

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 035**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16	(2006.01)
A61K 9/14	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 38/28	(2006.01)
A61P 17/00	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)
A61K 39/39	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2013 PCT/US2013/022463**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13110050**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2013 E 13738575 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2804592**

54 Título: **Formulaciones de inulina y de acetato de inulina**

30 Prioridad:

20.01.2012 US 201261589126 P

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

05.06.2020

73 Titular/es:

**SOUTH DAKOTA STATE UNIVERSITY (100.0%)
815 Medary Avenue, Suite 201
Brookings, SD 57006, US**

72 Inventor/es:

**TUMMALA, HEMACHAND y
KUMAR, SUNNY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 765 035 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de inulina y de acetato de inulina

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a vacunas y adyuvantes, y más específicamente a vacunas y adyuvantes que comprenden β -inulina y derivados de β -inulina, en los que dicha β -inulina y derivados de β -inulina sirven como dispositivos de administración, así como adyuvantes, incluidas nanopartículas y composiciones de micropartículas comprendidas de las mismas y procedimientos de tratamiento que usan dichas composiciones.

Información de antecedentes

10 El objetivo de la vacunación es proporcionar protección a largo plazo contra la infección al generar una fuerte respuesta inmune al antígeno administrado. Las vacunas a menudo requieren la adición de agentes inmunoestimuladores llamados adyuvantes para aumentar la potencia y la longevidad de la respuesta inmune específica a los antígenos. Un adyuvante de vacuna ideal debería estimular las respuestas inmunes humorales (tipo Th2) y celulares (tipo Th1) contra los antígenos coinyectados. Se necesita una respuesta humoral para eliminar los patógenos extracelulares.
15 Una respuesta celular es crítica para eliminar los patógenos intracelulares.

El alumbre (sales de aluminio), el único adyuvante aprobado para uso humano en los EE. UU., Estimula solo la respuesta inmune humoral. Aunque algunas vacunas basadas en proteínas recombinantes, incluidas las de la hepatitis B y el virus del papiloma humano, se han desarrollado con éxito para obtener respuestas de anticuerpos protectores utilizando solo alumbre como adyuvante, la próxima generación de vacunas recombinantes, dirigidas a enfermedades
20 como el cáncer, la malaria, el herpes, la gripe, la tuberculosis, el VIH y/o el SIDA requerirán no solo respuestas de anticuerpos muy fuertes y duraderas, sino también respuestas inmunes mediadas por células potentes.

Por consiguiente, existe la necesidad de nuevas composiciones que puedan promover respuestas de anticuerpos en sujetos. También existe la necesidad de adyuvantes de vacuna nueva, sistemas de administración de antígenos y composiciones que puedan promover respuestas inmunes tanto humorales como celulares.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona polímeros de polisacárido solubles o insolubles que estimulan el sistema inmunitario cuando se administran como micropartículas o nanopartículas. El derivado semisintético Acetato de Inulina (InAc) funciona como nuevos adyuvantes de vacunas y sistemas de administración de antígenos cuando se formulan como micro o nano partículas. Las partículas se usan para estimular una respuesta inmune en un sujeto con el fin de
30 prevenir o inhibir una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune, un trastorno de inmunodeficiencia, una enfermedad neoplásica, una enfermedad degenerativa o una enfermedad por envejecimiento.

En realizaciones, se describe una composición que incluye micropartículas o nanopartículas de acetato de inulina y un agente activo, donde el agente activo puede estar contenido dentro de las micropartículas o nanopartículas individuales. El agente activo puede incluir un antígeno, un péptido antigénico o una secuencia del mismo, un
35 inmunógeno, una inmunoglobulina o una combinación de los mismos. En un aspecto relacionado, el agente activo puede ser un hapteno o cualquier agente contra el cual se desea una respuesta inmune.

En realizaciones, se divulga una composición que incluye partículas de acetato de inulina y un agente activo, donde el agente activo puede estar contenido dentro de las partículas individuales, o físicamente asociado con las partículas, de acetato de inulina, donde la composición, cuando se administra a un humano o un animal, es eficaz para estimular
40 una respuesta inmune contra el agente activo en el humano o animal.

En un aspecto, la composición de la vacuna comprende un antígeno y una cantidad adyuvante eficaz de acetato de inulina, donde el grado de acetilación en el acetato de inulina es de aproximadamente 0,1 % a 100 %.

En otro aspecto, una composición incluye micropartículas o nanopartículas de un derivado de inulina y un agente activo, el agente activo incluye un antígeno, una secuencia de péptido antigénico o una inmunoglobulina, y la
45 composición incluye una cantidad adyuvante efectiva de β -inulina o un derivado de inulina, donde el derivado de inulina incluye inulina esterificada, inulina eterificada, inulina de dialdehído, carbamato de inulina, carbonato de inulina, formas oxidadas o reducidas de inulina, formación de complejos de inulina o su forma oxidada o reducida con un agente activo adicional, modificaciones catiónicas/aniónicas/no iónicas de inulina, o fosfatos de inulina, en forma de formulaciones particuladas donde el antígeno está encapsulado dentro de las partículas, recubierto o conjugado con las partículas o
50 puede incluir combinaciones de los mismos.

En realizaciones, se divulga un procedimiento para estimular una respuesta inmune en un sujeto, con el propósito de tratar o inhibir una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, trastorno de inmunodeficiencia, enfermedad

neoplásica, enfermedad genética, enfermedad degenerativa o de envejecimiento, donde el procedimiento incluye administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición descrita en este documento.

5 En realizaciones, proporciona un procedimiento para mejorar una respuesta inmune en un sujeto, con el propósito de tratar o inhibir una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, trastorno de inmunodeficiencia, enfermedad neoplásica, enfermedad genética, enfermedad degenerativa o de envejecimiento, donde el procedimiento incluye la administración a un sujeto que lo necesite, una cantidad efectiva de una composición descrita aquí.

En realizaciones, se divulga un procedimiento para inducir una respuesta inmunogénica en un sujeto que incluye administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una composición descrita en el presente documento.

10 En otra realización, se divulga un procedimiento para tratar una infección que incluye administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento. La infección puede ser causada por una bacteria, micoplasma, hongo, virus, protozoo u otro microbio, o una combinación de los mismos.

En realizaciones, se divulga un procedimiento para tratar una infestación en un animal o un ser humano que incluye administrar a un animal o un ser humano afectado por una infestación una cantidad efectiva de una composición descrita aquí. La infestación puede ser causada por un microbio, un gusano, un parásito o una combinación de estos.

15 En realizaciones, se divulga un procedimiento para producir anticuerpos o para estimular células inmunes que incluye inmunizar un animal o un ser humano con una formulación que comprende una composición descrita en el presente documento, y recoger los anticuerpos o células inmunes del animal o humano inmunizado. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales o fragmentos funcionales de los mismos (por ejemplo, Fab, scFv, conjugados de anticuerpos o similares).

20 En realizaciones, se divulga un procedimiento para producir antisueros que incluye inmunizar un animal o un ser humano con una formulación que tiene una composición descrita en el presente documento y recoger los antisueros del animal o humano inmunizado, o de un producto del animal o humano inmunizado (tal como un huevo del animal). Los antisueros pueden contener anticuerpos, donde los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. El animal puede ser un primate, perro, gato, vaca, cordero, cerdo, puerco, aves de corral, caballo, yegua,
25 mula, gato, yak, jenny, potro, ternero, ñojo, toro, buey, oveja, cabra, llama, bisonte, búfalo, cordero, cabrito, cochinito, gallina, pollo, pavo, pato, ganso, avestruz, ave, conejo, liebre, conejillo de indias, ratón hámster, rata, roedores, peces, animales acuáticos o anfibios.

30 La composición puede administrarse mediante inyección, inhalación, oral, rectal, vaginal, nasal o tópica. El agente activo puede prepararse en combinación con un vehículo no tóxico fisiológicamente aceptable antes de la encapsulación o asociación con las partículas, o las partículas se pueden combinar con un vehículo no tóxico fisiológicamente aceptable después de la encapsulación o asociación con el agente activo.

35 En un aspecto, las micropartículas o nanopartículas descritas en el presente documento pueden usarse como adyuvante. En un aspecto relacionado, las partículas de una composición descrita en el presente documento pueden ser micropartículas. Las micropartículas pueden tener un diámetro de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 30 μm , aproximadamente 1,5 μm a aproximadamente 25 μm , o aproximadamente 2 μm a aproximadamente 20 μm . Las partículas también pueden ser nanopartículas. Las nanopartículas pueden tener diámetros de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm, aproximadamente 10 nm a aproximadamente 950 nm, aproximadamente 10 nm a 5 aproximadamente 900 nm, aproximadamente 50 nm a aproximadamente 900 nm, aproximadamente 100 nm a aproximadamente 800 nm, aproximadamente 10 nm a aproximadamente 400 nm, aproximadamente 400 nm a
40 aproximadamente 900 nm, o aproximadamente 20 nm a aproximadamente 750 nm.

En otro aspecto, el acetato de inulina puede tener un peso molecular de aproximadamente 4 kDa a aproximadamente 25 kDa.

45 En un aspecto, la composición incluye, además, uno o más moduladores inmunes tales como linfocinas, citocinas, estimuladores de timocitos, estimuladores de monocitos o macrófagos, endotoxinas, patrón molecular asociado a patógenos (PAMS), ligandos para receptores de reconocimiento de patrón (PRR), o una combinación de los mismos.

50 En otro aspecto, el agente activo puede ser un antígeno, un péptido antigénico, o una secuencia antigénica, o una inmunoglobulina. En un aspecto relacionado, el antígeno puede ser, por ejemplo, ADN o ARN, o un componente biológico que incluye ADN o ARN. En otro aspecto relacionado, el agente activo también puede incluir un lisado de un patógeno bacteriano o viral, una célula cancerosa u otro componente biológico asociado con un patógeno o una enfermedad. Por ejemplo, el componente biológico puede ser un péptido, una proteína, un lípido, ADN o un polisacárido separado.

En un aspecto, la composición incluye además una cantidad eficaz de un segundo agente activo, encapsulado o asociado con las partículas.

55 En otro aspecto, la administración de una composición descrita en el presente documento puede estimular una respuesta inmune. La respuesta inmune puede incluir los tipos de respuesta inmune Th1 (IgG-2a, células T citotóxicas)

o Th2 (IgG-1, IgA), o una combinación de los mismos. En un aspecto relacionado, la administración a un animal o humano puede reducir al menos uno de los síntomas causados por el agente activo, o enfermedad o afección asociada con el agente activo.

5 En un aspecto, una composición inmunológica incluye una composición descrita en el presente documento en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la composición inmunológica puede formularse como una forma de dosificación líquida, semisólida, coloidal o sólida. En otro aspecto relacionado, el vehículo puede ser un vehículo líquido o el diluyente puede ser un diluyente sólido, por ejemplo, para inhalación de polvo seco.

10 Con inventiva, se divulgan formulaciones de micro y nanopartículas de acetato de inulina, y su uso como estimulantes inmunes. Las formulaciones tienen una liberación en ráfaga de menos de aproximadamente 30 % en peso de las moléculas encapsuladas o físicamente asociadas en los primeros 30 minutos después de la administración a un sujeto.

15 En realizaciones, la formulación puede tener una liberación en ráfaga de menos de aproximadamente 20 % en peso, una liberación en ráfaga de menos de aproximadamente 15 % en peso, o una liberación en ráfaga de menos de aproximadamente 10 % en peso, en los primeros 30 minutos después de la administración a un sujeto. En un aspecto relacionado, liberación de > aproximadamente 90 % en peso de un material encapsulado es > 20 días aproximadamente.

20 En realizaciones, se describe el uso de las composiciones descritas aquí para terapia médica, veterinaria y zoonótica o prevención de enfermedades. En un aspecto, la terapia médica puede ser la prevención y el tratamiento del cáncer u otras neoplasias, que incluyen, pero no limitadas a, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cerebro o colon, así como linfomas y leucemias y cánceres del hueso, la sangre o los sistemas linfáticos.

25 En realizaciones, se describe el uso de la composición como se describe en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, cáncer en un humano. En un aspecto, se divulga el uso de una composición como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en una especie no mamífera. En un aspecto relacionado, los medicamentos pueden incluir un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones, se divulga un kit que incluye una composición que comprende micropartículas o nanopartículas de β -inulina o acetato de inulina; opcionalmente un agente activo; un contenedor; uno o más tampones, instrucciones para asociar un agente activo con dicha composición; y una etiqueta

Breve descripción de los dibujos

30 Los siguientes dibujos forman parte de la especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertas realizaciones o diversos aspectos de la divulgación. En algunos casos, las realizaciones de la divulgación pueden entenderse mejor haciendo referencia a los dibujos adjuntos en combinación con la descripción detallada presentada aquí.

35 La descripción y los dibujos adjuntos pueden resaltar un cierto ejemplo específico, o un cierto aspecto de la divulgación. Sin embargo, un experto en la materia comprenderá que porciones del ejemplo o aspecto pueden usarse en combinación con otros ejemplos o aspectos de la divulgación.

La figura 1 muestra una comparación de espectros IR de β -inulina y acetato de inulina por espectroscopía FTIR.

40 La figura 2 muestra un perfil de liberación *in vitro* de ovoalbúmina de micropartículas de InAc. Los estudios de liberación se realizaron con 10 mg de micropartículas dispersas en 1 ml de PBS 100 mM a pH 7,4 con agitación a -100 rpm a 37 °C. A diferentes intervalos de tiempo, se tomaron muestras y se reemplazaron con un volumen igual de PBS fresco. La concentración de ovoalbúmina se midió mediante el ensayo de la proteína del ácido bicinónico (BCA) (n=3).

45 La figura 3 muestra la absorción de antígeno (ova) por las células dendríticas. (A) Citometría de flujo después de la incubación de células DC2.4 con ova FITC en solución o en micropartículas de inulina. (B) Los mismos resultados que en 3A mostrados por microscopio de fluorescencia, el núcleo de las células DC2.4 se tiñó con DAPI.

La figura 4 muestra (A) InAc activa los macrófagos a través de TLR dependientes de MyD88 o Mal y (B) las micropartículas de InAc interactúan con TLR-4. *indica que los resultados son estadísticamente significativos (P < 0,05) usando la prueba t de Student.

50 La figura 5 muestra títulos de anticuerpos IgG-Total, IgG-1 e IgG-2a específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) fueron inyectados intradérmicamente con ova (100 μ g) solos, ova con alumbre (200 μ g), ova con micropartículas de β -inulina en blanco, o micropartículas cargadas con ova de β -inulina, en los días 1 y 21 como dosis primaria y de refuerzo. Se recolectaron sueros a las 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones para el análisis de los títulos de anticuerpos antiova mediante ELISA indirecto.

La figura 6 muestra un perfil de liberación de ovoalbúmina (ova) a partir de micropartículas de β -inulina. Se realizaron estudios de liberación con 10 mg de micropartículas dispersas en 1 ml de PBS 100 mM (solución salina tamponada con fosfato) a pH 7,4 con agitación a -100 rpm a 37°C. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras y se reemplazaron con un volumen igual de PBS fresco. La concentración de ova FITC se midió por análisis fluorométrico (n=3).

La figura 7 muestra títulos de anticuerpos IgG-Total, IgG-1 e IgG-2a específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) fueron inyectados intradérmicamente con ova (100 μ g) solos, ova con alumbre (200 μ g), ova con micropartículas de InAc en blanco u ova cargada en micropartículas de InAc, en 10 días 1 y 21 como primaria e inmunización primaria y de refuerzo. Se recogieron sueros a las 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primaria y de refuerzo para el análisis de títulos de IgG usando ELISA indirecto.

La figura 8 muestra la proliferación de esplenocitos *in vitro* en respuesta al antígeno (Ova). Los esplenocitos se prepararon a partir de ratones inmunizados con ovas solos, ova con alumbre u ova cargada en micropartículas de β -inulina o InAc y se cultivaron durante 72 horas en presencia de Concanavalina A (ConA, 2,5 μ g/ml) u ova (100 μ g/ml) o medios RPMI 1640. La proliferación de esplenocitos se midió mediante el ensayo MTT y se mostró como un índice de estimulación (SI). SI = valor de absorbancia para cultivos tratados con antígeno (ova) o mitógeno (ConA) dividido por el valor de absorbancia para cultivos no estimulados (tratados con RPMI). ConA es un control positivo para la proliferación. * indica que los valores son estadísticamente significativos en comparación con el grupo inmunizado con ova (P < 0,001) utilizando la prueba t de Student.

La figura 9 muestra la medición de citocinas Th1 (IFN-g e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10). Los esplenocitos se prepararon a partir de ratones inmunizados con ova sola, ova con alumbre o micropartículas de InAc cargadas con ova y se cultivaron durante 72 horas en presencia de ovas (100 μ g/ml). Después de 72 horas, se recolectó el sobrenadante de diferentes grupos de tratamiento y se midió la concentración de diferentes citocinas usando ELISA sándwich. * indica que los valores son significativamente más altos en comparación con el grupo inmunizado con ova (P < 0,001) usando la prueba t de Student.

La figura 10 muestra respuestas DTH en ratones inmunizados. Se inyectó ova (5 μ g) en la almohadilla plantar izquierda y PBS en la almohadilla plantar derecha de cada ratón inmunizado. El grado de hinchazón de la almohadilla plantar se midió 24 horas después del tratamiento con ova y PBS. Los datos representan el grado medio de hinchazón + desviación estándar de 3-4 ratones inmunizados de cada grupo. * indica que los valores son estadísticamente significativos en comparación con el grupo inmunizado con ova (P < 0,001) usando la prueba t de Student.

La figura 11 muestra el efecto del tamaño de las partículas de acetato de inulina en la generación de títulos totales de IgG específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) se inyectaron por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 μ g) solos o junto con CFA (adyuvante completo de Freund) o se cargaron en micro o nanopartículas InAc los días 1 y 21 como inmunización primaria y de refuerzo. Se recogieron sueros a las 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primaria y de refuerzo para el análisis de títulos totales de IgG usando ELISA indirecto. Se usó CFA como control positivo (adyuvante más fuerte).

La figura 12 muestra el efecto del tamaño de las partículas de acetato de inulina en la generación de títulos de IgG-1 específicos para ova en suero en ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) se inyectaron por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 μ g) solos o junto con CFA o se cargaron en micropartículas o nanopartículas InAc los días 1 y 21. Los sueros se recogieron 1 y 3 semanas después. Las inmunizaciones primarias y de refuerzo para el análisis de títulos de IgG-1 utilizando ELISA indirecto.

La figura 13 muestra el efecto del tamaño de las partículas de acetato de inulina en la generación de títulos de IgG-2a específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) se inyectaron por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 μ g) solos o junto con CFA o se cargaron en micropartículas o nanopartículas InAc los días 1 y 21. Los sueros se recogieron 1 y 3 semanas después las inmunizaciones primarias y de refuerzo para el análisis de títulos de IgG-2a usando ELISA indirecto.

La figura 14 muestra el efecto de la cantidad de un antígeno cargado en micropartículas de InAc sobre la generación de títulos de IgG específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) se inyectaron por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 μ g) solos o junto con CFA o se cargaron en micropartículas de InAc los días 1 y 21. Los sueros se recogieron 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primarias y de refuerzo para el análisis de títulos de IgG-total, IgG-1 e IgG-2a usando ELISA indirecto.

La figura 15 muestra el efecto de la cantidad de un antígeno cargado en nanopartículas de InAc sobre la generación de títulos de IgG específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) se inyectaron subcutáneamente con ova (100, 10 o 1 μ g) solos o junto con CFA o se cargaron en nanopartículas de InAc los días 1 y 21. Los sueros se recogieron 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primaria y de refuerzo para análisis de títulos de IgG-total, IgG-1 e IgG-2a usando ELISA indirecto.

La figura 16 muestra los resultados de un ensayo de activación de la Ruta Alterna del Complemento (APC). El suero humano causa la lisis de los RBC de conejo, que se analizó determinando los valores de OD a 700 nm. El

suero humano se trató con diversas muestras antes de incubar con los RBC para la lisis. El porcentaje de lisis de RBC se calculó considerando la lisis de RBC con suero humano no tratado como 100 %. Zymosan (control positivo) activa APC y, por lo tanto, inhibe la lisis de los RBC del conejo.

- 5 La figura 17 muestra una tinción H&E de tejido cutáneo en un sitio de inyección de adyuvante. (A) muestra tres imágenes del sitio de la inyección de nanopartículas de InAcn (izquierda), la inyección de micropartículas de InAc (centro) y la inyección adyuvante completa de Freud (CFA) (derecha) con un aumento bajo y (B) muestra dos imágenes con un aumento mayor, con micropartículas InAc (izquierda) y CFA (derecha).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 10 Como se usa en este documento, los términos citados tienen los siguientes significados. Todos los demás términos y fases utilizados en esta especificación tienen sus significados ordinarios como entendería un experto en la materia. Tales significados ordinarios pueden obtenerse por referencia a diccionarios técnicos, tales como el Diccionario Químico Condensado de Hawley, 14^a Edición, por R. J. Lewis, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 2001.

- 15 Las referencias en la especificación a “una realización”, “una realización”, etc., indican que la realización descrita puede incluir un aspecto, característica, estructura, fracción o característica particular, pero no todas las realizaciones necesariamente incluyen ese aspecto, característica, estructura, fracción o característica. Además, tales expresiones pueden, pero no necesariamente, referirse a la misma realización mencionada en otras porciones de la especificación. Además, cuando se describe un aspecto, característica, estructura, fracción o característica particular en relación con una realización, está dentro del conocimiento de un experto en la materia afectar o conectar dicho aspecto, característica, estructura, fracción o característica con otras realizaciones, descritas explícitamente o no.

- 20 Las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a “un compuesto” incluye una pluralidad de tales compuestos, de modo que un compuesto X incluye una pluralidad de compuestos X. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva, como “únicamente”, “solo” y similares, en relación con la citación de elementos de reclamo o el uso de una limitación “negativa”.

- 25 El término “y/o” significa cualquiera de los ítems, cualquier combinación de los ítems, o todos los ítems con los que está asociado este término. La expresión “uno o más” se entiende fácilmente por un experto en la técnica, particularmente cuando se lee en el contexto de su uso. Por ejemplo, uno o más ingredientes opcionales pueden incluirse en una formulación particular, por lo tanto, uno o más pueden referirse a uno a aproximadamente cuatro, o de uno a aproximadamente cinco, o tantos ingredientes como se desee en una formulación particular.

