uso de uno o más insertos, perlas, formulaciones de liberación controlada, parches o formulaciones de liberación rápida.

También se contemplan kits que comprenden las composiciones vacunales y/o composiciones de adyuvantes inmunológicos descritas en el presente documento, que pueden proporcionarse en uno o más recipientes. Todos los componentes de las composiciones vacunales y/o composiciones adyuvantes inmunológicas están presentes juntas en un solo recipiente, pero también se contemplan dos o más recipientes en los que, por ejemplo, una composición adyuvante inmunológica está separada del antígeno y no está en contacto con el componente antigénico. A modo de teoría no limitante, se cree que, en algunos casos, la administración solo de la composición adyuvante inmunológica puede realizarse de manera beneficiosa, mientras que en otros casos dicha administración se puede separar de manera beneficiosa temporal y/o espacialmente (por ejemplo, en un sitio anatómico diferente) de la administración del antígeno, mientras que en otros casos se realiza beneficiosamente la administración al sujeto de una composición vacunal como se describe en el presente documento y que contiene tanto la composición antigénica como la composición adyuvante y, opcionalmente, también otros componentes descritos en el presente documento.

Un recipiente puede ser cualquier recipiente, contenedor, vial, ampolla, tubo, taza, caja, botella, matraz, tarro, plato, pocillo de un aparato de uno o varios pocillos, depósito, tanque o similares, u otro dispositivo adecuados en el que las composiciones descritas en el presente documento pueden colocarse, almacenarse y/o transportarse, y al que se puede acceder para retirar el contenido. Típicamente, tal recipiente puede estar hecho de un material que sea compatible con el uso previsto y del cual se pueda lograr fácilmente la recuperación del contenido. Los ejemplos preferidos de dichos recipientes incluyen tubos y ampollas sellados o resellables de vidrio y/o plástico, incluidos los que tienen un tapón de caucho u otro medio de sellado que sea compatible con la extracción del contenido usando una aguja y una jeringa. Por ejemplo, dichos recipientes pueden estar hechos de vidrio o de un plástico o resina químicamente compatible, que puede estar hecho o recubierto con un material que permita una recuperación eficiente del material del recipiente y/o proteja el material de, por ejemplo, condiciones degradantes tales como luz ultravioleta o temperaturas extremas, o de la introducción de contaminantes no deseados, incluyendo contaminantes microbianos. Preferiblemente, los recipientes son estériles o esterilizables, y están hechos de materiales que serán compatibles con cualquier portador, excipiente, disolvente, vehículo o similar, tales como los que se pueden usar para suspender o disolver las composiciones vacunales y/o composiciones de adyuvantes inmunológicos y/o antígenos y/o constructos de expresión recombinante, etc., que se describen en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

### Ejemplos

Ejemplo 1. Adsorción de un ligando sintético de TLR7/8 a oxihidróxido de aluminio para mejorar la actividad adyuvante

## Resumen

Durante casi un siglo, las sales de aluminio han sido la formulación adyuvante de vacuna más usada y, por lo tanto, han establecido un historial de seguridad y eficacia. Sin embargo, para objetivos de enfermedades extremadamente difíciles, tales como la tuberculosis o el VIH, la actividad adyuvante de las sales de aluminio puede no ser lo suficientemente potente como para lograr una eficacia protectora. La adsorción de los ligandos de TLR en las sales de aluminio facilita la actividad adyuvante mejorada, tal como en la vacuna contra el virus del papiloma humano Cervarix®. Sin embargo, algunos ligandos de TLR, tales como las imidazoquinolinas agonistas de TLR7/8, no se adsorben eficazmente en las sales de aluminio. La presente descripción describe un enfoque de formulación para resolver un desafío mediante el desarrollo de una nanosuspensión a base de lípidos de un ligando de TLR7/8 sintético (por ejemplo, 3M-052) que facilita la adsorción en sales de aluminio a través de las propiedades estructurales del lípido auxiliar empleado. En ratones inmunizados, la formulación adsorbida en oxihidróxido de aluminio de 3M-052 mejoró las respuestas inmunitarias celulares de tipo TH1 y de anticuerpos a los antígenos vacunales contra la tuberculosis y el VIH.

La presente descripción establece que las propiedades estructurales de los lípidos auxiliares pueden promover la adsorción de ligandos de PRR en sales de aluminio, sin alterar la estructura química del ligando de PRR, cuando el ligando de PRR se formula primero con el lípido auxiliar en forma de una nanosuspensión acuosa. Además, la versatilidad del enfoque puede permitir la adsorción del mismo ligando de PRR en diferentes tipos de sales de aluminio dependiendo de la estructura del lípido auxiliar con el que forma complejo. La presente descripción proporciona un enfoque de formulación que implica el desarrollo de nanosuspensiones para modular las interacciones de adsorción entre el ligando de TLR7/8 sintético 3M-052 (5) y las sales de aluminio para crear una formulación adyuvante de vacuna que mejore la inmunogenicidad celular y de anticuerpos para antígenos vacunales recombinantes adsorbidos conjuntamente contra la tuberculosis o el VIH.

## Materiales y métodos

*Materiales de formulaciones adyuvantes.* Los compuestos sintéticos 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfolina (DLPC) sintética, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DLPG), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DMPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DPPG), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DSPG), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG), 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP) y el adyuvante lipídico de glucopiranosilo (GLA, también conocido como PHAD®) se adquirieron en Avanti Polar Lipids Inc (Alabaster, AL). El polisorbato 80 se adquirió en J.T. Baker (San Francisco, CA). El poloxámero 188 se adquirió en Spectrum Chemical (Gardena, CA). La solución salina (0,9 % p/v) se adquirió en Teknova (Hollister, CA). El control de TLR9 CpG se obtuvo en Avecia (Milford, MA). Alhydrogel® '85' y AdjuPhos® se adquirieron en E.M. Sergeant Pulp & Chemical Co. (Clifton, NJ). Se hace referencia al antígeno gp120 del VIH en Fouts y col. ("Expression and Characterization of a Single-Chain Polypeptide Analogue of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120-CD4 Receptor Complex" *Virology*, vol. 74, n.º 24, diciembre de 2000, 11427-11436). El GLA usado en los ejemplos tiene la estructura de Fórmula (III), en donde R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>13</sub>.

*Fabricación de formulaciones adyuvantes.* Las nanosuspensiones acuosas se elaboraron dispersando 3M-052 o GLA con excipiente lipídico en una relación molar de 1:2 (adyuvante:lípido), en cloroformo o en una mezcla de cloroformo, metanol y agua. A continuación, el disolvente se evaporó usando un evaporador centrífugo Genevac EZ-2 (Stone Ridge, NY). Las películas secas se hidrataron de nuevo en agua ultrapura, a continuación se sometieron a sonicación en un baño de agua de sonicación Crest powerasonic CP230D (Trenton, NJ) a ~60 °C durante varias horas o hasta que las formulaciones se volvieron translúcidas sin partículas visibles. Para formular composiciones que contuvieran alumbre, las nanosuspensiones acuosas se mezclaron con Alhydrogel® o AdjuPhos®. Para los estudios de inmunogenicidad, se mezclaron antígenos vacunales recombinantes (antígeno ID93 o gp120 del VIH) junto con la nanosuspensión, el alumbre y el diluyente indicado.

*Caracterización y estabilidad de la formulación adyuvante.* Las nanosuspensiones acuosas se caracterizaron por tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica (DLS) usando el Zetasizer Nano-S o -ZS de Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido). Las nanosuspensiones acuosas se diluyeron 1:10 o 1:100 veces en agua en una cubeta de poliestireno antes del análisis, que consistió en tres mediciones que dieron como resultado un valor de diámetro promedio sesgado por la intensidad de dispersión informado como Z-prom. El potencial zeta se midió usando el Zetasizer Nano-ZS usando una celda capilar desechable, con nueve mediciones consecutivas recopiladas de cada muestra preparada a una dilución de 1:10 en agua. En general, la concentración de 3M-052 se midió mediante absorbancia UV a 322.5 nm después de diluir las formulaciones 1:20 en etanol:HCl (98:2 v:v) y compararlas con una curva patrón. La dilución en disolvente orgánico elimina la posible interferencia de la dispersión de la luz de las partículas de nanosuspensión. Sin embargo, para la isoterma de unión de 3M-052, en donde se deseaba la máxima sensibilidad, no se realizó ninguna dilución para las muestras o los patrones. La concentración de control de TLR9 CpG se midió por absorbancia UV a 260 nm después de una dilución 1:20 en etanol:HCl. La concentración de GLA se midió mediante HPLC de fase inversa con una columna C18 (Atlantis T3 o Agilent XBridge) y detección por aerosol cargado (CAD) usando un gradiente móvil de metanol:cloroformo:agua como se ha descrito anteriormente (6). Para detectar el ligando de TLR no unido, las formulaciones que contenían alumbre se centrifugaron brevemente según lo indicado y el sobrenadante se

ensayó mediante absorbancia UV o HPLC-CAD. A menos que se indique lo contrario, el tiempo de centrifugación fue de 5 min a 16.000 x g.

5 Imágenes de CryoTEM. Las muestras se conservaron en hielo vitrificado sostenido por películas de carbono perforadas en rejillas de cobre de malla 400. Las muestras se prepararon aplicando una gota de 3 µl de suspensión de muestra a una rejilla limpia, secando con papel de filtro y procediendo inmediatamente a la vitrificación en etano líquido. Las rejillas se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se transfirieron al microscopio electrónico para obtener las imágenes. La microscopía electrónica se realizó usando un microscopio electrónico FEI Tecnai T12, que funcionaba a 120 keV equipado con una cámara CCD FEI Eagle 4k x 4k. Las  
10 rejillas de hielo vítreo se transfirieron al microscopio electrónico usando una etapa criogénica que mantiene las rejillas a una temperatura inferior a -170 °C. Se adquirieron imágenes de cada rejilla en múltiples escalas para evaluar la distribución general de la muestra. Después de identificar las áreas de destino potencialmente adecuadas para obtener imágenes con aumentos más bajos, se adquirieron imágenes de gran aumento con aumentos nominales de 110.000x (0,10 nm/píxel), 52.000x (0,21 nm/píxel) y 21.000x (0,50 nm/píxel). Las  
15 imágenes se adquirieron con un subenfoco nominal de -2 µm (110.000x), -3 µm a -2 µm (52.000x) y -5 µm (21.000x) y dosis de electrones de ~9-42 e/Å<sup>2</sup>.

Adsorción de antígeno en sales de aluminio. La eficiencia de unión de 3M-052 y el antígeno ID93 o gp120 de VIH en Alhydrogel® y AdjuPhos® se determinó mediante espectroscopía UV-Vis y SDS-PAGE con tinción de plata. Se preparó  
20 1 ml de formulación mezclando diluyente salino, antígeno, 3M-052-AF y/o sal de aluminio. Para determinar la adsorción del antígeno gp120 del VIH, se mezclaron 30 µl del sobrenadante de muestra con 10 µl de tampón de muestra LDS no reductor o reductor 4X, después de lo cual se cargaron 20-25 µl en un gel SDS-PAGE de 10 carriles con 15 µl de patrón preteñido SeeBlue2. Para determinar la adsorción de ID93, se mezclaron 45 µl de sobrenadante de muestra con 15 µl de tampón de muestra LDS reductor 4X, después de lo cual se cargaron 25 µl en un gel SDS-PAGE de 10 carriles con 15 µl de patrón preteñido SeeBlue2. Los geles se analizaron durante 55 minutos a 190 V y a continuación se pusieron en una  
25 solución de fijación de 50:40:10 de EtOH:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O durante una noche. A continuación, los geles se tiñeron según las instrucciones proporcionadas por el kit de tinción de plata ProteoSilver Plus de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO).

Animales e inmunizaciones. Se adquirieron C57B1/6 y B6.129S1-TLR7<sup>tm1Flv/J</sup> (TLR7<sup>-/-</sup>) en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se inmunizaron mediante inyección intramuscular con el antígeno vacunal contra la tuberculosis recombinante ID93 (0,5 µg/dosis) o el antígeno gp120 del VIH (10 µg/dosis) adyuvado con AdjuPhos, Alhydrogel®, 3M-052+Alhydrogel®, 3M-052+AdjuPhos o GLA+Alhydrogel®. La dosis final de adyuvante fue de 5 µg de GLA o de 0,1-10 µg de 3M-052 con 200 µg de AdjuPhos o Alhydrogel® en 100 µl. Los ratones se revacunaron tres semanas después de la primera inmunización. Todos los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos. Todos los  
30 procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de IDRI.

Valores volumétricos de anticuerpo. Se prepararon sueros de ratón (N = 5/grupo) 21 días después de la inmunización mediante la extracción de sangre retroorbital en tubos de recogida de suero microtainer (VWR International, West Chester, PA), seguido de centrifugación. A continuación, cada muestra de suero se analizó  
40 mediante ELISA de captura de anticuerpos. En resumen, las placas ELISA (Nunc, Rochester, NY) se recubrieron con 2 µg/ml del antígeno inmunizante en tampón de bicarbonato 0,1 M y se bloquearon con BSA-PBS al 1 %. A continuación, en orden consecutivo y después de los lavados en PBS/Tween20, a las placas se les añadieron muestras de suero diluidas en serie, anti IgG de ratón, IgG1 o IgG2c-HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL) y ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Las placas se analizaron a 405 nm (ELX808, Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT). Los valores volumétricos del criterio de valoración se calcularon usando el software Prism V6 (GraphPad). Como alternativa, se recogió fluido de lavado vaginal tres semanas después de la  
45 tercera inmunización con antígeno gp120 de VIH y se analizó para determinar los valores volumétricos de anticuerpo usando los mismos métodos.

Tinción de citocinas intracelulares. Una semana después de la inmunización final, se aislaron los esplenocitos. Los glóbulos rojos se lisaron usando tampón de lisis de glóbulos rojos (eBioscience) y se suspendieron de nuevo en RPMI 1640 y FBS al 10 %. Las células se pusieron en placas a razón de 2x10<sup>6</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos y se estimularon durante 2 horas con el antígeno inmunizante (10 µg/ml) o sin estimulación a 37 °C. Se  
50 añadió GolgiPlug (BD Biosciences) y las células se incubaron durante 8 horas más a 37 °C. Las células se lavaron y la superficie se tiñó con anticuerpos marcados con fluorocromo contra CD4 (clon GK1.5), CD44 (clon IM7) y CD8 (clon 53-6.7) (BioLegend y eBioscience) en presencia de anti CD16/32 (clon 2.4 G2) durante 20 minutos. Las células se lavaron y se permeabilizaron con Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 20 minutos. Las células se lavaron dos veces con Perm/Wash (BD Biosciences) y se tiñeron intracelularmente con anticuerpos marcados con fluorocromo contra CD154 (clon MR1), IFN-γ (clon XMG-1.2), IL-2 (clon JES6-5H4), TNF (clon MP6-XT22), GM-CSF (clon MP1-22E9), IL-5 (clon TRFK5) e IL-17A (clon TC11-18H10.1) (BioLegend y eBioscience) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se suspendieron de nuevo en PBS. Se recogieron hasta 10<sup>6</sup> eventos en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences). Los datos se analizaron con FlowJo (TreeStar). Las células se clasificaron como singletes > linfocitos > CD4+ CD8- > positivas para citocina o CD44<sup>hi</sup> > positivas para citocina. Las frecuencias de respuesta específicas de antígeno se determinaron restando la frecuencia de respuestas positivas de células no estimuladas de las células  
60 estimuladas por antígeno.

