



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 306**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99930126 .0**

96 Fecha de presentación : **28.05.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1154793**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2001**

54 Título: **Uso de bioadhesivos y adyuvantes para la administración de antígenos por vía mucosa.**

30 Prioridad: **26.02.1999 US 122172 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.01.2011

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, Inc.
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Singh, Manmohan y**
O'Hagan, Derek

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 350 306 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

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere en general a sistemas de polímeros bioadhesivos. En particular, la invención se refiere al uso de bioadhesivos y adyuvantes para la administración de antígenos a través de una mucosa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La inmunidad de las mucosas proporciona un mecanismo de defensa importante contra una amplia diversidad de patógenos. Al respecto, las superficies mucosas de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario están continuamente expuestas a antígenos extraños, que incluyen organismos bacterianos, virales y, algunas veces, parásitos
- 15 potencialmente infecciosos. Las respuestas inmunitarias de las mucosas protegen contra tales desafíos y tienen características diferentes y especializadas.

- Por ejemplo, la principal inmunoglobulina producida por el sistema inmunitario mucoso es la IgA secretora. Las células especializadas captadoras de antígenos en las placas de Peyer del
- 20 tracto intestinal o los tejidos linfoides nasofaríngeos, denominados micropliegues o células M, transportan el antígeno a los tejidos linfoides asociados a la mucosa subyacente (MALT). En otras áreas del epitelio mucoso, tal como el epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias, las células dendríticas sirven como células de presentación de antígenos y migran a los nódulos linfáticos locales o al MALT. El procesamiento y la presentación de los antígenos
- 25 tienen lugar en el MALT, dando como resultado la activación de las células B productoras de IgA específica de antígeno. El posterior tránsito y recirculación de las células B productoras de IgA activadas a los distintos componentes del sistema inmune mucoso, por ejemplo, a los tractos respiratorio, intestinal y genital, proporciona las respuestas mucosas locales de IgA diseminadas a través del "sistema mucoso común". Por consiguiente, el sistema inmune
- 30 mucoso es adecuado únicamente para responder a los tipos de desafío antigénico que pueden ser encontrados por las superficies mucosas, y puede proporcionar el tipo de respuesta inmunitaria más eficaz frente a patógenos concretos. Por consiguiente, los mecanismos de administración de antígenos dirigidos al sistema inmune mucoso proporcionan un medio atractivo para conseguir la inmunidad.

Se han realizado intentos para usar polímeros bioadhesivos para la administración de fármacos. Los bioadhesivos son materiales sintéticos y materiales de tipo natural capaces de adherirse a sustratos biológicos por períodos de tiempo prolongados. Los mucoadhesivos son un subtipo de bioadhesivos que suelen adherirse al moco. Como ejemplo no limitante de mucoadhesivos, Carbopol y policarbofilo, ambos derivados sintéticos entrecruzados del poli(ácido acrílico), presentan excelentes propiedades de adhesión *in vitro*. Otro mucoadhesivo natural es el ácido hialurónico, también conocido como hialuronano. Se ha mostrado que el ácido hialurónico es mucoadhesivo, tanto *in vivo* como *in vitro*. Véase, por ejemplo, Cortivo y col., Biomaterials, 1991, 12: 727-730; Publicación Europea Nº 517.565; documento WO 96/29998. No obstante, algunos bioadhesivos pueden causar irritación local. Por consiguiente, pocos sistemas de administración de bioadhesivos están disponibles en el comercio.

El documento WO 94/20070 se refiere a mucoadhesivos poliméricos en la administración de inmunógenos en superficies mucosas y a composiciones que comprenden un antígeno y un mucoadhesivo, y opcionalmente, un adyuvante.

El documento WO 95/17211 se refiere a adyuvantes no tóxicos para las mucosas que pueden mezclarse con otros antígenos para proporcionar una vacuna que puede administrarse a superficies mucosas, en los que el adyuvante es, de preferencia, un mutante destoxificado de una toxina de ribosilación de ADP bacteriana.

El documento WO 98/42375 se refiere a mutantes destoxificados de toxinas de ribosilación de ADP bacterianas, en particular a las de pertussis (PT), cólera (CT) y *E. coli* termolábil (LT).

Sin embargo, el uso de bioadhesivos, incluidos los mucoadhesivos y adyuvantes para administrar “antígenos” de vacunas, según se definen en el presente documento, no ha sido descrito hasta el momento.

RESUMEN DE LA INVENCION

En el presente documento se dan a conocer composiciones para uso en un procedimiento eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero usando inmunización por vía mucosa y técnicas de administración de bioadhesivos.

La presente invención está basada en el descubrimiento que la administración por vía mucosa

de bioadhesivos, incluidos los mucoadhesivos y los derivados de mucoadhesivos, y un adyuvante, en combinación con un antígeno de interés, actúa aumentando la inmunogenicidad del antígeno coadministrado con los mismos. Sin la intención de estar ligados a una teoría concreta, se cree que las propiedades de bioadhesión de los bioadhesivos disminuyen la velocidad de aclaramiento del antígeno y permiten, por consiguiente, un tiempo de contacto más largo entre el antígeno y la membrana que lo absorbe. Además, puede producirse un ensanchamiento transitorio en las uniones entre las células de los epitelios de las mucosas que permiten un transporte más eficaz del antígeno de interés. El uso de bioadhesivos y adyuvantes proporciona un enfoque seguro y eficaz para mejorar la inmunogenicidad de una gran diversidad de antígenos.

Por consiguiente, en una forma de realización, la invención está dirigida a una composición según se define en la reivindicación 1, que comprende (incluye) al menos un bioadhesivo, al menos un adyuvante y al menos un antígeno seleccionado. El antígeno y el adyuvante pueden estar, cada uno, presentes en una cantidad desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 40% (p/p) del antígeno o el adyuvante al bioadhesivo. El bioadhesivo es un mucoadhesivo en el que el mucoadhesivo se selecciona de derivados entrecruzados de poli(ácido acrílico). En formas de realización de preferencia de la presente invención, el mucoadhesivo no es ácido hialurónico. El adyuvante es un mutante destoxificado de una toxina de ribosilación de ADP bacteriana seleccionado de LT-R72 o LT-K63. En aún otras formas de realización, la presente invención está dirigida a los procedimientos de producir composiciones farmacéuticas que comprenden (incluyen) combinar las composiciones descritas anteriormente de al tres componentes con excipientes mucosos farmacéuticamente aceptables. También se dan a conocer procedimientos de inmunización que comprende la administración por vía mucosa de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones farmacéuticas a un sujeto vertebrado. También se dan a conocer procedimientos para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno seleccionado que comprenden (incluyen) la administración por vía mucosa de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones farmacéuticas a un sujeto vertebrado.