- 30 El término “aproximadamente” puede referirse a una variación de $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 20\%$ o $\pm 25\%$ o el valor especificado. Por ejemplo, “aproximadamente 50” por ciento puede en algunas realizaciones llevar una variación del 45 al 55 por ciento. Para los rangos de enteros, el término “aproximadamente” puede incluir uno o dos enteros mayores que y/o menores que un entero citado en cada extremo del rango. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el término “aproximadamente” pretende incluir valores, por ejemplo, porcentajes en peso, próximos al rango mencionado que son equivalentes en términos de la funcionalidad del ingrediente individual, la composición o la realización.

- 35 Como entenderá por el experto en la materia, todos los números, incluidos aquellos que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., son aproximaciones y se entiende que están modificados opcionalmente en todos los casos por el término “aproximadamente”. Estos valores pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por los expertos en la técnica utilizando las enseñanzas de las descripciones de este documento. También se entiende que tales valores contienen inherentemente la variabilidad que necesariamente resulta de las desviaciones estándar encontradas en sus respectivas mediciones de prueba.

- 40 Como entenderá un experto en la materia, para cualquiera y para todos los propósitos, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los rangos mencionados aquí también abarcan todos y cada uno de los posibles subrangos y combinaciones de subrangos de los mismos, así como los valores individuales que componen el rango, particularmente los valores enteros. Un rango citado (por ejemplo, porcentajes en peso o grupos de carbono) incluye cada valor específico, entero, decimal o identidad dentro del rango. Cualquier rango listado puede reconocerse fácilmente como lo suficientemente descriptivo y permite que el mismo rango se divida en mitades, tercios, cuartos, quintas o décimas al menos iguales. Como un ejemplo no limitativo, cada rango discutido en este documento puede desglosarse fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la materia, todo lenguaje como “hasta”, “al menos”, “mayor que”, “menor que”, “más que”, “o más”, y similares, incluya el número citado y dichos términos se refieren a rangos que pueden desglosarse posteriormente en subrangos como se discutió anteriormente. De la misma manera, todas las proporciones que se mencionan en el presente documento también incluyen todas las subproporciones que caen dentro de la proporción más amplia. En

consecuencia, los valores específicos que se mencionan para radicales, sustituyentes y rangos, son solo ilustrativos; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de rangos definidos para radicales y sustituyentes.

5 un experto en la materia también reconocerá fácilmente que, cuando los miembros se agrupan de una manera común, como en un grupo Markush, la invención abarca no solo a todo el grupo en su conjunto, sino a cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal. Además, para todos los propósitos, la invención abarca no solo el grupo principal, sino también el grupo principal en ausencia de uno o más de los miembros del grupo. Por lo tanto, la invención prevé la exclusión explícita de uno o más de los miembros de un grupo recitado.

10 En consecuencia, se pueden aplicar condiciones a cualquiera de las categorías o realizaciones divulgadas por las cuales uno o más de los elementos, especies o realizaciones enumerados, pueden excluirse de tales categorías o realizaciones, por ejemplo, como se usa en una limitación negativa explícita.

La expresión "ponerse en contacto" se refiere al acto de tocar, hacer contacto o acercarse de manera inmediata o cercana, incluso a nivel celular, por ejemplo, para provocar una reacción fisiológica, una reacción química o un cambio físico, por ejemplo, en una solución, en una mezcla de reacción, *in vitro* o *in vivo*.

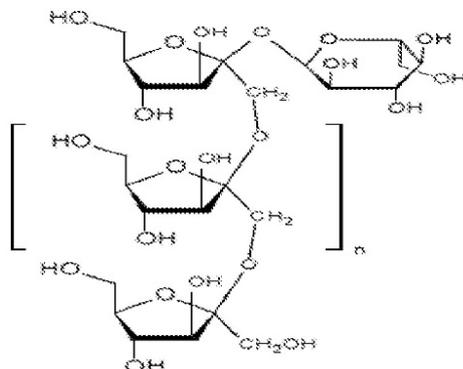
15 Una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad efectiva para tratar una enfermedad, trastorno y/o condición, o para producir un efecto citado. Por ejemplo, una cantidad efectiva puede ser una cantidad efectiva para reducir la progresión o la gravedad de la condición o los síntomas que se están tratando.

20 La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia. El término "cantidad eficaz" está destinado a incluir una cantidad de un compuesto descrito aquí, o una cantidad de una combinación de compuestos descritos aquí, por ejemplo, que es eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno, o para tratar los síntomas de la enfermedad o trastorno, en un huésped. Por lo tanto, una "cantidad efectiva" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto deseado.

25 Los términos "tratar", "trato" y "tratamiento" incluyen (i) prevenir que ocurra una enfermedad, condición patológica o médica (por ejemplo, profilaxis); (ii) inhibir la enfermedad, condición patológica o médica o detener su desarrollo; (iii) aliviar la enfermedad, condición patológica o médica; y/o (iv) disminuir de los síntomas asociados con la enfermedad, condición patológica o médica. Por lo tanto, los términos "trato", "tratamiento" y "tratar" se extienden a la profilaxis e incluyen evitar, prevención, prevenir, disminuir, detener o revertir la progresión o la gravedad de la condición o los síntomas que se están tratando. Como tal, el término "tratamiento" incluye tanto la administración médica, terapéutica y/o profiláctica, según corresponda.

30 Los términos "inhibir", "inhibiendo" e "inhibición" se refieren a ralentizar, detener o revertir el crecimiento o la progresión de una enfermedad, infección, condición o grupo de células. La inhibición puede ser mayor de aproximadamente 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, por ejemplo, en comparación con el crecimiento o la progresión que ocurre en ausencia del tratamiento o contacto.

35 Los términos "inulina" son bien conocidos en la técnica y se refieren a α -D-glucopiranosil- $[\alpha$ -D-fructofuranosil] $_{(n-1)}$ -D-fructofuranosido, un polisacárido que consiste en una familia de β -D lineal (2->1) polifrufructofuranosil α -D-glucosas, en el que una cadena no ramificada de hasta aproximadamente 100 fracciones de fructosa (n = aproximadamente 5 a aproximadamente 100 para material derivado de plantas y aproximadamente 5 a aproximadamente 100.000 para material derivado de microbios) están vinculados a una unidad de glucosa terminal única.



40 La inulina es un polisacárido derivado de plantas y tiene una estructura relativamente hidrófoba, similar al polioxietileno. Esta estructura y su naturaleza no ionizada permiten la recristalización y preparación en un estado muy puro. La inulina puede prepararse como polidisperso molecularmente a pesos moleculares de hasta aproximadamente 16 kDa. Las partículas de inulina adecuadas (tales como las partículas β -In e InAc descritas aquí) pueden prepararse a partir de inulina cruda que tiene un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 8 kDa, aproximadamente 4 kDa a aproximadamente 6 kDa, o
45 aproximadamente de 5 kDa.

5 La inulina actúa como el carbohidrato de almacenamiento de Compuestas (o Asteráceas) y se obtiene en altos pesos moleculares a partir de tubérculos de dalia. La inulina se puede obtener comercialmente de una variedad de proveedores, como Sigma (St. Louis, MO). La inulina existe en varias formas distintas (polimorfos), incluidas las formas alfa, beta, gamma, delta y épsilon (véase, por ejemplo, WO 2011/032229 (Petrovsky et al.)). Estas formas pueden diferenciarse por sus parámetros de solubilidad. La alfa inulina (α -In) y la beta inulina (β -In) pueden prepararse por precipitación a partir de agua y etanol, respectivamente. Tanto las isoformas alfa y beta son sustancialmente solubles en agua a 37°C. La inulina gamma (γ -In) es insoluble en agua a 37°C, pero es soluble en agua a altas concentraciones (>50 mg/ml) a 70-80°C. La inulina en forma β -polimórfica o en cualquier forma soluble en agua nunca ha demostrado tener un efecto potenciador adyuvante/inmune.

10 El término “acetato de inulina” (InAc) se refiere a inulina acetilada. Típicamente, al menos aproximadamente el 90 % de los grupos hidroxilo disponibles de la inulina están acetilados, y a menudo al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 98 %. En realizaciones, puede usarse inulina acetilada en un grado menor, tal como inulina con al menos aproximadamente 10 % de grupos hidroxilo disponibles acetilados. En realizaciones, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 75 % de los grupos hidroxilo disponibles pueden acetilarse para diversas formulaciones de acetato de inulina. En las realizaciones, la inulina acetilada se considera acetato de inulina cuando desaparece el pico de hidroxilo de su espectro infrarrojo y aparecen picos de acetilo. El acetato de inulina es insoluble en agua incluso a temperaturas elevadas, pero es soluble en diversos solventes orgánicos como acetona, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano y similares.

20 El acetato de inulina no activa la ruta alternativa del complemento (APC), e InAc no funciona como adyuvante de la vacuna cuando se coinyecta con un antígeno. InAc es fácilmente dispersable en solución salina. Se debe encapsular un antígeno dentro de las partículas de InAc o asociarlo físicamente con las partículas de InAc para que funcione como un adyuvante de vacuna. Las micropartículas y nanopartículas de InAc pueden funcionar como adyuvantes de la vacuna al mejorar la absorción del antígeno y entregar el antígeno encapsulado a los compartimentos relevantes de las células inmunes para su activación. InAc también es un nuevo agonista de TLR, como se muestra por primera vez aquí. Si bien no está limitado por la teoría, esto sugiere que InAc funciona como un adyuvante de vacuna por un mecanismo diferente al de las formas de inulina no acetiladas.

25 Se pueden usar otros derivados de inulina además de, o en lugar de, acetato de inulina. Un derivado de inulina puede ser inulina donde los grupos hidroxilo de la inulina se modifican por sustitución química con grupos alquilo, arilo o acilo, o por oxidación o reducción, por procedimientos conocidos. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por Greg T. Hermanson en *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, California. (1996).

30 Los derivados de inulina incluyen enlaces éster, enlaces éter, enlaces amida, enlaces carbamato, formas oxidadas o reducidas de inulina y sus derivados, modificaciones catiónicas/aniónicas/no iónicas de inulina (aniónico: O-(carboximetil)inulina; catiónico: Inutec H25P), un complejo de inulina o su forma oxidada/reducida con otros agentes (por ejemplo, complejación de inulina oxidada con metales pesados como cobre, zinc, cadmio o similares).

35 Un “éster de inulina” o “inulina esterificada” se refiere a la inulina esterificada en grupos hidroxilo por condensación con grupos formadores de éster tales como ácidos carboxílicos o acilación con grupos tales como anhídridos carboxílicos, o similares. Los ejemplos de éster de inulina incluyen, pero sin limitación, propanoilato de inulina, butanoilato de inulina, fosfatos de inulina y similares.

40 Un “éter de inulina” o “inulina eterificada” se refiere a la inulina eterificada en grupos hidroxilo con grupos formadores de éter tales como grupos que tienen grupos salientes apropiados tales como haluros, haluros de ácido o similares. Los ejemplos de éteres de inulina incluyen, pero no se limitan a, inulina metilada (por ejemplo, inulina por metiléter), inulina etilada y similares.

45 Los ejemplos de formas oxidadas o reducidas de inulina y sus derivados incluyen carbonato de inulina, inulina de dialdehído y similares. Otros derivados de inulina que pueden usarse incluyen cianoetilina, amino-3-oxopropilina, carboxietilina, hidroxiimino-3-aminopropilina, carbamatos de inulina (por ejemplo, Inutec SP1), o una combinación de los mismos.

50 Los derivados de inulina pueden estar en forma de formulaciones particuladas donde las moléculas de carga (por ejemplo, un antígeno) están encapsuladas dentro de las partículas, o recubiertas o conjugadas en las partículas. La modificación de los grupos hidroxilo disponibles de la inulina pueden ser en un grado como se describe anteriormente para la acetilación del acetato de inulina.

55 “Agente activo” o “activo” se refiere a un fármaco, agente inmunológico (por ejemplo, un antígeno) u otra molécula de carga que puede estar encapsulada o físicamente asociada con partículas de beta-inulina o InAc. “Asociado físicamente” se refiere a una asociación por interacciones electrostáticas, incluidas interacciones hidrófilas, hidrófobas o enlaces de hidrógeno a un polímero o partículas. “Físicamente asociado con una partícula” puede referirse a la partícula que se reviste con el agente, así como a la partícula que se conjuga covalentemente al agente.

Los procedimientos de conjugación son bien conocidos en la técnica y varias técnicas se describen en Greg T. Hermanson en *Bioconjugate Techniques*. Academic Pres, San Diego, California. (1996). El agente activo puede cargarse en partículas a aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 25 % en peso, aproximadamente 1 % en

peso a aproximadamente 10 % en peso o aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de las partículas combinadas y de la carga y/o moléculas asociadas físicamente.

“Antígeno” se refiere a cualquier sustancia que es capaz, en condiciones apropiadas, de inducir una respuesta inmune específica y de reaccionar con los productos de esa respuesta; es decir, con anticuerpos específicos o linfocitos T específicamente sensibilizados, o ambos. Los términos “antígeno”, “agente inmunogénico” y “agente activo” se pueden usar indistintamente en este documento. Los antígenos pueden ser sustancias solubles, como toxinas y proteínas/péptidos propios o extraños, o partículas, como bacterias, virus y células de tejido; sin embargo, solo una pequeña porción de la molécula de proteína o polisacárido conocida como determinante antigénico o epítipo es reconocida por el receptor específico en un linfocito. De manera similar, el anticuerpo o linfocito efector producido por la respuesta se combina solo con un determinante antigénico. Una célula bacteriana o proteína grande puede tener muchos cientos de determinantes antigénicos, algunos de los cuales son más importantes que otros en la inmunidad protectora.

Una lista parcial de antígenos conocidos que pueden usarse con los adyuvantes proporcionados en el presente documento es la siguiente: antígenos alogénicos, que se producen en algunos pero no en todos los individuos de la misma especie, por ejemplo, antígenos de histocompatibilidad y antígenos de grupos sanguíneos, anteriormente llamados isoantígenos; antígenos bacterianos; antígenos de grupos sanguíneos, que están presentes en la superficie de los eritrocitos y varían entre individuos de la misma especie y se usan como base para la tipificación de la sangre; antígenos capsulares; Antígenos K, L y V; antígeno carcinoembrionario (CEA); antígeno oncofetal; antígenos comunes, que son determinantes antigénicos presentes en dos o más moléculas de antígeno diferentes y la base para reacciones cruzadas entre ellos; antígenos completos, que son antígenos que estimulan la respuesta inmune y reaccionan con los productos, por ejemplo, anticuerpos, de esa respuesta; antígenos conjugados; haptenos los antígenos de reacción cruzada son antígenos que se combinan con anticuerpos producidos en respuesta a un antígeno relacionado diferente, debido a la similitud de determinantes antigénicos, o antígenos idénticos en dos cepas bacterianas, de modo que el anticuerpo producido contra una cepa reaccionará con la otra; antígeno de eritrocitos de perro (DEA), que son antígenos que se encuentran en los eritrocitos de perro y se usan para distinguir diferentes grupos sanguíneos en la especie; antígenos ambientales, los que se encuentran en pólenes, hongos, polvo doméstico, alimentos y caspa de animales; antígeno de membrana celular de oncornavirus felino (FOCMA), que es un antígeno específico de tumor presente en la membrana de las células en gatos infectados con el virus de la leucemia felina; antígenos flagelares; H o antígenos de Hauch, que son antígenos que se encuentran en los flagelos bacterianos; antígenos de pulgas, que comprenden algunos componentes de la saliva de pulgas, así como extractos de pulgas; Antígenos Forssman; antígenos heterófilos, que son aquellos antígenos que se encuentran en varias especies no relacionadas, principalmente en los órganos pero no en los eritrocitos o solo en los eritrocitos u ocasionalmente tanto en el órgano como en los eritrocitos; antígenos específicos de grupo (gs), que son comunes a cierto grupo de organismos, p. ej. estreptococos, oncornavirus; antígenos heterogéneos; antígenos xenogénicos; antígeno heterófilo; antígeno heterogénico, que incluye un antígeno capaz de estimular la producción de anticuerpos que reaccionan con tejidos de otros animales o plantas; Antígenos ocultos, que son antígenos que no están normalmente expuestos a los linfocitos circulantes, por ejemplo, dentro del tejido nervioso central, tejido testicular y ciertos componentes intracelulares, y por lo tanto, normalmente no provocan una respuesta inmune; antígenos de histocompatibilidad; antígenos H-Y, que son antígenos de histocompatibilidad de la membrana celular; antígenos Ia, que son antígenos de histocompatibilidad gobernados por la región I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), ubicado en linfocitos B, linfocitos T, piel y ciertos macrófagos; antígenos isogénicos, que son antígenos transportados por un individuo o miembros de la misma cepa endogámica, capaces de provocar una respuesta inmune en individuos genéticamente diferentes de la misma especie, pero no en individuos que la portan; antígenos K; antígenos capsulares bacterianos; antígenos L, que son antígenos capsulares de *Escherichia coli*; antígenos Ly, que son marcadores antigénicos de la superficie celular de subpoblaciones de linfocitos T, clasificados como Ly 1, 2 y 3; antígenos definidos por linfocitos (LD); antígenos de clase II encontrados en linfocitos, macrófagos, células epidérmicas y esperma; antígenos M, antígenos específicos de tipo que parecen estar ubicados principalmente en la pared celular y están asociados con la virulencia de *Streptococcus pyogenes*; Antígeno específico de tumor de Marek (MATSA), que se encuentra en la superficie de las células infectadas por la enfermedad de Marek, el virus del herpes; Antígeno Negre, que es un antígeno preparado a partir de bacilos de tuberculosis muertos, secos y triturados por medio de acetona y alcohol metílico; antígenos nucleares, que son los componentes de los núcleos celulares con los que reaccionan los anticuerpos antinucleares; el antígeno O, que se produce en la pared celular de las bacterias, el antígeno oncofetal, que es un producto génico que se expresa durante el desarrollo fetal, pero reprimido en el tejido especializado del adulto y también es producido por cierto cáncer, incluye la alfafetoproteína y el antígeno carcinoembrionario; antígeno específico de un órgano, que es cualquier antígeno que se produce exclusivamente en un órgano particular y sirve para distinguirlo de otros órganos; antígenos parciales; antígeno de polen, los polipéptidos esenciales del polen de las plantas; antígenos privados, que son antígenos de los grupos sanguíneos de baja frecuencia; antígenos con memoria inmunológica, que son antígenos a los que un individuo ha sido previamente sensibilizado y que posteriormente se administra como una dosis estimulante para provocar una reacción de hipersensibilidad; antígenos secuestrados, que son ciertos antígenos secuestrados anatómicamente del sistema inmune durante el desarrollo embrionario y, por lo tanto, se cree que no se reconocen como “propios” y si tales antígenos se exponen al sistema inmune durante la vida adulta, se generaría una respuesta autoinmune; antígeno definido serológicamente (SD), que es un antígeno de clase 1 del complejo principal de histocompatibilidad, identificable por el uso de antiseros específicos; antígeno sintético, uno sintetizado químicamente o producido mediante tecnología de ADN recombinante, la síntesis de polímeros,

basada en secuencias encontradas en antígenos microbianos u otros; Antígeno dependiente de T (la respuesta inmune de la mayoría de los antígenos requiere linfocitos T cooperadores (Th); las linfocinas producidas por los linfocitos T determinan las características de los anticuerpos producidos, que pueden cambiar durante la respuesta inmune); antígeno dependiente del timo, un antígeno que requiere la participación de linfocitos T antes de que pueda ocurrir una respuesta inmune; antígeno independiente del timo, un antígeno que provoca una respuesta de anticuerpos sin la participación de linfocitos T; antígeno tolerogénico; antígeno específico de tumor (TSA), que son antígenos que se encuentran solo en células tumorales; Antígeno V, antígeno Vi, que son antígenos contenidos en la cápsula de una bacteria y se cree que contribuyen a su virulencia; antígeno xenogénico, que son comunes a los miembros de una especie pero no a los miembros de otras especies; llamado también antígeno heterogéneo.

La “ruta de complemento” se refiere a una complicada cascada de enzimas formada por numerosas glucoproteínas séricas que normalmente existen en forma de proenzima inactiva. El sistema tiene tres rutas distintas: “la ruta clásica”, “la ruta alternativa” y la “ruta de lecitina”. La ruta clásica del sistema de complemento es un efector importante de la rama humoral de la respuesta inmune humana. El desencadenante de la ruta clásica es el anticuerpo IgG o IgM unido al antígeno. La unión del anticuerpo al antígeno expone un sitio en el anticuerpo que es un sitio de unión para el primer componente del complemento, C1.

La “ruta alternativa de complemento” o APC no requiere anticuerpos para su activación. Más bien, una variedad de antígenos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y los componentes de virus y otros patógenos tienen la capacidad de activar esta ruta. Aunque no está limitado por la teoría, se cree que evolucionó antes que la ruta clásica de complemento, que depende de la molécula de anticuerpo desarrollada relativamente recientemente. Al igual que la ruta clásica, la ruta alternativa produce una convertasa C3 y C5, lo que conduce a la producción de C5b y luego a la formación del complejo de ataque de membrana (MAC). Sin embargo, los jugadores moleculares específicos y el camino seguido a lo largo de la vía son, sin embargo, diferentes a los de la ruta clásica de complemento.

Si bien los factores estimulantes para cada ruta son distintos, cada uno tiene una secuencia terminal similar que crea el complejo de ataque de membrana (MAC), un complejo enzimático que perfora diversas superficies celulares. Además, tanto las rutas alternativas como las clásicas tienen como subproductos una serie de anafilatoxinas, pequeños péptidos que contribuyen a una respuesta inflamatoria.

Las moléculas involucradas en el sistema de complemento generalmente reciben el nombre “C” y luego un número, por ejemplo “C1”. Los números no son indicativos del orden en que actúan dentro de la cascada, pero se refieren al orden en que fueron descubiertos. Las proteínas del complemento normalmente existen en forma de proenzima, y se activan secuencialmente por sucesivas divisiones de las diversas moléculas. Cuando se divide una proteína del complemento, se forman dos fragmentos, generalmente denominados “a” y “b”. La molécula del complemento C5, por ejemplo, se divide en fragmentos C5a y C5b.

La ovoalbúmina, u “ova”, es una albúmina soluble en agua y es el componente principal de la clara de huevo de gallina. Aproximadamente el 60-65 % de la proteína total en una clara de huevo es ovoalbúmina. La ovoalbúmina puede actuar como una proteína de almacenamiento y la ovoalbúmina de los huevos de gallina se puede usar como antígeno para estimular reacciones alérgicas en los sujetos de prueba.