Ensayo ELISPOT de células secretoras de anticuerpos. Las células secretoras de anticuerpos específicos de antígeno presentes en la médula ósea se cuantificaron usando un ensayo ELISPOT. Un día antes del inicio del ensayo, las placas Multiscreen ELISPOT (Millipore) se recubrieron con 1 ug de antígeno/pocillo y se incubaron durante una noche. Las placas bloqueadas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS + Tween 20 al 0,5 %), se bloquearon con medio de recogida durante dos horas y se lavaron 3 veces. La médula ósea se recogió 21 días después de la inmunización en medio RPMI complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, se cuantificó usando un contador de células automatizado Guava (Millipore) y se suspendió de nuevo a razón de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se diluyeron tres veces en serie, se añadieron a las placas y se incubaron durante 5 horas a 37 °C. El anticuerpo secretado se detectó mediante la adición de una dilución 1:100 de anticuerpo anti IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Southern Biotech). Las manchas se visualizaron con el kit de sustrato AEC Peroxidase (Vector Labs) según las instrucciones del fabricante. Las manchas se cuantificaron en un bioanalizador CTL.

Respuesta inmunitaria innata. Dieciocho horas después de la inmunización intramuscular en el músculo gastrocnemio, se extrajo el ganglio linfático poplíteo drenante y se disoció en PBS que contenía inhibidores de la proteasa (Thermo Fisher Scientific). Las células se tiñeron superficialmente para CD8, CD90.2 (clon 53-2.1), CD19 (clon 1D3), NK1.1 (clon PK136), CD11c (clon N418), CD11b (clon M1/70), Ly6G (clon 1A8), Ly6C (HK1.4), CD69 (clon H1.2F3) y CD86 (clon GL1) durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron y se permeabilizaron con Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 20 minutos. Las células se lavaron dos veces con Perm/Wash (BD Biosciences) y se tiñeron intracelularmente con anticuerpos marcados con fluorocromo contra IFN- $\gamma$  y proIL-1 $\beta$  (clon NJTEN3) (BioLegend y eBioscience) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se suspendieron de nuevo en PBS. Se recogieron hasta  $10^6$  eventos en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences). Los datos se analizaron con FlowJo (TreeStar). Las células se clasificaron como singletes > células > CD19+ CD90.2- (linfocitos B), CD8+ CD90.2+ (linfocitos T CD8), CD8- CD90.2+ (linfocitos T CD4), CD8-CD19- NK1.1+ (linfocitos NK), CD8- CD19- CD11c+ (DC), CD8-CD19- CD11b+Ly6C+ (monocitos inflamatorios) o CD19-CD11b+Ly6G+ (PMN)

Análisis estadístico. Las respuestas de anticuerpos y linfocitos T se analizaron mediante ANOVA bidireccional con la corrección de comparación múltiple de Tukey usando Prism versión 5 o posterior (GraphPad). Las comparaciones que dieron como resultado valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativas. Solo se informan comparaciones significativas en las figuras (grupos con adyuvante frente a antígeno solo; 3M-052-Alhydrogel® frente a Alhydrogel®, 3M-052-AF o 3M-052-AdjuPhos®; 3M-052-AdjuPhos frente a AdjuPhos® o 3M-052-AF).

## Resultados

### Desarrollo de formulaciones y caracterización fisicoquímica

Las nanosuspensiones acuosas de ligandos de TLR se forman añadiendo un lípido auxiliar adecuado y aportando energía (por ejemplo, sonicación) para descomponer el tamaño de partícula del complejo lipídico (7). Para determinar un lípido auxiliar adecuado para formar partículas de tamaño nanométrico con 3M-052, se cribó una variedad de fosfolípidos (figura 1). Estos lípidos auxiliares se mezclaron primero con 3M-052 en un disolvente orgánico en una relación molar de 1:2 (3M-052:lípido auxiliar), según el trabajo con un ligando de TLR4 (8). Después de la evaporación del disolvente, las formulaciones se hidrataron y se sometieron a sonicación para reducir el tamaño de partícula a aproximadamente <200 nm para permitir el potencial para la filtración estéril terminal. Varias formulaciones demostraron un tamaño de partícula aceptable (aproximadamente <200 nm) después de la fabricación según lo determinado por dispersión de luz dinámica (figura 2A). La naturaleza del lípido auxiliar dictaba el tamaño de partícula y la estabilidad física de la formulación. Algunas formulaciones habían aumentado significativamente de tamaño (DLPC, DOPC, polisorbato 80), lo que indica la inestabilidad física de la formulación, mientras que otras mostraron pocos cambios (DSPG, DSTAP) tras el almacenamiento a 5 °C durante 2 semanas (figura 2B).

La mayoría de las formulaciones estaban cargadas positivamente (figura 2C), como se esperaba debido a la estructura química de las imidazoquinolinas tales como 3M-052, que tienen un pKa de ~7 (9). Sin embargo, DSPG provocó la formación de partículas aniónicas debido a la carga negativa del grupo fosfato en DSPG. Una suspensión acuosa aniónica es de particular interés para el desarrollo de adyuvantes vacunales debido al potencial para la adsorción en oxihidróxido de aluminio. Por consiguiente, se ensayó la adsorción de las suspensiones acuosas estables de 3M-052 en oxihidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. A una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  de 3M-052, se observó una unión eficaz de la suspensión a base de DSPG a oxihidróxido de aluminio, mientras que solo una pequeña fracción de la suspensión a base de DSTAP de 3M-052 se adsorbió en oxihidróxido de aluminio (figura 2D). En contraste, la suspensión a base de DSTAP se adsorbió eficientemente en fosfato de aluminio. Curiosamente, también fue evidente una adsorción significativa de la nanosuspensión de 3M-052-DSPG en fosfato de aluminio, aunque a un ritmo más lento (figura 2E). Mientras que la nanosuspensión se unió completamente al oxihidróxido de aluminio en 5 min, la adsorción en fosfato de aluminio aumentó gradualmente durante un período de al menos 20 horas. Por lo tanto, mediante la selección

adecuada de lípidos auxiliares, se facilita la adsorción de nanosuspensiones acuosas de 3M-052 en diferentes tipos de sales de aluminio. Los fosfolípidos con el mismo grupo principal o similar que DSPG pero de diferente longitud o saturación de la cadena de acilo también promovieron la formación de una nanosuspensión y la adsorción de 3M-052 en oxihidróxido de aluminio (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la cadena de acilo y la saturación en el tamaño de nanosuspensión a base de PG y las propiedades de adsorción. Los valores representan el promedio +/- d.e. de tres mediciones de la misma muestra para determinar el tamaño de partícula y la polidispersidad de tamaño, o de muestras duplicadas para el experimento de adsorción en Alhydrogel®.

Lípido auxiliar	Longitud de la cadena de acilo: Número de enlaces insaturados	Tamaño (Z-Prom., nm)	Pdl	Adsorción calculada en Alhydrogel®
D LPG	12:0	114 ± 9	0,79 ± 0,09	85 ± 2 %
D MPG	14:0	117 ± 47	0,25 ± 0,07	79 ± 0 %
D PPG	16:0	167 ± 13	0,38 ± 0,09	86 ± 1 %
D SPG	18:0	182 ± 1	0,44 ± 0,01	87 ± 1 %
D OPG	18:1	181 ± 9	0,52 ± 0,07	87 ± 0 %

Los esfuerzos posteriores en la nanosuspensión a base de DSPG (en lo sucesivo denominada 3M-052-AF) se centraron a su capacidad para formar una nanosuspensión que se adsorbe en oxihidróxido de aluminio, que es la sal de aluminio generalmente preferida para antígenos de proteínas recombinantes aniónicas tales como los empleados en la presente descripción. 3M-052-AF fue físicamente estable durante al menos 6 meses a 4 °C, mostrando pocos cambios en el tamaño de partícula promedio o la polidispersidad del tamaño de partícula (figura 10).

La morfología de 3M-052-AF caracterizada por microscopía electrónica de criotransmisión (cryo-TEM) indica una suspensión bastante uniforme de estructuras micelares de ~5-15 nm de diámetro, aunque también estaban presentes partículas más grandes de forma irregular (figura 3A). Puede parecer que estas características de tamaño contradicen la dispersión de luz dinámica indicada anteriormente, en donde los valores de Z-prom. fueron generalmente superiores a 100 nm. Sin embargo, el valor de Z-prom. basado en la intensidad de dispersión de la luz indicado por la dispersión de luz dinámica se ve influenciado por una pequeña proporción de partículas grandes, ya que dispersan más luz que las partículas más pequeñas (la dispersión de la luz es proporcional a 10<sup>6</sup> del diámetro de partícula), como se muestra en la figura 3B. La conversión matemática de la distribución de tamaño basada en la intensidad en una distribución de tamaño basada en volumen indica más partículas en el intervalo de -20 nm, aunque incluso las distribuciones de tamaño basadas en volumen también están sesgadas por partículas más grandes, con una proporcionalidad de 10<sup>3</sup>. Sin embargo, la distribución de tamaño basada en volumen de 3M-052-AF es más consistente con los resultados de la cryo-TEM (figura 3C). Debido al pequeño tamaño de partícula del 3M-052-AF, las partículas de nanosuspensión no fueron evidentes en las imágenes de cryo-TEM que contenían oxihidróxido de aluminio (figura 3D-3E). De hecho, la morfología de las partículas de oxihidróxido de aluminio parecía muy similar independientemente de la presencia de 3M-052-AF, con la notable excepción de que los agregados cristalinos parecían de mayor tamaño en la muestra que contenía 3M-052-AF en comparación con el control de oxihidróxido de aluminio.

Para determinar la capacidad de adsorción de Alhydrogel® para 3M-052-AF, la nanosuspensión en diversas concentraciones se mezcló con oxihidróxido de aluminio y se dejó en reposo durante -30 min con agitación vorticial intermitente, seguido de centrifugación de manera que las partículas de aluminio sedimentaran. A continuación, el sobrenadante se ensayó para determinar 3M-052 con el fin de detectar material no unido (figura 4). La capacidad de adsorción de la nanosuspensión fue de ~0,16 mg por mg de aluminio. Las dosis de 3M-052 empleadas en los experimentos posteriores de inmunogenicidad en ratones descritos en la presente descripción estaban por debajo de este nivel. La estabilidad de adsorción de 3M-052-AF en Alhydrogel® en el tiempo se evaluó ensayando muestras para determinar 3M-052 no unido antes y después del almacenamiento a 5 °C durante 16 sem. Aunque parecía haber una pérdida parcial de 3M-052 en los sobrenadantes de los controles (posiblemente indicativo de la adherencia al tubo de microcentrífuga de plástico), no hubo un aumento detectable de 3M-052 en los sobrenadantes de las muestras que contenían alumbre, lo que indica que no hubo desorción durante 16 sem (Tabla 2). Según los datos presentados en la figura 2E, la cantidad de 3M-052 adsorbida en fosfato de aluminio aumentó con el tiempo. Además, la presencia de otros ligandos de TLR no pareció interferir con la adsorción de 3M-052 en oxihidróxido de aluminio, lo que indica que podría ser factible una formulación a base de alumbre que contenga múltiples ligandos de PRR adsorbidos (Tabla 2).

Tabla 2. Estabilidad de la adsorción de 3M-052-AF en el tiempo y en presencia de ligandos de TLR adsorbidos conjuntamente. 3M-052-AF contiene DSPG mientras que GLA-AF contiene DPPG. El control de TLR9 CpG es soluble y, por lo tanto, no contiene lípido auxiliar. Los ligandos de TLR no unidos se ensayaron mediante

absorbancia UV (3M-052, control de TLR9 CpG) o HPLC con detección por aerosol cargado (GLA). Los valores representan el promedio +/- d.e. de muestras duplicadas.

Ligando(s) de TLR	Sal de aluminio	Conc. de agonista de TLR en el sobrenadante ( $\mu\text{g/ml}$ , T = 0)	Conc. de agonista de TLR en el sobrenadante ( $\mu\text{g/ml}$ , T = 16 sem)
3M-052	-	94 $\pm$ 1	74 $\pm$ 1
Ligando(s) de TLR	Sal de aluminio	Conc. de agonista de TLR en el sobrenadante ( $\mu\text{g/ml}$ , T = 0)	Conc. de agonista de TLR en el sobrenadante ( $\mu\text{g/ml}$ , T = 16 sem)
GLA	-	93 $\pm$ 1	84 $\pm$ 4
Control de TLR9 CpG	-	90 $\pm$ 3	81 $\pm$ 0
3M-052/GLA	-	88 $\pm$ 1/94 $\pm$ 6	80 $\pm$ 2/89 $\pm$ 8
3M-052/Control de TLR9 CpG	-	93 $\pm$ 1/NM	81 $\pm$ 1/NM
3M-052	Alhydrogel®	11 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1
GLA	Alhydrogel®	<10	<10
Control de TLR9 CpG	Alhydrogel®	<10	<10
3M-052/GLA	Alhydrogel®	11 $\pm$ 3/<10	<10/<10
3M-052/Control de TLR9 CpG	Alhydrogel®	11 $\pm$ 1/<10	<10/<10
NM: No medido			

- 5 Para determinar si 3M-052 se adsorbió en oxihidróxido de aluminio mediante un intercambio de ligandos o un mecanismo electrostático, se evaluó el efecto de la fuerza iónica sobre la adsorción, que neutraliza la unión mediada por electrostática (10). Una tendencia a la disminución del contenido de 3M-052 en el sobrenadante de las muestras de control con el aumento de la concentración de cloruro de sodio se atribuye a un rápido aumento de las partículas de 3M-052-AF tras la exposición a la solución salina, lo que da como resultado la formación de gránulos de la nanosuspensión incluso cuando el aluminio no estaba presente (Tabla 3). No obstante, el aumento de la concentración de cloruro de sodio no pareció reducir la unión de 3M-052-AF al oxihidróxido de aluminio.

Tabla 3. Efecto de la concentración de solución salina en la adsorción de 3M-052-AF en Alhydrogel®. Las muestras se centrifugaron durante 10 s a 2000 x g. Los valores representan el promedio +/- d.e. de muestras duplicadas.