En el presente documento también se dan a conocer procedimientos de inmunización que comprenden la administración por vía mucosa de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones farmacéuticas que comprenden los bioadhesivos, adyuvantes, antígenos y excipientes a un sujeto vertebrado, y procedimientos para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno seleccionado que comprenden (incluyen) la administración por vía mucosa

de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones farmacéuticas que comprenden los antígenos, adyuvantes y bioadhesivos a un sujeto vertebrado.

5 En aún otras formas de realización, la presente invención está dirigida a las composiciones farmacéuticas, según se definen en la reivindicación 9, que comprenden (incluyen) al menos un antígeno, al menos un adyuvante, al menos un bioadhesivo y al menos un excipiente mucoso farmacéuticamente aceptable, para uso en procedimientos de inmunización que comprenden la administración por vía mucosa de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones farmacéuticas a un sujeto vertebrado. También se dan a conocer procedimientos para generar
10 una respuesta inmunitaria contra un antígeno seleccionado que comprenden (incluyen) administrar por vía mucosa cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones farmacéuticas a un sujeto vertebrado.

Estas y otras formas de realización de la presente invención vendrán fácilmente a la mente de
15 los expertos en la técnica en vista de la descripción en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa la inmunogenicidad del antígeno HA en diferentes bioadhesivos en
20 conejos. Los grupos de conejos a los que se administró antígeno y adyuvante con carbopol o HPMC tuvieron valores más altos que los conejos a los que se administró antígeno y adyuvante solos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La práctica de presente invención utilizará, a menos que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, incluidos en la experiencia de la técnica. Tales técnicas están explicadas completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences,
30 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell. Scientific Publications); y Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989).

35 Según se utilizan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las

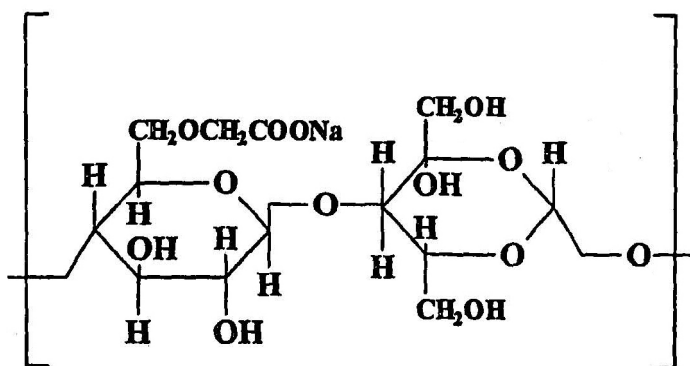
formas singulares “un”, “una” y “el” “la” incluyen referencias al plural a menos que el contenido lo dicte claramente de otra manera. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a “un antígeno” incluye una mezcla de dos o más de tales agentes.

5 I. Definiciones

En la descripción de la presente invención, se utilizarán los siguientes términos, y se pretende que estén definidos como se indica a continuación.

- 10 El término “mucoadhesivo” se refiere a un agente bioadhesivo que se une de manera preferente al moco o a las superficies de las células mucosas. Ejemplos de mucoadhesivos conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, los derivados reticulados de poli (ácido acrílico), alcohol polivinílico, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polisacáridos y carboximetilcelulosa. La carboximetilcelulosa, un bioadhesivo de ejemplo, se muestra a
15 continuación (estructura 1).

(1)



Un “derivado de mucoadhesivo” es una molécula derivada de un mucoadhesivo y denota cualquiera de diversas sustancias, conocidas en la técnica, tales como los mucoadhesivos esterificados en los que aproximadamente el 75%-100% de los grupos carboxilo libres están esterificados con un grupo alquilo. El término también incluye los ésteres de mucoadhesivos “mezclados”, en los que los grupos carboxilo están esterificados con más de un grupo alquilo. Tales ésteres “mezclados” se describen de manera más completa a continuación. Además, el término “derivado de mucoadhesivo” también se refiere a los derivados autorreticulados de
35 mucoadhesivos que incluyen ésteres internos y en los que aproximadamente del 0,5% hasta

aproximadamente el 20% de los grupos carboxilo de los mucoadhesivos están reticulados a grupos hidroxilo del mismo o de diferentes mucoadhesivos.

5 El término “microesfera” según se utiliza en el presente documento, se refiere a una partícula de aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 150 μm de diámetro, de más preferencia de aproximadamente 200 nm hasta aproximadamente 30 μm de diámetro, y de mayor preferencia de aproximadamente 500 nm hasta aproximadamente 10 μm de diámetro. El tamaño de las microesferas se determina fácilmente por medio de técnicas bien conocidas en la técnica, tales como la espectroscopía de correlación de fotones, la difracción láser y/o la
10 microscopía electrónica de barrido. Las microesferas para uso en el presente documento se formarán a partir de mucoadhesivos y de sus derivados, descritos con más detalle, que no son tóxicos y que son biodegradables.

Los mucoadhesivos de la presente invención también pueden utilizarse para formar
15 microesferas y/o micropartículas, como se describe en la publicación PCT/US98/01738. El término “alquilo” según se utiliza en el presente documento se refiere a un grupo hidrocarburo saturado, ramificado o no ramificado, de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, t-butilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo, y similares, así como a grupos cicloalquilo, tales como ciclopentilo, ciclohexilo,
20 bencilo, y similares. La expresión “administración por vía mucosa” se refiere a la administración de un antígeno a una superficie mucosa, que incluye la administración nasal, pulmonar, vaginal, rectal, uretral y sublingual o bucal.

El término “antígeno” se refiere a cualquier sustancia, incluidos una proteína o una proteína-polisacárido, proteína-lipopolisacárido, polisacárido, lipopolisacárido, polipéptidos, ADN, ARN, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), subunidades virales, virus enteros o bacterias enteras que, cuando es extraña para el torrente sanguíneo de un animal, al conseguir acceder a los tejidos de tal animal, estimula la formación de anticuerpos específicos y reacciona específicamente *in vivo* o *in vitro* con un anticuerpo homólogo. Además, un “antígeno” puede incluir
30 modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza), en la secuencia nativa, con la condición de que la modificación mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser intencionadas, como, por ejemplo, a través de mutagénesis dirigida a sitios, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de los huéspedes que producen los
35 antígenos. Por otra parte, según se utiliza en el presente documento, un antígeno, estimula la

proliferación de linfocitos T, de preferencia linfocitos Th1, con receptores para el antígeno y puede reaccionar con los linfocitos para iniciar las series de respuestas denominada inmunidad mediada por células.

- 5 Un hapteno está dentro del alcance de esta definición de antígeno. Un hapteno es aquella porción de una molécula antigénica o complejo antigénico que determina su especificidad inmunológica. Comúnmente, un hapteno es un péptido o un polisacárido en los antígenos que se presentan naturalmente. En los antígenos artificiales puede ser una sustancia de bajo peso molecular, tal como un derivado de ácido arsanílico. Un hapteno reaccionará de manera
- 10 específica *in vivo* o *in vitro* con anticuerpos homólogos o con linfocitos T. Son descriptores alternativos los determinantes antigénicos, el agrupamiento estructural antigénico y el agrupamiento hapténico.