El término “animal”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de un reino de seres vivos que incluye, pero no se limita a, un miembro del reino Animal, incluidos organismos con muchas células y organismos unicelulares que típicamente difieren de las plantas en 1) que tienen células sin paredes de celulosa, 2) que carecen de clorofila y capacidad para la fotosíntesis, 3) que requieren materiales alimenticios más complejos, por ejemplo, proteínas, 4) que se organizan en mayor grado de complejidad, y 5) que tienen la capacidad de movimiento espontáneo y respuestas motoras rápidas a la estimulación. El término animal, como se usa en el presente documento, también se refiere a cualquiera de las grandes divisiones del reino animal, o subreinos, y las clases principales bajo ellas, que incluyen, pero no se limitan a: Vertebrados, incluidos Mammalia o mamíferos, incluidos Aves o pájaros, Reptilia, Anfibia, Piscis o peces, Marsipobranchiata (Craniota); y Leptocardia (Acrania); Tunicata, incluida la Thaliaceae, y Ascidioidea o ascidias; Articulata o Annulosa, incluyendo Insecta, Myriapoda, Malacopoda, Arachnida, Pycnogonida, Merostomata, Crustacea (Arthropoda); y Annelida, Gehyra (Anarthropoda); Helmintos o vermes, incluidos Rotifera, Chaetognatha, Nematoidea, Acanthocephala, Nemertina, Turbellaria, Trematoda, Cestoidea, Mesozoa, Molluscoidea, incluidos Brachiopoda y Bryozoa; Mollusca, incluyendo Cephalopoda, Gastropoda, Pteropoda, Escaphopoda, Lamellibranchiata o Acephala; Echinodermata, incluyendo Holothurioidea, Echinoidea, Asteroidea, Ophiuroidea y Crinoidea; Coelenterata, que incluye Antozoa o Pólipos; Ctenophora e Hydrozoa o Acalephs; Spongiozoa o Porifera, incluidas las esponjas; y Protozoa, incluidos Infusoria y Rhizopoda. El término animal, como se usa en el presente documento, se refiere además a los siguientes ejemplos no limitantes: humano, primate, perro, gato, vaca, cordero, cerdo, puerco, aves de corral, caballo, yegua, mula, yak, Jenny, potro, ternero, añojo, toro, buey, oveja, cabra, llama, bisonte, búfalo, cordero, cabrito, cochinito, gallina, pollo, pavo, pato, ganso, avestruz, otros pájaros o aves, conejo, liebre, conejillo de indias, ratón hámster, rata, otros roedores, peces, y otras especies acuáticas y anfibios. El término “animal” como se usa en el presente documento se refiere adicionalmente a animales transgénicos.

El término “sujeto” como se usa en este documento significa un animal que es objeto de estudio médico o científico.

El ensayo de proteína de ácido bicinconínico (BCA) es un ensayo bioquímico para determinar el nivel total de proteína en una solución (por ejemplo, 0,5 µg/mL a 1,5 mg/ml). La concentración de proteína total se exhibe mediante un cambio de color de una solución de muestra de verde a púrpura en proporción a la concentración de proteína, que luego se puede medir utilizando técnicas de análisis colorimétrico.

5 Desde 1926, el alumbre ha sido el único adyuvante aprobado para uso humano en los EE. UU., pero solo produce respuestas inmunes humorales (tipo Th2). Además, las vacunas con adyuvante de alumbre tienen muchas desventajas, incluida la pérdida de potencia por liofilización y congelación convencionales (Maa et al., J. Pharm. Sci. 2003; 92(2):319-32). El almacenamiento en frío de varias vacunas disponibles actualmente es una preocupación seria para las compañías y proveedores farmacéuticos, especialmente en los países en desarrollo.

10 En las realizaciones descritas en el presente documento se proporcionan formulaciones adyuvantes eficientes capaces de estimular ambos brazos del sistema inmune, incluyendo humoral (para patógenos extracelulares) y celular (para patógeno intracelular). Además, la divulgación proporciona formulaciones de vacuna y suministro que pueden ser físicamente estables a temperatura ambiente y adecuadas para la liofilización, eliminando así el requisito de almacenamiento en cadena de frío. Además, el acetato de inulina es un nuevo agonista de TLR y estimula el sistema inmunitario cuando se formula en forma de partículas. En el presente documento se proporcionan algunas de las muchas otras ventajas de usar InAc como adyuvante de vacuna.

La divulgación que se proporciona a continuación detalla la preparación de formulaciones de nanopartículas y micropartículas de la forma β-polimórfica soluble en agua de inulina (β-In) y su derivado sintético acetato de inulina (InAc) y el uso de estas formulaciones como inmunopotenciadores. La ovoalbúmina (ova) se puede usar como antígeno modelo. Las micropartículas de β-In o InAc que contienen ova pueden prepararse mediante un procedimiento de evaporación de doble emulsión-disolvente. Los estudios de liberación *in vitro* muestran que la mayoría de la ova incorporada (>95 %) se libera de las partículas β-In y de las partículas InAc en 16 horas y 528 horas (22 días), respectivamente.

Los estudios de inmunización en ratones muestran que las ova encapsuladas en micropartículas β-In produjeron respuestas de anticuerpos más fuertes (solo tipo Th2) que las ova no encapsuladas (libres). Este resultado fue similar en tipo de respuesta y mayor en intensidad en comparación con el grupo donde el alumbre (el único adyuvante aprobado por la FDA) se usa como adyuvante. Por ejemplo, la intensidad de la respuesta puede ser de hasta aproximadamente 4 veces, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces la intensidad de la respuesta del grupo donde el alumbre se usa como adyuvante. Sin embargo, los ova que contienen micropartículas de InAc generaron respuestas de anticuerpos significativamente más altas que los ova unidos al alumbre.

Por ejemplo, la respuesta total de IgG en ratones que recibieron micropartículas de InAc que contenían ova fue hasta aproximadamente 90 veces mayor que en ratones que recibieron ova unida a alumbre. Además, la respuesta de IgG1 en ratones que recibieron micropartículas de InAc que contenían ova fue hasta aproximadamente 75 veces mayor que en ratones que recibieron ova unidos al alumbre. Además, la respuesta de IgG2a en ratones que recibieron micropartículas de InAc que contenían ova fue hasta aproximadamente 1200 veces mayor que en ratones que recibieron ova unidos al alumbre. En consecuencia, las partículas de InAc cargadas de ova pueden generar respuestas de anticuerpos que son significativamente más altas que otros adyuvantes unidos a la ova. Por ejemplo, las partículas de InAc cargadas con ova pueden generar títulos significativamente más altos que los ova unidos al alumbre de la siguiente manera: IgG total: al menos aproximadamente 5-100 veces mayor, al menos aproximadamente 10-150 veces mayor, o al menos aproximadamente 10-200 veces mayor; IgG1; al menos aproximadamente 10-100 veces más alto, al menos aproximadamente 15-85 veces más alto, o al menos aproximadamente 20-80 veces más alto; IgG2a: al menos aproximadamente 2-1500 veces más alto, al menos aproximadamente 100-1500 veces más alto, o al menos aproximadamente 500-1500 veces más alto.

Significativamente, las micropartículas de InAc generaron respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2, que son deseables en la tecnología moderna de administración de vacunas. El hecho de que los ejemplos divulgados se llevaron a cabo mediante una ruta intradérmica (i.d.) enfatiza aún más el uso potencial de partículas de InAc como adyuvantes en la tecnología de administración de vacunas, tales como microagujas u otros procedimientos de administración que usan la ruta i.d.

La presente divulgación también demuestra el alcance de la respuesta inmune que puede manipularse modulando la dosis, el tamaño de partícula (nano frente a micro) y la ruta de administración. Se pueden preparar diferentes tamaños de partículas de InAc mediante el uso de una combinación seleccionada de tampones, tensioactivos, solventes y otros excipientes. Estas formulaciones múltiples tienen el potencial para usos amplios debido a sus efectos inmunoestimuladores. Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para proporcionar un adyuvante de vacuna novedoso y rentable con propiedades de respuesta inmune significativamente altas (celulares y humorales) y perfiles de seguridad mejorados.

Las formulaciones adyuvantes descritas aquí proporcionan respuestas inmunes más fuertes que el alumbre como adyuvante. Las formulaciones adyuvantes de la invención estimulan la producción de inmunidad mediada por humoral (Th2; para patógenos extracelulares) e inmunidad mediada celular (Th1; para patógenos intracelulares), que es un beneficio significativo sobre otros adyuvantes, incluido el alumbre. Además, las vacunas actuales pueden perder

potencia con la liofilización y congelación convencionales. Las vacunas y las formulaciones de administración divulgadas pueden ser físicamente estables a temperatura ambiente y adecuadas para la liofilización, eliminando así el requisito de almacenamiento en cadena de frío o la adición de conservantes.

5 Las formulaciones adyuvantes que se proporcionan aquí son biocompatibles y biodegradables. La inulina tiene una larga historia de uso seguro en humanos con la ventaja de tener un perfil no tóxico. Los metabolitos de la inulina son fructosa y glucosa, que pueden ser fácilmente excretadas. Se ha informado que la inulina no es tóxica y se ha utilizado como aditivo alimentario.

10 Las formulaciones adyuvantes descritas en el presente documento derivan de plantas. Debido a su origen vegetal, estas formulaciones adyuvantes, que incluyen InAc, pueden usarse universalmente. Esto está en marcado contraste con las sustancias derivadas de los animales, que los vegetarianos no usan ni consumen. Además, debido a que se derivan de plantas, las formulaciones adyuvantes proporcionadas en el presente documento no conllevan un riesgo de contaminación microbiana o sanguínea de los animales.

15 Las formulaciones adyuvantes descritas en este documento proporcionan una estabilidad mejorada sobre las opciones disponibles actualmente. Las vacunas comerciales requieren almacenamiento en frío, lo que resulta en altos costos y una mayor logística asociada con el almacenamiento en frío y el transporte de vacunas. El uso de micropartículas o nanopartículas de InAc como adyuvantes proporciona formulaciones de vacunas que son físicamente estables a temperatura ambiente, así como físicamente estables después de la liofilización.

20 Esta mayor estabilidad elimina el requisito costoso y complejo para el monitoreo y almacenamiento de la cadena de frío. Ciertos adyuvantes, como la gamma-inulina, requieren la coinyección de una solución de antígeno para obtener un efecto inmunoadyuvante. La coinyección de antígeno y adyuvante puede hacer que el antígeno sea susceptible de agregación o degradación. Los antígenos que tienen características que los hacen inestables a la luz, el oxígeno o la humedad también pueden protegerse mediante encapsulación en las micropartículas de InAc o adyuvantes de nanopartículas para mejorar la vida útil.

25 Las formulaciones adyuvantes descritas aquí son rentables de producir. InAc puede prepararse a partir de cualquier forma de inulina, incluida la inulina cruda disponible comercialmente. Las formulaciones adyuvantes descritas en este documento pueden prepararse a un costo significativamente menor que otros sistemas sofisticados de administración de vacunas. Al preparar InAc como se proporciona aquí, se pueden evitar procedimientos complejos para preparar diferentes formas de inulina y las conversiones polimórficas entre diferentes isoformas no son una preocupación. Sorprendentemente, el rendimiento de la preparación de InAc es cercano al 100 %, lo cual es muy favorable en comparación con los rendimientos del 10-50 % para la preparación de gamma-inulina.

30 Las formulaciones adyuvantes descritas en este documento proporcionan una capacidad de dispersión y dinámica superiores, así como un tamaño de partícula uniforme. La dispersibilidad es una propiedad importante de una formulación de vacuna con respecto a su preparación, manipulación y administración a partir de viales multidosis. Las micropartículas o nanopartículas de InAc se optimizaron para una fácil redispersión mediante el uso de tensioactivos y crioprotectores adecuados. Por lo tanto, las formulaciones de InAc proporcionadas en el presente documento pueden dispersarse uniformemente en un disolvente o tampón acuoso. Las micropartículas o nanopartículas de InAc pueden dispersarse uniformemente en solución acuosa al agitarlas y, por lo tanto, pueden administrarse fácilmente usando procedimientos estándar de viales multidosis.

35 Las formulaciones adyuvantes descritas en el presente documento proporcionan una liberación prolongada de antígeno. El antígeno puede liberarse de las formulaciones de InAc descritas en este documento durante períodos prolongados de tiempo (que incluyen, pero no se limita a, 1-2 meses, 2-3 meses o más). Debido a los períodos de tiempo prolongados para la liberación de antígeno, las formulaciones de la invención pueden usarse como vacunas de inyección única sin la necesidad de administrar dosis de refuerzo. Al eliminar la necesidad de múltiples dosis de una vacuna, las formulaciones descritas en este documento proporcionan reducciones significativas en el costo y son más convenientes para el paciente y proveedor. Hay otras ventajas creadas por la eliminación de la necesidad de más de una inyección de vacuna. Por ejemplo, una campaña de vacunación puede ser más exitosa cuando se incrementa el cumplimiento del paciente. Además, debido a que el tamaño de las partículas de las formulaciones descritas en el presente documento puede manipularse (nano frente a micro), el destino de entrega deseado en el sujeto también puede seleccionarse, lo que a su vez permite una mayor precisión en la respuesta inmune resultante.

40 La divulgación proporciona beta-inulina y acetato de inulina como adyuvante de vacuna novedoso y formulaciones de administración que no son tóxicas y biocompatibles. La inulina tiene una larga historia de uso seguro en humanos y sus productos metabólicos (fructosa y glucosa) se excretan fácilmente. Las observaciones preliminares indican que no hay toxicidades visibles o histológicas asociadas con InAc y formulaciones de InAc en el sitio de inyección en ratones. Si aparece alguna inflamación o irritación local en el sitio de inyección en humanos, la reducción de la cantidad de adyuvante incorporado evitará sustancialmente este problema. Para acomodar una dosis de antígeno requerida en cantidades reducidas de beta-inulina o partículas de InAc, la carga de antígeno puede aumentar al manipular la formulación y los parámetros del proceso mientras se preparan las nano/micropartículas.

Se pueden usar varios procedimientos que incluyen técnicas preparatorias de solvente/no solvente, emulsión simple y emulsión doble. Se descubrió que las micro/nano partículas preparadas por el procedimiento de doble emulsión tienen una combinación ventajosa de alta carga de antígeno, baja liberación de estallido (porcentaje de antígeno liberado de las partículas en los primeros 30 minutos) y mayor liberación sostenida, bajo condiciones de formulación similares probadas. Sin embargo, al cambiar los parámetros de las formulaciones, la carga del antígeno podría mejorarse más allá de la carga lograda por cualquier procedimiento conocido. La carga de antígeno en micro/nanopartículas InAc puede incrementarse aún más al aumentar la relación antígeno: polímero en la formulación (partículas de 0,4 µg/mg a partículas de 51 µg/mg al aumentar las condiciones de carga de aproximadamente 100 µg de antígeno por aproximadamente 100 mg de polímero InAc a aproximadamente 20 mg de antígeno por aproximadamente 100 mg de polímero InAc. Esta relación puede aumentarse a aproximadamente 75 µg/mg de partículas de InAc o aproximadamente 100 µg/mg de partículas de InAc, con factores de formulación optimizados. La carga de un antígeno dentro de nano/micropartículas se puede mejorar aún más incorporando manitol con el antígeno en el procedimiento de carga. Se pueden cargar cantidades de antígeno de hasta aproximadamente 100 µg/mg de partículas de InAc en presencia de manitol. De manera similar, se pueden agregar otros carbohidratos o sustancias hidrofílicas (por ejemplo, trehalosa) a la formulación para mejorar la carga de un antígeno dentro de micro/nano partículas de InAc.

La eficacia de carga de antígeno en β-inulina es significativamente mayor. Se puede lograr una carga de hasta aproximadamente 500 µg de antígeno por mg (por ejemplo, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg o 500 µg de antígeno/mg (β-inulina). Por lo tanto, las formulaciones proporcionadas en el presente documento imparten la capacidad de adaptar el suministro del antígeno según sea necesario para cumplir con los objetivos del tratamiento, las particularidades del antígeno y/o la necesidad única del sujeto.

Los siguientes se proporcionan como ejemplos no limitativos de algunas de las aplicaciones comerciales y de investigación de las composiciones y formulaciones de la invención.

Las partículas de inulina e InAc funcionan como sistemas de administración de vacunas y adyuvantes de vacunas. Los adyuvantes de vacunas fuertes y seguros son escasos. Como ejemplo no limitativo, las vacunas contra el cáncer y las vacunas contra patógenos extracelulares y patógenos intracelulares (como virus y parásitos) son solo algunos de los ejemplos de vacunas en las que el uso de las formulaciones de la invención sería beneficioso para activar ambos tipos de respuesta inmune Th1 y Th2. La tecnología proporcionada en esta invención proporciona un enfoque superior y más seguro que la tecnología existente (alumbre) para estimular ambos brazos de respuesta inmune. Las composiciones y formulaciones de esta invención pueden utilizarse como adyuvantes de vacunas humanas o animales para una gama diversa y muy amplia de enfermedades y condiciones.

Las formulaciones adyuvantes descritas en el presente documento pueden combinarse con otros agentes inmunoestimuladores y/o inmunomoduladores tales como citocinas u otras proteínas reguladoras, que incluyen pero no se limitan a linfocinas e interleucinas, o productos de las células del sistema inmunitario u otras células, así como esos productos de las células del sistema inmunitario u otras células que actúan como mediadores intercelulares en la modulación de respuestas como las respuestas inmunes o los productos de patógenos que estimulan de manera no específica el sistema inmunitario, como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMS) o cualquier ligando para el reconocimiento de patrones receptores (PRR). Los ejemplos adecuados incluyen, pero no se limita a, CpG u otros agonistas de TLR, interleucinas IL-1 a IL-35 y otros, interferones (todos los tipos, incluidos los tipos 1 y 2), que pueden usarse con las formulaciones adyuvantes descritas aquí para modular y mejorar aún más la respuesta inmune.

Las formulaciones adyuvantes descritas en el presente documento pueden combinarse con otras terapias para la administración de fármaco o farmacéutica en un sujeto. Por ejemplo, una formulación adyuvante se puede administrar en combinación con agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, Bleomicina, doxorubicina, paclitaxel, 5-fluorouracilo, vincristina y similares) para el tratamiento del cáncer, medicamentos como donepezilo, galantamina, memantina, rivastigmina o tacrina para la terapia de Alzheimer, o con terapia fotodinámica y/o suplementos dietéticos (por ejemplo, curcumina, ácidos grasos omega-3, vitamina C y similares) para otras terapias.

Las formulaciones adyuvantes descritas en este documento pueden usarse para propósitos de vacuna y proporcionarse para el suministro de una variedad de antígenos. Las composiciones y formulaciones descritas en el presente documento pueden usarse para administrar antígenos que incluyen, pero no se limitan a, antígenos virales, vacunas de subunidades, antígenos tumorales, alérgenos como antígenos, vacunas de ácido nucleico, que incluyen, pero no se limitan a vacunas de ADN o ARN, proteínas recombinantes y antígenos recombinantes, así como antígenos de proteínas/carbohidratos/polisacáridos.

Las formulaciones adyuvantes descritas en el presente documento pueden usarse con antígenos, productos farmacéuticos o proteínas, o cualquier otro compuesto o formulación de tratamiento, para el tratamiento y prevención de una amplia variedad de dolencias y condiciones. Las nuevas composiciones y formulaciones descritas en el presente documento pueden usarse como terapia, profilaxis o vacunas, contra condiciones que afectan a humanos, mamíferos y otros animales, y otros organismos vivos.

Las composiciones y formulaciones de la invención pueden usarse en combinación con antígenos, otros agentes, productos farmacéuticos, proteínas o cualquier otro compuesto o formulación adecuada como terapia, profilaxis o vacuna para enfermedades, que incluyen pero no se limitan a malaria, influenza A y B, otra influenza y variantes de la misma, como influenza estacional, influenza porcina, parainfluenza, influenza pandémica, influenza pandémica resistente, influenza aviar, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, ántrax, difteria, *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), SIDA, encefalitis, encefalitis japonesa (JE), enfermedad de Lyme, malaria, virus de Marburg, sarampión, viruela del mono, paperas, tos ferina (tos convulsiva), rubéola (sarampión alemán), poliomielitis (polio), rabia, rotavirus, viruela, tétanos (trismos), tuberculosis, fiebre tifoidea, fiebre amarilla, enfermedades tropicales, enfermedades parasitarias, leishmaniasis, trastornos conformacionales, sarcocistis, síndrome de fatiga crónica, fiebres hemorrágicas, leptospirosis, botulismo, fiebre de dengue, fiebre Q, babesiosis, legionella, tripanosomiasis, lepra, enfermedad de Lyme y fiebre maculosa de las montañas Rocosas.

Las composiciones y formulaciones de la invención se pueden usar en combinación con antígenos, otros agentes, productos farmacéuticos, proteínas o cualquier otro compuesto o formulación adecuada como terapia o profilaxis o vacuna para enfermedades, incluidas, pero no limitadas a, aquellas enfermedades o condiciones causadas por especies de *Giardia*, especies de estreptococos, especies de estafilococos, especies de *Escherichia*, especies de *Enterobacteriaceae*, especies de *Enterococos*, especies de *Haemophilus*, especies de *Mycobacterium*, especies de *Myxobacterium*, especies de *Neisseria*, especies de *Plasmodium*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Salmonella*, especies de *Shigella*, especies de Meningo coco, especies de *Leptospira*, *Candida*, especies de *Copodella*, especies de levadura, especies de hongos, especies de *Cryptococcus*, especies de *Bartonella*, especies de *Rickettsia*, especies de *Borrelia*, especies de tripanosomiasis, especies de *Campylobacter*, Rotavirus, VIH, SIDA, Virus de la influenza aviar, virus del herpes, incluyendo herpes (Herpes zoster) y HSV (virus del herpes simple), virus del papiloma humano (VPH), el virus Hendra, Metapneumovirus humanos, Rinovirus, Bocavirus, Coronavirus, virus invasivo del scaffold, Virus Sinsitial Respiratorio (RSV), Hantavirus, Virus de la fiebre hemorrágica, Virus de vaccinia, SARS, Virus del Nilo Occidental, enfermedades zoonóticas, incluidas, pero no limitadas a, la encefalitis espongiiforme bovina (EEB) y el virus Nipah, brucelosis, rabia y enfermedades parasitarias, incluidas, pero no limitadas a, cisticercosis/teniasis y equinococosis/hidatidosis, influencias animales, enfermedades zoonóticas desatendidas, enfermedades de rumiantes, PRRS, diarrea epidémica porcina, ehrlichiosis, lengua azul, caquexia crónica, peste porcina clásica, metritis equina contagiosa, herpesvirus equino, anemia infecciosa equina, piroplasmosis equina, arteritis viral equina, fiebre aftosa, enfermedad de Hohnes, piroplasmosis, pseudorabias, tembladera, viremia primaveral de la carpa, estomatitis vesicular, enfermedad transmitida por alimentos, enfermedades causadas por Priones, enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD) y variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vJD), especies de *Coxsackievirus*, enfermedades transmitidas por garrapatas, enfermedades transmitidas por mosquitos, enfermedades transmitidas por murciélagos, enfermedades transmitidas por roedores, enfermedades transmitidas por aves y enfermedades resistentes a los agentes antimicóticos y antimicrobianos.