Conc. de solución salina (mM)	Sal de aluminio	Conc. de 3M-052 en el sobrenadante ( $\mu\text{g/ml}$ )	Adsorción en Alhydrogel®
60	-	79 $\pm$ 1	-
60	Alhydrogel®	<10	$\geq$ 87 %
120	-	61 $\pm$ 3	-
120	Alhydrogel®	<10	$\geq$ 84 %
240	-	57 $\pm$ 9	-
240	Alhydrogel®	<10	$\geq$ 82 %
480	-	51 $\pm$ 10	-
480	Alhydrogel®	<10	$\geq$ 80 %

#### Actividad biológica adyuvante

- 20 Para determinar si la unión de 3M-052 al oxihidróxido de aluminio altera la adyuvancia *in vivo* del oxihidróxido de aluminio o 3M-052-AF, se inmunizaron ratones C57BL/6 con el antígeno vacunal contra la tuberculosis ID93 (11) adyuvado con 3M-052 -AF, oxihidróxido de aluminio o 3M-052-AF unido a oxihidróxido de aluminio. Tres semanas después de la primera inmunización, los ratones que recibieron ID93+3M-052-Alhydrogel® presentaron los valores volumétricos séricos más altas de IgG total específica para ID93, así como también de los subtipos IgG1 e IgG2c, lo que indica que 3M-052-Alhydrogel tiene propiedades adyuvantes únicas en comparación con 3M-052-AF o Alhydrogel® solo (figura 5A). Un mes después de la tercera inmunización, se evaluaron las respuestas de los linfocitos T CD4 estimulando los esplenocitos con ID93 y midiendo la producción de citocinas en presencia de Brefeldina A mediante citometría de flujo. En comparación con los ratones inmunizados con ID93 solo, los ratones inmunizados tanto con ID93+3M-052-AF como con ID93+3M-052-Alhydrogel® tenían mayores frecuencias de linfocitos T CD4 específicos de ID93 que expresaban CD154. Los ratones inmunizados con ID93+3M-052-Alhydrogel® presentaron células TH1 que produjeron IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2 y GM-CSF tras la estimulación con ID93 (figura 5B). Si bien varios experimentos de seguimiento confirmaron estos hallazgos, algunos lotes de 3M-052-AF parecieron inducir una actividad adyuvante de linfocitos T TH1 comparable a 3M-052-Alhydrogel®. Una posible explicación de esta discrepancia se refiere a la relación de fosfolípidos (DSPG) con respecto a 3M-052. En el trabajo que usó un ligando de TLR4, se demostró que la variación sistemática de la relación de fosfolípido:ligando de TLR4 reveló una respuesta bifásica en ensayos fisicoquímicos y de bioactividad *in vitro* (12). Por lo tanto, si la relación de fosfolípido:3M-052 empleada en la presente descripción está cerca de tal punto de inflexión, variaciones aparentemente

menores en la preparación o las propiedades físicas de la formulación podrían dar como resultado cambios en su actividad biológica.

Para determinar si la unión de 3M-052-AF al oxihidróxido de aluminio cambiaba fundamentalmente su actividad adyuvante o simplemente alteraba su biodisponibilidad, se examinó la actividad adyuvante de 3M-052-AF solo o unido al oxihidróxido de aluminio en un intervalo de dosis de dos log<sub>10</sub>. Tres semanas después de la primera inmunización con ID93 adyuvado, la formulación de 3M-052-AF adsorbida en alumbre provocó valores volumétricos séricos de anticuerpos más altos en todo el intervalo de dosis en comparación con Alhydrogel® solo o el mismo intervalo de dosis de 3M-052-AF (figura 6A). De manera similar, 3M-052-Alhydrogel® demostró una respuesta a la dosis en forma de campana para aumentar los linfocitos T CD4 específicos de ID93 con la respuesta máxima de las dosis ensayadas a 1 µg. Estas respuestas de CD 154 e IFN-γ fueron sustancialmente más altas que las provocadas con ID93 adyuvado con oxihidróxido de aluminio o 3M-052-AF a 0,1, 1 o 10 µg (figura 6B). También se observaron respuestas a la dosis similares para los linfocitos T CD4 productores de TNF e IL-2. En base a esto, se puede concluir que la unión de 3M-052-AF al oxihidróxido de aluminio altera su actividad adyuvante por algún medio que no sea simplemente cambiar la biodisponibilidad en un intervalo de 1 log<sub>10</sub> en cualquier dirección.

El 3M-052 *in vitro* activa el TLR7 y el TLR8 humanos (5). Para determinar si estos receptores inmunitarios innatos son un factor para la actividad adyuvante *in vivo* de 3M-052-Alhydrogel®, se compararon las respuestas inmunitarias de ratones C57BL/6 vacunados de tipo natural (WT) y ratones que carecían de TLR7 (los ratones C57BL/6 expresan un TLR8 hipofuncional). Como control, se inmunizaron ratones C57BL/6 y TLR7<sup>-/-</sup> con ID93 adyuvado con el adyuvante agonista de TLR4 GLA-Alumbre. Todos los grupos inmunizados produjeron valores volumétricos elevados de anticuerpos IgG1 específicos de ID93, independientemente del adyuvante o el genotipo (figura 7A). Tanto 3M-052-Alhydrogel® como GLA-Alhydrogel® provocaron valores volumétricos altos de IgG2c en ratones C57BL/6 en comparación con Alhydrogel® solo. En ratones TLR7<sup>-/-</sup>, la inducción de IgG2c se redujo drásticamente en animales inmunizados con ID93+3M-052-Alumbre, mientras que la respuesta de IgG2c a ID93+GLA-Alhydrogel no se vio afectada por la deficiencia de TLR7, lo que demuestra que se usó TLR7 para reconocer 3M-052, pero no Alhydrogel® o GLA. ID93+3M-052-Alhydrogel® también provocó respuestas celulares fuertes en ratones WT caracterizadas por linfocitos T CD4 capaces de producir IFN-γ y TNF con muy poca producción de IL-5 o IL-17A (marcadores de inmunidad TH2 y TH17, respectivamente). Sin embargo, en ratones TLR7<sup>-/-</sup>, ID93+3M-052-Alhydrogel® provocó solo respuestas menores de linfocitos T CD4 a ID93 que no fueron sustancialmente diferentes en magnitud de las respuestas provocadas por ID93 adyuvado con Alhydrogel® solo en ratones WT (figura 7B). La inmunización de ratones WT y TLR7<sup>-/-</sup> con ID93+GLA-Alhydrogel® provocó respuestas TH1 similares, lo que indica que los ratones TLR7<sup>-/-</sup> no se ven afectados en su respuesta de linfocitos T CD4 a las vacunas con otros adyuvantes que contienen agonistas de TLR formulados en alumbre. Por lo tanto, se puede concluir que, de manera similar a los hallazgos *in vitro*, 3M-052-Alhydrogel® usa TLR7 para su actividad adyuvante *in vivo*, particularmente para provocar altas frecuencias de linfocitos T TH1 CD4 y respuestas de anticuerpos IgG2c conmutados.

Para probar la actividad adyuvante *in vivo* de 3M-052 con un antígeno vacunal diferente, así como el efecto de diferentes sales de aluminio, se inmunizaron ratones C57BL/6 con el antígeno gp120 del VIH (13) adyuvado con 3M-052-AF, oxihidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o 3M-052-AF en combinación con oxihidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. Tres semanas después de la primera inmunización, las respuestas séricas de anticuerpos IgG e IgG2c más elevadas fueron provocadas por el antígeno gp120 del VIH adyuvado con 3M-052-oxihidróxido de aluminio (figura 8B). Curiosamente, el 3M-052-oxihidróxido de aluminio también produjo los niveles más altos de IgG2c en la mucosa y células plasmáticas de vida prolongada secretoras de anticuerpos (figuras 8D y 11). Además, la formulación que contenía 3M-052 y oxihidróxido de aluminio fue el inductor más potente de IFNγ y TNF de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (figura 8C), particularmente una semana después de la inmunización inicial (figura 11). En general, el 3M-052-oxihidróxido de aluminio parecía tener una actividad adyuvante más potente en este modelo que el 3M-052-fosfato de aluminio; sin embargo, dado que el antígeno gp120 del VIH se adsorbe en el oxihidróxido de aluminio pero no sustancialmente en el fosfato de aluminio (figura 12), la reducción de las respuestas de inmunogenicidad reducidas podría atribuirse a una adsorción menos óptima tanto del antígeno como del 3M-052 en el fosfato de aluminio.

La inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa fuerte a los antígenos vacunales usa la activación apropiada del sistema inmunitario innato para proporcionar el medio coestimulador y de citocinas. Por lo tanto, se analizaron las respuestas inmunitarias innatas en el ganglio linfático drenante que se alteran por la inmunización con 3M-052 +/- fosfato de aluminio u oxihidróxido de aluminio. 3M-052 se sinergizó con el oxihidróxido de aluminio y, en menor medida, fosfato de aluminio para provocar un fuerte aumento en el número de monocitos inflamatorios (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>) en el ganglio linfático drenante 18 horas después de la inyección i.m. (figura 9A). De manera similar, 3M-052 y ambas formulaciones de alumbre aumentaron la expresión de la molécula coestimuladora CD86 en APC, incluyendo los linfocitos B, los monocitos y las células dendríticas, y la activación transitoria de los linfocitos T CD4 y CD8, así como los linfocitos B, según se indica por la expresión de CD69 (figura 9B y C). 3M-052 se sinergizó de manera única con oxihidróxido de aluminio para aumentar el número de linfocitos NK que expresaban IFN-γ y neutrófilos que producían IL-1 (figura 9D), siendo ambas moléculas importantes para la inducción de respuestas TH1 fuertes con adyuvantes vacunales (14). Esta respuesta innata a la sinergia entre 3M-052 y el alumbre probablemente crea el entorno apropiado para la generación sólida de respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos vacunales. La expansión de los linfocitos NK productores de IFN-γ y los neutrófilos productores de IL-1 se correlaciona con la actividad adyuvante más

fuerte de 3M-052+oxihidróxido de aluminio en comparación con las respuestas más débiles inducidas por 3M-052+fosfato de aluminio.

#### Análisis

5

La formulación apropiada de agonistas de TLR7/8 es un enfoque de desarrollo de adyuvante atractivo por varias razones que incluyen la capacidad de fabricación, la inducción de respuestas TH1 potentes y el uso previo en un producto aprobado por la FDA. La capacidad de las imidazoquinolinas para dirigirse a TLR7 y/o TLR8 para generar respuestas inmunitarias innatas de tipo TH1 mejoradas, incluyendo los anticuerpos IgG2 en ratones, se ha documentado en la bibliografía (15-17). Como pequeñas moléculas sintéticas, las imidazoquinolinas se pueden fabricar de forma rentable y con una gran pureza. El ligando de TLR7 imiquimod es el componente activo de la crema tópica Aldara®, aprobada para uso inmunoterapéutico humano para tratar el cáncer de piel y las verrugas genitales. Sin embargo, las imidazoquinolinas inyectadas como adyuvantes vacunales no han avanzado más allá de las pruebas clínicas de fase inicial. Debido a su pequeño tamaño, se plantea la hipótesis de que las imidazoquinolinas solubles no formuladas, tales como R848, se difunden rápidamente desde el sitio de inyección, provocando una activación inmunitaria sistémica en lugar de una estimulación localizada. Por esta razón, las estrategias para “ralentizar” la difusión de imidazoquinolina, tal como la conjugación covalente con antígenos de vacunas o la encapsulación en formulaciones de partículas, se han mostrado prometedoras en las pruebas preclínicas (5, 18-21). Smirnov y col. describen un enfoque de síntesis química que da como resultado la adición de una cadena de 18 carbonos a una estructura de imidazoquinolina que mantiene la actividad adyuvante local pero no las respuestas sistémicas evidentes con estructuras no lipidadas tales como R848 (5). Esta molécula, denominada 3M-052 (figura 1), es más adecuada para incorporarla en formulaciones a base de lípidos, tales como nanosuspensiones, liposomas o emulsiones.

El trabajo de Wu y col. demostró que la síntesis química de nuevos ligandos de TLR7 con grupos fosfonato facilitaba la adsorción en oxihidróxido de aluminio, dando como resultado una actividad adyuvante localizada transitoria mejorada al tiempo que redujo la activación sistémica (21). Las formulaciones de TLR7 adsorbidas en alumbre potenciaron eficazmente la magnitud y la calidad de los anticuerpos contra diversos antígenos vacunales, incluyendo una mayor protección contra la exposición en comparación con el antígeno con alumbre solo o el ligando de TLR7 solo (21). Por el contrario, el enfoque de formulación descrito en el presente documento no usa sustancialmente grupos fosfonato en el ligando de PRR para facilitar la adsorción de ligandos de PRR en sales de aluminio y, por lo tanto, puede tener una aplicabilidad más amplia. La capacidad de promover la adsorción de ligandos de PRR en las sales de aluminio podría proporcionar una ventaja de desarrollo desde un punto de vista regulatorio, ya que una formulación de ligando de PRR adsorbida en alumbre ya está contenida en vacunas aprobadas tales como Cervarix®. Un enfoque basado en la formulación podría evitar la necesidad de modificar químicamente las estructuras agonistas existentes, confiando en cambio en las propiedades de la formulación para promover la adsorción en las sales de aluminio. Además, las modificaciones de la formulación lipídica podrían adaptar la preferencia de adsorción del ligando de PRR en sales de aluminio específicas, de modo que el antígeno vacunal y el ligando de PRR pudieran adsorberse en el mismo tipo de sal de aluminio. Dichas propiedades de los excipientes incluyen la longitud y la saturación de las cadenas de acilo y la estructura/carga del grupo principal. Se descubrió que esto último parecía ser el principal determinante en la capacidad de la nanosuspensión para adsorberse en sales de aluminio, aunque también se debe tener en cuenta la estructura de la cadena de acilo para garantizar la formación de una suspensión estable entre el ligando de PRR y el lípido auxiliar.

A pesar de la versatilidad de este enfoque de formulación a base de nanosuspensión, se observa que los efectos de la selección de tampón/sal, el tipo de sal de aluminio, el orden de mezcla, el diluyente y las propiedades del antígeno vacunal deben estar bien caracterizados para optimizar la formulación vacunal adyuvada. Por ejemplo, no fue posible distinguir completamente la importancia de la adsorción de 3M-052-AF independientemente de la adsorción de antígeno, ya que el antígeno gp120 del VIH y 3M-052-AF se adsorbieron de manera menos óptima en el fosfato de aluminio en comparación con el oxihidróxido de aluminio.

Se usó el enfoque del lípido auxiliar para adsorber ligandos de TLR4 en oxihidróxido de aluminio. El ligando de TLR4 GLA de cualquier otra manera insoluble, se puede formular como una suspensión acuosa usando un lípido auxiliar que, a continuación, se puede mezclar con oxihidróxido de aluminio para permitir la adsorción. Sin embargo, en el caso de GLA, el propio agonista contiene un grupo fosfato que promueve la adsorción a través del intercambio de ligandos. En el caso de 3M-052, el agonista no contiene grupo fosfato, por lo que la adsorción debida al intercambio de ligandos puede atribuirse al lípido auxiliar. Aunque en la presente descripción, ID93+3M-052-Alumbre parecía inducir una respuesta TH1 más potente que ID93+GLA-Alumbre. La ubicación y distribución celular de TLR7/8 y TLR4 es significativamente diferente y varía entre especies (17). Por ejemplo, TLR8 se considera refractario en ratones; por lo tanto, un agonista tal como 3M-052 puede provocar respuestas alteradas o mejoradas en los seres humanos u otras especies con TLR8 funcional. Tales consideraciones, en combinación con los datos presentados aquí, indican que una formulación adyuvante de TLR7/8 a base de alumbre podría proporcionar una formulación adyuvante potente para las respuestas TH1 en los seres humanos.