- Para los fines de la presente invención, los antígenos pueden obtenerse a partir de cualquiera
- 15 de varias fuentes conocidas, que incluyen, sin limitación, virus, bacterias, parásitos y hongos. El término también se refiere a los diversos antígenos tumorales.

- Según se utiliza en el presente documento, el término inmunización se refiere al proceso de generación de una respuesta inmunológica a través de la administración de un antígeno a un
- 20 individuo.

- Una “respuesta inmunológica” para un antígeno o para una composición es el desarrollo, en un sujeto, de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular para las moléculas presentes en la composición de interés. Para los fines de la presente invención, una “respuesta inmunitaria
- 25 humoral” se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpos, mientras que una “respuesta inmunitaria celular” es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por células T citolíticas (“CTL”). Las CTL tienen especificidad por los antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresan en las superficies de las células. Las CTL
- 30 ayudan a inducir y a promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante células T ayudantes. Las células T ayudantes actúan ayudando a estimular la función, y se centran en la actividad, de las células efectoras no
- 35 específicas frente a las células que presentan antígenos peptídicos en asociación con las

moléculas del MHC en su superficie. Una “respuesta inmunitaria celular” también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras de tales moléculas producidas por células T activadas y/u otros glóbulos blancos, incluidas las derivadas de células T CD4+ y CD8+.

- 5 Según se utiliza en el presente documento, una “composición inmunogénica” o una vacuna es una composición que provoca una respuesta inmunológica. Las composiciones inmunogénicas o vacunas que provocan una respuesta inmunitaria celular pueden servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado por la presentación del antígeno en asociación con moléculas del MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por células se dirige a las células que
10 presentan el antígeno en su superficie o a su proximidad. Además, pueden generarse linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un huésped inmunizado.

- La capacidad de un antígeno o de una composición inmunogénica concretos para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse por una serie de
15 ensayos, tales como por ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, o por medio de ensayos para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado. Tales ensayos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson y col., J. Immunol., 1993, 151: 4189-4199; Doe y col., Eur. J. Immunol., 1994, 24: 2369-2376; y los ejemplos a continuación.

- 20 Por consiguiente, una respuesta inmunológica según se usa en el presente documento puede ser una que estimula la producción de CTL y/o la producción o la activación de células T ayudantes. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. Por lo tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los
25 siguientes efectos: la producción de anticuerpos por células B y/o la activación de células T supresoras y/o células T γδ dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad y/o para mediar la citotoxicidad anticuerpo-complemento, o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para proporcionar protección a un huésped inmunizado.
30 Tales respuestas pueden determinarse usando inmunoensayos y ensayos de neutralización convencionales que son muy conocidos en la técnica.

- Una composición inmunogénica que contiene un antígeno seleccionado en combinación con un bioadhesivo y un adyuvante según se describe en el presente documento, presenta
35 “inmunogenicidad aumentada” cuando posee una capacidad mayor para provocar una

respuesta inmunitaria que la respuesta inmunitaria provocada por una cantidad equivalente del antígeno y el adyuvante sin el bioadhesivo. Por consiguiente, una composición inmunogénica puede presentar “inmunogenicidad aumentada” porque el antígeno es absorbido mucho más fácilmente por el sujeto vertebrado, o porque el antígeno es más fuertemente inmunogénico o porque es necesaria una dosis más baja del antígeno para conseguir una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se le administra. Tal inmunogenicidad aumentada puede determinarse administrando la composición de bioadhesivo/antígeno/adyuvante y controles de antígeno/adyuvante a los animales y comparando los valores de anticuerpos contra ambos usando ensayos convencionales, tales como el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ambos muy conocidos en la técnica.

Las expresiones “cantidad eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz”, según se utilizan en el presente documento, se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente de la composición para proporcionar la respuesta inmunológica deseada y el efecto terapéutico correspondiente.

Como se señalará a continuación, la cantidad exacta requerida variará según el sujeto, dependiendo de la especie, la edad y del estado general del sujeto, de la gravedad de la afección tratada, del antígeno concreto de interés, del modo de administración y similares. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad apropiada “eficaz” en cualquier caso individual usando experimentación de rutina.

Según se utiliza en el presente documento, “tratamiento” se refiere a cualquiera de (i) la prevención de la infección o reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción o la eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno en cuestión. El tratamiento puede efectuarse de manera profiláctica (antes de la infección) o terapéutica (después de la infección). El término “tratamiento” también se refiere a la mejora de la respuesta inmunológica a un antígeno.

Según se utiliza en el presente documento, el término “mejora” se refiere a un aumento en el nivel de respuesta inmunológica a un antígeno y puede incluir un aumento en la respuesta de la rama humoral y/o celular del sistema inmunológico.

Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se entiende un material que no es indeseable desde el punto de vista biológico o de otra manera, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con las formulaciones de micropartículas sin que cause ningún efecto biológico indeseable ni interactúe de una manera perjudicial con ninguno

de los componentes de la composición en la que está contenido.

Por “sujeto vertebrado” se entiende cualquier miembro del subfilo cordados (Chordata), incluidos, sin limitación, seres humanos y otros primates, que incluyen primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de mono; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio, que incluyen roedores, tales como ratones, ratas y cobayas; aves, que incluyen aves domésticas, salvajes y de caza, tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. La expresión “sujeto vertebrado” no denota una edad concreta. Por consiguiente, se pretende abarcar sujetos adultos y recién nacidos. El sistema descrito anteriormente está diseñado para uso en cualquiera de las especies de vertebrados anteriores, puesto que los sistemas inmunológicos de todos estos vertebrados actúan de manera similar.

II. Modos de llevar a cabo la invención

Antes de describir la presente invención detalladamente, debe entenderse que la presente invención está limitada por las reivindicaciones. Debe entenderse también que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir sólo las formas de realización particulares de la invención, y no pretende ser limitante.

Aunque en la puesta en práctica de la presente invención pueden utilizarse una serie de procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, los materiales y los procedimientos de preferencia se describen en el presente documento. Se dan a conocer técnicas de administración mediadas por bioadhesivos para provocar una respuesta inmunitaria contra patógenos transmitidos por vía mucosa y patógenos sistémicos. El sistema provoca una respuesta inmunitaria vigorosa, incluso cuando el antígeno es por sí mismo débilmente inmunogénico.

La atención se ha dirigido al desarrollo de bioadhesivos, en especial mucoadhesivos, como sistemas de administración por vía mucosa. Tales sistemas están basados en sustancias naturales, tales como lectinas y proteínas fimbriales, y en sustancias artificiales, tales como derivados de poli(ácido acrílico), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), alcoholes polivinílicos y polisacáridos. Estos bioadhesivos suelen adherirse al moco.