Además, las formulaciones adyuvantes descritas en el presente documento pueden usarse en combinaciones con antígenos, otros agentes, productos farmacéuticos, proteínas o cualquier otro compuesto o formulación adecuada para la prevención o el tratamiento del cáncer, o para la mitigación de los síntomas y efectos secundarios del cáncer, tales como en el tratamiento de condiciones tales como trastornos y enfermedades autoinmunes, enfermedades que afectan la memoria, incluidas, pero no limitadas a, demencia y enfermedad de Alzheimer, enfermedades que afectan la función motora, enfermedad de Crohn, enfermedades del tracto gastrointestinal y trastornos y enfermedades genéticas. Las formulaciones y composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para la administración de antígenos asociados a tumores para el tratamiento del cáncer y otras neoplasias malignas o la mitigación de síntomas y efectos secundarios asociados con los mismos. Los antígenos de ADN recombinante pueden administrarse con éxito con las formulaciones y composiciones de la invención como una potente formulación de vacuna.

Las composiciones, formulaciones y procedimientos de la invención pueden usarse en la producción de una respuesta inmune o respuestas inmunes en uno o más humanos o animales. Las composiciones y procedimientos pueden usarse en la producción de cantidades de anticuerpos de animales, o de productos de animales (por ejemplo, huevos), o componentes de animales (por ejemplo, sangre, líquido linfático, tejido, células y otros componentes derivados de animales), para su uso en investigación, productos comerciales, ensayos, medicamentos y tratamientos médicos, vacunas y otras áreas de interés. Las composiciones y procedimientos también pueden usarse en la producción de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y antisueros, así como cualquier otro producto deseado de sistemas inmunes o células inmunes.

Las formulaciones adyuvantes de la invención permiten diferentes rutas de administración: Las composiciones y formulaciones de la invención pueden administrarse por una variedad de diferentes rutas de administración que incluyen parenteral (por ejemplo, subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intravenosa (IV)), transdérmica (TD), intrarectal (IR), intranasal (IN), pulmonar, intraocular (IO), intragástrico (IG), intravaginal (IVG), intratratraqueal (IT), sublingual, bucal y/u oral.

Micropartículas y nanopartículas de beta-inulina y acetato de inulina

Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable en una forma adecuada para inyección, o una forma adecuada para administración oral, rectal, vaginal, tópica, nasal, pulmonar u ocular (por ejemplo, una composición farmacéutica). Las composiciones

pueden incluir uno o más agentes activos tales como, por ejemplo, un antígeno de vacunación (que incluye antígenos recombinantes), una secuencia de péptidos antigénicos o una inmunoglobulina.

En realizaciones, se divulga un procedimiento para estimular una respuesta inmune en un sujeto, con el propósito de, por ejemplo, prevenir, tratar o inhibir una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, trastorno de inmunodeficiencia, enfermedad neoplásica, enfermedad degenerativa o enfermedad por envejecimiento, donde el procedimiento incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una formulación descrita en este documento.

En realizaciones, se divulga un procedimiento para mejorar una respuesta inmune en un sujeto, con el propósito de, por ejemplo, prevenir, tratar o inhibir una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, trastorno de inmunodeficiencia, enfermedad neoplásica o enfermedad degenerativa, o enfermedad por envejecimiento, donde el procedimiento incluye administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una formulación descrita en este documento.

El término "sustancialmente purificado", como se usa en el presente documento, debe entenderse que se refiere a una preparación de inulina que está esencialmente libre de otros polisacáridos y/u otros materiales biológicos exógenos (por ejemplo, materiales derivados de microbios o vegetales). Las formulaciones descritas en el presente documento están típicamente purificadas o sustancialmente purificadas. Dichas formulaciones comprenderán no más de aproximadamente el 10 % (en peso) o no más de aproximadamente el 5 % (en peso) de materiales biológicos exógenos, y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, incluidos los bien conocidos procesos de extracción y purificación de agua caliente empleados en la producción comercial de inulina a partir de achicoria (Stephen, A.M. et al. (Eds.), Food Polysaccharides and their Applications, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, FL (2006)).

Las composiciones pueden incluir diversos agentes activos tales como antígenos de vacunación, secuencias de péptidos antigénicos, inmunoglobulinas o combinaciones de las mismas. Alternativamente, o adicionalmente, el agente activo puede ser una linfocina o citocina, un estimulador de timocitos, un estimulador de macrófagos, una endotoxina, una molécula de polinucleótido (por ejemplo, que codifica un agente de vacunación), CpG, o un vector viral recombinante, un microorganismo completo (por ejemplo, un lisado bacteriano), un virus completo (por ejemplo, un virus inactivado o atenuado), o una combinación de los mismos. Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse con virus completo inactivado/atenuado como componente activo. Ejemplos adicionales de agentes que pueden combinarse con las composiciones proporcionadas en el presente documento se proporcionan anteriormente y en todo este documento. Los antígenos de vacunación ventajosos que son adecuados para su inclusión en las composiciones descritas en el presente documento incluyen todas o porciones antigénicas de bacterias, virus, levaduras, hongos, protozoos y otros microorganismos o patógenos de origen humano, animal o vegetal y pólenes y otros alérgenos, incluidos venenos (por ejemplo, venenos de abejas y avispas) y alérgenos inductores de asma como ácaros del polvo doméstico, caspa de gatos o perros.

Los antígenos de vacunación ventajosos adicionales incluyen los proporcionados anteriormente, así como: antígenos virales del virus de la influenza, como la proteína hemaglutinina (por ejemplo, cepas estacionales del virus de la influenza inactivado, antígeno HA recombinante y H1 estacional, H3 B o antígeno pandémico H5) y nucleoproteína de la influenza, antígenos de las proteínas de la cápside externa del rotavirus, antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como la proteína gp120 del VIH, las proteínas de la superficie del virus sincitial respiratorio (VSR), el antígeno E7 del virus del papiloma humano (VPH), el herpes simplex, Virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B (por ejemplo, HBsAg), proteínas de la superficie del virus de la hepatitis C (VHC), virus de la encefalitis japonesa inactivada, proteínas de la superficie del lisavirus (causante de la rabia); y antígenos de microorganismos que incluyen, pero no se limitan a, *Shigella*, *Porphyromonas gingivalis* (por ejemplo, las proteínas proteinasa y adhesina), *Helicobacter pylori* (por ejemplo, ureasa), *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, BCG), *Mycobacterium avium* (por ejemplo, hsp65), *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans* (por ejemplo, Las proteínas de la membrana externa de *C. albicans*), *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, Proteína externa de clase 1), *Bacillus anthracis* (causante del ántrax), *Coxiella burnetii* (causante de la fiebre Q, pero que también puede inducir protección a largo plazo contra la diabetes autoinmune (es decir, diabetes tipo 1) y los protozoos que causan la malaria (como *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*).

Otros antígenos ventajosos son los antígenos de cáncer (es decir, antígenos asociados con uno o más cánceres) tales como: antígeno carcinoembrionario (CEA), mucina-1 (MUC-1), antígeno tumoral epitelial (ETA), productos anormales de p53 y ras, y antígeno asociado a melanoma (MAGE). Otros antígenos ventajosos incluyen alérgenos para tratar alergias mediante inmunoterapia (por ejemplo, polen, ácaros del polvo doméstico, pólenes del pasto, alergias a maní y similares).

Cuando la composición descrita en el presente documento incluye un antígeno de vacunación, la composición también puede incluir un material portador de unión a antígeno tal como, por ejemplo, una o más sales o precipitados metálicos tales como fosfatos de magnesio, calcio o aluminio, sulfatos, hidróxidos o hidratos de los mismos, (por ejemplo, hidróxido de aluminio y/o sulfato de aluminio) y/o una o más proteínas, lípidos, ácidos orgánicos, incluidos polisacáridos sulfatados o fosforilados (por ejemplo, heparina, dextrano o derivados de celulosa), bases orgánicas como quitina (poli N-acetil glucosamina) y derivados desacetilados de los mismos, o derivados de celulosa básicos, y/u otros antígenos. El material portador de unión a antígeno puede incluir partículas poco solubles de dichos materiales (por ejemplo, partículas de gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o un complejo de sal hidratada del mismo).

Ventajosamente, el material portador de unión a antígeno no tiende a agregarse y/o puede tratarse para evitar la agregación. En algunas realizaciones, el material portador de unión a antígeno puede ser gel de hidróxido de aluminio (alumbre), gel de fosfato de aluminio o gel de fosfato de calcio.

5 Cuando la composición descrita en el presente documento incluye un antígeno de vacunación, la composición también puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones y preparaciones del antígeno deben contener al menos el 0,1 % del agente activo (por ejemplo, el antígeno de una (composición de β -In o InAc descrita en el presente documento). El porcentaje del principio activo en las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variar y puede ser convenientemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 60 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %, o de aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %, del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

10 Cuando un material portador de unión a antígeno está presente en una composición, puede estar presente en una forma que está intrínsecamente asociada con el β -In o InAc, como, por ejemplo, los cocristales con dichos materiales. Se pueden preparar cocristales de una forma particulada de β -In o InAc y un material portador de unión a antígeno tal como una sal metálica, por ejemplo:

- (a) preparar una solución de inulina calentando partículas β -In en agua;
- (b) añadir a la solución una cantidad de una o más sales metálicas;
- (c) recristalizar el β -In de dicha solución para proporcionar β -In cocrystalizado con las sales metálicas; y
- (d) aislar cocristales formados de β -In y una o más sales metálicas. La sal metálica puede ser, por ejemplo, un fosfato, sulfato, hidróxido o hidrato de magnesio, hierro, calcio, aluminio o similares.

20 El diámetro de las partículas de β -In en combinación con un material portador de unión a antígeno tal como una sal metálica puede ser de aproximadamente 10 nm a 5 μ m, o de aproximadamente 150 nm a aproximadamente 30 mm. Pueden usarse partículas más grandes (por ejemplo, mayores de aproximadamente 2 μ m de diámetro) en formulaciones tales como geles. Las partículas de β -In en combinación con el material de soporte de unión a antígeno pueden incluir una cantidad relativa (en peso) del material de inulina al material de soporte de unión a antígeno en una relación de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 200:1.

25 En realizaciones se divulga un procedimiento para estimular una respuesta inmune en un sujeto, o potenciar, provocar o disminuir o prevenir una respuesta inmune en un sujeto, con el propósito de, por ejemplo, prevenir, tratar o inhibir una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, trastorno de inmunodeficiencia, enfermedad neoplásica, enfermedad degenerativa o de envejecimiento, en donde el procedimiento incluye administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una formulación descrita en este documento. Las formulaciones proporcionadas en el presente documento, cuando se combinan con antígenos u otros compuestos proporcionados anteriormente, son capaces de crear capacidad inmune en un sujeto, crear reconocimiento inmunitario de antígeno u otro compuesto, así como sensibilizar el sistema inmunitario de un sujeto a un antígeno u otro compuesto.

30 El término "cantidad efectiva" se refiere típicamente a una cantidad no tóxica pero suficiente de la preparación/composición inmunológica para proporcionar el efecto deseado. La cantidad exacta requerida puede variar de un sujeto a otro dependiendo de factores como la especie a tratar, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad del trastorno a tratar, la preparación particular/composición inmunológica administrada y el modo de administración etc. Por lo tanto, no siempre es posible especificar una "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, los expertos en la técnica pueden determinar rutinariamente una "cantidad efectiva" apropiada.

35 Las micropartículas que tienen diámetros de partículas de aproximadamente 2-5 micras, y las nanopartículas que tienen diámetros de partículas de aproximadamente 100-400 nm, pueden prepararse típicamente como se divulgó en los ejemplos de la presente memoria. Sin embargo, los rangos de tamaño para las micropartículas de InAc como se describe en el presente documento pueden ser de aproximadamente 1 μ m a aproximadamente 30 μ m, o de aproximadamente 1,5 μ m a aproximadamente 25 μ m. Los rangos de tamaño para las nanopartículas de InAc como se describe en el presente documento pueden ser de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm, de 15 nm a aproximadamente 950 nm o de 20 nm a aproximadamente 900 nm.

40 Los procedimientos descritos en este documento pueden crear, estimular, provocar, mejorar, aumentar, desarrollar, potenciar o mejorar una respuesta inmune en un sujeto mediante la activación o modulación de la función de células inmunes mononucleares (por ejemplo, monocitos, macrófagos y/o células dendríticas) y/o la ruta del complemento en un sujeto animal humano o no humano, con el propósito de inducir o modular una respuesta inmune. La inducción o modulación de una respuesta inmune puede ser, por ejemplo, para el tratamiento, inhibición o prevención de una infección por una bacteria, micoplasma, hongo, virus, protozoo u otro microorganismo, o de una infestación por un gusano o parásito o cualquiera de los antígenos o patógenos mencionados anteriormente, o para tratar, inhibir o prevenir la inmunopatología inducida por dicha infección; el tratamiento o inhibición de un trastorno inmune tal como una enfermedad alérgica o reumática, una enfermedad autoinmune, una enfermedad de inmunodeficiencia, o trastornos neurológicos, dermatológicos, renales, respiratorios o gastrointestinales relacionados con la disfunción del

sistema inmune; o el tratamiento o inhibición de un tumor o células cancerosas, o la prevención de la eliminación de la agregación de proteínas en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Como tal, también debe entenderse que la invención se extiende a los procedimientos para tratar, inhibir o prevenir el cáncer en un sujeto, en donde los procedimientos incluyen administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación descrita aquí.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención anterior y no deben interpretarse como un alcance limitado. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que los ejemplos sugieren muchas otras formas en que se podría practicar la invención. Debe entenderse que pueden realizarse numerosas variaciones y modificaciones mientras permanecen dentro del ámbito de la invención.

10 Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de inulina

1.1. Preparación de β -inulina (β -In). La β -inulina se preparó a partir de inulina cruda por un procedimiento de precipitación con etanol. La inulina cruda disponible comercialmente obtenida de los tubérculos de dalia (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) Se suspendió en etanol y se dejó reposar durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la β -inulina precipitada se separó después de la centrifugación y se liofilizó. La β -inulina seca se utilizó luego para los estudios adicionales que se describen a continuación.

1.2. Síntesis de acetato de inulina (InAc). Se añadieron dos gramos de β -inulina a 15 ml de dimetilformamida (DMF) para formar una solución y se dejó agitar para completar la solubilización de la β -inulina. Luego se añadieron 25 ml de anhídrido acético y la reacción de acetilación se llevó a cabo a 40 °C durante 24 horas bajo nitrógeno. Se usó acetato de sodio (0,1 %, p/v) como catalizador para la reacción. Después de 24 horas, InAc se precipitó en un gran exceso de agua fría y se recogió después de la filtración. InAc se lavó dos veces más con agua para eliminar cualquier rastro de β -inulina sin reaccionar y se dejó secar durante la noche. El InAc preparado se usó para los estudios adicionales que se describen a continuación.

Ejemplo 2. Preparación de micropartículas cargadas de antígeno

2.1. Preparación de micropartículas de β -inulina cargadas de ovoalbúmina (ova). Las micropartículas de β -inulina se prepararon mediante una única técnica de nanoprecipitación en emulsión (w/o). La β -inulina (100 mg) y ova (10 mg) se disolvieron en 10 ml de tampón de fosfato 10 mM pH 7,4 (fase acuosa). Se usó ova marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en lugar de ova en la preparación de micropartículas para evaluar el perfil de carga y liberación de ova. La fase acuosa se añadió gota a gota en 30 ml de aceite mineral ligero que contenía 1 % p/v de Tween-80 como tensioactivo con agitación continua (1000 rpm) para obtener una emulsión estable de agua en aceite (w/o). La emulsión se agitó durante 4 horas y luego se añadieron gota a gota 30 ml de acetona para precipitar las micropartículas de β -inulina. La emulsión se dejó agitando durante la noche y las micropartículas de β -inulina se recogieron por centrifugación a 3000 g, 30 min a 4°C. Las micropartículas de β -inulina cargadas con ova granuladas se lavaron dos veces con n-hexano, se mantuvieron a -80°C durante 1 hora y se liofilizaron durante 48 horas.

2.2. Preparación de micropartículas de InAc cargadas con ovoalbúmina. Las micropartículas de InAc cargadas con Ova se prepararon mediante una técnica de evaporación de disolvente de emulsión doble (w/o/w). Brevemente, se mezclaron 200 μ l de solución de ova de 50 mg/ml con 50 μ l de solución de Pluronic F-68 (tensioactivo) de 10 mg/ml en tampón de fosfato 10 mM (pH 7,4) como una fase acuosa (W1). Esta fase acuosa se emulsionó con 5 ml de diclorometano (DCM) como una fase oleosa (O) que contenía 100 mg de InAc, dando como resultado la formación de una emulsión primaria (w/o). Esta emulsión primaria se añadió luego gota a gota en otra fase acuosa (W2) (30 ml de agua) que contenía 0,5 % p/v de alcohol polivinílico (PVA) como tensioactivo, con agitación continua (800 rpm) que resultó en la formación de emulsión doble (w/o/w). La agitación continuó durante la noche para la evaporación completa del disolvente orgánico. Luego, se recogieron las micropartículas por centrifugación a 50.000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y las micropartículas de InAc cargadas con ova granuladas se resuspendieron en tampón de citrato 100 mM pH 7,4, se mantuvieron a -80°C durante 1 hora y luego se liofilizaron (VirTis, Gardiner, NY) durante 48 horas.

2.3. Preparación de nanopartículas de InAc cargadas con ovoalbúmina. Las nanopartículas de InAc cargadas con Ova se prepararon mediante una técnica de evaporación de disolvente de emulsión doble (w/o/w). Brevemente, se mezclaron 200 μ l de solución de ova de 50 mg/ml con 50 μ l de solución de Pluronic F-68 (tensioactivo) de 10 mg/ml en tampón de fosfato 10 mM (pH 7,4) como una fase acuosa. Esta fase acuosa se emulsionó con 5 ml de diclorometano (DCM) como una fase oleosa que contenía 100 mg de InAc usando sonicación con sonda durante 20 s a 10 W (Sonics Vibracell, Newtown, CT), lo que resultó en la formación de emulsión primaria (w/o). Esta emulsión primaria se emulsionó luego con otra fase acuosa (30 ml de agua) que contenía alcohol polivinílico (PVA) al 3,0 % p/v como tensioactivo usando sonicación con sonda durante 120 s a 50 W, lo que resultó en la formación de emulsión doble (w/o/w). La emulsión doble se dejó agitando durante la noche (800 rpm) para la evaporación completa del disolvente orgánico. Las nanopartículas de InAc cargadas con ova se recogieron luego por centrifugación a 50.000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y las nanopartículas granuladas

se resuspendieron en tampón de citrato 100 mM pH 7,4, se mantuvieron a -80°C durante 1 hora y luego liofilizado (VirTis, Gardiner, NY) durante 48 horas.

2.4. Tamaño de partícula y carga de ovoalbúmina. Las partículas se dispersaron en tampón de citrato 10 mM (pH 7,4), que se filtró previamente a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm y se diluyó adecuadamente para la medición del tamaño de partícula. El tamaño de partícula se midió mediante un procedimiento dinámico de dispersión de luz utilizando un analizador de tamaño y potencial zeta (Nicomp 360 ZLS, Santa Bárbara, CA). Las micropartículas de β-inulina cargadas con Ova tenían un tamaño de 1,74 µm ± 0,14 y las micropartículas de InAc cargadas con ova tenían un tamaño de aproximadamente 2 µm (Tabla 1).

Para determinar la carga de ova en micropartículas de β-inulina, se disolvió una cantidad conocida de micropartículas de β-inulina cargadas con FITC en una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1 %. El contenido de ova se determinó midiendo los valores de fluorescencia de ova FITC a 490 nm de excitación y 530 nm de emisión. La concentración de ova se calculó a partir de la curva estándar preparada usando micropartículas de β-inulina en blanco enriquecidas con concentraciones conocidas de ova FITC. La carga de ova se reportó como embolsamiento de ova presente por mg de micropartículas de β-inulina (p/p). La carga de ovoalbúmina fue de 75,9 ± 2,7 µg/mg con 75,3 % ± 4 de eficiencia de encapsulación (Tabla 1).

Para determinar la carga de ova en micro o nanopartículas de InAc, se disolvió una cantidad conocida de micro o nanopartículas de InAc cargadas de ova en acetona, y luego la proteína precipitada se extrajo con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1 %. El contenido de ovoalbúmina en el extracto se midió mediante un ensayo de proteína de ácido bicinonínico (BCA). La concentración de ova se calculó a partir de la curva estándar preparada usando micro o nanopartículas de InAc en blanco disueltas en acetona y enriquecidas con concentraciones conocidas de ova, que se extrajeron adicionalmente en solución SDS al 1 % y se analizaron mediante el ensayo de proteína BCA. La carga de ova medida por este procedimiento se reportó como embolsamiento de ovoalbúmina presente por mg de micro o nano partículas InAc (p/p). La carga de ova fue de alrededor de 20,0 ± 5,4 µg/mg (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de micropartículas cargadas con Ova (MP)

Muestra	Partículas	Tamaño	Carga de ova (µg/mg)
1	MP de β-Inulina cargado con ova	1,74 µm ± 0,14	75,9 ± 2,7
2	MP de InAc cargado con ova	2,31 µm ± 0,32	20,0 ± 5,4

En la Tabla 1, los datos representan la media ± desviación estándar (n=3). La carga de ova se refiere a 1 µg de Ova presente por mg de micropartículas de β-inulina o acetato de inulina.

Se prepararon varios tamaños diferentes de partículas. Al variar y optimizar el proceso y los parámetros de formulación; tales como energía de sonicación requerida, tiempo de sonicación, tipo de tensioactivo, concentración de tensioactivo, relación de volumen de fase, cantidad de antígeno y mediante la adición de otros ingredientes, nanopartículas y micropartículas de diferentes tamaños, diferentes cargas y diferentes cantidades de liberación en ráfaga (porcentaje de antígeno liberado en los primeros 30 min) se prepararon. Se pueden preparar nanopartículas de aproximadamente 100 nm a 1000 nm, o aproximadamente 220 nm a 800 nm, usando diversas condiciones modificadas. El tamaño y la polidispersidad de las partículas también pueden controlarse mediante las condiciones modificadas de las micropartículas o la preparación de nanopartículas.

