



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 966**

51 Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02739776 .9**

96 Fecha de presentación : **11.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1404363**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54 Título: **Composición adyuvante para vacunas administradas por vía mucosa y por inyección.**

30 Prioridad: **19.06.2001 US 884201**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2011

73 Titular/es: **ADVANCED BIOADJUVANTS, L.L.C.**
Suite 770, 1125 South 103 Street
Omaha, Nebraska 68124, US

72 Inventor/es: **Gerber, Jay, Dean**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 363 966 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

Composición adyuvante para vacunas administradas por vía mucosa y por inyección

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención se refiere a composiciones para la administración de vacunas sobre superficies mucosas, por ejemplo, para la administración por vía oral o intranasal. La invención puede administrarse también con un antígeno por vía tópica o como inyectable por vía parenteral. Además, se refiere a una composición que consta de lecitina y un polímero o copolímero de ácido acrílico que es útil para proteger el antígeno de la degradación en el estómago, adsorber el antígeno vacunal sobre las superficies mucosas y mejorar su penetración en el tejido linfático mucoso subyacente.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 [0002] La administración de vacunas por vía mucosa ha sido infrutilizada a causa de los problemas asociados con la administración efectiva de los antígenos vacunales a la superficie mucosa y al tejido linfático mucoso subyacente. Dado que las superficies mucosas son la puerta de entrada de la mayoría de los agentes infecciosos (Sabin, A. B., Vaccination at the portal of entry of infectious agents. Dev. Biol. Stand. 33: 3-9, 1976), es importante para la salud de un animal haber desarrollado una fuerte respuesta inmunitaria protectora de anticuerpos y mediada por células en la puerta de entrada. La mejor manera de conseguir esto es con un sistema adyuvante y de administración que dirija selectivamente los antígenos vacunales a las membranas mucosas de la cavidad oral, el intestino, la nariz, el recto o la vagina. Ya que esto no se consigue normalmente con una vacuna inyectable, sería ventajoso disponer de una composición adyuvante y de administración vacunal que adsorbiera la vacuna sobre la superficie mucosa para luego, después de la absorción, ponerla en contacto con el tejido linfático asociado a la mucosa.

30 [0003] Por ejemplo, la administración por vía oral de una vacuna contra un patógeno intestinal puede generar una respuesta inmunitaria más fuerte contra tales patógenos al provocar la producción de anticuerpos de inmunoglobulina A secretora en la mucosa. Esto tiene lugar cuando la vacuna se presenta al tejido linfático asociado al intestino (O'Hagen, D., Oral Delivery of Vaccines: Formulation and Clinical Pharmacokinetic Considerations 1992, Clin. Pharmacokinet. 22 (1): 1-10). Igualmente, la administración de una vacuna contra un patógeno de las vías respiratorias superiores puede mostrar una eficacia máxima si se administra al tejido linfático asociado a la mucosa en la cavidad oral o en las vías nasales. Es interesante que la administración de antígenos no solamente induce una respuesta inmunitaria de la mucosa en el lugar de administración del antígeno, por ejemplo, la mucosa oral, sino también en otras mucosas como la mucosa nasal (Mestecky, J. I., The Common Mucosal Immune System and Current Strategies for Induction of Immune Responses in External Secretions. J. Clin. Immunol. 7 (4): 265-76).

40 [0004] La vacunación de un elevado número de animales, como ganado, cerdos y aves de corral requiere mucho trabajo y es muy costoso. Los animales han de manejarse individualmente en el momento de la vacunación para inyectarles la vacuna. Con gran frecuencia la vacuna ha de administrarse al animal al menos dos veces y en ocasiones tres o más veces. En términos de tiempo y coste, sería ventajoso que la vacuna pudiera administrarse simultáneamente con el alimento o el agua, a un gran número de animales.

45 [0005] Otra ventaja de dirigir la vacuna selectivamente a las superficies mucosas es que la vacuna puede estimular una respuesta inmunitaria protectora en presencia de anticuerpos circulantes que interfieren con las vacunas inyectadas por vía parenteral (Periwal, S. B. y col., Orally administered microencapsulated reovirus can bypass suckled, neutralizing maternal antibody that inhibits active immunization of neonates. J. Virol. 1997 (abril 71 (4): 2844-50).

50 [0006] Los sistemas adyuvantes para mejorar la respuesta inmunitaria de un animal a un antígeno vacunal son bien conocidos en la técnica. Igualmente, en la técnica se conocen sistemas para la administración de vacunas y fármacos a las superficies mucosas. Se han descrito procedimientos diferentes para proteger el antígeno vacunal y los fármacos de la degradación por el ácido gástrico y las enzimas digestivas y para adsorber el antígeno a la superficie mucosa. Frecuentemente, estos adyuvantes y sistemas de administración incluyen la mezcla del antígeno con uno o más componentes.