El procedimiento que se da a conocer en el presente documento proporciona inmunidad mediada por células y/o respuestas de anticuerpos humorales. Por consiguiente, los procedimientos de la presente invención encontrarán utilidad con cualquier antígeno para el que se desee respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo los antígenos derivados de patógenos virales, que inducen anticuerpos, epítomos de células T ayudantes y epítomos de células T citotóxicas. Tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, los codificados por los virus humanos y animales y pueden corresponder a proteínas estructurales o no estructurales.

Por ejemplo, la composición de la reivindicación 1 encontrará utilidad para estimular una respuesta inmunitaria contra una amplia diversidad de proteínas de la familia del herpesvirus, incluidas las proteínas derivadas de los tipos 1 y 2 del virus del herpes simplex (VHS), tales como las glicoproteínas gB y gH de VHS-1 y VHS-2; los antígenos derivados del virus de la varicela zóster (VVZ), del virus de Epstein-Barr (VEB) y del citomegalovirus (CMV) incluidas gB y gH de CMV; y los antígenos derivados de otros herpesvirus humanos tales como HVH6 y HVH7. (Véase, por ejemplo, Chee y col., Cytomegaloviruses (J. K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) páginas 125-169, para una revisión del contenido codificador de proteínas del citomegalovirus; McGeoch y col., J. Gen. Virol., 1988, 69: 1531-1574, para una discusión sobre diversas proteínas codificadas por VHS-1; Patente de EEUU Nº 5.171.568 para una discusión de las proteínas gB y gD de VHS-1 y VHS-2 y los genes que las codifican; Baer y col., Nature, 1984, 310: 207-211, para la identificación de secuencias codificadoras de proteínas en un genoma de VEB; y Davison and Scott, J. Gen. Virol., 1986, 67: 1759-1816, para una revisión de VSV).

Los antígenos de la familia de virus de la hepatitis, incluidos el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis delta (VHD), el virus de la hepatitis E (VHE) y el virus de la hepatitis G (VHG), pueden usarse también de manera conveniente en las técnicas descritas en el presente documento. A modo de ejemplo, se conoce la secuencia genómica viral del VHC, como también se conocen los procedimientos para obtener la secuencia. Véase, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nº WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90/14436. El genoma del VHC codifica varias proteínas virales, incluidas E1 (también conocida como E) y E2 (también conocida como E2/NSI) y una proteína de nucleocápside N-terminal (denominada "core") (véase, Houghton y col., Hepatology, 1991, 14: 381-388, para una discusión de las proteínas del VHC, incluidas E1 y E2). Cada una de estas proteínas, así como sus fragmentos antigénicos, encontrarán utilidad en los presentes procedimientos. De manera similar, se conoce la secuencia para el antígeno δ

del VHD (véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 5.378.814) y este antígeno también puede usarse de manera conveniente en los presentes procedimientos. Además, encontrarán utilidad en el presente documento los antígenos derivados del VHB, tales como el antígeno del núcleo “core”, el antígeno de superficie, Ags, así como las secuencias de los presuperficie, pre-S1 y pre-S2 (anteriormente llamados pre-S), así como las combinaciones de los anteriores, tales como Ags/pre-S1, Ags/pre-S2, Ags/pre-S1/pre-S2 y pre-S1/pre-S2. Véase, por ejemplo, “HBV Vaccines - from the laboratory to license: a case study” en Mackett, M. and Williamson, J. D., Human Vaccines and Vaccination, páginas 159-176, para una discusión sobre la estructura del VHB; y las Patentes de EEUU N° 4.722.840, 5.098.704, 5.324.513; Beames y col., J. Virol., 1995, 69: 6833-6838, Birnbaum y col., J. Virol., 1990, 64: 3319-3330; y Zhou y col., J. Virol., 1991, 65 : 5457-5464.

Antígenos derivados de otros virus también encontrarán utilidad en los procedimientos reivindicados, tales como, pero sin limitación, las proteínas de los miembros de las familias Picornaviridae (por ejemplo, poliovirus, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por ejemplo, virus del sarampión, virus del dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae; Birnaviridae; Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, etc.); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe tipos A, B y C, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-II; VIH-1 (también conocidos como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), que incluyen, pero no se limitan a, los antígenos de los aislamientos VIH_{IIb}, VIH_{SF2}, VIH_{LAV}, VIH_{LAI}, VIH_{MN}; VIH-1_{CM235}, VIH-1_{US4}; VIH-1 subtipo (O); VIH-2; virus de inmunodeficiencia del simio (VIS) entre otros. Además, los antígenos también pueden obtenerse del papilomavirus humano (VPH) y de los virus de la encefalitis transmitida por garrapata. Véase, por ejemplo, Virology, 3ª Edición (W. K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª Edición (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds. 1991), para una descripción de estos y otros virus.

Más particularmente, las proteínas gp120 de la envoltura de cualquiera de los aislamientos de VIH anteriores, incluidos los miembros de los diversos subtipos genéticos de VIH, son conocidos y están informados (véase, por ejemplo, Myers y col., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, Nuevo México (1992); Myers y col., Human Retroviruses and Aids, 1990, Los Alamos, Nuevo México: Los Alamos National Laboratory; y Modrow y col., J. Virol., 1987, 61: 570-578, para una comparación de las secuencias de la envoltura de una diversidad de aislamientos de VIH) y los antígenos derivados de cualquiera de

estos aislamientos encontrarán utilidad en los presentes procedimientos. Además, la invención es igualmente aplicable a otras proteínas inmunogénicas derivadas de cualquiera de los diversos aislamientos de VIH, que incluyen cualquiera de las diversas proteínas de la envoltura tales como gp160 y gp41, los antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como las proteínas derivadas de la región pol.

En el presente documento se dan a conocer también numerosos antígenos bacterianos, tales como los derivados de los organismos que causan difteria, cólera, tuberculosis, tétanos, tos ferina, meningitis y otros estados patógenos, incluidos, sin limitación, *Meningococcus* A, B y C, *Hemophilus influenza* tipo B (Hib), *Neisseria gonorrhoeae* y *Helicobacter pylori*. Ejemplos de antígenos de parásitos incluyen los derivados de los organismos que causan malaria y la enfermedad de Lyme.

Además, los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan un medio para tratar una diversidad de cánceres malignos. Por ejemplo, la composición de la presente invención puede utilizarse para montar respuestas inmunes humorales y mediadas por células para proteínas concretas específicas del cáncer en cuestión, tales como un oncogén activado, un antígeno fetal o un marcador de activación. Tales antígenos tumorales incluyen cualquiera de los diversos MAGE (antígeno E asociado al melanoma), incluidos MAGE 1, 2, 3, 4, etc. (Boon, T. Scientific American (marzo de 1993): 82-89); cualquiera de las diversas tirosinasas; MART 1 (antígeno del melanoma reconocido por células T), ras mutante; p53 mutante; antígeno p97 del melanoma; CEA (antígeno carcinoembrionario), entre otros.