Las micropartículas de InAc se hicieron en ausencia de energía de sonicación y en presencia de una baja concentración de tensioactivos. La concentración de tensioactivo puede depender del tipo de tensioactivo y el tamaño de las micropartículas deseadas. Con 0,5 % de alcohol polivinílico usando aproximadamente 800 r.p.m. velocidad de agitación, el tamaño de las micropartículas de InAc obtenidas fue de aproximadamente 2-3 µm. El tamaño puede variar cambiando el tipo de tensioactivo, la concentración de tensioactivo, la relación de volumen de fase, el tiempo de evaporación del disolvente y la velocidad de agitación.

Se pueden preparar fácilmente partículas de aproximadamente 100 µm a aproximadamente 200 µm con agitación lenta de los componentes (por ejemplo, aproximadamente 60 r.p.m.). El uso de surfactantes puede ayudar a reducir o prevenir la agregación de las partículas formadas. Por consiguiente, se puede usar de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 % de un tensioactivo en peso para preparar las formulaciones. En algunas formulaciones, una cantidad del tensioactivo, como el PVA, puede permanecer en las partículas una vez formadas. Se puede usar un crioprotector (por ejemplo, manitol o trehalosa) para que las partículas se liofilicen.

Al aumentar la concentración de tensioactivo y al proporcionar energía de sonicación para romper las partículas, se pueden generar partículas de InAc en el tamaño nanométrico (200-600 nm). Este rango puede variar según la cantidad de energía de sonicación proporcionada, el tiempo de sonicación, el tipo y la concentración de tensioactivo utilizado, la relación de volumen de fase, el tiempo de evaporación de solvente y la velocidad de agitación de la formulación. Una energía de sonicación más alta (se probó hasta 50 vatios) durante tiempos más largos (se probó hasta 5 minutos)

durante la segunda emulsión produjo tamaños de partículas más pequeños. Entre varios tensioactivos evaluados, el uso de PVA (3 %) resultó en partículas pequeñas, 260 ± 26 nm de diámetro.

Ejemplo 3. Estudios de liberación *in vitro*

5 Las micropartículas de β -inulina cargadas con ova FITC (10 mg) se dispersaron en 1 ml de tampón de fosfato 100 mM (pH 7,4) y se incubaron a 37 °C con agitación a 100 rpm. A intervalos de tiempo predeterminados se sacaron tubos y se centrifugaron a 20.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se tomó una alícuota de 50 μ l de sobrenadante para la medición de las ova FITC liberadas y se reemplazó con un volumen igual de tampón de fosfato fresco. La concentración de ova liberada en el sobrenadante se midió por análisis fluorométrico. Este estudio de liberación *in vitro* indicó que más del 90 % de la ovoalbúmina se liberó en 16 horas (Figura 6).

10 Las micropartículas o nanopartículas InAc cargadas con Ova (10 mg) se dispersaron en 1 ml de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) y se incubaron a 37 °C con agitación a 100 rpm. A intervalos de tiempo predeterminados se tomaron tubos y se centrifugaron a 20.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se tomó una alícuota de 50 μ l de sobrenadante para la medición de las ova liberadas y se reemplazó con un volumen igual de tampón fresco. La concentración de ova en el sobrenadante se midió mediante un ensayo de BCA. Este estudio *in vitro* liberado mostró que los ova liberados se mantuvieron durante más de 20 días (Figura 2). Se tardó más de 20 días en liberar >90 % de las ova cargadas en comparación con 16 horas en caso de β -inulina.

Ejemplo 4. Estudios de inmunización: partículas cargadas con ova como adyuvantes de vacunas y sistemas de administración

20 Las isoformas insolubles de inulina (gamma, delta y épsilon) se han probado como adyuvantes para vacunas. Sin embargo, nunca se ha demostrado que la inulina en su forma soluble en agua, como la forma β -polimórfica, tenga un efecto adyuvante/inmunopotenciador. En los siguientes estudios, se evaluó la capacidad de potenciación inmunológica de las micropartículas y nanopartículas de β -inulina o InAc cargadas de ova. Los siguientes estudios de inmunización se realizaron con ratones Balb/C machos (n=4-5 por grupo, 6-8 semanas de edad).

25 4.1. Estudio de inmunización de micropartículas de β -inulina cargadas con ova. Los ratones se inmunizaron por ruta intradérmica (i.d.) con los siguientes grupos: i) ova (100 embolsamiento por ratón) en solución salina tamponada con fosfato (PBS); ii) mezcla física de ova (100 embolsamiento por ratón) y micropartículas de β -inulina en blanco en PBS; iii) 100 embolsamiento de ova con 200 μ g de alumbre (hidróxido de aluminio) en PBS; y iv) micropartículas de β -inulina cargadas de ova (equivalentes a 100 μ g de ova) en PBS.

30 Las formulaciones de la vacuna se administraron en dos sitios diferentes (50 μ l en cada sitio) a la piel afeitada de la espalda del ratón usando una jeringa estándar desechable de calibre 27/2. Una inflamación cutánea elevada visible se consideró como evidencia de éxito i.d. administración. Según el protocolo de inmunización, los ratones fueron vacunados en el "día 1" con la dosis primaria seguida de una dosis de refuerzo en el "día 21". Se recogieron muestras de sangre en tubos de gel de suero del plexo retro orbitario a las 1ª y 3ª semanas después de las dosis primaria y de refuerzo. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 30 minutos y los sueros se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

35 Los títulos de anticuerpos (IgG-total, IgG-1 e IgG2a) producidos por micropartículas de β -inulina cargadas de ova fueron significativamente mayores (p<0,05) que el grupo de ova adyuvados con alumbre después de la inmunización de refuerzo (Figura 5). Las micropartículas de β -inulina generaron una mayor respuesta inmune de IgG2a que el alumbre (Figura 5C).

40 4.1.1. Captación de antígeno (ova) por las células dendríticas. Las células dendríticas (DC2.4) se incubaron durante 1 h con las ova FITC en solución o se cargaron dentro de micropartículas de β -inulina a 37 °C. Después de 1 h de incubación, las células se lavaron abundantemente, se fijaron en 4 % (p/v) de paraformaldehído y analizaron usando citometría de flujo para determinar la captación de ova FITC por las células DC2.4 (Figura 3 (A)). Se mostraron resultados similares por microscopía de fluorescencia. DAPI muestra la tinción nuclear de las células (Figura 3 (B)).
45 La cuantificación de estos datos se representa en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis citométrico de flujo de la captación de antígeno por las células dendríticas.

S. No.	Grupos de tratamiento	Intensidad de fluorescencia media (conteos)	% de células verdes
1	Sin tratamiento	$4,60 \pm 0,57$	$3,31 \pm 1,61$
2	Ova en solución	$13,18 \pm 1,06$	$22,0 \pm 2,68$
3	Micropartículas de β -Inulina cargadas con ova	$324,16 \pm 22,22^*$	$98,82 \pm 0,71^*$

Las células dendríticas se analizaron por citometría de flujo después de la incubación con ova FITC en solución o dentro de micropartículas de β -inulina. La intensidad de fluorescencia media de ova FITC en el canal verde se representó como unidades de fluorescencia arbitrarias. Se cerraron las células para eliminar la autofluorescencia observada en células dendríticas en blanco. Los datos representan la media \pm de una desviación estándar (n=3) * representa que la varianza es significativa ($p < 0,0001$) en comparación con las ova en el grupo de solución.

4.1.2. Estimulación de los receptores Toll Like (TLR) en las células que presentan antígenos (APC). Además de demostrar las respuestas Th1 y Th2, se seleccionaron varios polímeros para identificar candidatos que estimulan los TLR en las APC. Los TLR son un grupo de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que, cuando son activados por patógenos a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), secretan/liberan varias citocinas que impulsan la respuesta inmune hacia los tipos Th1 y Th2. La activación de TLR (excepto para TLR3) requiere una molécula adaptadora llamada MyD88 Mal para liberar citocinas como TNF- α .

4.1.2.1. El acetato de inulina (InAc) es un agonista de TLR-4. Se incubaron células de macrófagos de ratón de tipo silvestre y células Mal/MyD88^{-/-} (1×10^5 células/pocillo) con diferentes formulaciones durante 12 horas. Posteriormente, las concentraciones de TNF- α en el sobrenadante del cultivo se midieron por ELISA (véase la Figura 4(A)). InAc estimuló la liberación de la citocina TNF- α de los macrófagos My88, pero no pudo estimular la liberación de TNF- α de los macrófagos que carecen de Mal y My88. Las células HEK, que se transfectaron de manera estable con el receptor TLR4 (1×10^5 células/pocillo), se incubaron con diferentes formulaciones: solo medios, micropartículas InAc (250 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml) y Zymosan (1 μ g/ml). Los sobrenadantes celulares se analizaron para la secreción de IL-8 por ELISA en pocillos por triplicado después de 16 h de estimulación (véase la Figura 4(B)).

Como se puede ver en estos datos, InAc estimula las células de presentación de antígeno (APC) para liberar citocinas (Figura 4(A)). Además, parece que InAc activa los APC a través de los TLR, especialmente a través de la activación de receptores TLR4 (Figura 4(B)). Las micropartículas de InAc dieron como resultado una secreción de TNF- α significativamente mejorada de las células regulares de macrófagos (proteína adaptadora MyD88 expresada). Esta secreción se abolió cuando la proteína adaptadora de TLR MyD88 se eliminó de las mismas células (Figura 4(A)). Esto sugiere claramente que InAc activa las células inmunes con la ayuda de TLR. Hay múltiples receptores TLR. Se descubrió que InAc interactúa con TLR-4 específicamente. (Figura 4(B)). Esta es la primera vez que se ha demostrado que InAc activa el sistema inmune innato al interactuar con TLR-4. Ni la β -inulina soluble ni la isoforma γ podrían activar los TLR. Se sabe que la inulina γ activa el sistema inmune a través de la ruta alternativa del complemento (ACP). El ensayo de activación de ACP mide la lisis de glóbulos rojos de conejo (RBC) en la activación de la APC presente en sueros humanos normales. Como se muestra aquí, ni β -inulina ni micro o nanopartículas de InAc podrían activar ACP. Sin embargo, como se muestra en el presente documento, la γ -inulina y el Zymosan activaron ACP (ver Figura 6).

En base a estos datos, la β -inulina/InAc (micro o nanopartículas) puede estar funcionando a través de un mecanismo diferente al de la γ -inulina al funcionar como adyuvantes para activar una respuesta inmune. Además, mediante el uso del agonista TLR-4 (InAc), se ha identificado y probado un sistema de suministro de vacunas en partículas (nano/micro), donde el sistema tiene la capacidad de estimular un sistema inmune animal (por ejemplo, un ratón). Un hallazgo importante es que el polímero utilizado para hacer el sistema de entrega es en sí mismo un agonista de TLR. El sistema de entrega no necesita la adición de otros PAMPS para mejorar la respuesta inmune. Para el sistema inmune, los sistemas de suministro de partículas basados en InAc son similares a los patógenos en la forma en que son particulados, consisten en una superficie hidrófoba basada en polisacáridos, se pueden usar para encapsular múltiples antígenos y activar APC (sistema inmune innato) a través de TLR al proporcionar señalización PAMP.

4.2. Los resultados de este estudio mostraron que las micropartículas de β -inulina cargadas con ova liberaron el antígeno encapsulado (ovoalbúmina) en 16 horas y generaron títulos de anticuerpos significativamente más altos (IgG-total e IgG-1) que el alumbre aprobado por la FDA.

En el siguiente estudio, se utilizó el derivado de inulina β -inulina insoluble en agua (InAc). El objetivo de este estudio fue mantener aún más la liberación de antígeno durante períodos prolongados de tiempo encapsulando el antígeno en micropartículas de InAc y evaluar su capacidad de potenciación inmunológica y usar InAc como un nuevo agonista de TLR4 para estimular respuestas inmunes humorales y celulares. Se necesita una respuesta humoral para eliminar los patógenos extracelulares y una respuesta celular para los patógenos intracelulares.

En la estructura de InAc, los grupos hidroxilo de β -inulina están sustituidos por grupos acetilo. La desaparición de la banda de estiramiento OH de β -inulina ($\sim 3326 \text{ cm}^{-1}$) y la aparición de una banda de carbonilo (C=O $\sim 1743 \text{ cm}^{-1}$) en el espectro FTIR de InAc confirma la síntesis del éster de acetato InAc de β -inulina (figura 6). Además de la banda de carbonilo, el acetato de inulina también se caracteriza por la aparición de una banda de acetato C-O ($\sim 1224 \text{ cm}^{-1}$) y una banda $-\text{CH}_3$ ($\sim 1369 \text{ cm}^{-1}$). Los ratones (n = 4-5 por grupo) se inyectaron por ruta intradérmica (i.d.) con los siguientes grupos: i) ova (100 embolsamiento por ratón) en solución salina tamponada con fosfato (PBS); ii) mezcla física de ova (100 μ g por ratón) y micropartículas de InAc en blanco en PBS; iii) 100 μ g de ova con 200 μ g de alumbre (hidróxido de aluminio) en PBS; y iv) micropartículas de InAc cargadas de ova (equivalentes a 100 μ g de ova) en PBS, en los días 1 y 21 como inmunización primaria y de refuerzo. Se recogieron sueros a las 1 y 3 semanas después de

las inmunizaciones primaria y de refuerzo para el análisis de títulos de IgG usando ELISA indirecto. El resto del protocolo de inmunización utilizado fue el mismo que se describe en la sección 4.1.

Las micropartículas de InAc cargadas con ova generaron una respuesta de anticuerpos significativamente mayor ($p < 0,001$) que los ova unidos al alumbre (IgG total, 12-87 veces; IgG1, 25-60 veces; IgG2a, 7-1000 veces). La figura 7 representa títulos de anticuerpos IgG-Total, IgG-1 e IgG-2a específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Lo más interesante es que las micropartículas de InAc generaron ambos tipos de respuesta inmune Th1 (IgG-2a) y Th2 (IgG-1), que es necesaria en las vacunas modernas. La encapsulación de ova en micropartículas de InAc dio como resultado una respuesta inmune mejorada. Cuando los ova simplemente se coinyectaron con micropartículas o nanopartículas de InAc en blanco, no se observó una mejora de la respuesta inmune contra los ova. Sin embargo, la gamma-inulina de la técnica anterior u otras formas de inulina insolubles en agua, cuando se coinyectan como un adyuvante con un antígeno, proporcionan una respuesta inmune mejorada, pero la coinyección con beta-inulina o acetato de inulina no proporciona una respuesta inmune mejorada.

4.3. Estudio de inmunización de micro o nano partículas InAc cargadas con Ova: evaluación como adyuvantes de vacunas y sistemas de administración. Este estudio se realizó para evaluar el efecto del tamaño de partícula (micro vs. nano) de las partículas de InAc y la dosis (100, 10 o 1 μg) de un antígeno (ovoalbúmina) utilizado en la generación de una respuesta inmune. Se prepararon formulaciones con diferentes tamaños de partículas y diferentes cargas de ova. Se realizaron estudios de optimización utilizando un enfoque de diseño factorial donde se variaron los siguientes parámetros de formulación y proceso.

1) Cantidad de antígeno (ova) utilizada durante la primera etapa de emulsificación de la preparación de micropartículas o nanopartículas de InAc. La carga de ova ($\mu\text{g}/\text{mg}$) se incrementó de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$, al aumentar la cantidad de ova (500 μg a 20 mg por 100 mg de polímero) utilizados durante la preparación de partículas. Sin embargo, la liberación en ráfaga también aumentó a una mayor carga de ova (50 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

2) Al aumentar el volumen de la segunda fase acuosa a 45 ml en la preparación de las micropartículas y nanopartículas de InAc, la liberación en ráfaga se restringió a aproximadamente el 20 %.

3) Para reducir el tamaño de las partículas de InAc, se usó energía de sonicación. Los parámetros del proceso, incluidos el tiempo y la energía de la sonicación, se optimizaron para proporcionar un rango de tamaño nanométrico de las partículas (aproximadamente 100-600 nm) con la carga deseada (por ejemplo, 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para partículas InAc y aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para partículas de β -inulina) y liberación en ráfaga restringida (menos de aproximadamente 30 %, o menos de aproximadamente 20 %, en los primeros 30 minutos después de la administración).

Al optimizar estos tres parámetros, se pueden preparar con éxito las formulaciones deseadas con varios tamaños (aproximadamente 100 nm-1000 nm para nanopartículas; y aproximadamente 1 μm -30 μm para micropartículas) y la carga se puede preparar exitosamente.

Para estudiar el efecto del tamaño de partícula en la respuesta inmune estimulada, los ratones se inmunizaron con micropartículas de InAc cargadas con ova (tamaño aproximado: 2 μm) o nanopartículas (tamaño aproximado: 250 nm) con dosis variadas de ova. Los ratones se inmunizaron por ruta subcutánea (s.c.) con los siguientes grupos: i) ova (100, 10 o 1 μg por ratón) en PBS; ii) ova (100, 10 o 1 μg por ratón) con 100 μm de emulsión CFA; y iii) partículas de micro o nano InAc cargadas de ova (equivalentes a 100, 10 o 1 μg de ova) en PBS. El resto del protocolo de inmunización fue el mismo que se describe en la sección 4.1.

La figura 11 muestra el efecto del tamaño de las partículas de acetato de inulina en la generación de títulos totales de IgG específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones ($n = 4-5$ por grupo) fueron inyectados por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 μg) solos o junto con CFA o cargados en micro o nanopartículas InAc en los días 1 y 21 como inmunización primaria y de refuerzo. Se recogieron sueros a las 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primaria y de refuerzo para el análisis de títulos totales de IgG usando ELISA indirecto. Se usó CFA como control positivo (adyuvante más fuerte).

La figura 12 muestra el efecto del tamaño de las partículas de acetato de inulina en la generación de títulos de IgG-1 específicos para ova séricos en suero de ratones inmunizados. Los ratones ($n = 4-5$ por grupo) fueron inyectados por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 μg) solos o junto con CFA o cargados en micro o nanopartículas InAc en los días 1 y 21. Se recogieron sueros a las 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primaria y de refuerzo para el análisis de títulos de IgG-1 usando ELISA indirecto.

La figura 13 muestra el efecto del tamaño de las partículas de acetato de inulina en la generación de títulos de IgG-2a específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones ($n = 4-5$ por grupo) fueron inyectados por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 μg) solos o junto con CFA o cargados en micro o nanopartículas InAc en los días 1 y 21. Se recolectaron sueros a las 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primaria y de refuerzo para el análisis de títulos de IgG-2a usando ELISA indirecto.

Las micropartículas de InAc produjeron títulos de anticuerpos más altos que las nanopartículas a dosis de 100 y 10 embolsamiento de ova y los niveles de anticuerpos fueron incluso más altos que el grupo adyuvante de CFA de control

positivo. Sin embargo, las nanopartículas produjeron títulos de anticuerpos más altos que las micropartículas a una dosis de 1 µg de antígeno (Figuras 11, 12 y 13). Estos datos indican que las micropartículas de InAc son más potentes que el CFA en la generación de respuesta inmune a una dosis de 10 y 100 µg de un antígeno.

5 Para estudiar el efecto de la dosis de un antígeno, los ratones fueron inmunizados con 100, 10 o 1 µg de ovoalbúmina cargados en micro o nanopartículas de InAc. La figura 14 muestra el efecto de la cantidad de un antígeno cargado en micropartículas de InAc sobre la generación de títulos de IgG específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) fueron inyectados por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 µg) solos o junto con CFA o cargados en micropartículas de InAc en los días 1 y 21. Se recolectaron sueros a las 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primaria y de refuerzo para el análisis de los títulos de IgG-total, IgG-1 e IgG-2a usando ELISA indirecto.

10 La figura 15 muestra el efecto de la cantidad de un antígeno cargado en nanopartículas de InAc sobre la generación de títulos de IgG específicos de ova en suero de ratones inmunizados. Los ratones (n = 4-5 por grupo) fueron inyectados por ruta subcutánea con ova (100, 10 o 1 µg) solos o junto con CFA o cargados en nanopartículas de InAc en los días 1 y 21. Se recolectaron sueros a las 1 y 3 semanas después de las inmunizaciones primaria y de refuerzo para el análisis de los títulos de IgG-total, IgG-1 e IgG-2a usando ELISA indirecto.

15 Las micropartículas de InAc cargadas con Ova mostraron que la respuesta inmune depende de la dosis de ova con los títulos de anticuerpos más altos a 100 µg de un antígeno seguido de una dosis de 10 µg y 1 µg (Figura 14). Las nanopartículas de InAc cargadas con ova también generaron títulos de anticuerpos más fuertes a 100 µg de un antígeno en comparación con 10 µg y 1 µg de un antígeno, pero no se encontraron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos a 10 µg y 1 µg de una dosis de antígeno (Figura 15).

20 4.4. Detección de anticuerpos anti-ova utilizando el ensayo inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA). Los sueros de los ratones inmunizados se analizaron para detectar la presencia de anticuerpos (IgG total, IgG1 e IgG2a) generados contra las ova mediante un procedimiento de ensayo ELISA indirecto. Brevemente, las placas ELISA de 96 pocillos se revistieron con ova (1 µg/pocillo) en tampón de carbonato a pH 9,6 y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con solución de lavado (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, Tween 20 al 0,05 %, pH 8), y luego bloqueado con 200 µl de solución de bloqueo (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, BSA al 1 %, pH 8) durante 30 minutos a temperatura ambiente (-23°C). Después de lavar las placas con tampón de lavado, los pocillos en placas se incubaron con diferentes diluciones de sueros de prueba (100 µl) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y posteriormente se incubaron con 100 µl de anticuerpos anti-ratón de cabra conjugados con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron y se incubaron con 100 µl de solución de sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) durante 5 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color. La reacción se detuvo usando H₂SO₄ 2 M y se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm. Los resultados se expresaron como títulos de inmunoglobulina G (IgG) en suero, que se definen como la dilución de suero final recíproca en la cual la DO es más que la DO promedio más dos desviaciones estándar del control PBS.

25 35 4.5. Ensayo de proliferación de esplenocitos. La obtención de respuestas de memoria es esencial para que las vacunas confieran protección duradera. Para evaluar la generación de una respuesta de memoria, tres semanas después de la inmunización de refuerzo, se prepararon esplenocitos a partir de los bazo de ratones.