[0007] Algunos ejemplos de adyuvantes de la técnica anterior se incluyen a continuación.

60 [0008] La patente de los EE. UU. n° 4.917.892, Speaker y col., concedida el 17 de abril de 1990, describe un sistema de administración por vía tópica que comprende un vehículo viscoso que contiene un principio activo disuelto o disperso y un principio activo microencapsulado dentro de una película de sal anisótropa semipermeable que es el producto de la reacción de emulsión de a) un ácido de Lewis polifuncional parcialmente lipófilo y parcialmente hidrófilo o una sal del mismo en un medio acuoso, como carboximetilcelulosa, una sal de metal alcalino de ácido poliacrílico o ácido poliacrílico/polioxietileno reticulado con b) una base de Lewis o una sal de la misma en un disolvente orgánico de la base, ligeramente polar e inmiscible con agua, como cloruro de benzalconio y

5 piperidina. La patente de los EE. UU. n° 5.132.117, Speaker y col., concedida el 21 de julio de 1992, desvela una microcápsula con un núcleo acuoso y una membrana de sal de Lewis anisótropa, capsular y estabilizada por iones, formada por el producto de la reacción interfacial de una emulsión de una disolución acuosa de un ácido de Lewis polimérico hidrófilo y soluble en agua o una sal del mismo con una disolución no acuosa de una base de Lewis lipófila o una sal de la misma. La base de Lewis puede ser estarilamina, piperidina o cloruro de benzalconio y el ácido de Lewis puede ser carboximetilcelulosa, ácido poliacrílico o copolímero de ácido poliacrílico/polioxietileno, por ejemplo.

10 **[0009]** La patente de los EE. UU. n° 4.740.365, Yukimatsu y col., concedida el 26 de abril de 1988, describe una preparación de liberación mantenida que puede administrarse a membranas mucosas en la cavidad oral. La preparación consta de un principio activo en una mezcla de un componente polimérico (A) que comprende uno o más polímeros seleccionados entre polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polietilenglicol, ácido algínico o una sal del mismo y un copolímero alternante de anhídrido maleico y metilviniléter y un componente polimérico (B) que comprende uno o más polímeros seleccionados entre ácido poliacrílico y una sal del mismo. Los componentes poliméricos (A) y (B) están en una relación ponderal de 95:5 a 5:95. La preparación se estratifica con el principio activo y puede contener opcionalmente vehículos y aditivos convencionales.

20 **[0010]** La patente de los EE. UU. n° 5.451.411, Gombotz y col., concedida el 19 de septiembre de 1995, describe un sistema de administración para un agente terapéutico catiónico, en el que se reticula alginato en presencia del agente terapéutico y ácido poliacrílico para obtener una composición de liberación mantenida para administración por vía oral.

25 **[0011]** La patente de los EE. UU. n° 5.352.448, Bowersock y col., concedida el 4 de octubre de 1994, describe una formulación de vacuna oral que comprende un antígeno degradable enzimáticamente en una matriz de hidrogel para la estimulación de una respuesta inmunitaria en tejidos linfáticos asociados al intestino. Las pellas de hidrogel se sintetizan preferentemente por polimerización de ácido metacrílico en presencia de metilbisacrilamida y persulfato de amonio y bisulfito de sodio.

30 **[0012]** La patente de los EE. UU. n° 5.674.495, Bowersock y col., concedida el 7 de octubre de 1997, describe una composición vacunal para administración por vía oral que comprende un gel de alginato en forma de partículas discretas. El gel de alginato puede contener un recubrimiento de polímero, como una poli-L-lisina, para mejorar la estabilidad y para añadir una carga positiva a la superficie.

35 **[0013]** La patente de los EE. UU. n° 4.944.942, Brown y col., concedida el 31 de julio de 1990, describe una vacuna intranasal para caballos que puede comprender ácido poliacrílico reticulado con polialilsacarosa, comercializado como Carbopol 934P, combinado con monoleato de polioxietilensorbitano y monolaurato de sorbitano, preferentemente del 7,5 al 15% en volumen respecto al volumen total de la formulación, como adyuvante.

40 **[0014]** La patente de los EE. UU. n° 5.500.161, Andrianov y col., concedida el 19 de marzo de 1996, describe un procedimiento para la preparación de micropartículas y el producto del mismo, que incluye la dispersión de un polímero iónico o no iónico sustancialmente insoluble en agua en una disolución acuosa en la que también se disuelve, dispersa o suspende la sustancia que ha de administrarse y, después, la coagulación del polímero junto con la sustancia por fuerzas de impacto para formar una micropartícula. De manera alternativa, la micropartícula se forma por coagulación de una dispersión polimérica acuosa mediante el uso de electrolitos, cambios de pH, disolventes orgánicos en concentraciones bajas o cambios de temperatura para formar matrices de polímero que encapsulan los materiales biológicos.