3M-052 y el alumbre se sinergizaron para aumentar la expresión de la molécula coestimuladora CD86 en APC en el LN drenante y para activar transitoriamente los linfocitos para permanecer en el ganglio linfático drenante de una manera independiente del antígeno. Al activar las APC y atrapar los linfocitos en el mismo LN drenante, esta sinergia crea un entorno óptimo para el cebado y la expansión de los linfocitos. Curiosamente, las respuestas innatas,

65

incluida la producción temprana de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , que se observó que se usan para la adyuvancia de GLA-SE (14), también fueron pronunciadas cuando se formuló 3M-052 con oxihidróxido de aluminio. Esto puede sugerir que estos parámetros podrían ser firmas universales útiles de la actividad adyuvante eficaz. La identificación de dichas firmas ayudaría al desarrollo racional de nuevas vacunas candidatas.

5 En conclusión, se desarrolló un método para formular ligandos de PRR a base de lípidos en nanosuspensiones acuosas que se pueden adsorber en sales de aluminio basándose en las propiedades del lípido auxiliar. La capacidad de desarrollar formulaciones compatibles con alumbre de nuevos ligandos de PRR puede permitir una traducción más rápida a la clínica, ya que dichas formulaciones son análogas a la combinación de ligando de TLR4-alumbre empleada en Cervarix®, y las sales de aluminio son la clase de adyuvantes más ampliamente empleada en vacunas humanas, con un historial de seguridad e inmunogenicidad bien establecido.

Ejemplo 2. Adsorción de un ligando de TLR4 sintético en alumbre

15 Se probó la adsorción de las suspensiones acuosas estables del ligando de TLR 4 GLA en oxihidróxido de aluminio o fosfato de aluminio y los resultados se muestran en la Tabla 4. Estos datos indican que la adsorción del ligando de TLR4 se puede adaptar al oxihidróxido de aluminio o al fosfato de aluminio mediante la selección adecuada de lípidos auxiliares.

20 Tabla 4: Adsorción de nanosuspensiones acuosas de GLA en Alhydrogel® o AdjuPhos®.

Lípido auxiliar	Sal de aluminio	Conc. de GLA en el sobrenadante ( $\mu\text{g/ml}$ )	% de adsorción calculado
DPPC	-	90 $\pm$ 8	-
DPTAP	-	37 $\pm$ 1	-
DPPC	Alhydrogel®	<10	$\geq$ 89 %
DPTAP	Alhydrogel®	<10	$\geq$ 73 %
DPPC	AdjuPhos®	62 $\pm$ 2	31 $\pm$ 4 %
DPTAP	AdjuPhos®	<10	$\geq$ 73 %

#### Referencias

- 25 1. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol.* 1926;29:31-40.
2. Hem SL, HogenEsch H. Aluminum-containing adjuvants: properties, formulation, and use. In: Singh M, editor. *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2007. p. 81-114.
- 30 3. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, Kielland A, Vosters O, Vanderheyde N, Schiavetti F, Larocque D, Van Mechelen M, Garçon N. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009;10:6186-97.
- 35 4. Mullen GED, Aebig JA, Dobrescu G, Rausch K, Lambert L, Long CA, Miles AP, Saul A. Enhanced antibody production in mice to the malaria antigen AMA1 by CPG 7909 requires physical association of CpG and antigen. *Vaccine.* 2007;25(29):5343-7.
- 40 5. Smirnov D, Schmidt JJ, Capecchi JT, Wightman PD. Vaccine adjuvant activity of 3M-052: an imidazoquinoline designed for local activity without systemic cytokine induction. *Vaccine.* 2011;29:5434-42.
6. Misquith A, Fung M, Dowling QM, Guderian JA, Vedvick TS, Fox CB. In vitro evaluation of TLR4 agonist activity: formulation effects. *Coll Surf B: Biointerfaces.* 2014;113:312-9.
- 45 7. Fung HWM, Mikasa TJJ, Vergara J, Sivananthan SJ, Guderian JA, Duthie MS, Vedvick TS. Optimizing manufacturing and composition of a TLR4 nanosuspension: physicochemical stability and vaccine adjuvant activity. *J Nanobiotechnology.* 2013;11:43.
- 50 8. Fox CB. Characterization of TLR4 agonist effects on Alhydrogel sedimentation: a novel application of laser scattering optical profiling. *J Pharm Sci.* 2012;101:4357-64.
9. Chollet JL, Jozwiakowski MJ, Phares KR, Reiter MJ, Roddy PJ, Schultz HJ, Ta QV, Tomai MA. Development of a topically active imiquimod formulation. *Pharm Dev Technol.* 1999;4:35-43.
- 55 10. Iyer S, Robinett RSR, HogenEsch H, Hem SL. Mechanism of adsorption of hepatitis B surface antigen by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine.* 2004;22(11-12):1475-9.

11. Bertholet S, Ireton GC, Ordway DJ, Windish HP, Pine SO, Kahn M, Phan T, Orme IM, Vedvick TS, Baldwin SL, Coler RN, Reed SG. A defined tuberculosis vaccine candidate boosts BCG and protects against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med*. 2010;2:53ra74.
- 5 12. Dowling QM, Sivananthan SJ, Guderian JA, Moutaftsi M, Chesko JD, Fox CB, Vedvick TS, Kramer RM. Modulating Potency: Physicochemical Characteristics are a Determining Factor of TLR4-Agonist Nanosuspension Activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(3):879-89.
- 10 13. Fouts TR, Tuskan R, Godfrey K, Reitz M, Hone D, Lewis GK, DeVico AL. Expression and Characterization of a Single-Chain Polypeptide Analogue of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120-CD4 Receptor Complex. *Journal of Virology*. 2000;74(24): 11427-36.
- 15 14. Desbien AL, Reed SJ, Bailor HR, Cauwelaert ND, Laurance JD, Orr MT, Fox CB, Carter D, Reed SG, Duthie MS. Squalene emulsion potentiates the adjuvant activity of the TLR4 agonist, GLA, via inflammatory caspases, IL-18, and IFN- $\gamma$ . *European Journal of Immunology*. 2015;45(2):407-17.
- 20 15. Vasilakos JP, Tomai MA. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. *Expert Review of Vaccines*. 2013;12(7):809-19.
- 25 16. Schwenk R, DeBot M, Porter M, Nikki J, Rein L, Spaccapelo R, Crisanti A, Wightman PD, Ockenhouse CF, Dutta S. IgG2 Antibodies against a Clinical Grade *Plasmodium falciparum* CSP Vaccine Antigen Associate with Protection against Transgenic Sporozoite Challenge in Mice. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e111020.
- 30 17. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*. 2013;19:1597-608.
- 35 18. Fox C, Sivananthan S, Duthie M, Vergara J, Guderian J, Moon E, Coblenz D, Reed S, Carter D. A nanoliposome delivery system to synergistically trigger TLR4 AND TLR7. *Journal of Nanobiotechnology*. 2014;12(1):17.
- 40 19. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsouanos D, Hua T, Nakaya HI, Ravindran R, Stewart S, Alam M, Kwissa M, Villinger F, Murthy N, Steel J, Jacob J, Hogan RJ, Garcia-Sastre A, Compans R, Pulendran B. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature*. 2011;470:543-7.
20. Wille-Reece U, Wu C-y, Flynn BJ, Kedl RM, Seder RA. Immunization with HIV-1 Gag Protein Conjugated to a TLR7/8 Agonist Results in the Generation of HIV-1 Gag-Specific Th1 and CD8+ T Cell Responses. *The Journal of Immunology*. 2005;174(12):7676-83.
21. Wu TY-H, Singh M, Miller AT, De Gregorio E, Doro F, D'Oro U, Skibinski DAG, Mbow ML, Bufali S, Herman AE, Cortez A, Li Y, Nayak BP, Tritto E, Filippi CM, Otten GR, Brito LA, Monaci E, Li C, Aprea S, Valentini S, Calabro S, Laera D, Brunelli B, Caproni E, Malyala P, Panchal RG, Warren TK, Bavari S, O'Hagan DT, Cooke MP, Valiante NM. Rational design of small molecules as vaccine adjuvants. *Science Translational Medicine*. 2014;6(263):263ra160

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 (a) un agonista de TLR7/8, en donde el agonista de TLR 7/8 es 3M-052;  
 (b) un lípido auxiliar o polisorbato 80; y  
 (c) una sal de aluminio.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde el agonista de TLR7/8 se adsorbe en la sal de aluminio.

10 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde el agonista de TLR7/8 se adsorbe en la sal de aluminio al 25 por ciento de la sal de aluminio.

15 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la sal de aluminio se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, trihidrato de aluminio, oxihidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, hidroxifosfato sulfato de aluminio y sulfato de potasio y aluminio, o en donde la sal de aluminio comprende gel de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.

20 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el lípido auxiliar es un fosfolípido o un lípido de sal de amonio cuaternario; o

en donde el lípido auxiliar comprende una cadena de alquilo C<sub>10-20</sub>; o  
 en donde el lípido auxiliar se selecciona de DOPC, DSPG, DSTAP.

25 6. La composición de la reivindicación 1, que comprende 3M-052, gel de hidróxido de aluminio y DSPG; o que comprende 3M-052, fosfato de aluminio y DSTAP.

7. Una composición que comprende:

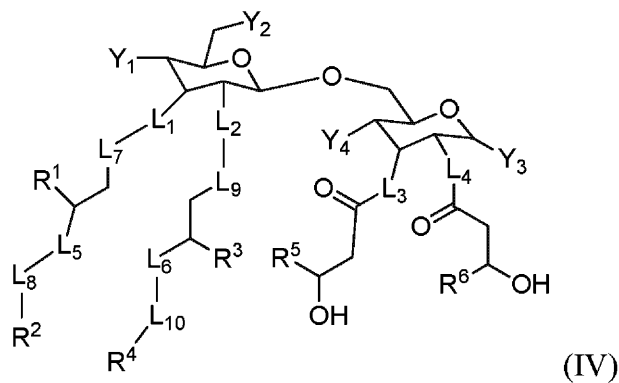
- 30 (a) un agonista de TLR4, en donde el agonista de TLR4 es GLA;  
 (b) un lípido auxiliar; y  
 (c) una sal de aluminio;

35 en donde el lípido auxiliar es DPTAP y la sal de aluminio es fosfato de aluminio, o en donde el lípido auxiliar es DPPC y la sal de aluminio es hidróxido de aluminio.

8. La composición de la reivindicación 7, en donde el agonista de TLR4 se adsorbe en la sal de aluminio.

40 9. La composición de la reivindicación 7 u 8, en donde el agonista de TLR4 se adsorbe en la sal de aluminio al 25 por ciento de la sal de aluminio.

10. La composición de la reivindicación 7, en donde el agonista de TLR4 comprende un GLA sintético de Fórmula (IV):

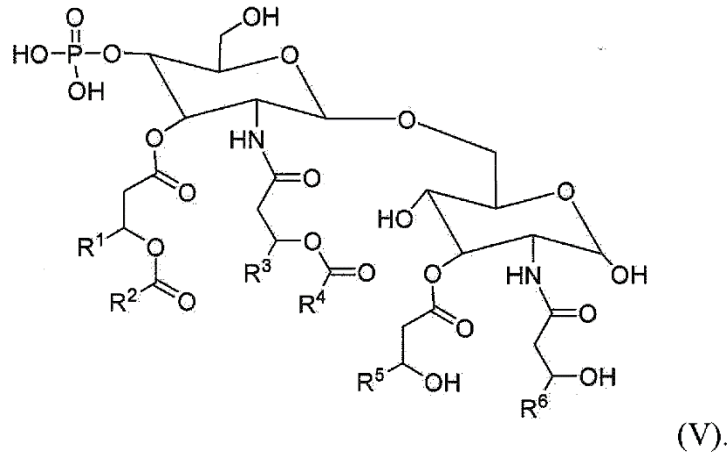


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 50 L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y L<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente -O-, -NH- o -(CH<sub>2</sub>)-;  
 L<sub>7</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub> y L<sub>10</sub> son iguales o diferentes e independientemente están ausentes o son -C(=O)-;  
 Y<sub>1</sub> es un grupo funcional ácido;  
 Y<sub>2</sub> e Y<sub>3</sub> son iguales o diferentes e independientemente -OH, -SH o un grupo funcional ácido;  
 Y<sub>4</sub> es -OH o -SH;

R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>8-13</sub>; y R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son iguales o diferentes e independientemente alquilo C<sub>6-11</sub>. en donde el agonista de TLR4 comprende un GLA sintético de Fórmula (V):

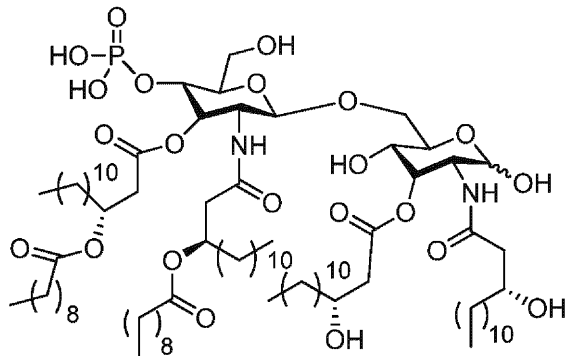
5



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

10

R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son alquilo C<sub>11</sub>-C<sub>20</sub>; y R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son alquilo C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>. en donde el agonista de TLR4 comprende un GLA sintético de Fórmula:



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además un antígeno.

20

12. La composición de la reivindicación 11, en donde el antígeno se selecciona de un antígeno relacionado con la tuberculosis, un antígeno relacionado con la gripe, un antígeno relacionado con la hemaglutinina, un antígeno relacionado con el cáncer, un antígeno relacionado con un virus y un antígeno relacionado con la amebiasis;

25

en donde el antígeno relacionado con la tuberculosis se selecciona del grupo que consiste en ID93, ID91 y BCG;

30

en donde el antígeno relacionado con la gripe se selecciona del grupo que consiste en H5N1, gripe A, gripe B y gripe C;

en donde el antígeno relacionado con la amebiasis es LecA.

35

en donde el antígeno relacionado con un virus se selecciona del grupo que consiste en hepatitis B y hepatitis C.