40 El día 21 después de la inmunización de refuerzo, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los bazo. La suspensión de células individuales de los esplenocitos se preparó en medio RPMI completo (medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal inactivo (FBS) al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 %, piruvato de sodio 1 mM y 2-mercaptoetanol 50 µM). La suspensión celular se centrifugó a 700 g a 25 °C durante 5 min. Después de desechar el sobrenadante, los RBC se lisaron usando NH₄Cl 100 mM. Los esplenocitos se resuspendieron en medio RPMI completo y se contaron las células mediante exclusión con azul tripano usando un Cellometer (nexcelom Bioscience, Lawrence, Massachusetts). Los esplenocitos (10⁶ células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron con 200 µl de medio RPMI 1640 completo solamente, que contenía ovoalbúmina (100 µg/ml) o concanavalina A (2,5 µg/ml). Después de 72 horas de incubación, se retiró el sobrenadante y se guardó para el análisis de citocinas. Las células se incubaron con 50 µl de solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-,5-difenil-tetrazolio (MTT) (0,5 mg/ml) durante 4 horas. Al final, las placas se incubaron con 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a 37 °C durante 10 minutos. Luego, las placas se leyeron a 540 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis. El índice de estimulación (SI) se calculó dividiendo los valores de absorbancia de las células tratadas con Concanavalina A u ova con los valores de absorbancia de las células tratadas con RPMI.

50 Los datos indican que las células T de memoria que reconocen los ova durante las exposiciones consiguientes se generaron en un número significativamente mayor en ratones tratados con micropartículas de InAc cargadas con ova (Figura 8). El mitógeno Concanavalina A (ConA) sirvió como control positivo y mejoró el índice de estimulación (S.I.) de manera no específica en todos los grupos.

55 4.6. Análisis de citocinas: mediciones de citocinas Th1 (IFN-γ y IL-2) y TH2 (IL-4 e IL-10). Para evaluar si las micropartículas de InAc cargadas con ova inducen respuestas inmunes preferentemente humorales (Th2) o mediadas por células (Th1), la presencia de citocinas Th1 secretadas (IL-2 IFNγ) y citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos se examinaron después de la reestimulación con ova.

Los esplenocitos se prepararon a partir de ratones inmunizados con ova solo, ova con alumbre o micropartículas de InAc cargadas con ova y se cultivaron durante 72 horas en presencia de ova (100 μ /ml). Después de 72 horas, se recolectó el sobrenadante de diferentes grupos de tratamiento y se midió la concentración de diferentes citocinas usando ELISA sándwich. Ver figura 9). El asterisco (*) indica que los valores son significativamente más altos en comparación con el grupo inmunizado de ova ($P < 0,001$) usando la prueba t de Student.

En apoyo de los datos de respuesta de anticuerpos (niveles altos de IgG-1 e IgG-2a), se observaron niveles altos de ambos tipos de citocinas (Th1 y Th2) en los sobrenadantes de esplenocitos de ratones inmunizados con las micropartículas de InAc cargadas de ova (Figura 9).

4.7. Respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). Las respuestas DTH se midieron inyectando 5 μ g de ova en la almohadilla plantar izquierda y un volumen igual de PBS en la almohadilla plantar derecha de cada ratón inmunizado. El grado de hinchazón de la almohadilla plantar después de 24 horas de los tratamientos se midió restando el grosor de la almohadilla plantar derecha de la almohadilla plantar izquierda. Los datos en la figura 10 representan el grado medio de hinchazón + desviación estándar de 3-4 ratones inmunizados de cada grupo. El asterisco (*) indica valores que son estadísticamente significativos en comparación con el grupo inmunizado de ova ($P < 0,001$) utilizando la prueba t de Student.

El análisis de la respuesta DTH confirmó aún más la generatoína de un tipo Th1 de respuesta inmune. Los ratones inmunizados con micropartículas de InAc cargadas con ova generaron una respuesta DTH significativamente mayor ($p < 0,001$) que los ratones inmunizados con ova (Figura 10). Estos resultados respaldan aún más un tipo Th1 de respuesta inmune inducida por micropartículas de InAc cargadas de ova.

4.8. Ensayo de activación de la ruta alternativa del complemento (APC). Se ha demostrado que el polimorfo insoluble de la inulina (gamma-inulina) actúa como un adyuvante de vacuna activando APC (Silva et al., Immunol. Cell Biol. (2004) 82, 611-616). Sin embargo, nunca se ha demostrado que la β -inulina actúe como adyuvante de la vacuna/potenciador inmunitario. El potencial de las partículas de β -inulina, las micropartículas de InAc y las nanopartículas de InAc para activar APC se evaluó como se describe a continuación.

El suero humano causa la lisis de los RBC de conejo y, por lo tanto, se usaron sueros humanos y glóbulos rojos de conejo (RBC) para un ensayo de activación de APC. Los RBC de conejo se lavaron usando tampón APC (tampón de gelatina veronal (tampón GVB) + ácido etilenglicol tetraacético 5 mM (EGTA)). Para el ensayo de activación de APC, se diluyeron 100 μ l de suero humano que contenía 1 mg/ml de inulina, β -inulina, gamma-inulina, Zymosan (control positivo para la activación de APC), micropartículas de InAc y nanopartículas de InAc con 400 μ l de tampón GVB, incubado a 37°C durante 30 min y centrifugado. El sobrenadante se incubó con 500 μ l de glóbulos rojos (1×10^8 células/ml) a 37 °C durante 45 minutos, y luego O.D. Se observó un valor a 700 nm. El porcentaje de lisis de RBC se calculó considerando la lisis de RBC con suero humano no tratado como 100 %. Los datos se reportaron como % 10 de RBC lisados. El suero humano diluido en tampón GVB tras la incubación con RBC dio como resultado una lisis de 100 % de RBC. Zymosan activa APC y, por lo tanto, inhibe la lisis de los RBC del conejo.

El ensayo de activación de APC mide la lisis de los RBC de conejo (RBC) en la activación de la ruta alternativa del complemento presente en el suero humano normal. Los datos mostrados en la figura 16 indica que la β -inulina, las micropartículas de InAc y las nanopartículas de InAc no activaron APC, a diferencia de la gamma-inulina y el Zymosan. Por consiguiente, la β -inulina, las micropartículas de InAc y las nanopartículas de InAc funcionan por mecanismos diferentes que la gamma-inulina.

Ejemplo 5. Seguridad

El tejido del ratón se analizó mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E) después de la inmunización con diversos sistemas adyuvantes (nanopartículas InAc, micropartículas InAc y adyuvante completo de Freud (CFA)). Se desarrollaron imágenes para los sitios de inyección 21 días después de la administración de la vacuna. La inyección subcutánea de micropartículas de InAc (2-4 micras de diámetro) formó un depósito local en el sitio de inyección similar al alumbre o CFA y mantuvo la liberación de antígeno durante >20 días. Sin embargo, las nanopartículas de InAc (diámetro medio 200-300 nm) se eliminaron del sitio de inyección y probablemente se dirigieron al sistema linfático. En cualquier caso, no se observó inflamación, daño tisular o formación de abscesos (figura 17 (A)).

La actividad adyuvante fuerte a menudo se asocia con toxicidad. Por ejemplo, el adyuvante de vacuna aprobado por la FDA, alumbre, también causa dolor, inflamación, linfadenopatía, necrosis y granuloma en el sitio de inyección. La seguridad de la formulación de la vacuna se analizó determinando el daño estructural bruto en el sitio de inyección en la piel del ratón.

Puede observarse una clara diferencia entre el tratamiento con CFA y las micropartículas de InAc. Los sitios tratados con micropartículas de InAc cargadas con ova tienen un número muy alto de células inmunitarias infiltrantes y poco o ningún daño tisular en el sitio de inyección en comparación con el tratamiento con CFA. Como se esperaba, la inyección de CFA resultó en una necrosis tisular severa (mostrada por flechas negras) en el sitio de inyección. En contraste, las micropartículas de InAc no causaron ninguna toxicidad importante en el sitio de inyección. Se encontró que el número de células inmunitarias infiltrantes (mostradas con flechas blancas) en los sitios de inyección era mayor con las micropartículas de InAc en comparación con el tratamiento con CFA. Nuevamente, estos datos sugieren

claramente que las micropartículas de InAc no solo son potentes adyuvantes de vacuna, sino que también muestran un buen perfil de seguridad.

Ejemplo 6. Formas de dosificación farmacéutica

- 5 Las siguientes formulaciones ilustran formas de dosificación farmacéuticas representativas que pueden usarse para la administración terapéutica o profiláctica de una composición de β -inulina o InAc descrita en este documento, una composición de β -inulina o InAc específicamente divulgada en este documento, o una composición de β -inulina o InAc en combinación con otros componentes descritos en este documento (en adelante denominados con "Composición X"):

(i) Comprimido 1	mg/comprimido
"Composición X"	100,0
Lactosa	77,5
Povidona	15,0
Croscarmelosa sódica	12,0
Celulosa microcristalina	92,5
Estearato de magnesio	3,0
	300,0

(ii) Comprimido 2	mg/ comprimido
"Composición X"	20,0
Celulosa microcristalina	410,0
Almidón	50,0
Glicolato de almidón sódico	15,0
Estearato de magnesio	5,0
	500,0

(iii) Cápsula	mg/cápsula
"Composición X"	10,0
Dioxido de silicio coloidal	1,5
Lactosa	465,5
Almidón pegelatinizado	120,0
Estearato de magnesio	3,0
	600,0

(iv) Inyección 1 (1 mg/ml)	g/ml
"Composición X" (forma ácida libre)	1,0
Fosfato de sodio dibásico	2,0
Fosfato de sodio monobásico	0,7
Cloruro de sodio	4,5
Solución de hidróxido de sodio 1,0 n (ajuste de pH a 7,0-7,5)	c.s.
Agua para inyección	c.s. ad 1 ml

(v) Inyección 2 (10mg/ml)	mg/ml
"Composición X" forma ácida libre	10,0
Fosfato de sodio monobásico	0,3
Fosfato de sodio dibásico	1,1
Polietilenglicol 400	200,0
Solución de hidróxido de sodio 0,1 n (ajuste de pH a 7,0-7,5)	c.s.
Agua para inyección	c.s. ad 1 ml

(vi) Aerosol	mg/bote
"Composición X"	20
Ácido leico	10
Tricolomonofluorometano	5.000
Diclorodifluorometano	10.000
Diclorotetrafluoroetano	5.000

10

15

(vii) Gel tópico 1	Peso %
"Composición X"	5 %
Carbómero 934	1,25 %
Trietanolamina	c.s.
Ajuste de pH a 5-7	0,2 %
Metil parabeno	c.s. a 100g
Agua purificada	

(viii) Gel tópico 2	Peso %
"Composición X"	5 %
Metilcelulosa	2 %
Metilparabeno	0,2 %
Propilparabeno	0,02 %
Agua purificada	c.s. a 100g

(ix) Ungüento tópico	Peso %
"Composición X"	5 %
Propilenglicol	1 %
Base de ungüento anhidro	40 %
Polisorbato 80	2 %
Metilparabeno	0,2 %
Agua purificada	c.s. a 100g

(x) Crema tópica 1	Peso %
"Composición X"	5 %
Cera de abejas blanca	10 %
Parafina líquida	30 %
Alcohol bencílico	5 %
Agua purificada	c.s. a 100g

(xi) Crema tópica 2	Peso %
"Composición X"	5 %
Acido esteárico	10 %
Glicerilmonoestearato	3 %
Polioxietilenoestearileter	3 %

(xi) Crema tópica 2	Peso %
Sorbitol	5 %
Isopropilpalmitato	2 %
Metilparabeno	0,2 %
Agua purificada	c.s. a 100g

Estas formulaciones pueden prepararse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica farmacéutica. Se apreciará que las composiciones farmacéuticas anteriores se pueden variar de acuerdo con técnicas farmacéuticas bien conocidas para acomodar diferentes cantidades y tipos de ingrediente activo "Composición X". La formulación de aerosol (vi) se puede usar junto con un dispensador de aerosol de dosis medida estándar. Además, los ingredientes y proporciones específicos son para fines ilustrativos. Los ingredientes pueden cambiarse por equivalentes adecuados y las proporciones pueden variar, de acuerdo con las propiedades deseadas de la forma de dosificación de interés.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende micropartículas o nanopartículas de acetato de inulina (InAc) y una molécula de carga, en la que la molécula de carga está encapsulada dentro de las partículas, en la que la composición es producida por una doble emulsión de agua/aceite/agua y dicha composición exhibe una liberación en ráfaga de menos del 30 % en peso en 30 minutos.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la molécula de carga está contenida dentro de nanopartículas individuales.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, que comprende además uno o más moduladores inmunes, en la que el uno o más moduladores inmunes son linfocinas, citocinas, estimuladores de timocitos, estimuladores de monocitos o macrófagos, endotoxinas, o una combinación de los mismos, y en la que la molécula de carga comprende un antígeno, ADN, ARN, un péptido antigénico, o secuencia antigénica, un inmunógeno o una inmunoglobulina o en la que la molécula de carga comprende un lisado de una célula bacteriana o patógeno viral, célula cancerosa u otro componente biológico que estimula una respuesta inmune contra un patógeno o enfermedad.
- 15 4. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además una cantidad eficaz de una segunda molécula de carga encapsulada o asociada con las partículas.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que la molécula de carga está contenida dentro de micropartículas individuales para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, enfermedad genética, alergia, diabetes, trastorno de inmunodeficiencia, enfermedad neoplásica o enfermedad degenerativa.
- 20 6. Una composición que comprende micropartículas o nanopartículas de acetato de inulina (InAc) y una molécula de carga para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune, enfermedad genética, alergia, diabetes, trastorno de inmunodeficiencia, enfermedad neoplásica o enfermedad degenerativa, en donde la molécula de carga está contenida dentro de micropartículas o nanopartículas individuales y en la que dichas micropartículas o nanopartículas se preparan mediante una doble emulsión de agua/aceite/agua.
- 25 7. La composición de la reivindicación 6, en la que la molécula de carga está contenida dentro de nanopartículas individuales.
8. La composición de la reivindicación 6 o 7, en la que la composición induce una respuesta inmunogénica en un sujeto a través de TLR.

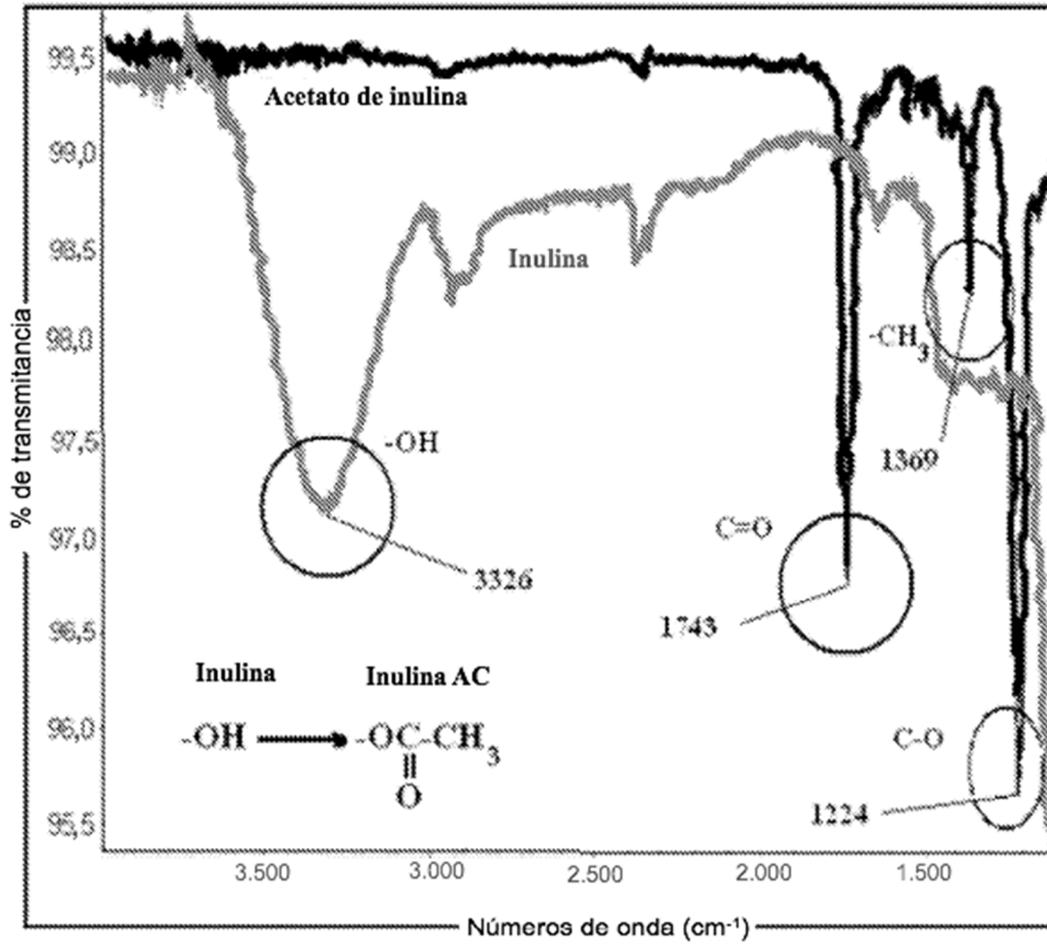


FIG. 1

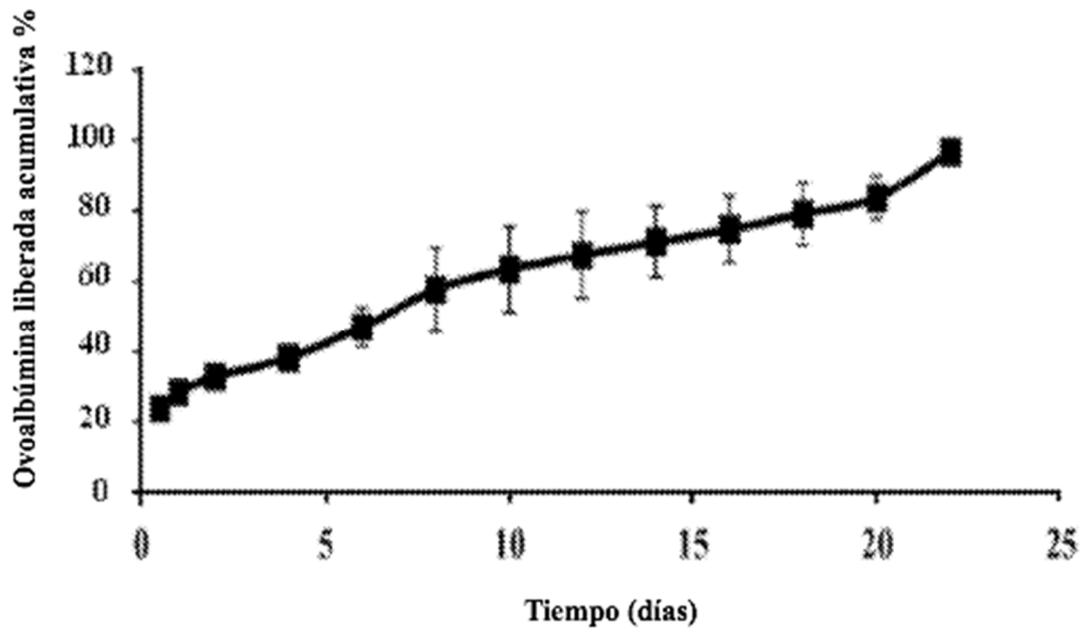
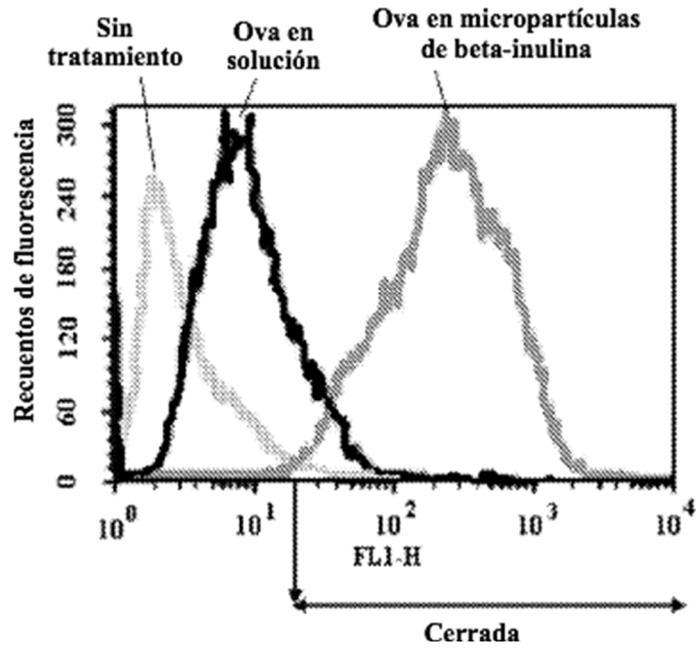


FIG. 2

A)



B)