Resulta fácilmente evidente que la presente invención puede utilizarse para prevenir o tratar una gran diversidad de enfermedades.

La presente descripción proporciona además procedimientos para la inmunización, que generan una respuesta inmunitaria y mejoran una respuesta inmunológica, que comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende al menos un antígeno, al menos un adyuvante, al menos un bioadhesivo y al menos un excipiente mucoso farmacéuticamente aceptable.

Aunque la invención es ampliamente aplicable a cualquiera de los patógenos mencionados anteriormente, la invención se ejemplifica en el presente documento por referencia al virus de la gripe. Específicamente, las glicoproteínas HA y NA de la envoltura del virus de la gripe A son

de particular interés para generar una respuesta inmunitaria. Se han identificado numerosos subtipos de HA de la gripe A (Kawaoka y col., *Virology*, 1990, 179: 759-767; Webster y col., "Antigenic variation among type A influenza viruses," páginas 127-168. En: P. Palese and D.W. Kingsbury (ed.), *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, Nueva York). Por consiguiente, las proteínas derivadas de cualquiera de estos aislamientos también pueden utilizarse en las técnicas de inmunización descritas en el presente documento.

El antígeno seleccionado se combina con el bioadhesivo y el adyuvante para la posterior administración por vía mucosa. Los bioadhesivos útiles en los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, hidroxipropilmetilcelulosa, polisacáridos y carboximetilcelulosa. Muchos de estos polímeros están disponibles en una diversidad de pesos moleculares, y el peso molecular adecuado para el uso con un antígeno dado es determinado fácilmente por medio de la experimentación rutinaria por un experto en la técnica.

Los bioadhesivos de la presente invención pueden proporcionarse como microesferas, con el antígeno adsorbido o físicamente incorporado (atrapado), usando cualquiera de varias técnicas, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Benedetti y col., *J. Controlled Rel.*, 1990, 13: 33-41; Ghezzi y col., *Int. J. Pharm.*, 1992, 87: 21-29; Illum y col., *J. Controlled Rel.*, 1994, 29: 133-141; Publicación Europea N° 517.565; publicación del PCT US98/01738.

La producción de microesferas mezclando la fase discontinua con la fase continua es muy conocida por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 3.891.570 y Benedetti y col., *J. Controlled Rel.*, 1990, 13: 33-41. La extracción con disolventes de preparaciones de microesferas es también muy conocida por los expertos en la técnica. Para otra descripción de la técnica de extracción con disolventes, véase, por ejemplo, Illum y col., *J. Controlled Rel.*, 1994, 29: 133-141; y Ghezzi y col., *Int. J. Pharm.*, 1992, 87: 21-29; y Publicación Europea N° 517.565.

Como alternativa, las microesferas también pueden formarse usando secado por pulverización, como se describe en, por ejemplo, Kyyronen y col., *Int. J. Pharm.*, 1992, 80: 161-169; Ghezzi y col., *Int. J. Pharm.*, 1992, 87: 21-29; y Masters, K. (1976) *Spray Drying* 2ª Edición Wiley, Nueva York. Pueden producirse microesferas especialmente pequeñas, denominadas "nanoesferas" usando antisolventes supercríticos (SAS), como se describe en la Publicación Internacional N° WO 96/29998.

La velocidad de liberación del antígeno de las composiciones del bioadhesivo puede modificarse dependiendo del procedimiento utilizado para asociar el antígeno con las microesferas. Por ejemplo, si el antígeno se dispersa físicamente en la matriz de polímero, la liberación es controlada en gran medida por la velocidad de difusión del antígeno a través de la red de polímero. Además, si los disolventes se extraen en lugar de evaporarse, las microesferas incluyen superficies más porosas que dan como resultado una liberación más rápida del antígeno atrapado.

Además, la esterificación de los grupos carboxilo reduce la bioadhesividad de los bioadhesivos debido a la tendencia reducida para los ésteres de formar enlaces de hidrógeno con el sustrato biológico. Además, la hidrofobicidad de las microesferas, impartida por los diferentes ésteres y los grados de reticulación, afectará a la cantidad de bioadhesión puesto que el tejido mucoso parece presentar hidrofobicidad apreciable que puede tener implicaciones importantes para la bioadhesión. Por consiguiente, por ejemplo, un grado de esterificación más alto da lugar a una liberación más lenta y reducida de la proteína atrapada pero produce por lo general una microesfera con mejores propiedades bioadhesivas.

Además, factores biológicos tales como la frecuencia del latido ciliar, así como factores físicos tales como el tamaño de partícula, la densidad y el grado de agrupación, y la solubilidad en agua del antígeno, influirán en el grado de bioadhesión y bioerosión. Véase, por ejemplo, Pritchard y col., Int. J. Pharm., 1996, 129: 137-145.

Por otra parte, las mezclas de microesferas con ésteres diferentes, cantidades variables de esterificación, así como variables grados de reticulación, encontrarán utilidad en las formulaciones para conseguir la cinética de bioadhesión y de liberación deseada para un antígeno dado y para proporcionar tanto una respuesta inmunitaria primaria como secundaria.

Una vez formada, puede determinarse la adhesividad de una combinación particular de bioadhesivo/antígeno/adyuvante usando cualquier serie de procedimientos, muy conocidos en la técnica, para evaluar si una formulación particular tiene propiedades bioadhesivas adecuadas. Por ejemplo, pueden realizarse estudios de separación por peso *in vitro*, que se basan en mediciones de la tensión superficial. Véase, por ejemplo, Smart y col., J. Pharm. Pharmacol., 1984, 36: 295-299. Brevemente, se aplican las microesferas de prueba a un sustrato biológico, tal como tejido epitelial, y se llevan a cabo los estudios de separación por peso con un aparato que determina el peso requerido para separar dos secciones de tejido del

bioadhesivo de prueba que está emparedado entre ellas. Véase, por ejemplo, Pritchard y col., Int. J. Pharm., 1996, 129: 137-145. Como alternativa, puede usarse la velocidad de transporte mucociliar como determinante de la adhesividad ya que cuanto mayor sea la adhesividad de la sustancia de prueba, más lenta será la velocidad de transporte. Tales estudios pueden realizarse por medio de, por ejemplo, control del movimiento de bioadhesivos a lo largo de parte de un paladar superior extirpado de rana (*Rana pipiens*), como se describe en Pritchard y col., *supra*.