40

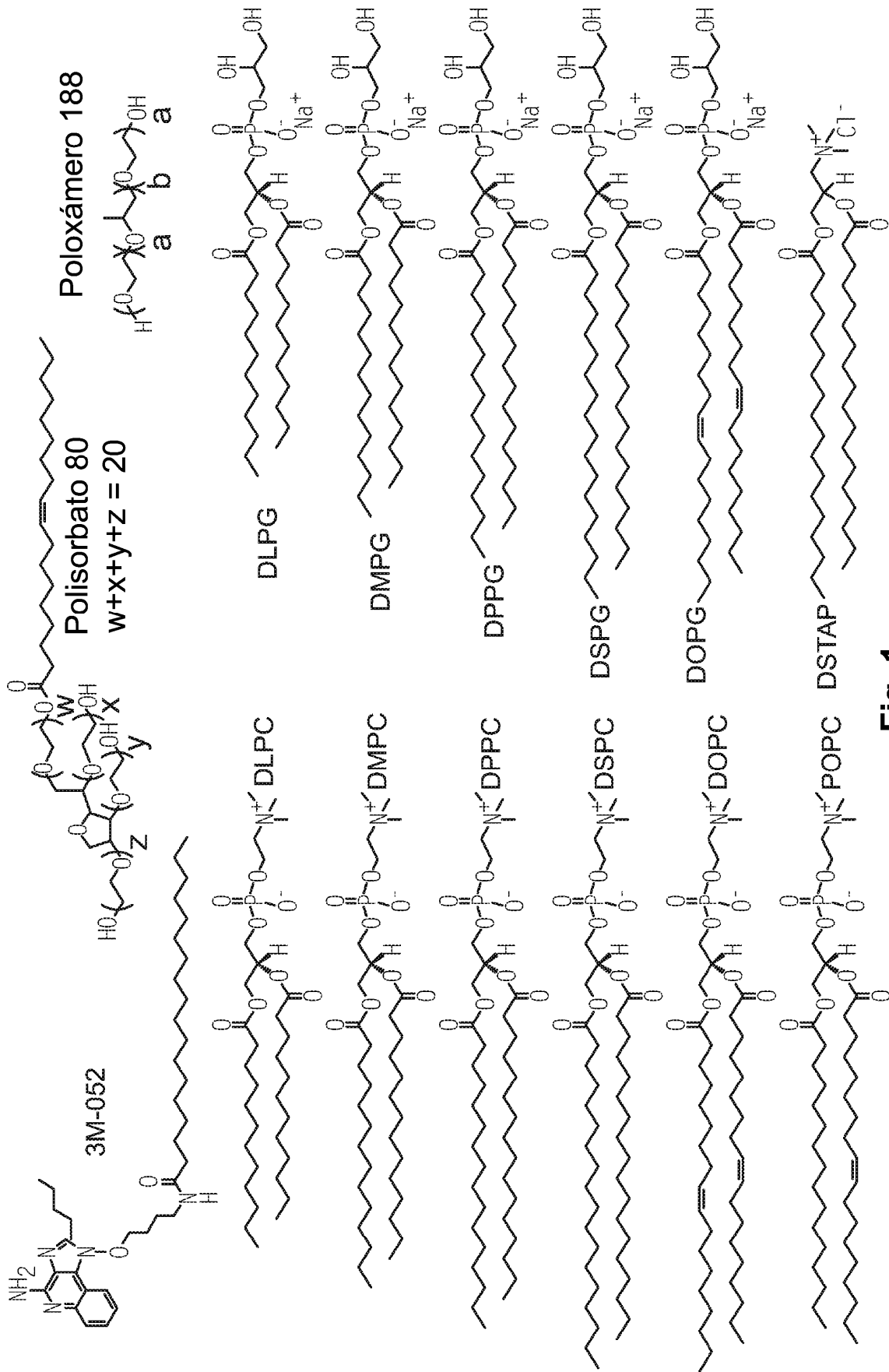
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde la composición es estable, estable durante al menos aproximadamente seis meses, o

45

en donde la composición es estable durante al menos aproximadamente un año, o

en donde la composición es estable a 2-8 °C durante al menos seis meses, o en donde la composición es estable a 2-8 °C durante al menos un año.

14. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar la composición a un sujeto y estimular así una respuesta inmunitaria en el sujeto.
- 5 15. Una composición según la reivindicación 14, en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria inespecífica, o  
en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria específica de antígeno.
- 10 16. Una composición según la reivindicación 14, en donde la respuesta inmunitaria implica la activación de linfocitos B, la activación de linfocitos T, la producción de anticuerpos o la liberación de citocinas.
17. Una composición según la reivindicación 14, en donde la composición se usa para el tratamiento de una alergia, adicción, cáncer o autoinmunidad.
- 15 18. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde el sujeto es un ser humano, o  
en donde el sujeto es un mamífero no humano,  
en donde el mamífero no humano es un perro, una vaca o un caballo.
- 20 19. Un método para preparar una formulación acuosa que comprende un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y un lípido auxiliar o polisorbato 80, en donde la composición que comprende el agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y el lípido auxiliar o polisorbato 80 comprende partículas que se encuentran en un intervalo de 1 nm a aproximadamente 450 nm; en donde el método comprende
- 25 (a) mezclar un agonista de TLR7/8 o un agonista de TLR4 y un lípido auxiliar o polisorbato 80 en disolvente para preparar la solución;  
(b) eliminar el disolvente de la solución de la etapa (a) para preparar una composición de película;  
y  
30 (c) rehidratar la composición de película de la etapa (c) para preparar una composición rehidratada; y  
(d) someter la composición rehidratada a una fuente de alta energía para preparar una composición de nanosuspensión.  
(e) comprendiendo además mezclar una sal de aluminio con la nanosuspensión.
- 35 20. El método de la reivindicación 19, en donde la fuente de alta energía se genera a partir de un microfluidificador, una extrusora, un sonicador, un mezclador Silverson o un homogeneizador.
- 40 21. El método de la reivindicación 19, que comprende además mezclar un antígeno con la composición de nanosuspensión.