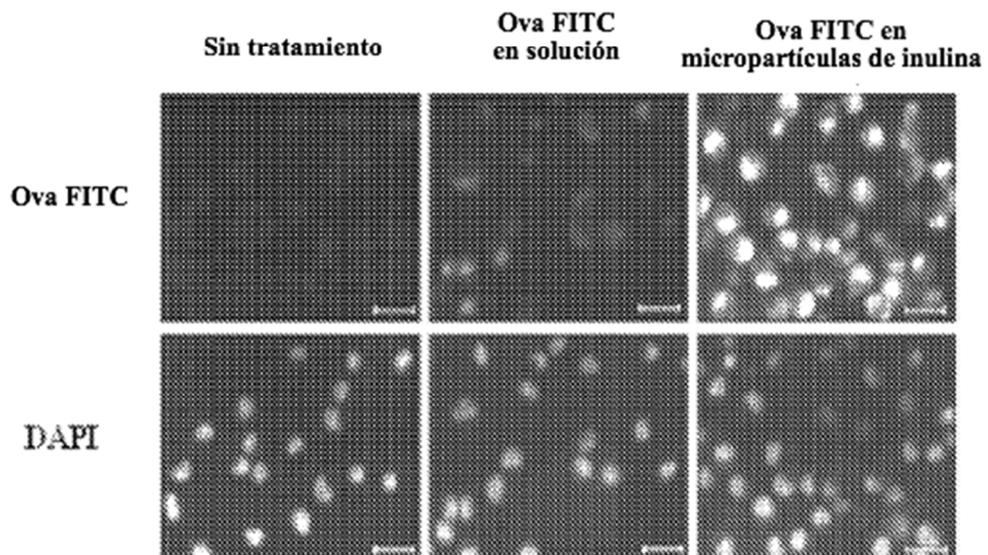
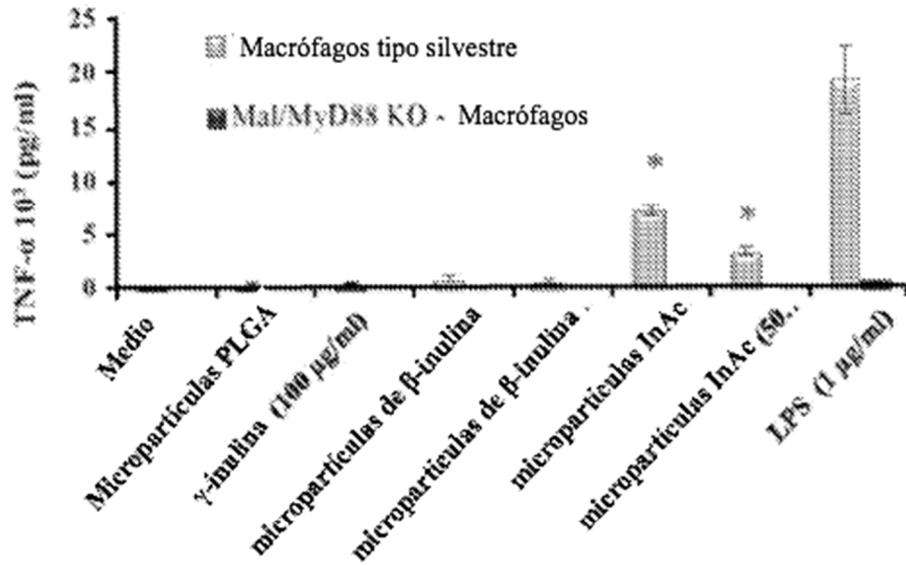


FIG. 3

A)



B)

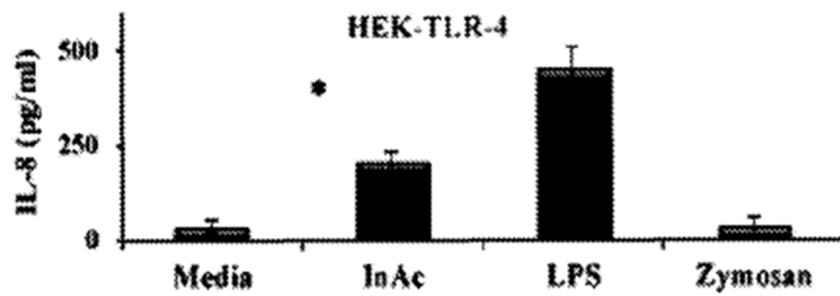
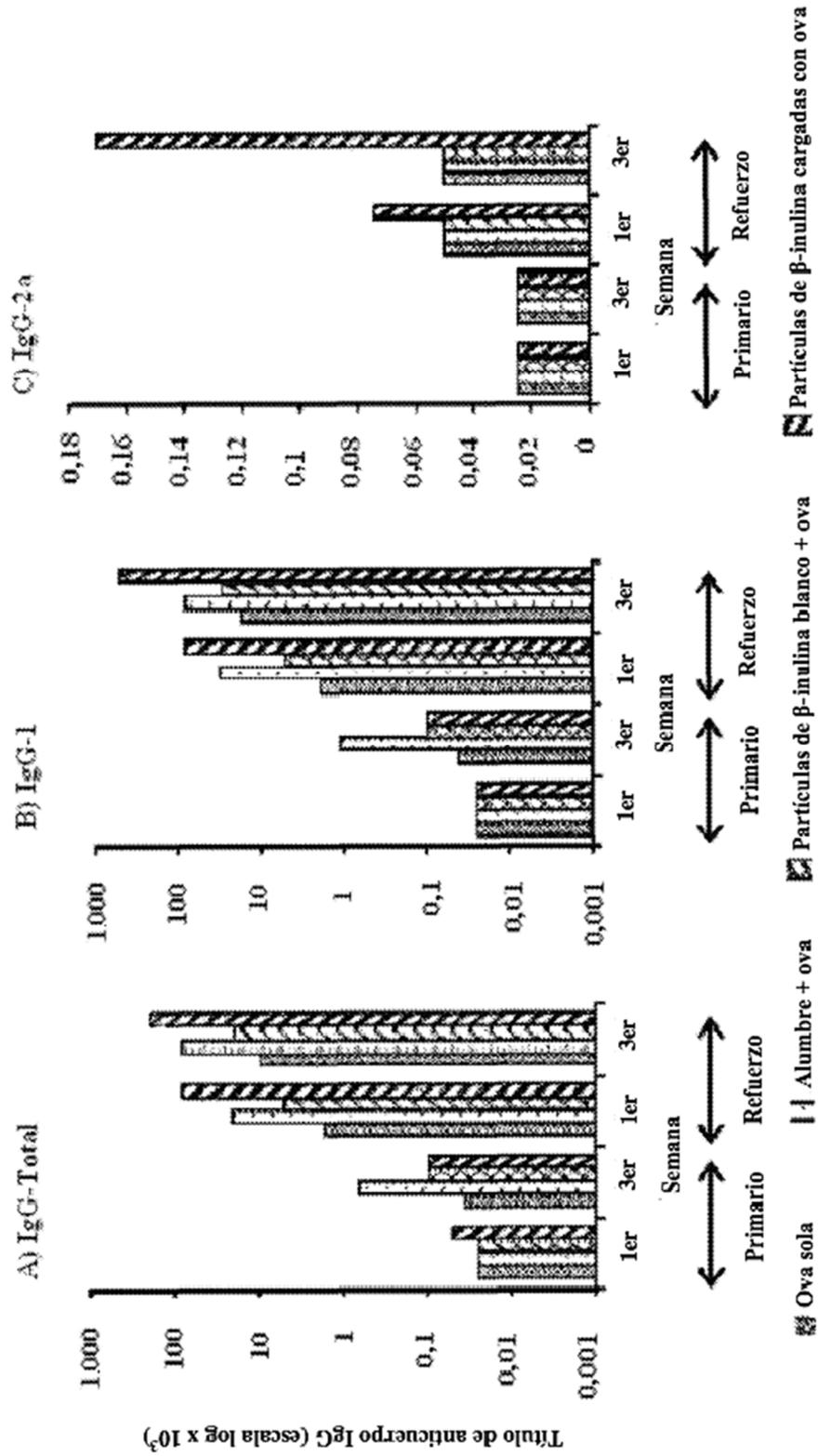