De manera similar, puede determinarse la velocidad de bioerosión de las microesferas usando técnicas convencionales, muy conocidas en la técnica, tal como por medio de perfiles de liberación *in vitro*, para determinar si la formulación de bioadhesivo/adyuvante/antígeno en cuestión proporciona una cantidad adecuada de antígeno al sistema inmune para la enfermedad dada. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo pruebas de disolución, por ejemplo, dispersando microesferas en un tampón apropiado tal como un tampón de fosfato o BSA, con agitación continua. Se retiran muestras de la disolución en intervalos de tiempo fijados y se realizan las pruebas para el antígeno de interés usando, por ejemplo, ELISA o cualquier otra prueba adecuada. Véase, Ghezzi y col., Int. J. Pharm., 1992, 87: 21-29.

El tamaño de partícula puede determinarse por medio de, por ejemplo, dispersión de luz láser, usando por ejemplo, un espectrómetro que incorpora un láser de helio-neón. Por lo general, el tamaño de partícula se determina a temperatura ambiente e implica múltiples análisis de la muestra en cuestión (por ejemplo, 5-10 veces) para dar un valor promedio para el diámetro de las partículas. El tamaño de partícula también se determina fácilmente usando microscopía electrónica de barrido (SEM). Para llevarlo a cabo, se recubren las microesferas por bombardeo iónico con una mezcla de oro/paladio hasta un grosor de aproximadamente 100 Angstrom, a continuación se examinan con un microscopio electrónico de barrido.

Si el antígeno se proporciona en una microesfera, el contenido de antígeno se determina generalmente para poder proporcionar una cantidad adecuada de las microesferas al sujeto para provocar una respuesta inmunitaria adecuada. El contenido de antígeno puede determinarse según los procedimientos conocidos en la técnica, tal como rompiendo las microesferas y extrayendo cualquier antígeno atrapado. Por ejemplo, pueden disolverse las microesferas en un disolvente tal como DMSO o dispersarse en, por ejemplo, NaOH 0,1 M que contiene SDS al 5% (p/v). Se agita la muestra, opcionalmente se centrifuga, y se realiza el análisis en el sobrenadante para el antígeno de interés usando un ensayo adecuado. Véase,

por ejemplo, Benedetti y col., J. Controlled Rel., 1990, 13: 33-41; y O'Hagan y col., Int. J. Pharm., 1994, 103: 37-45.

5 Por ejemplo, el antígeno se incuba generalmente con el bioadhesivo en una cantidad que represente aproximadamente del 1% hasta aproximadamente el 40% (p/p) del antígeno al bioadhesivo, de más preferencia aproximadamente del 0,5% hasta aproximadamente el 25% (p/p) del antígeno, y de más preferencia aún aproximadamente del 1% hasta aproximadamente el 10% (p/p) del antígeno. El porcentaje del antígeno dependerá de la dosis deseada y de la afección a tratar, como se analiza más detalladamente a continuación. El adyuvante se incuba
10 generalmente con el bioadhesivo en una cantidad que represente aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 40% (p/p) del adyuvante al bioadhesivo, de más preferencia aproximadamente del 0,5% hasta aproximadamente el 25% (p/p) del adyuvante, y de más preferencia aún aproximadamente del 1% hasta aproximadamente el 10% (p/p) del adyuvante. El porcentaje de adyuvante dependerá de la dosis deseada y de la afección a tratar, como se
15 analiza más detalladamente a continuación. La incubación del antígeno y el adyuvante con el polímero tiene lugar durante aproximadamente 0 horas a 48 horas o más, de preferencia durante aproximadamente 0 horas hasta aproximadamente 24 horas, de más preferencia aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 10 horas, y de mayor preferencia aproximadamente 2 horas hasta aproximadamente 4 horas. Tras la incubación, la suspensión
20 puede liofilizarse y la composición seca se suspende en un vehículo adecuado antes de la inmunización.

Una vez producidos el antígeno, el adyuvante y el bioadhesivo, como se describió anteriormente, las composiciones se formulan para la posterior administración por vía mucosa.
25 Las composiciones incluirán por lo general uno o más "excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables" adecuados para la administración por vía mucosa, tal como agua, disolución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, etc. Además, en tales vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsivos, sustancias tamponadoras de pH, y similares.

30 Por ejemplo, las formulaciones intranasales incluirán habitualmente vehículos que no causen irritación de la mucosa nasal ni perturben significativamente la función ciliar. Con la presente invención pueden utilizarse diluyentes tales como agua, disolución salina acuosa u otras sustancias conocidas. Las formulaciones nasales pueden contener también conservantes tales
35 como, pero no limitados a, clorobutanol y cloruro de benzalconio. Puede estar presente un

tensioactivo para mejorar la absorción de las proteínas sujeto por la mucosa nasal. Las formulaciones intranasales pueden administrarse, sin limitación, en forma de inhalantes o pulverizaciones.

- 5 Para los supositorios rectales y uretrales, la composición del vehículo incluirá los aglutinantes y vehículos tradicionales, tales como, manteca de cacao (aceite de Theobroma) u otros triglicéridos, aceites vegetales modificados por esterificación, hidrogenación y/o fraccionamiento, gelatina glicerizada, glicoles polialcalinos, mezclas de polietilenglicoles de diversos pesos moleculares y ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol.

10 Para la administración vaginal, las formulaciones de la presente invención pueden incorporarse en bases de pesario, tales como las que incluyen mezclas de triglicéridos de polietileno, o pueden suspenderse en aceites tales como aceite de maíz o aceite de sésamo, conteniendo opcionalmente sílice coloidal. Véase, por ejemplo, Richardson y col., Int. J. Pharm., 1995, 115: 9-15.

15 Para otra discusión sobre vehículos adecuados a utilizar en modos de administración concretos, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 19^a edición, 1995. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente el vehículo adecuado a usar para el antígeno y el sitio de administración concretos.

25 Los adyuvantes utilizados en esta formulación pueden mejorar la eficacia de las composiciones farmacéuticas. Los adyuvantes se administran, de preferencia, simultáneamente con las formulaciones de bioadhesivos de la presente invención, por ejemplo, en la misma composición, pero también pueden administrarse en formulaciones separadas. Puede administrarse un adyuvante adicional antes o después de las formulaciones de bioadhesivos de la presente invención. Los adyuvantes utilizados en el presente documento en la formulación o como adyuvantes adicionales incluyen, pero no están limitados a: (1) sales de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo (a) MF59 (Publicación Internacional N° WO 90/14837), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (que contiene 35 opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no es

necesario) formulados en partículas submicrónicas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualano al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 bloqueados con pluronic al 5% y thr-MDP (véase a continuación) microfluidizados en una emulsión submicrónica o sometidos a vórtice para generar una emulsión de partículas de tamaño más grande, y (c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo constituido por monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), de preferencia MPL + CWS (Detox™); (3) adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), que pueden utilizarse o pueden generarse partículas a partir de los mismos, tales como ISCOM (complejos inmunostimulantes); (4) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2, etc.), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) mutantes destoxificados de una toxina de ribosilación de ADP bacteriana tales como una toxina del cólera (CT), una toxina de tos ferina (PT) o una toxina termolábil (LT) de *E. coli*, en particular LT-K63 (donde el aminoácido de tipo natural en la posición 63 está sustituido por lisina), LT-R72 (donde el aminoácido de tipo natural en la posición 72 está sustituido por arginina), CT-S109 (donde el aminoácido de tipo natural en la posición 109 está sustituido por serina), y PT-K9/G129 (donde el aminoácido de tipo natural en la posición 9 está sustituido por lisina y el de la posición 129 por glicina) (véase, por ejemplo, Publicación Internacional Nº WO 93/13202 y WO 92/19265); y (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición.