**Fig. 1**

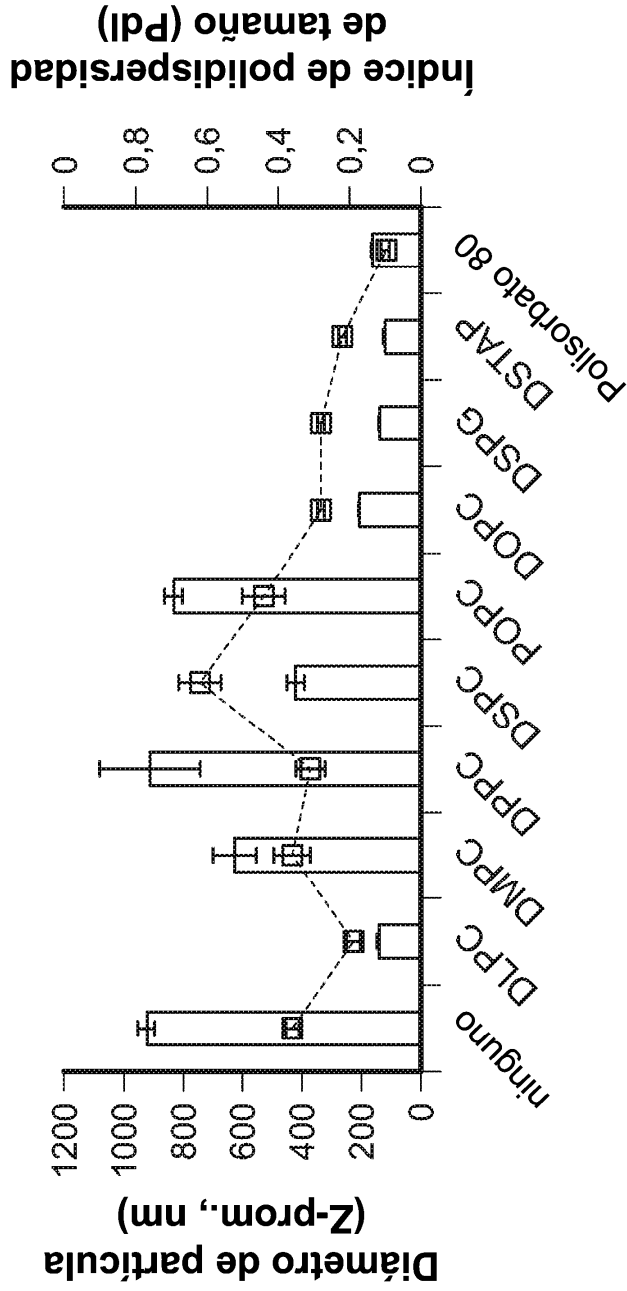


Fig. 2A

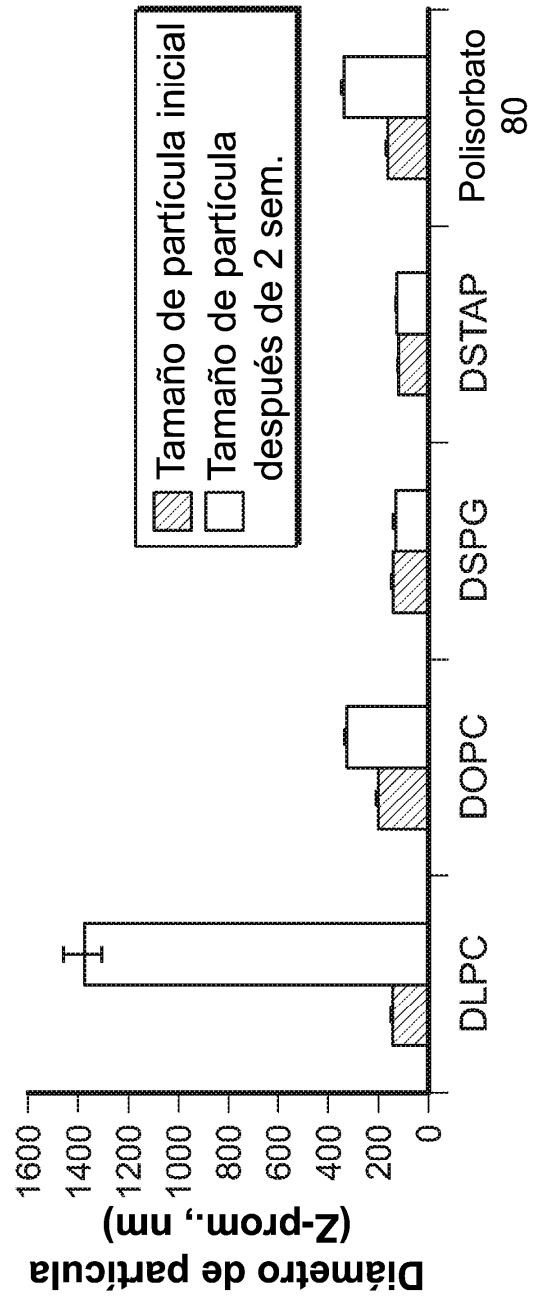


Fig. 2B

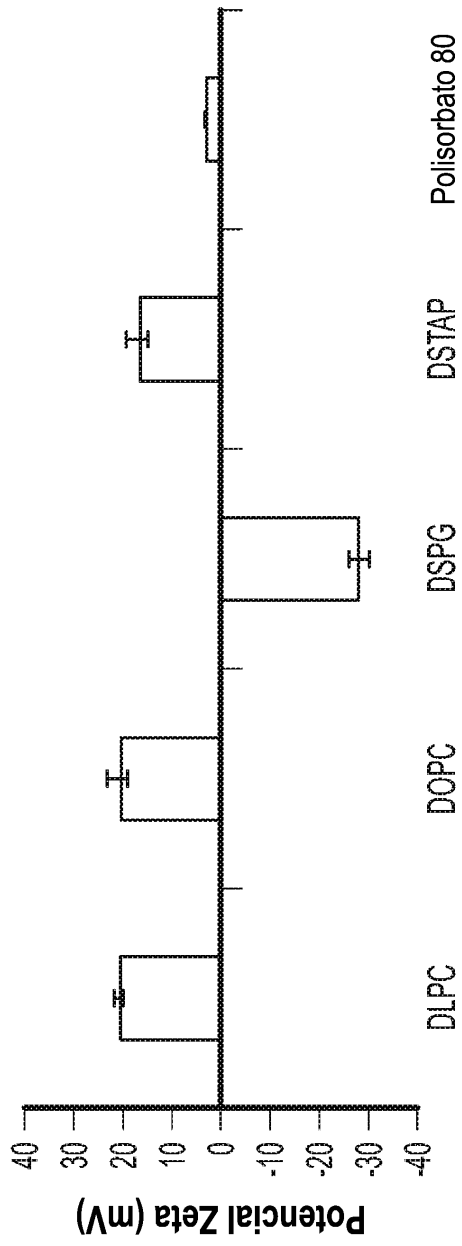


Fig. 2C

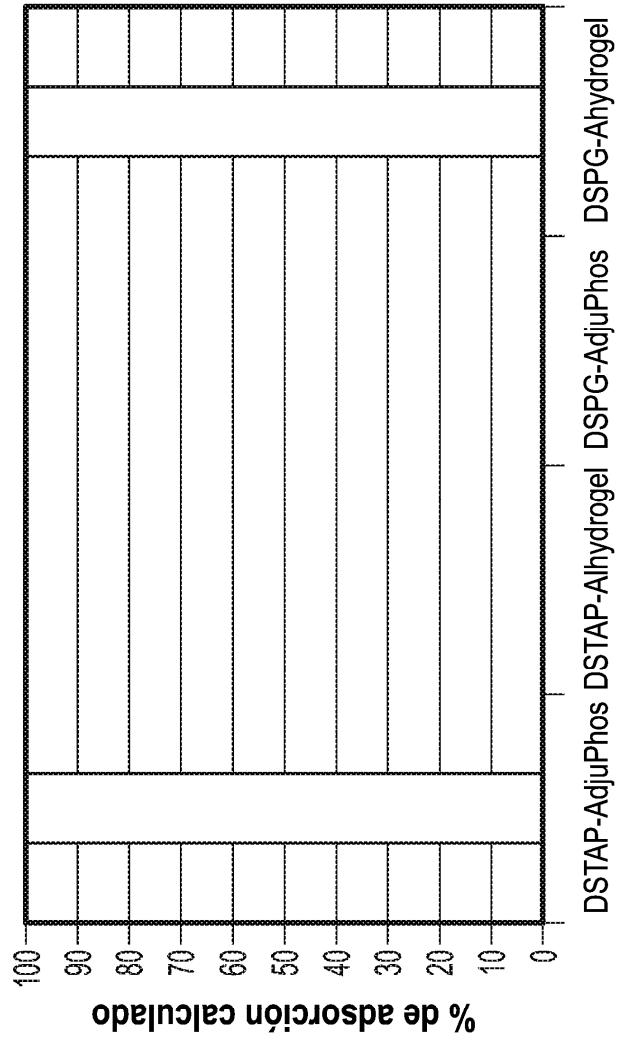
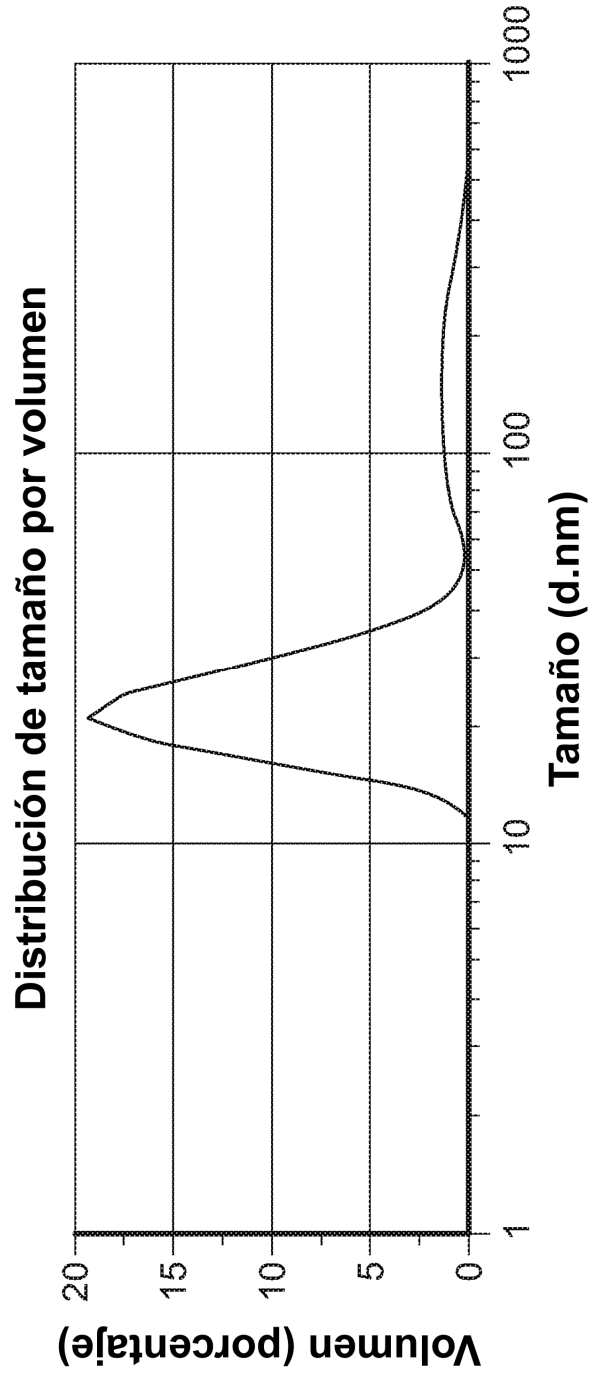
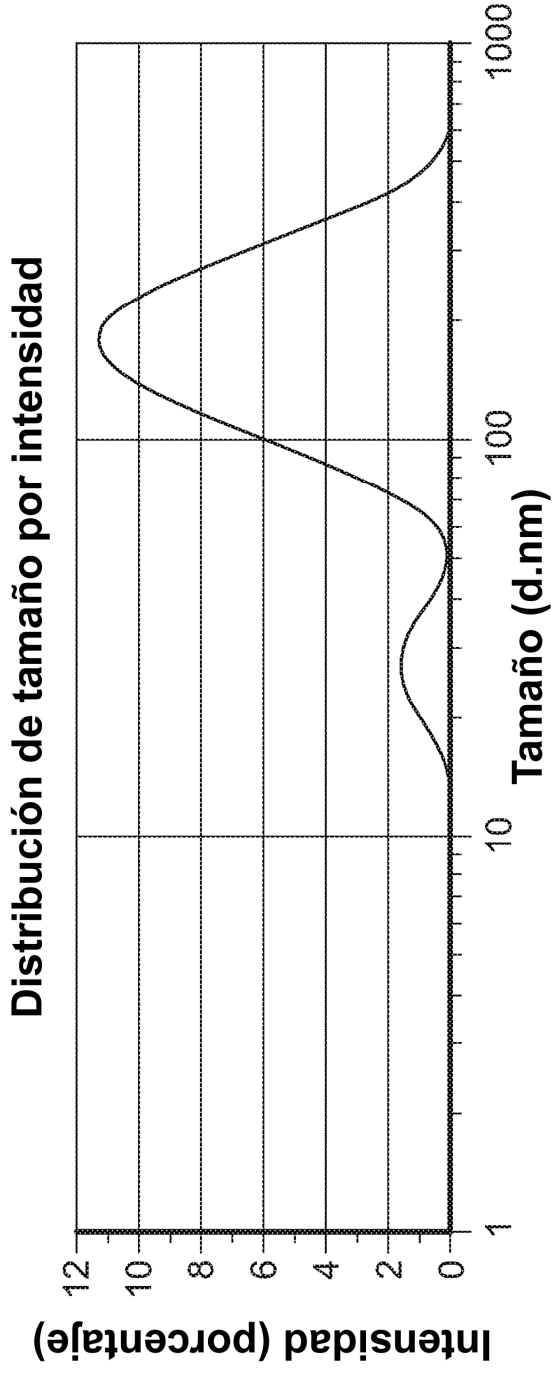


Fig. 2D



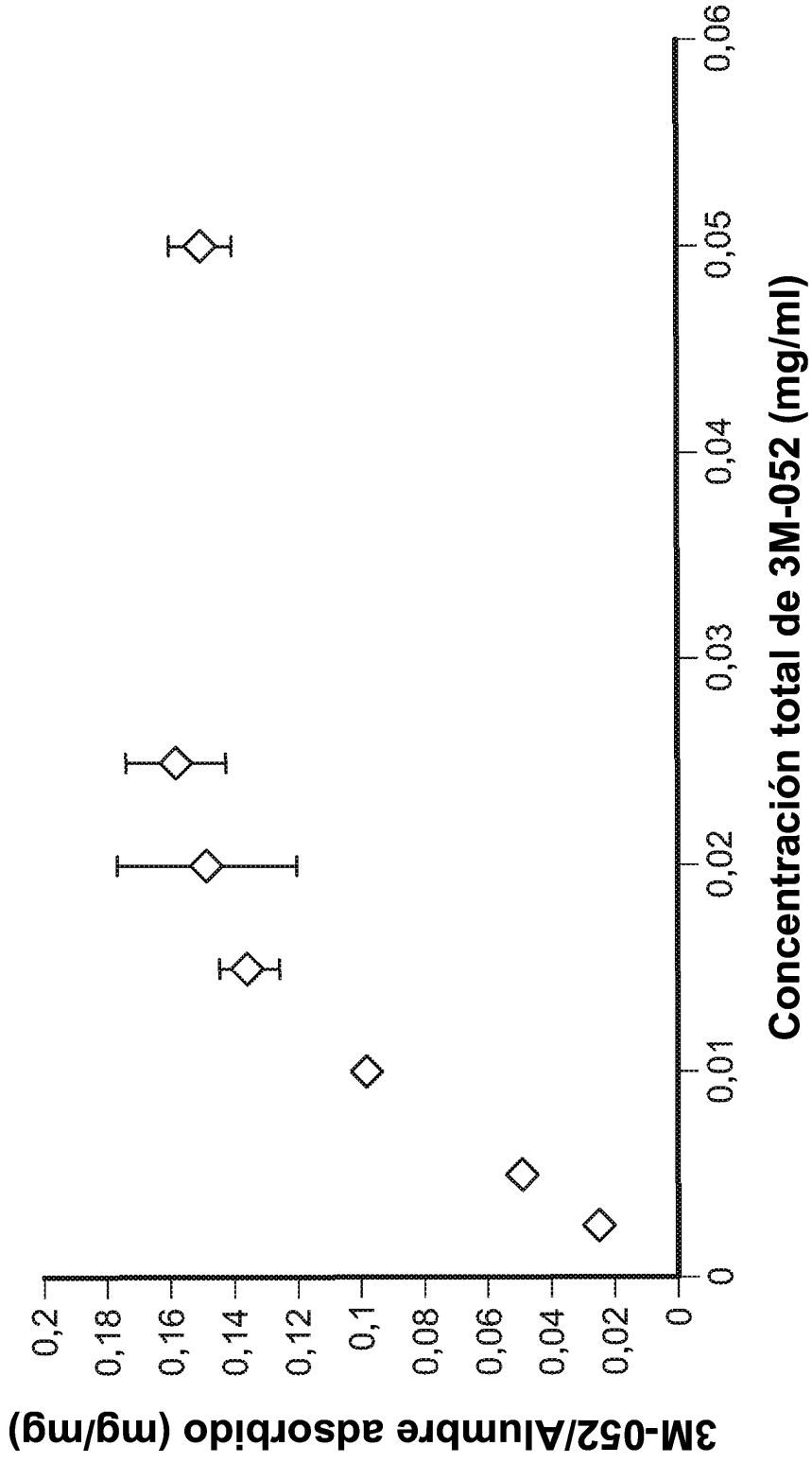
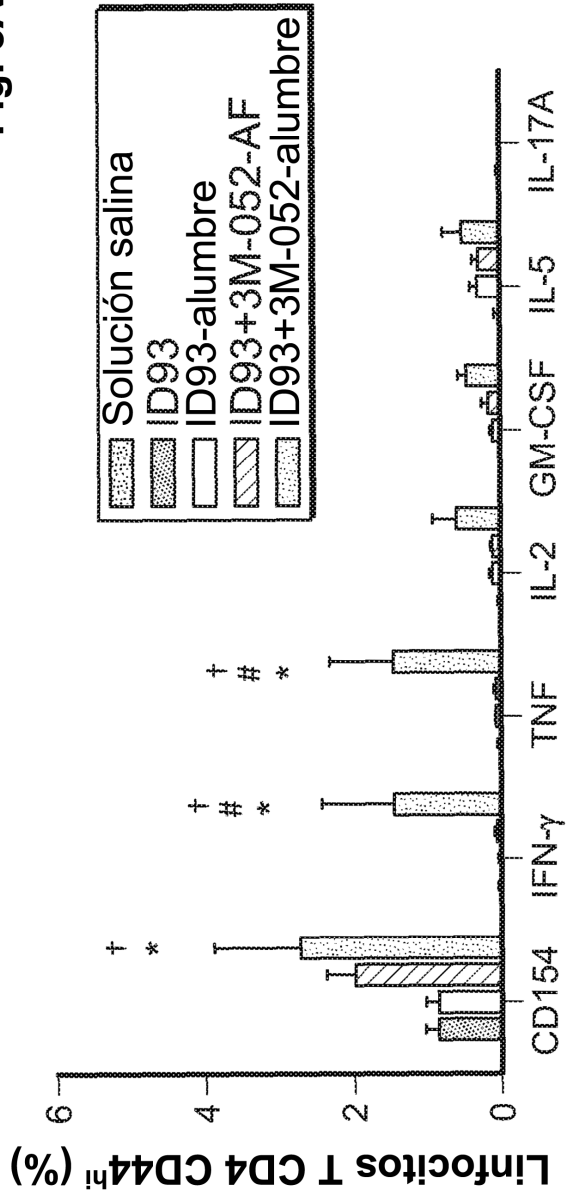
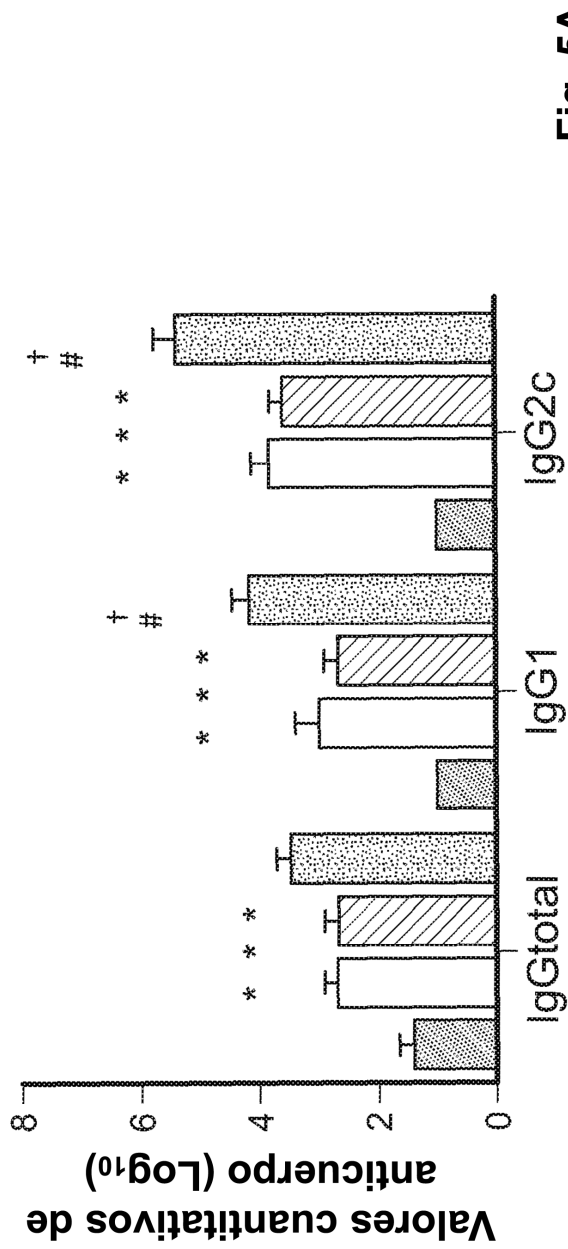