FIG. 4



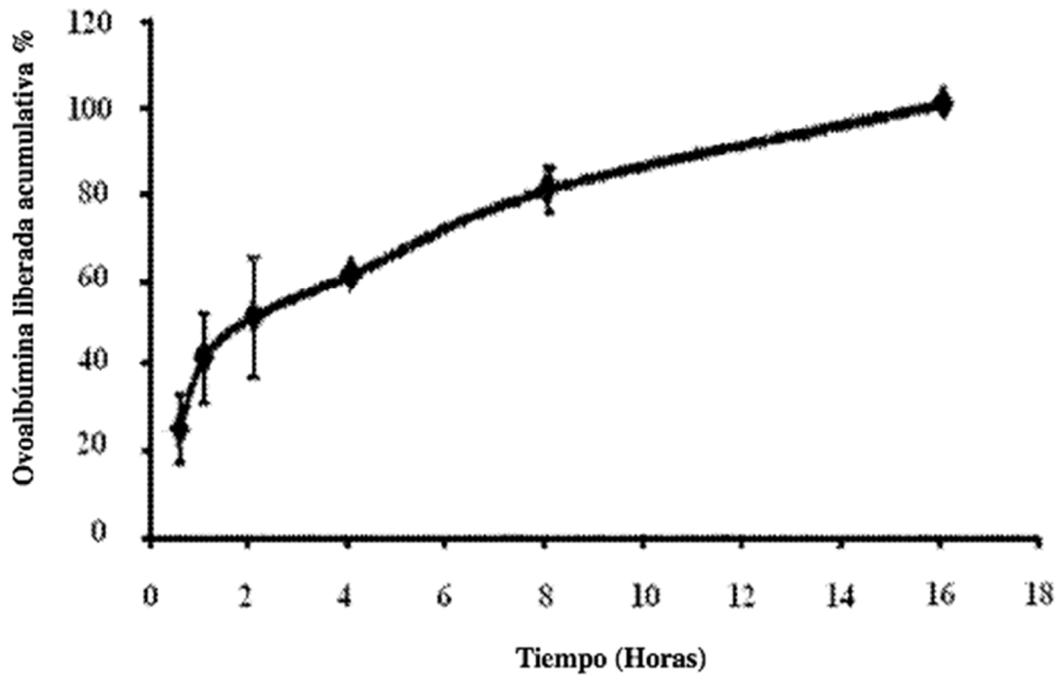


FIG. 6

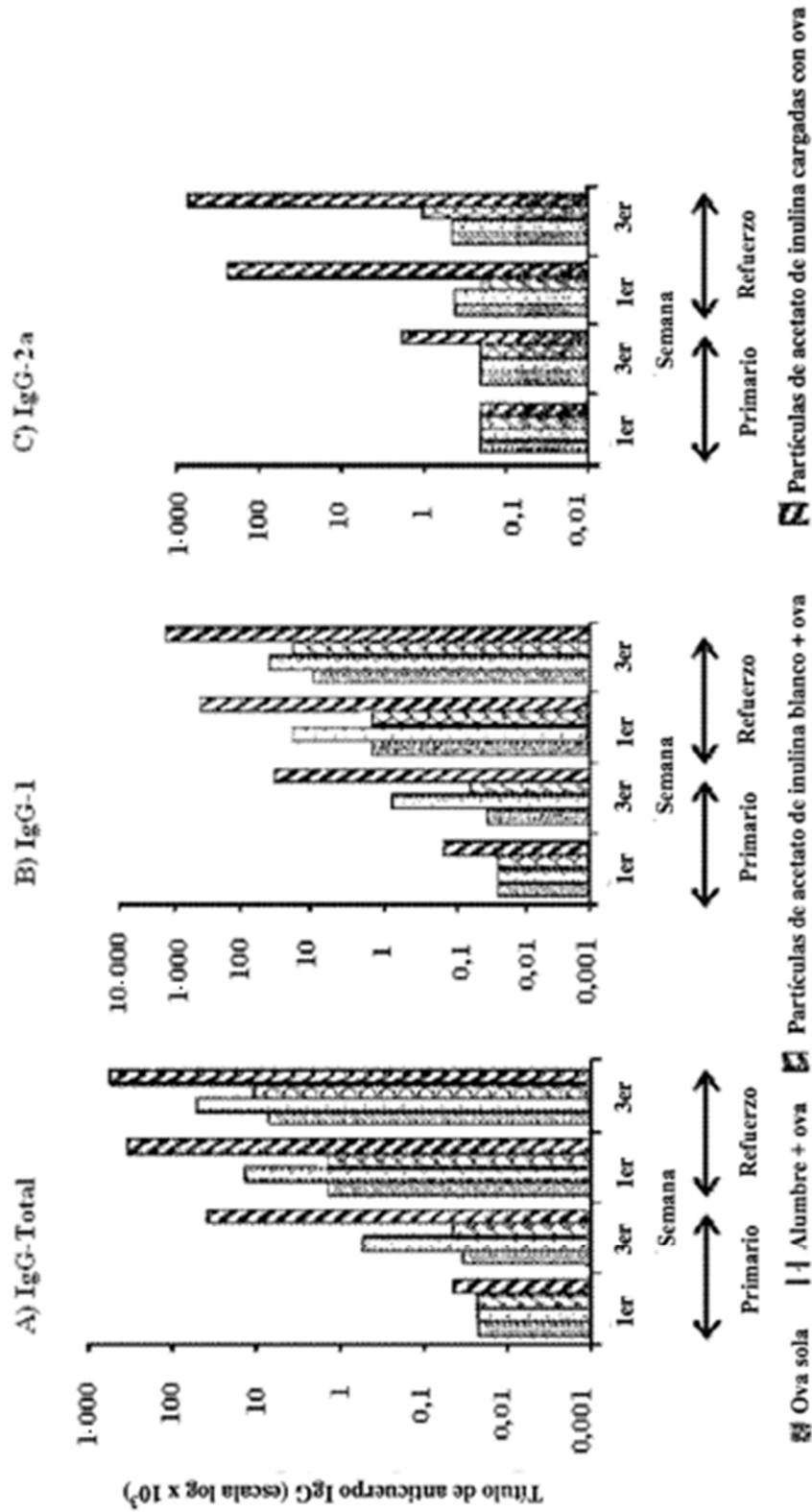


FIG. 7

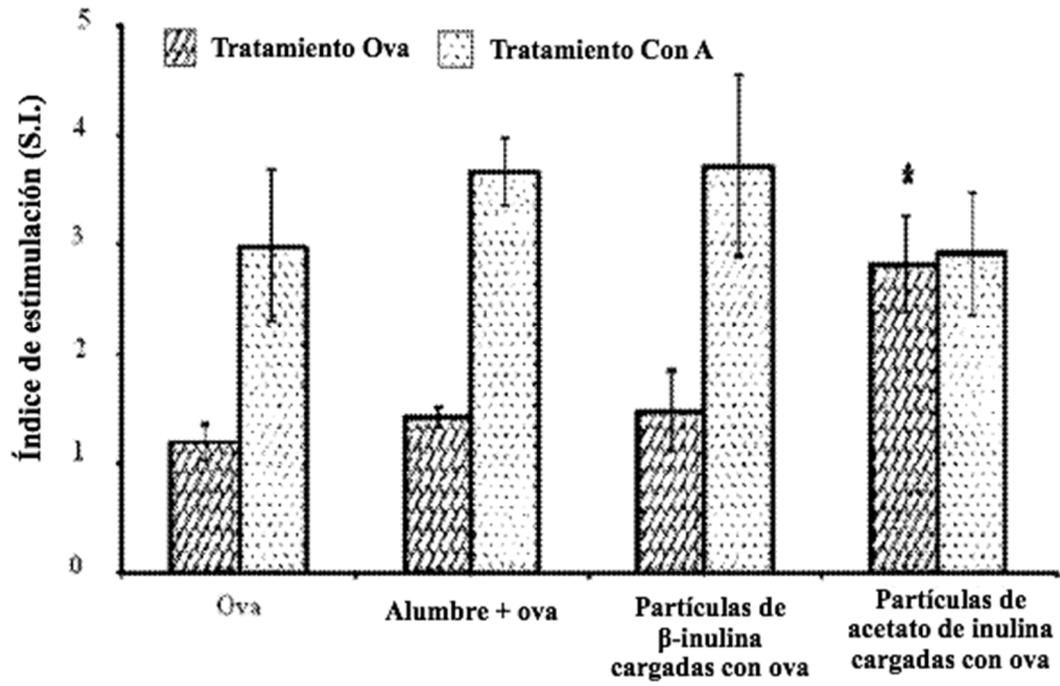


FIG. 8

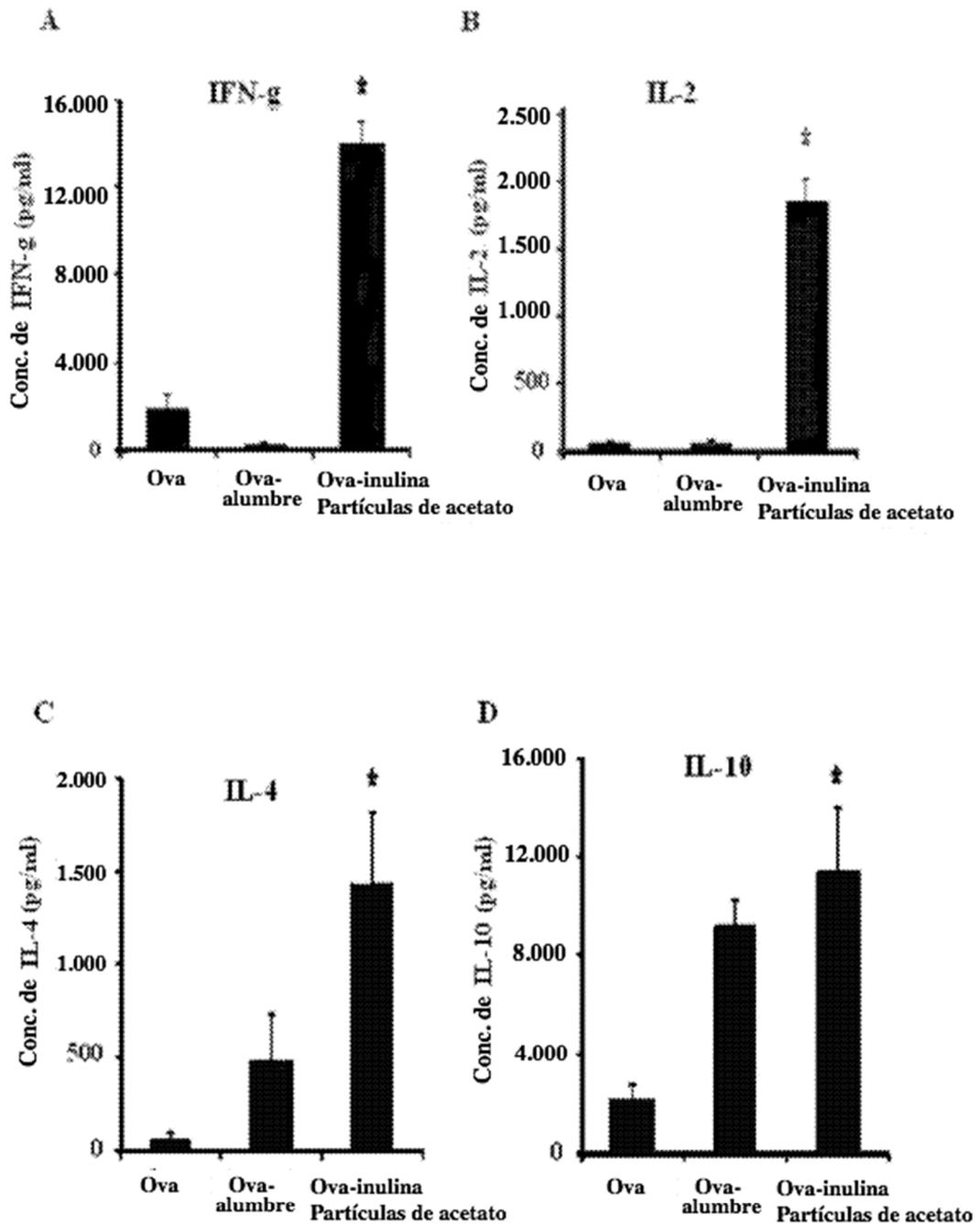


FIG. 9

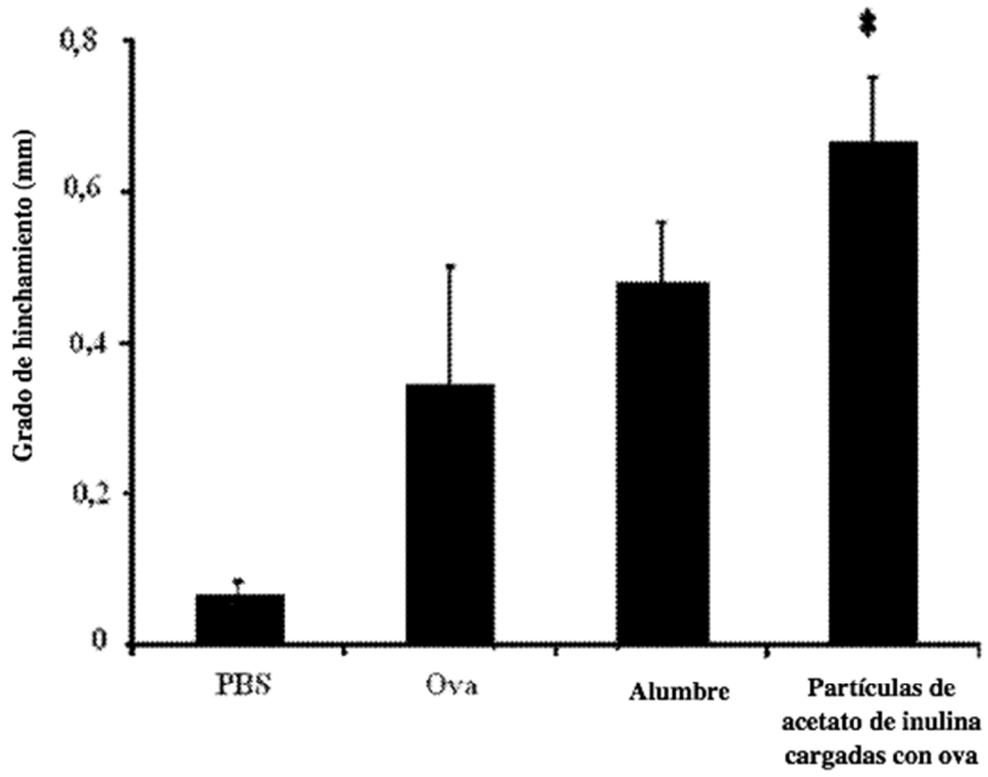


FIG. 10

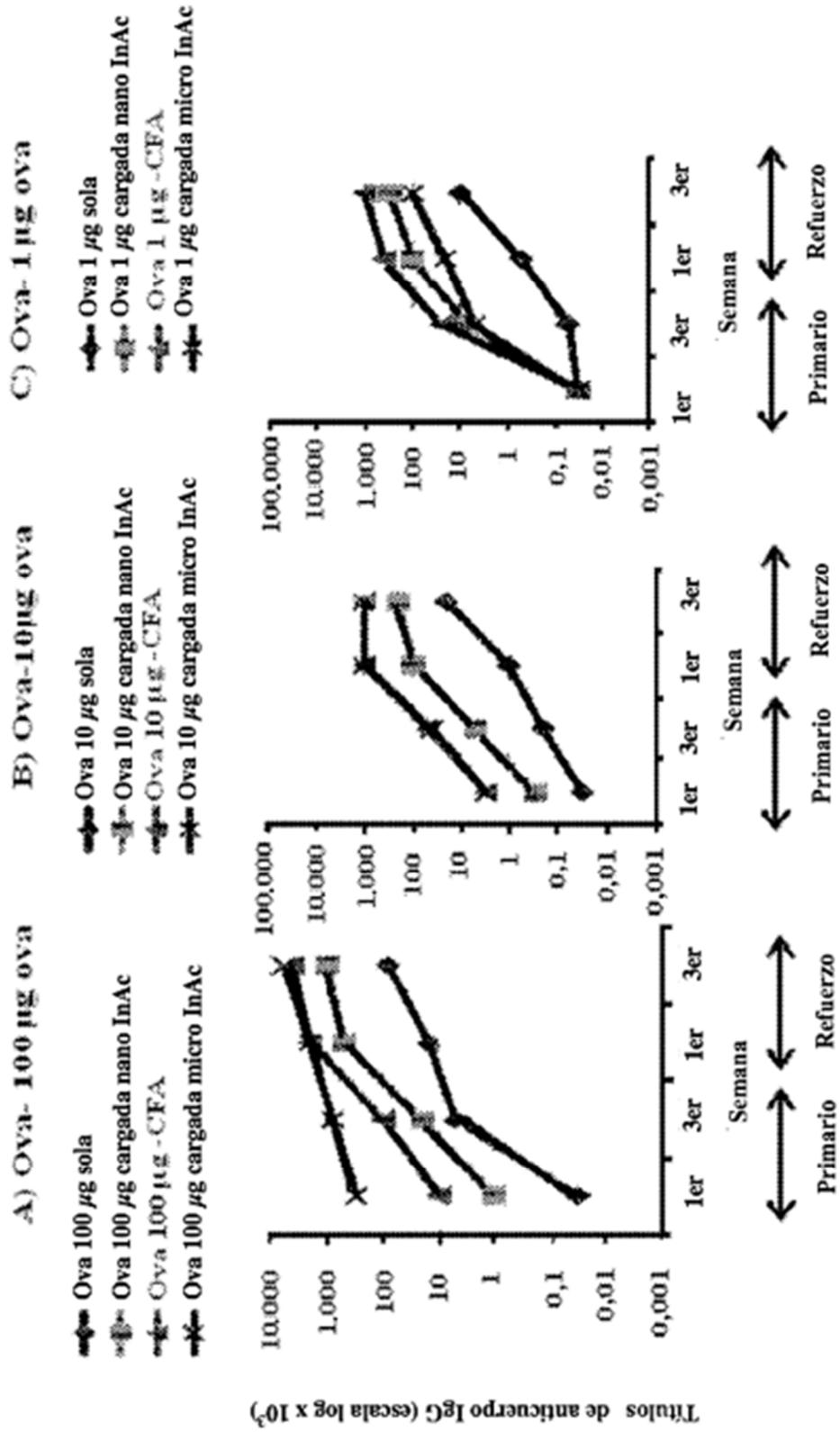


FIG. 11

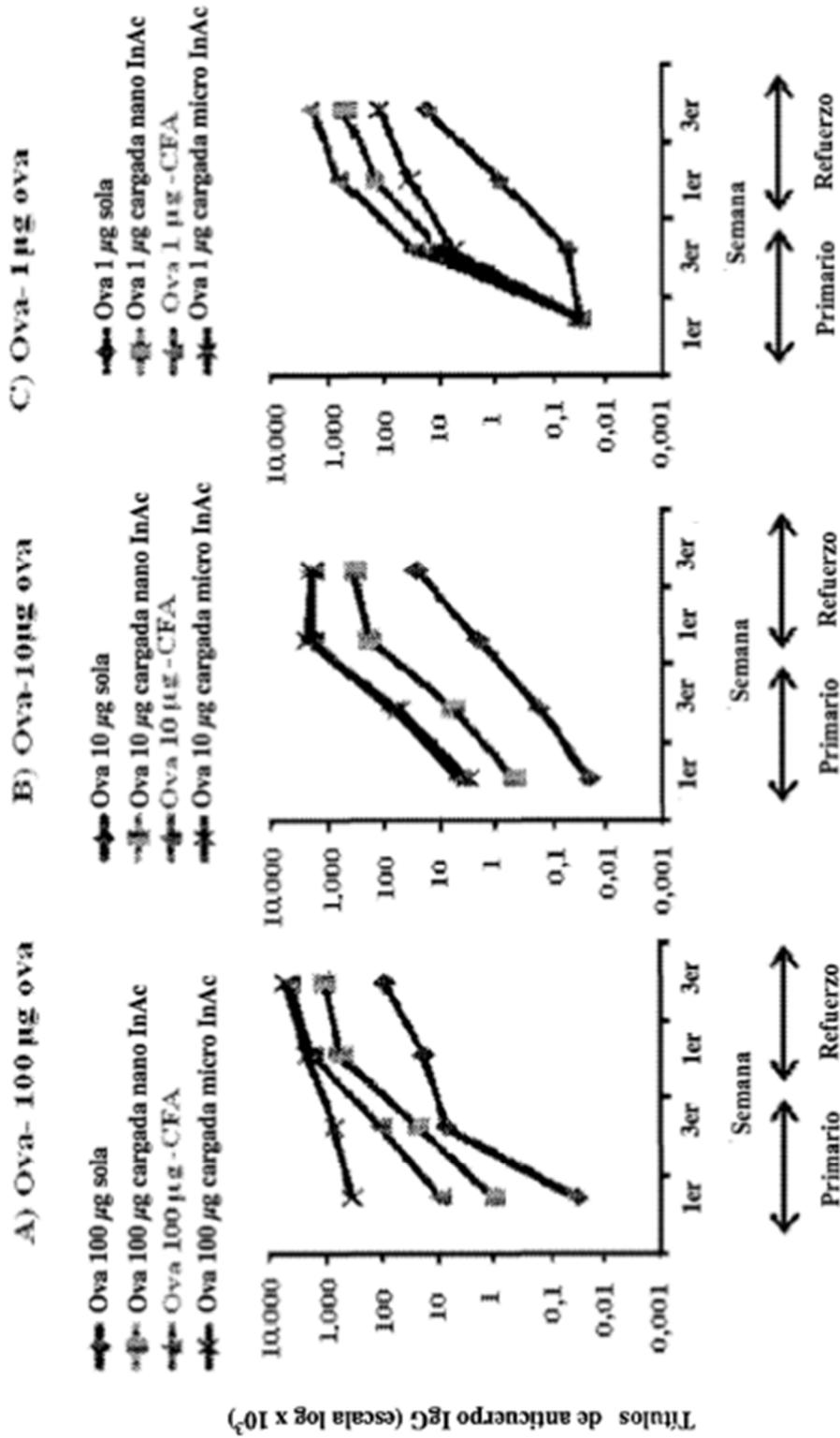


FIG. 12

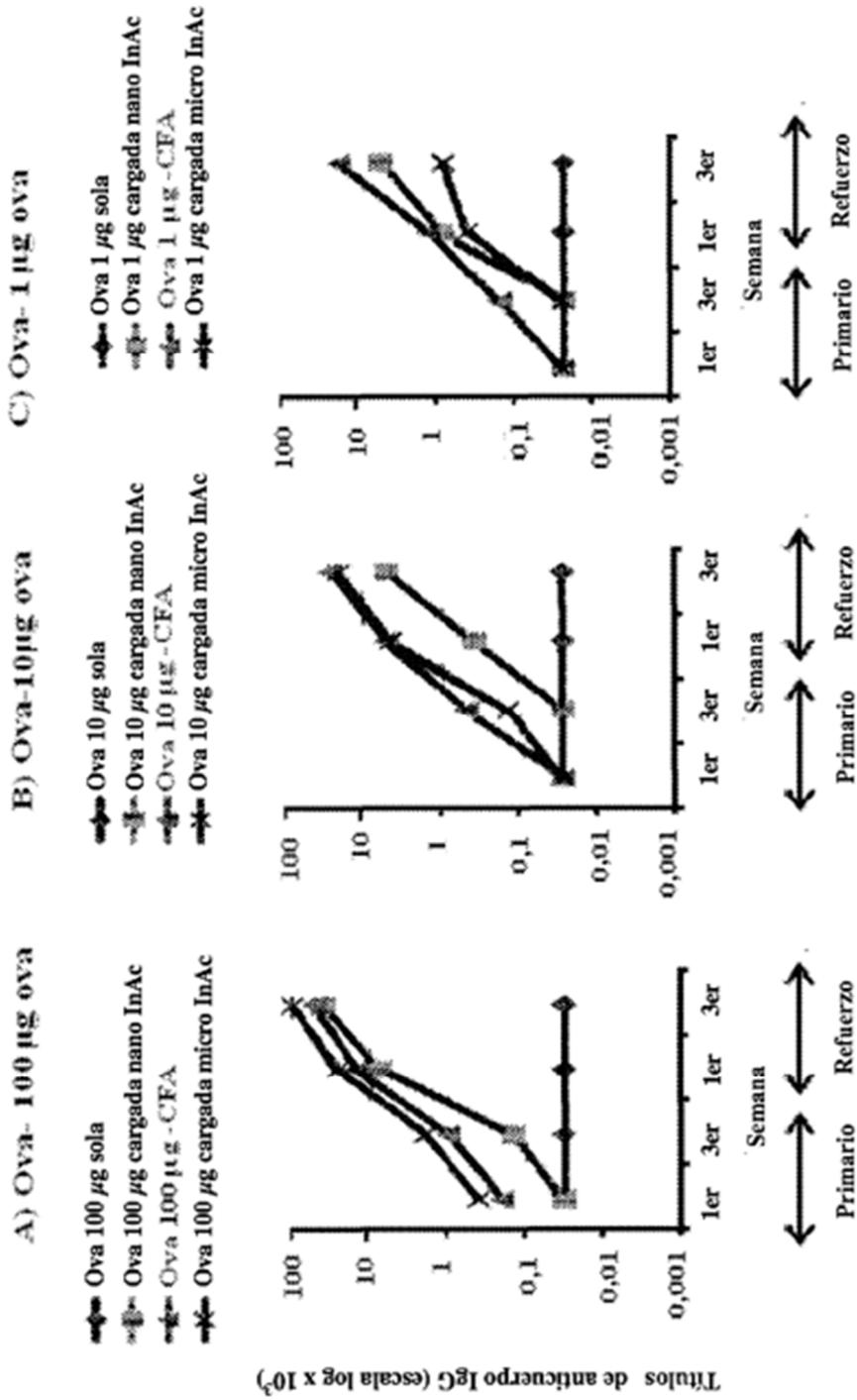


FIG. 13

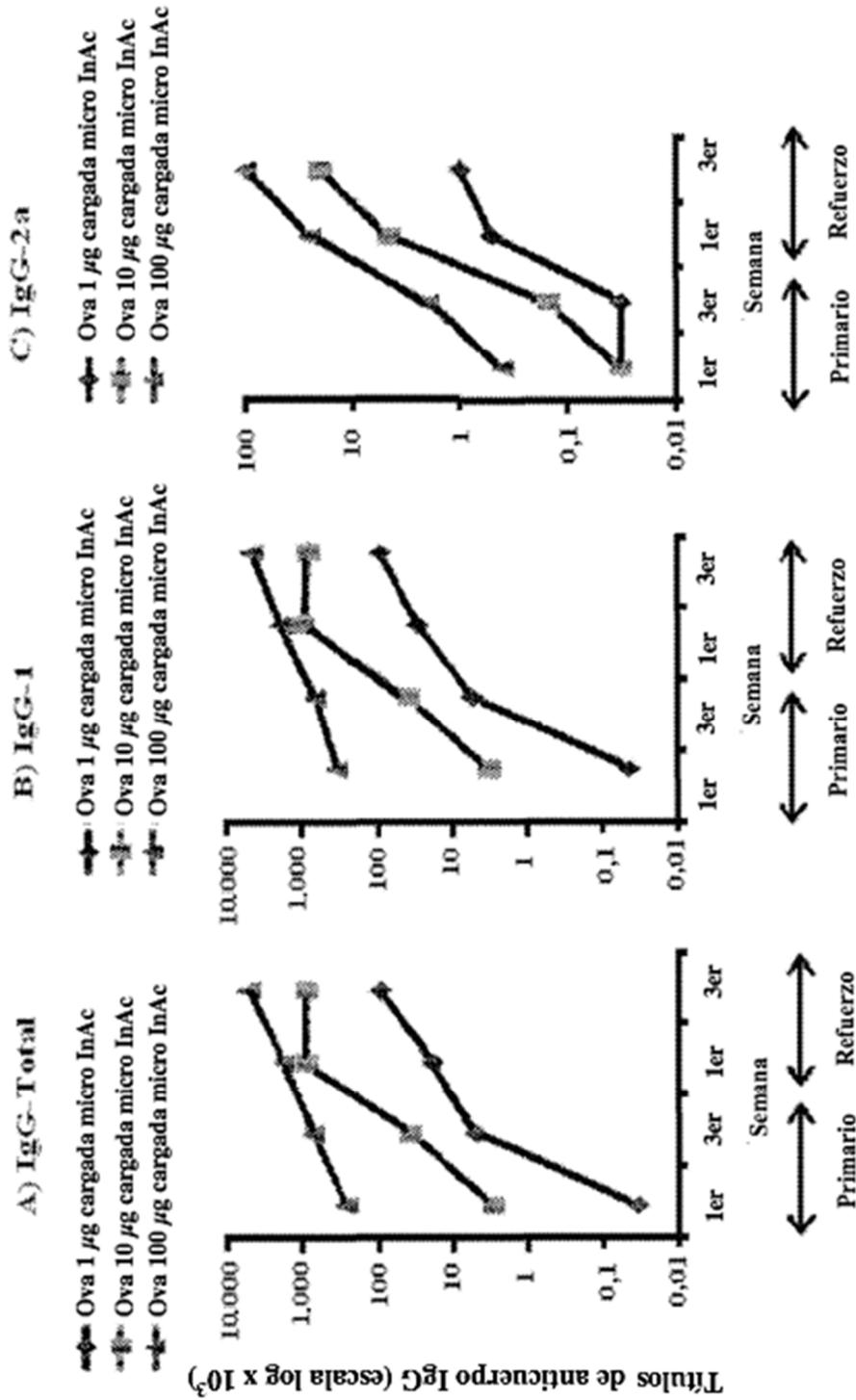


FIG. 14

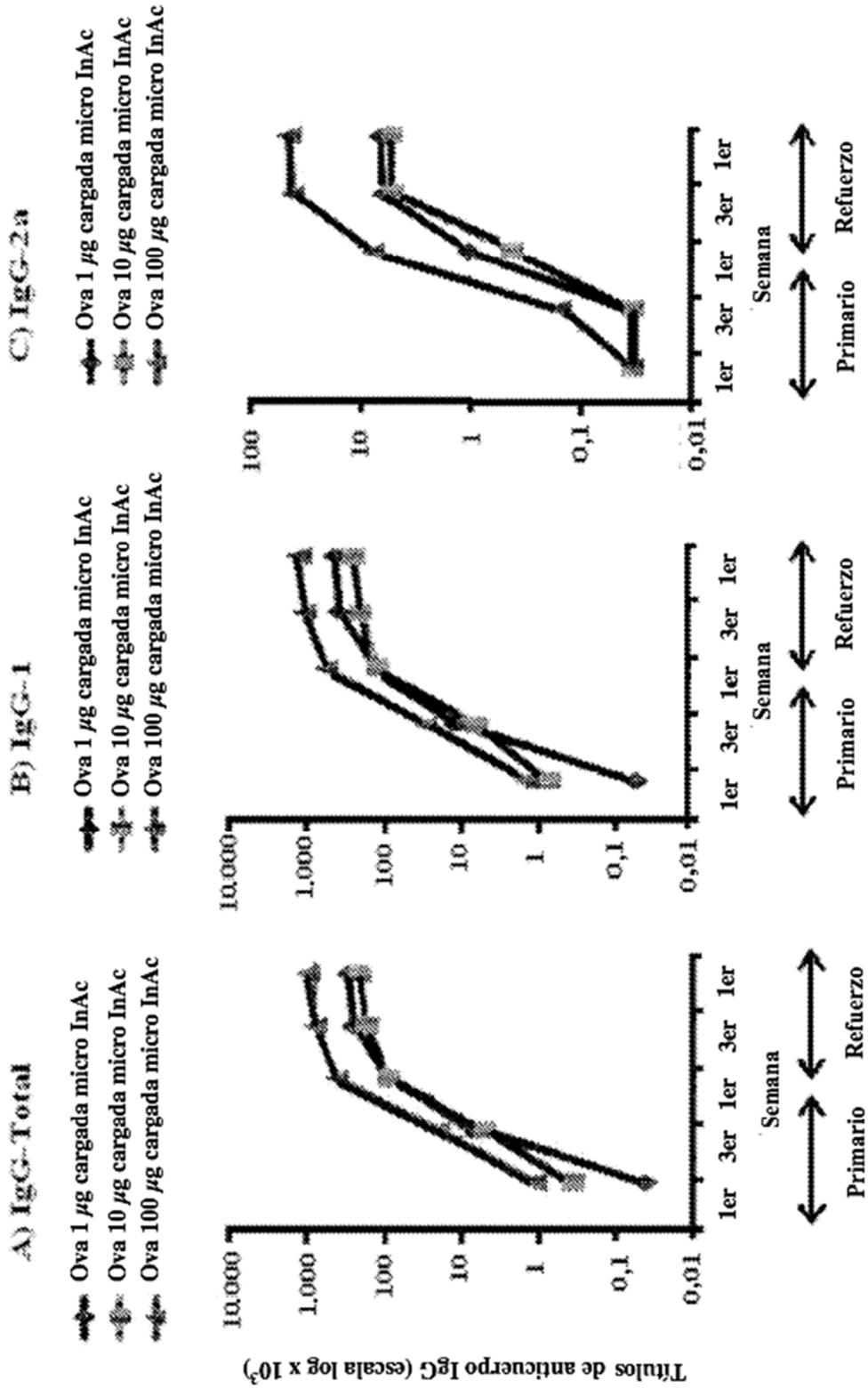


FIG. 15

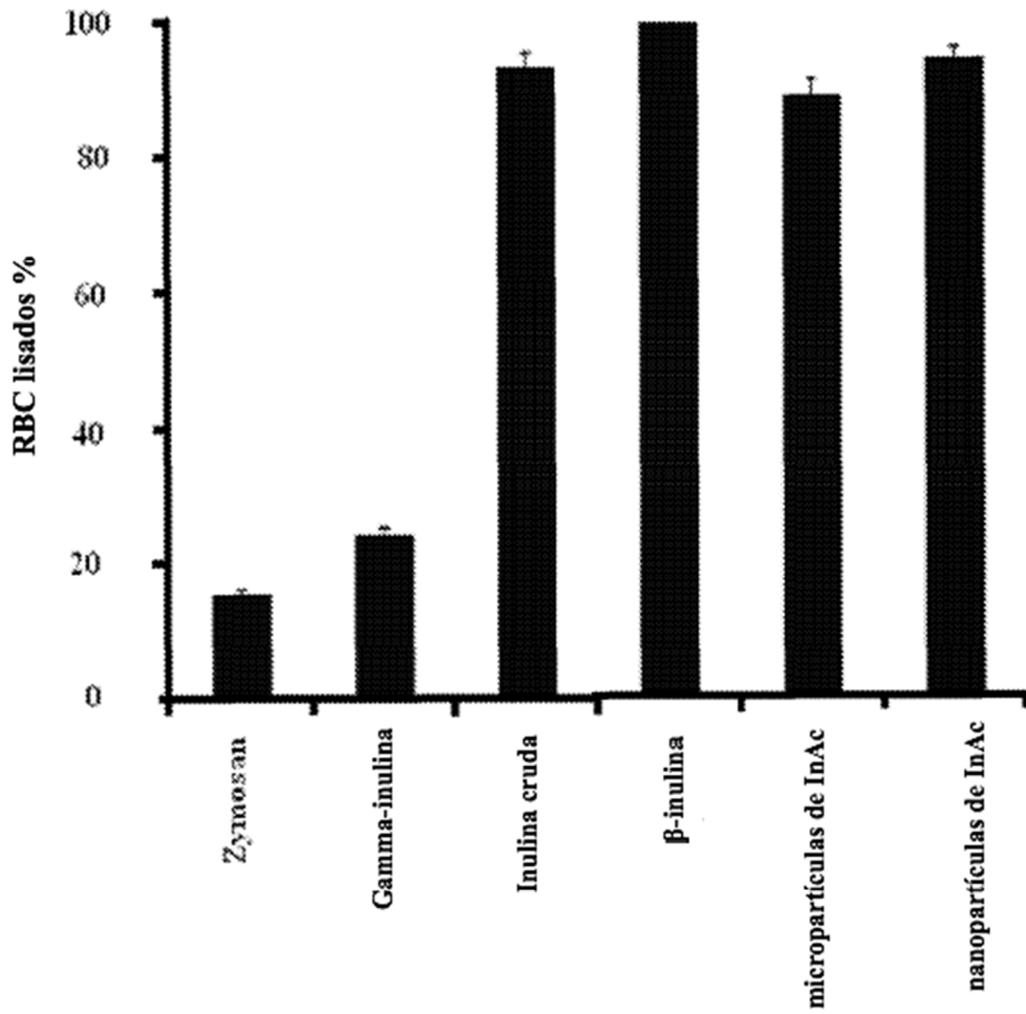


FIG. 16

A.



B.

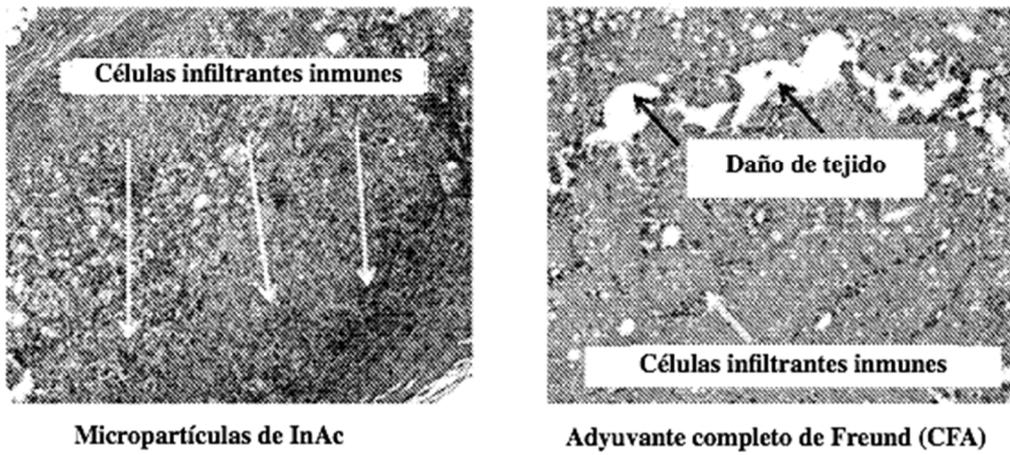


FIG. 17