Los péptidos de muramilo incluyen, pero no están limitados a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoflutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (MTP-PE).

Los diversos componentes de la composición pueden estar presentes en un amplio intervalo de relaciones. Por ejemplo, los componentes antígeno y bioadhesivo se utilizan típicamente en un intervalo de volumen de 1:10 a 10:1, de preferencia de 1:50 a 50:1, y de mayor preferencia de 1:100. Los componentes adyuvante y bioadhesivo se utilizan típicamente en un intervalo de volumen de 1:10 a 10:1, de preferencia de 1:50 a 50:1, y de mayor preferencia de 1:100. Los componentes antígeno y adyuvante se utilizan típicamente en un intervalo de volumen de 1:10 a 10:1, de preferencia de 1:5 a 5:1, de más preferencia desde aproximadamente 1:2 hasta 2:1, y de mayor preferencia de aproximadamente 1:1. Sin embargo, otras relaciones pueden ser

más apropiadas para fines específicos, tales como cuando un antígeno concreto es difícil de incorporar en una composición de bioadhesivo y tiene una inmunogenicidad baja, en cuyo caso es necesaria una cantidad relativa más alta del componente antígeno.

- 5 Las composiciones comprenderán una “cantidad terapéuticamente eficaz” del antígeno de interés. Es decir, se incluirá en las composiciones una cantidad de antígeno que hará que el sujeto produzca una respuesta inmunológica suficiente para prevenir, reducir o eliminar síntomas. La cantidad necesaria exacta variará, dependiendo del sujeto tratado; la edad y el estado general del sujeto a tratar; la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos; el grado de protección deseado; la gravedad de la afección tratada; el antígeno concreto seleccionado y su modo de administración, entre otros factores. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad eficaz adecuada. Por consiguiente, una “cantidad terapéuticamente eficaz” caerá dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse con ensayos de rutina. Por ejemplo, para los fines de la presente invención, una dosis eficaz variará típicamente desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 100 mg, de preferencia desde aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 1 mg, y de mayor preferencia desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 500 µg del antígeno administrado por dosis.
- 10
- 15
- 20 Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía mucosa, usando técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 19^a edición, 1995, para las técnicas de administración por vía mucosa, incluidas las técnicas intranasales, pulmonares, vaginales y rectales, así como la Publicación Europea Nº 517.565 e Illum y col., J. Controlled Rel., 1994, 29: 133-141, para las técnicas de administración intranasal. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía dérmica o transdérmica, usando técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 19^a edición, 1995.
- 25
- 30 El tratamiento farmacológico puede ser un programa de monodosis o un programa de dosis múltiples. Un programa de dosis múltiples es uno en el que un curso primario de vacunación puede ser con 1 a 10 dosis separadas, seguidas por otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores, elegidos para mantener y/o para reforzar la respuesta inmunitaria, por ejemplo a los 1-4 meses para una segunda dosis, y de ser necesario, una o más dosis posteriores después de varios meses. El estímulo de refuerzo puede ser con la misma
- 35

formulación administrada para la respuesta inmunitaria primaria, o puede ser con una formulación diferente que contenga el antígeno. El régimen de dosificación también estará determinado, al menos en parte, por la necesidad del sujeto y dependerá del criterio del médico. Además, si se desea la prevención de la enfermedad, las composiciones de bioadhesivos se administran por lo general antes de la infección primaria con el patógeno de interés. Si se desea el tratamiento, por ejemplo, la reducción de síntomas o las recurrencias, las composiciones de bioadhesivos se administran por lo general posteriormente a la infección primaria.

Las formulaciones pueden probarse *in vivo* en una serie de modelos animales desarrollados para el estudio de la administración por vía mucosa, dérmica o transdérmica. Como es fácilmente evidente, las composiciones de la presente invención son útiles para tratar y/o para prevenir una amplia diversidad de enfermedades y de infecciones causadas por virus, bacterias, parásitos y hongos, así como para provocar una respuesta inmunitaria contra una diversidad de antígenos. Las composiciones no sólo pueden utilizarse terapéuticamente o profilácticamente, como se describió anteriormente, las composiciones también pueden utilizarse para preparar anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, para, por ejemplo, fines de diagnóstico, así como para la inmunopurificación del antígeno de interés. Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con las composiciones de la presente invención. El animal se estimula generalmente 2-6 semanas más tarde con una o más administraciones del antígeno. A continuación se obtienen los antisueros policlonales del animal inmunizado y se tratan según los procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Jurgens y col., J. Chrom. 1985, 348: 363-370.

Los anticuerpos monoclonales se preparan por lo general usando el método de Kohler y Milstein, Nature, 1975, 256: 495-496, o una de sus modificaciones. Típicamente, se inmuniza un ratón o una rata como se describió anteriormente. Sin embargo, en lugar de extraer sangre del animal para extraer el suero, se extirpa el bazo (y opcionalmente varios nódulos linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Si se desea, las células del bazo pueden cribarse (tras eliminar las células adherentes de manera inespecífica) aplicando una suspensión de células a una placa o a un pocillo recubierto con el antígeno proteico. Las células B, que expresan la inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa, y no serán aclaradas con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, se inducen a continuación para que se fusionen con células de

mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se colocan en placas por medio de dilución limitante y se realizan los ensayos para verificar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de inmunización (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales seleccionados se cultivan a continuación, ya sea *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o en reactores de fibra hueca), o *in vivo* (como ascitis en ratones). Véase, por ejemplo, M. Schreier y col., *Hybridoma Techniques* 1980; Hammerling y col., *Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas*, 1981; Kennett y col., *Monoclonal Antibodies*, 1980; véase también las Patentes de EEUU N° 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.452.570; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; y 4,493,890. Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra el polipéptido de interés pueden seleccionarse por diversas propiedades; es decir, por isotipo, epítipo, afinidad, etc.

III: Parte experimental

A continuación se presenta un ejemplo de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. El ejemplo se ofrece sólo con fines ilustrativos, y no pretende limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a las cifras usadas (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debe contarse la posibilidad de que se produzca cierto error y desviación experimental.

Ejemplo 1

Comparación de diferentes bioadhesivos

Se comparó la inmunogenicidad del antígeno HA en diferentes bioadhesivos en conejos (cepa Nueva Zelanda).