Fig. 4



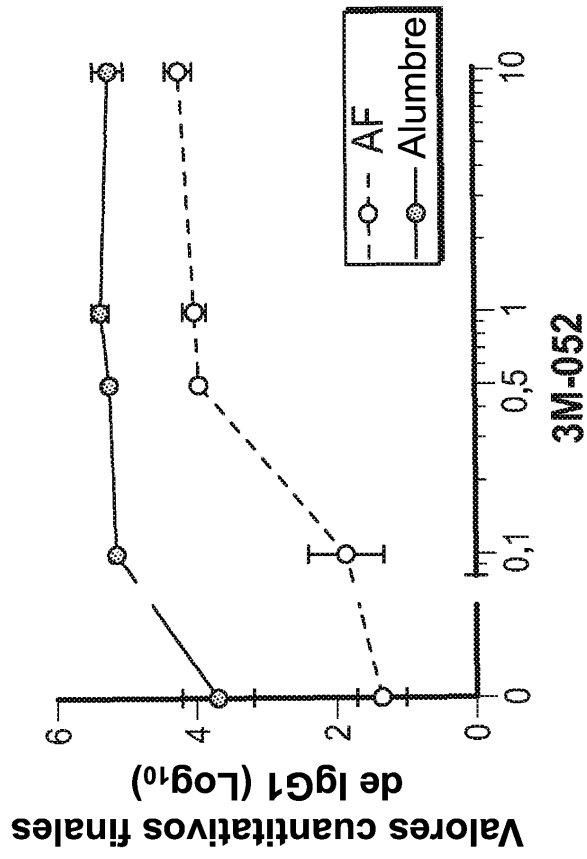


Fig. 6A

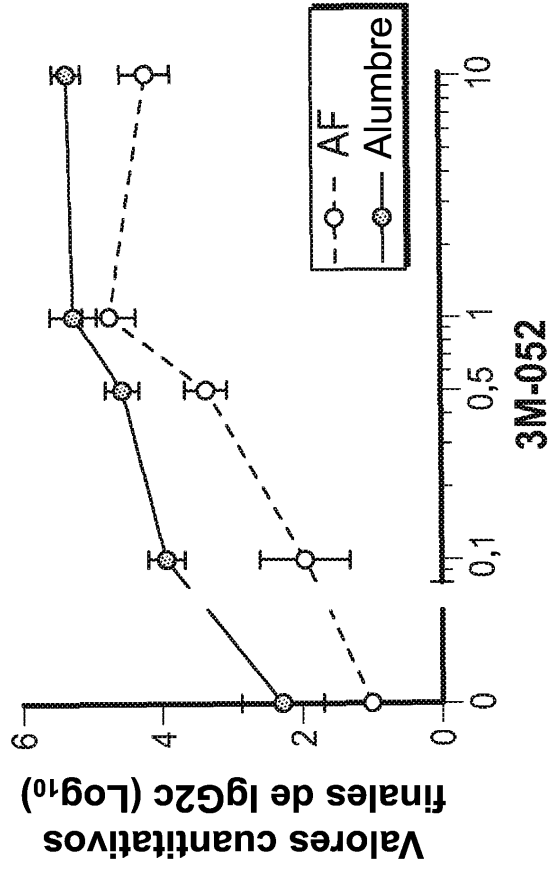


Fig. 6B

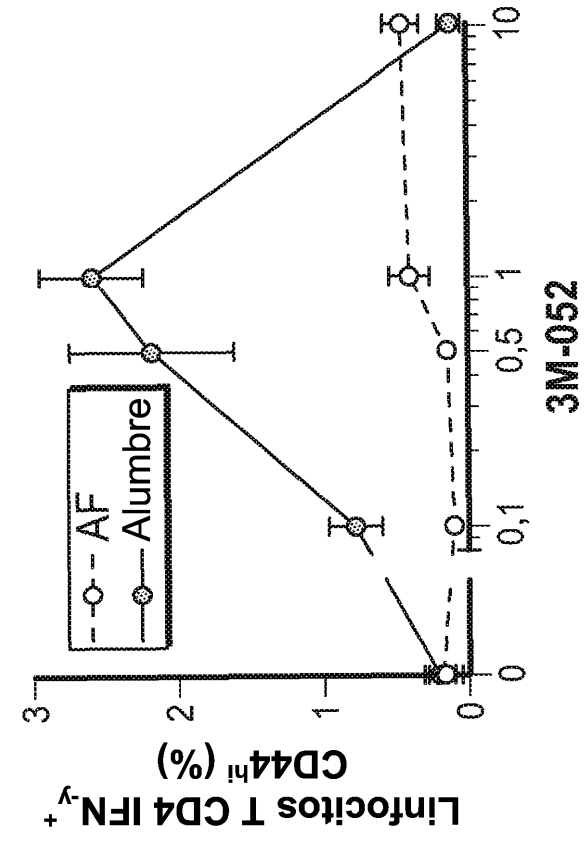


Fig. 6D

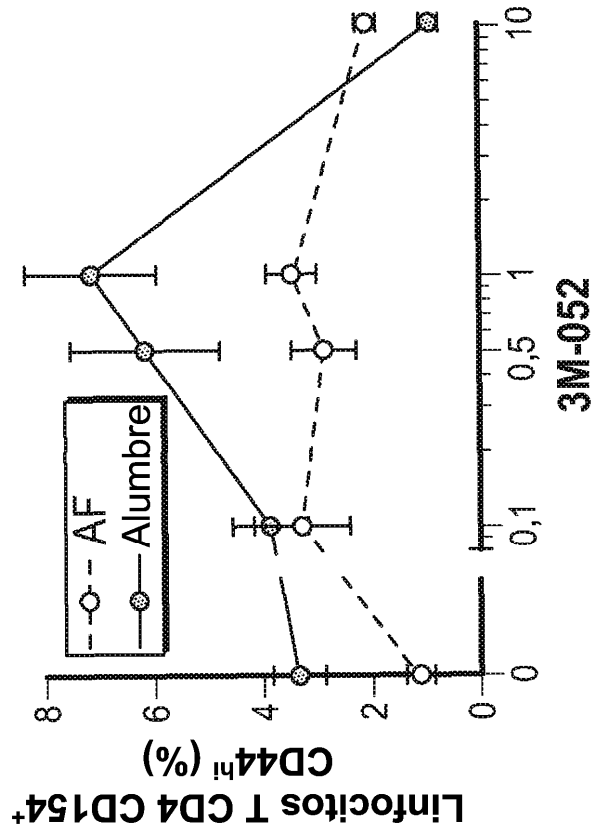
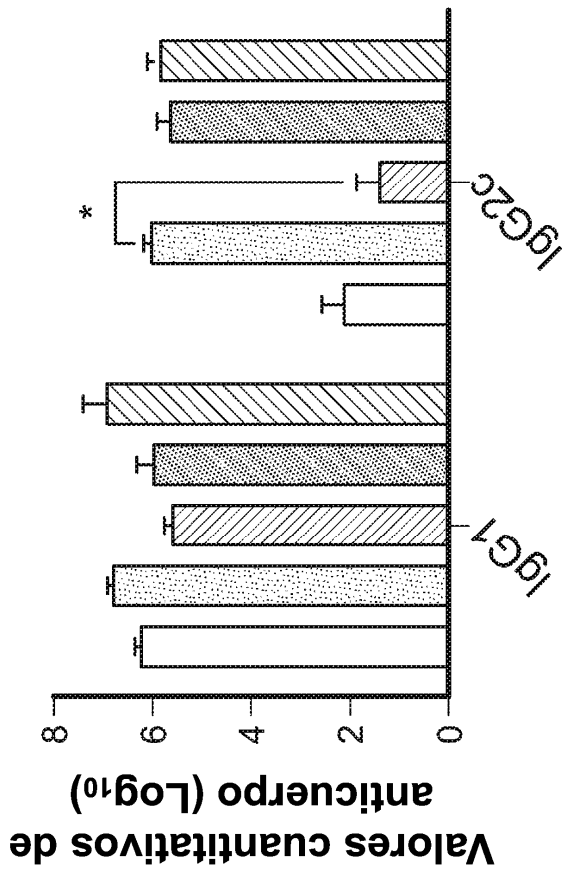
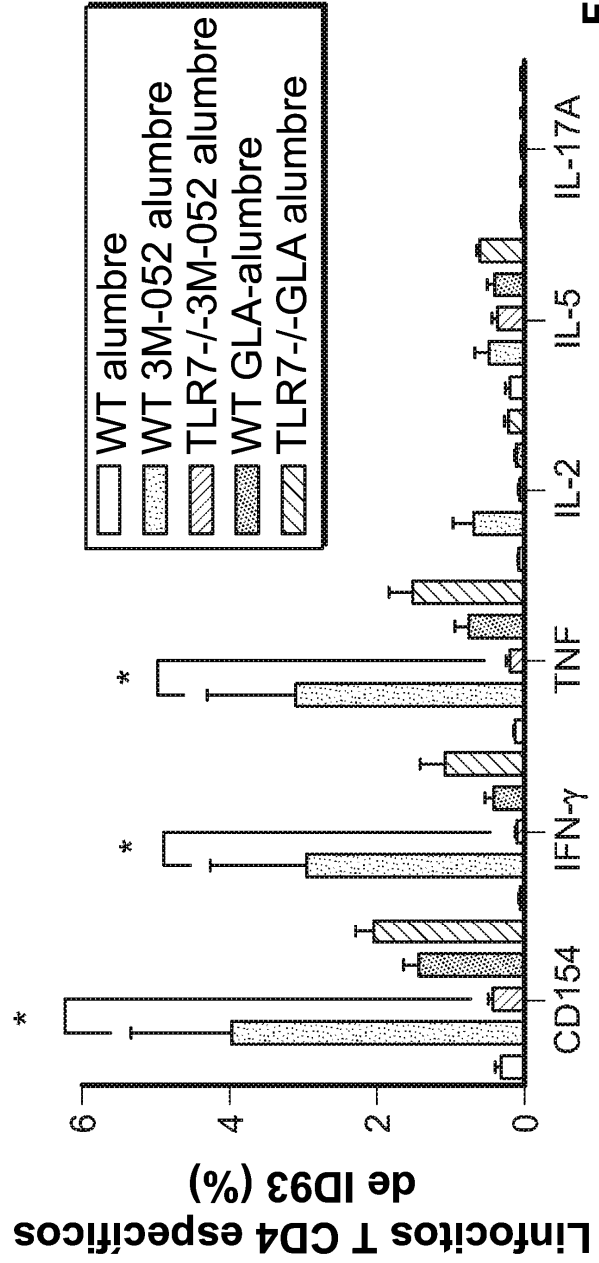


Fig. 6C

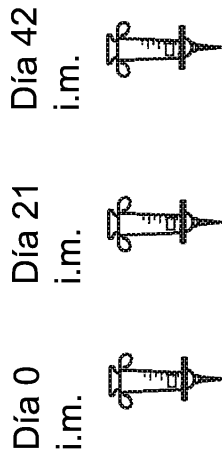


**Fig. 7A**



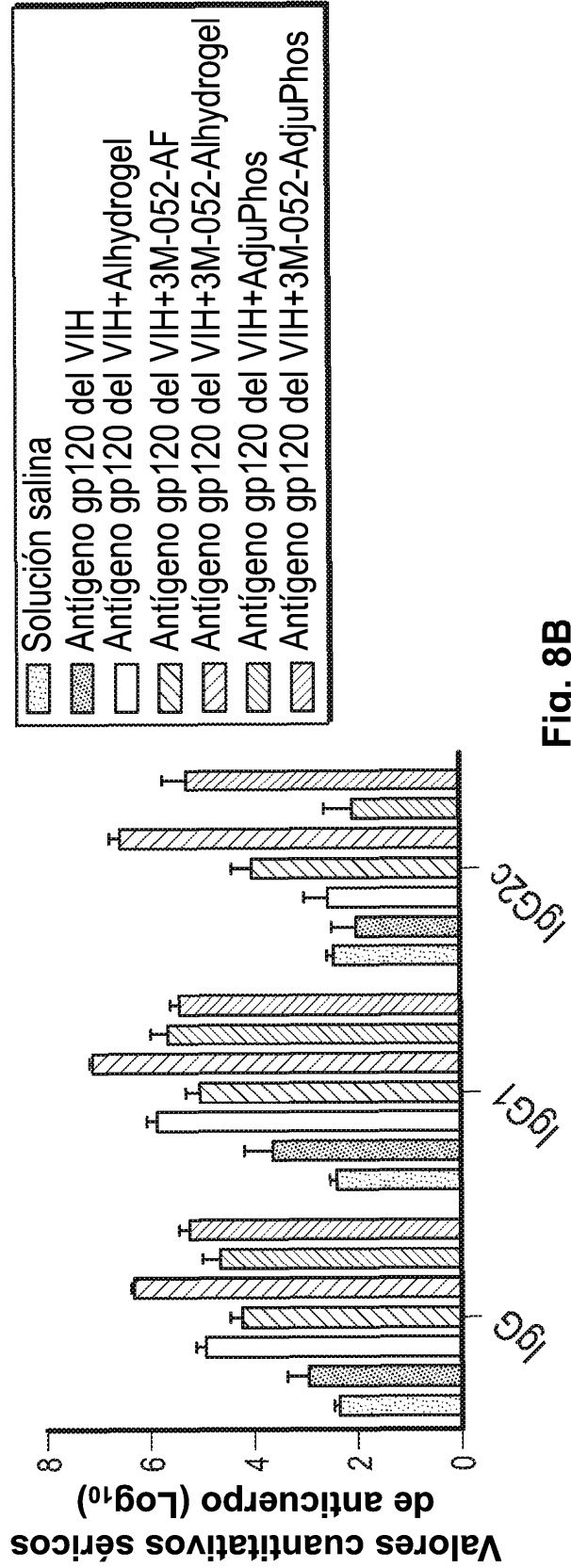
**Fig. 7B**

**Inmunización (i.m.)  
5 ratones C57BL/6/grupo**



Día 21    Día 28    Día 42,63  
 Valores de Ab    Flujo de linfocitos T    Médula ósea  
 cuantitativos (ELISPOT)

**Fig. 8A**



**Fig. 8B**

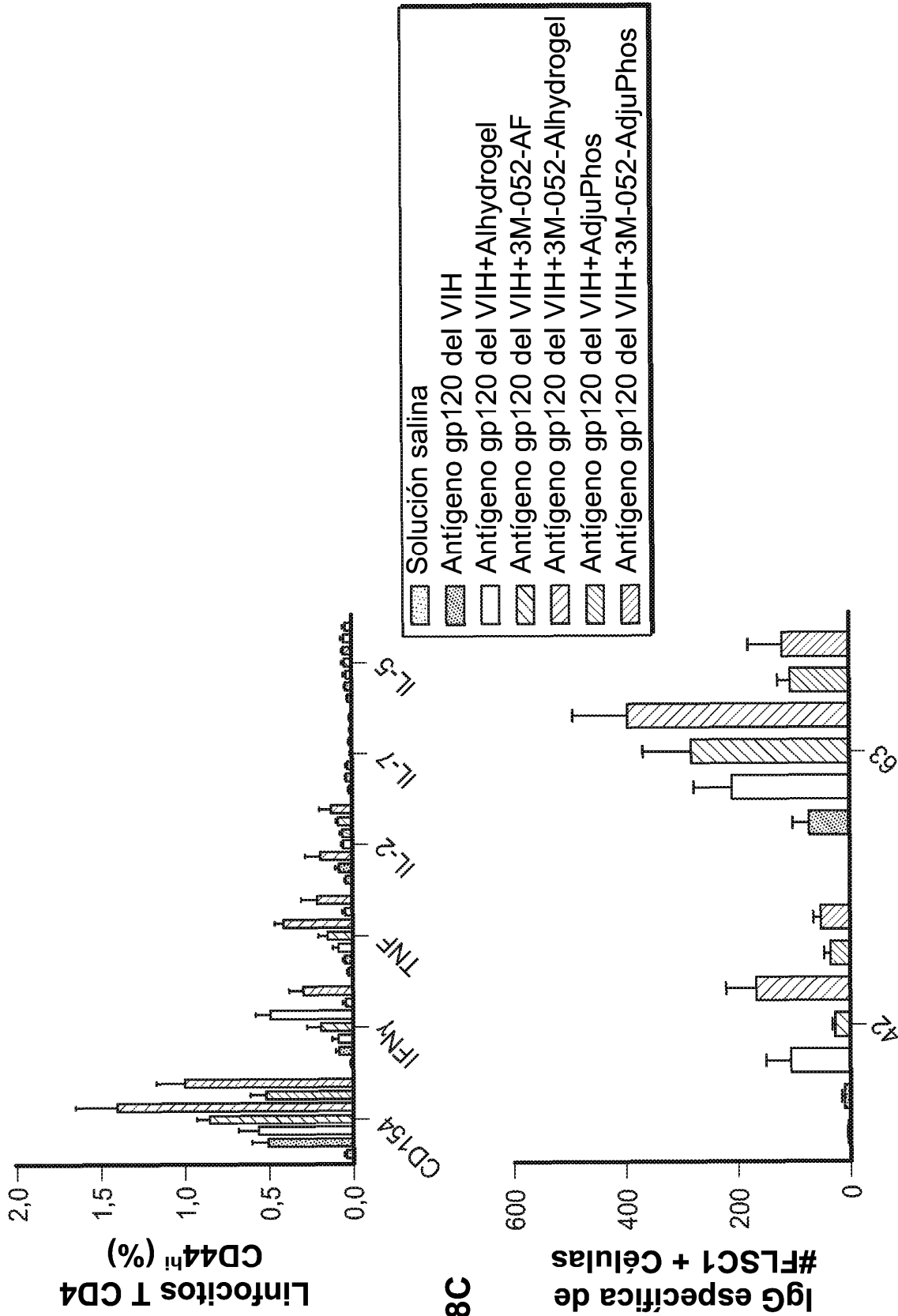
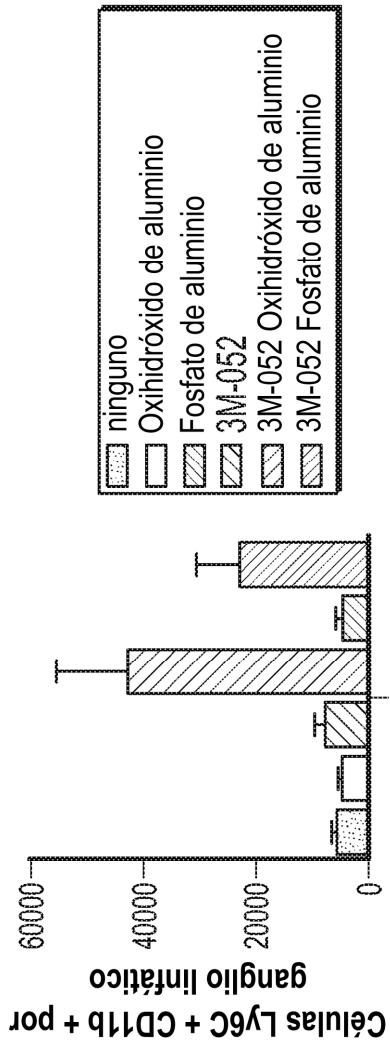
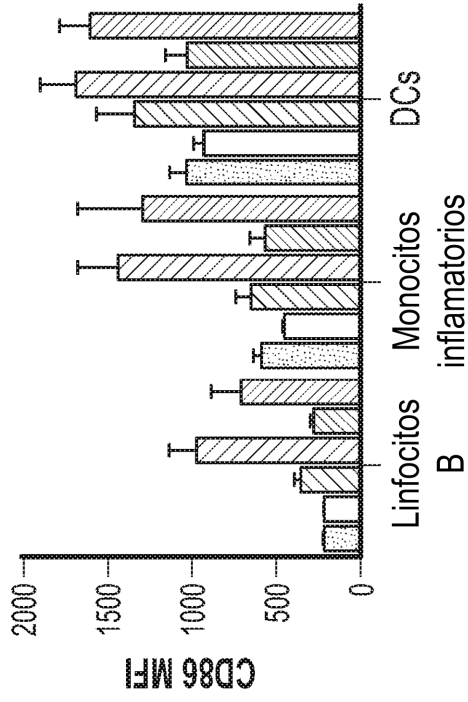


Fig. 8C

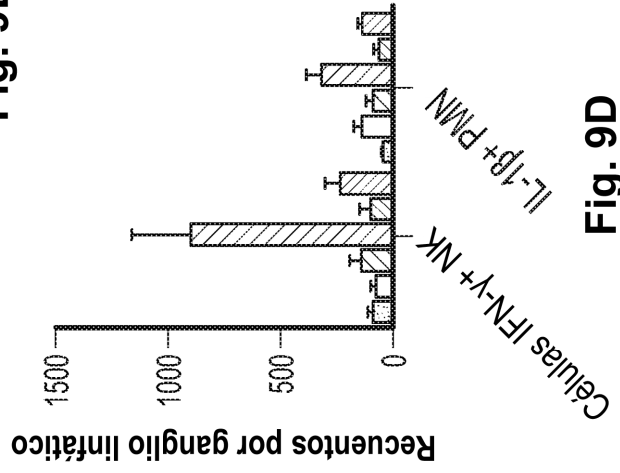
Fig. 8D



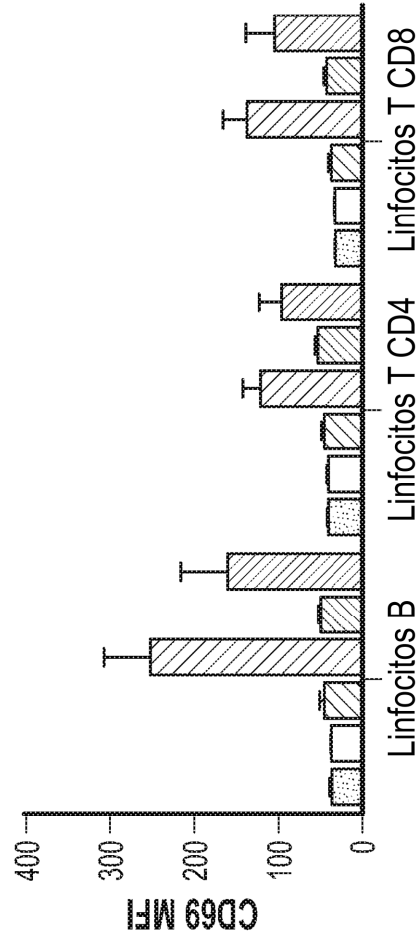
**Fig. 9A**



**Fig. 9B**



**Fig. 9D**



**Fig. 9C**

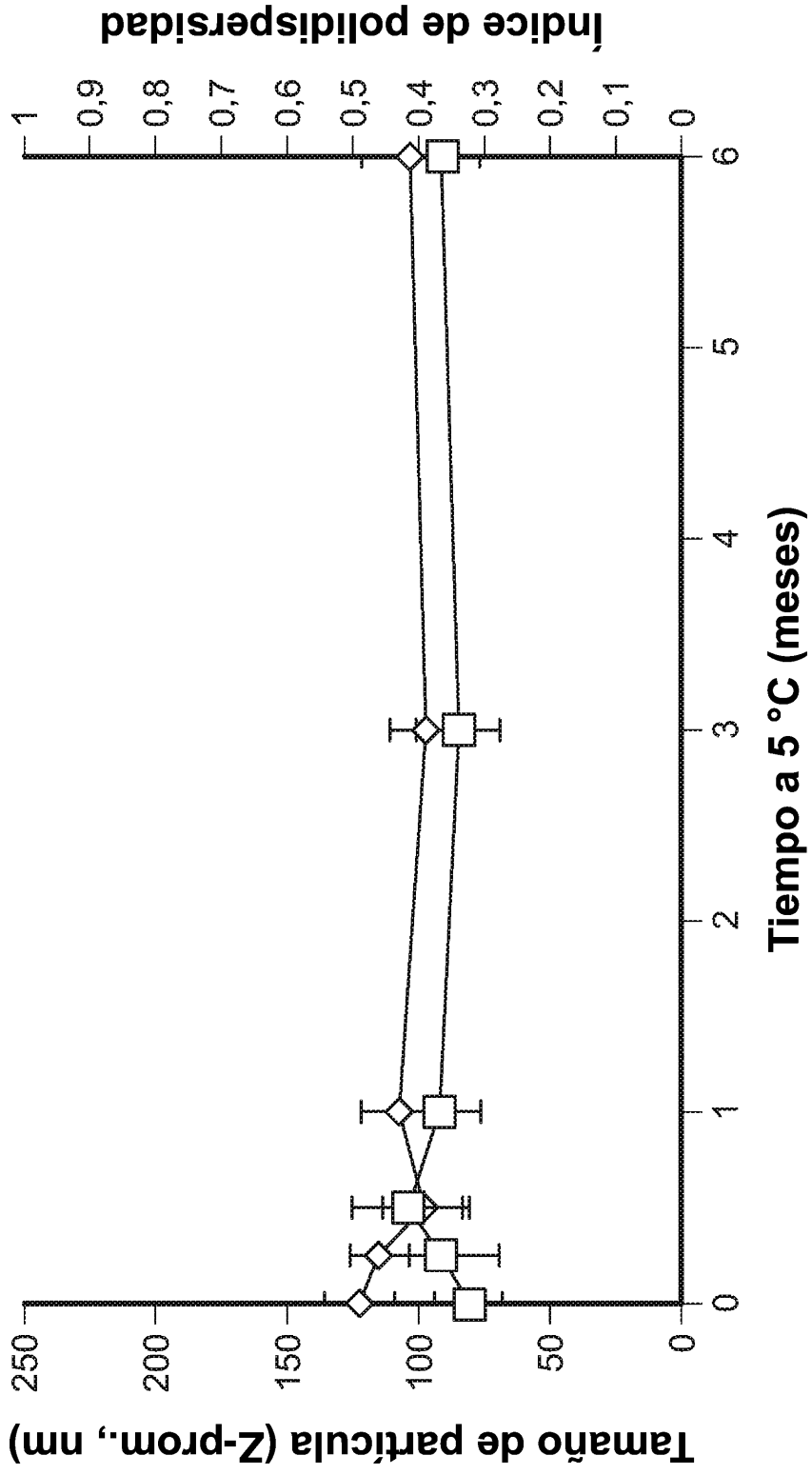
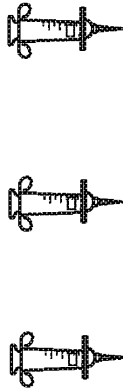


Fig. 10

Inmunización (i.m.)  
5 ratones C57BL/6/grupo

Día 0    Día 21    Día 42  
i.m.    i.m.    i.m.



Día 21    Día 28    Día 42,63  
 Valores    Flujo    Médula  
 cuantitativos (linfocitos ósea  
 de Ab    T)    ELISPOT

Fig. 11A

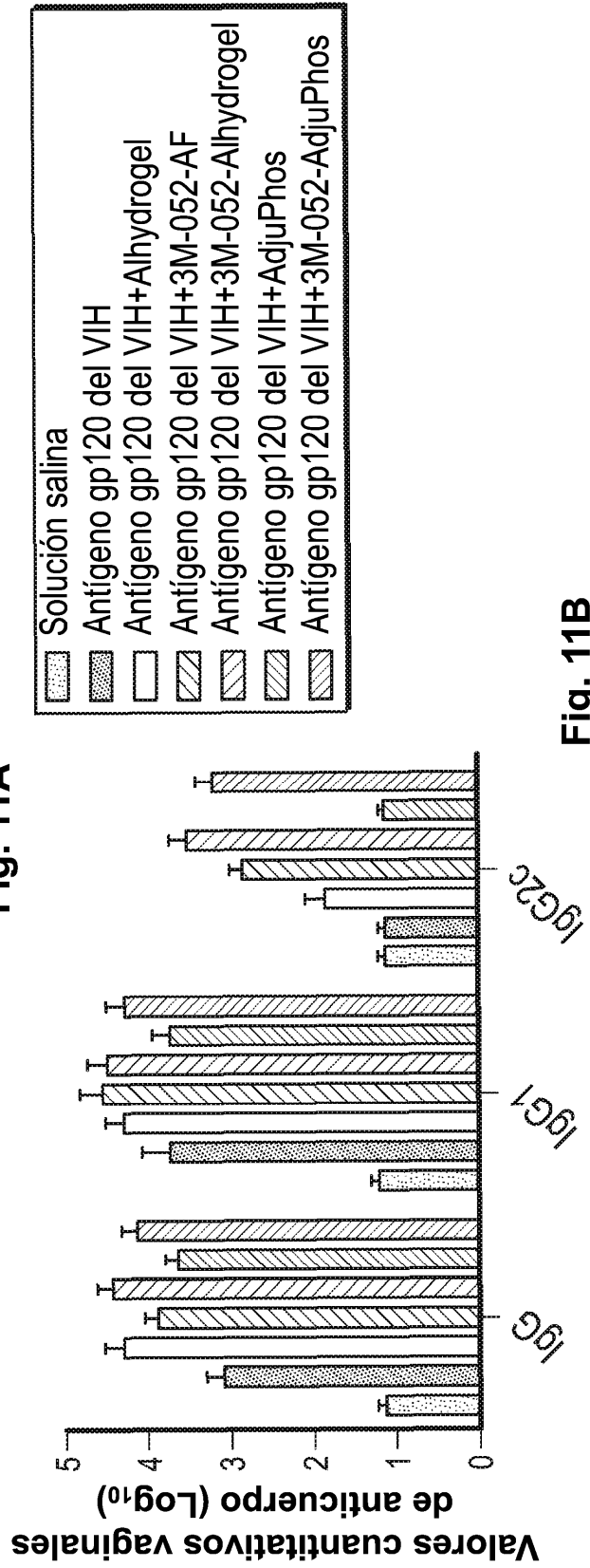
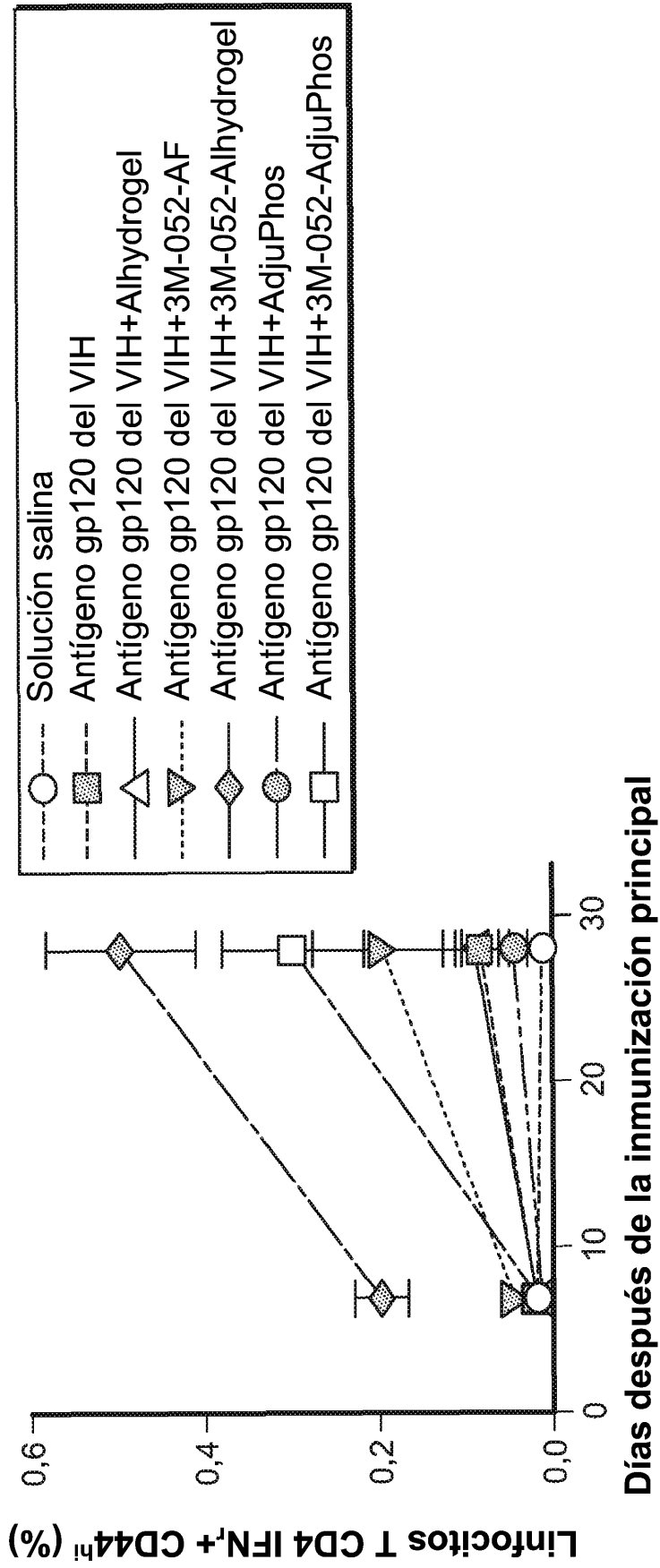


Fig. 11B



**Fig. 11C**