Para conseguir una dosis de 25 µg del antígeno de gripe H3N2 ("HA") (Chiron Vaccines, Sienna, Italia) y 25 µg de LT-R72 (Publicación Internacional N° WO 93/13202), se usó como objetivo una relación 1:1:100 (antígeno:adyuvante:bioadhesivo). El antígeno HA se suministró en disolución a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml. Los adyuvantes también se

suministraron en disolución en concentraciones de entre aproximadamente 1 y 3 mg/ml. Los bioadhesivos hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), Carbopol y policarbofilo (B. F. Goodrich, Cleveland, Ohio) se prepararon suspendiendo el producto según se recibió en PBS para obtener un gel al 0,5% p/p. Para facilitar la formación de los bioadhesivos, la disolución de carbopol se neutralizó con NaOH 0,2 N hasta pH 7,2. Los tres componentes se mezclaron por agitación.

Se separaron treinta conejos en cuatro grupos, como se muestra en la Tabla 1. Para conseguir la dosis adecuada, se administró a todos los grupos las composiciones de prueba por vía intranasal usando un catéter de Teflon de calibre 16.

Se administró a los conejos el antígeno y el adyuvante con o sin bioadhesivos en PBS en un volumen total de 250 µl por animal. Las formulaciones se administraron dentro de los 60 minutos de la preparación.

Los conejos recibieron un estímulo de refuerzo en el día 28. Se recogió el suero y se ensayó para determinar los niveles de IgG anti HA del suero usando un ELISA. Los sueros se recogieron en alícuotas de 5 ml a los 28 días después de la inyección inmediatamente antes del estímulo de refuerzo (4sp1), a los 42 días después de la inyección (2 semanas después del estímulo de refuerzo; 2sp2) y a los 56 días después de la inyección (4 semanas después del estímulo de refuerzo; 4sp2).

Como puede observarse en la Tabla 1 y en la Figura 1, los grupos de conejos a los que se había administrado antígeno y adyuvante con carbopol o HPMC tuvieron valores más altos que los conejos a los que se había administrado sólo antígeno y adyuvante.

Tabla 1				
Grupo	Formulación	Valores de anti-Ha en suero por ELISA (28 días)	Valores de anti-Ha en suero por ELISA (42 días)	Valores de anti-Ha en suero por ELISA (56 días)
1	LT-R72 (25 µg) + HA (25 µg)	17248 +/- 8562	23350 +/- 12188	77463 +/- 19049
2	LT-R72 (25 µg) + HA (25 µg) + policarbofilo (0,5% p/p)	34448 +/- 16106	51851 +/- 36537	76876 +/- 43987

(continuación)

3	LT-R72 (25 µg) + HA (25 µg) + carbopol (0,5% p/p)	87951 +/- 40543	160255 +/- 78956	127882 +/- 61443
4	LT-R72 (25 µg) + HA (25 µg) + HPMC (0,5% p/p)	17556 +/- 9106	49985 +/- 40641	36052 +/- 10271

Por consiguiente, se describe el uso de bioadhesivos y adyuvantes para administrar antígenos.

Las formas de realización de preferencia de la presente invención se han descrito con cierto

5 detalle.

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende al menos un bioadhesivo, al menos un adyuvante y al menos un antígeno viral, en la que al menos un adyuvante comprende un mutante destoxificado LT-R72 o LT-K63 de una toxina de ribosilación de ADP bacteriana, en la que al menos un bioadhesivo es un mucoadhesivo seleccionado de derivados reticulados de poli(ácido acrílico).
5
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el antígeno está presente en una cantidad desde aproximadamente el 0,1% al 40% (p/p) del antígeno al bioadhesivo y el adyuvante está presente en una cantidad desde aproximadamente el 0,1% al 40% (p/p) del adyuvante al bioadhesivo.
10
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el derivado reticulado de poli(ácido acrílico) es carbopol o policarbofilo.
15
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos un adyuvante comprende además un adyuvante seleccionado del grupo constituido por alumbre, formulaciones de emulsión de aceite en agua y péptidos de muramilo.
20
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno viral es un antígeno de la gripe.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el bioadhesivo se proporciona como una microesfera.
25
7. La composición de la reivindicación 6, en la que el antígeno está encapsulado dentro de la microesfera.
8. La composición de la reivindicación 6, en la que el antígeno está adsorbido a la microesfera.
30
9. Una composición farmacéutica que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y al menos un excipiente mucoso farmacéuticamente aceptable.
10. Un procedimiento para producir una composición farmacéutica que comprende combinar la
35

composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un excipiente mucosal farmacéuticamente aceptable.

11. La composición de una cualquiera de las composiciones 1 a 8, para uso en medicina.

5

12. El uso de al menos un bioadhesivo, al menos un adyuvante y al menos un antígeno viral, en la fabricación de un medicamento para inmunizar un sujeto vertebrado, en el que al menos un adyuvante comprende un mutante destoxificado LT-R72 o LT-K63 de una toxina de ribosilación de ADP bacteriana, en el que al menos un bioadhesivo es un mucoadhesivo
10 seleccionado de derivados reticulados de poli(ácido acrílico).

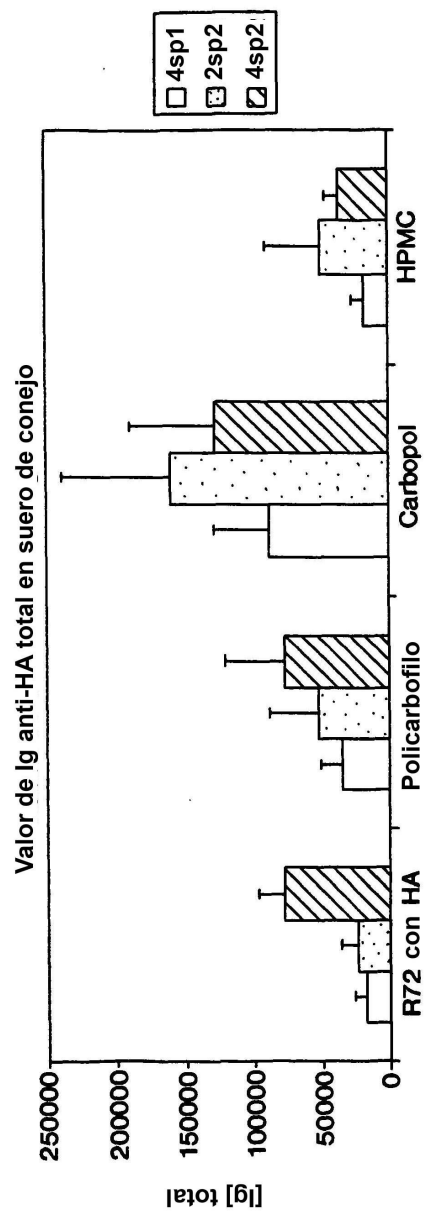


FIG. 1