50 **[0015]** La patente de los EE. UU. n° 6.015.576, See y col., concedida el 18 de enero de 2000, describe un procedimiento que comprende la administración por vía oral de liposomas multilaminares liofilizados que contienen el antígeno, en que la preparación de liposomas está contenida en una píldora o dentro de una cápsula con recubrimiento entérico. Un recubrimiento entérico tal puede estar compuesto de polímeros y copolímeros acrílicos.

55 **[0016]** La patente de los EE. UU. n° 5.811.128, Tice y col., concedida el 22 de septiembre de 1998, describe un procedimiento y composiciones para la administración de un agente bioactivo a un animal que comprende las etapas de la encapsulación de cantidades efectivas del agente en un excipiente biocompatible para formar microcápsulas con un tamaño inferior a aproximadamente diez micrómetros y la administración de cantidades efectivas de las microcápsulas al animal. Se obtiene una respuesta pulsátil, así como inmunidad mucosa y sistémica. El excipiente biocompatible se selecciona del grupo que consta de poli(DL-lactida-co-glicolida), poli(lactida), poli(glicolida), copolioxalatos, policaprolactona, poliortoésteres y poli(ácido β-hidroxibutírico), polianhídridos y mezclas de los mismos.

65 **[0017]** La patente de los EE. UU. n° 5.565.209, Rijke, concedida el 15 de octubre de 1996, describe vacunas no oleosas que comprenden polioles de polioxipropileno y polioxietileno y un polímero de ácido acrílico como constituyentes adyuvantes para vacunas inyectables.

[0018] La patente de los EE. UU. n° 5.084.269, Kullenberg, concedida el 28 de enero de 1992, describe un adyuvante, compuesto de lecitina en combinación con un vehículo que puede seleccionarse del grupo que consta de

aceites no comestibles como aceite mineral y aceites triglicéridos comestibles como aceite de soja, para una vacuna inyectable.

5 **[0019]** La patente de los EE. UU. n° 5.026.543, Rijke, concedida el 25 de junio de 1991, desvela vacunas no oleosas que contienen polioles de polioxipropileno y polioxietileno, así como un polímero de ácido acrílico como constituyentes adyuvantes.

10 **[0020]** La patente de los EE. UU. n° 5.451.411, Gombotz y col., concedida el 19 de septiembre de 1995, desvela perlas de alginato como sistema de administración por vía oral específico del sitio para agentes terapéuticos catiónicos, diseñado para dirigir selectivamente los agentes al lado luminal del intestino delgado. El aumento de la bioactividad de los agentes terapéuticos liberados del alginato se atribuye a la capacidad del ácido poliacrílico de proteger a los agentes frente a la interacción con fragmentos de menor peso molecular de alginato tratado con ácido.

15 **[0021]** La patente de los EE. UU. n° 5.567.433, Collins, concedida el 22 de octubre de 1996 desvela un procedimiento para la producción de liposomas útiles para la encapsulación y administración de una amplia diversidad de materiales biológicamente activos. El procedimiento implica la formación de una dispersión de liposomas en ausencia de un disolvente orgánico o detergente, uno o varios ciclos de congelación y descongelación y deshidratación para formar un polvo lipídico. El polvo se hidrata en presencia de un material biológicamente activo para su encapsulación en los liposomas.

20 **[0022]** La patente de los EE. UU. n° 5.091.188, Haynes, concedida el 25 de febrero de 1992 desvela medicamentos insolubles en agua que se hacen inyectables mediante formulación como suspensiones acuosas de microcristales recubiertos de fosfolípidos.

25 **[0023]** La patente de los EE. UU. n° 4.832.958, Baudier y col., concedida el 23 de mayo de 1989, describe composiciones de liberación prolongada de verapamilo (un fármaco bien conocido) en las que microgránulos que comprenden verapamilo y un agente humectante se recubren con una membrana microporosa. Los agentes humectantes adecuados para su uso en los microgránulos que comprenden verapamilo se discuten, por ejemplo, de la columna 2, línea 65 a la columna 3, línea 4 y en la columna 3, líneas 31-53. La lecitina se menciona como ejemplo de agente humectante adecuado para su uso en los microgránulos (véase, por ejemplo, la columna 3, líneas 4 y 35). La membrana microporosa comprende un adyuvante y un polímero acrílico o metacrílico (véase, por ejemplo, la columna 2, líneas 52-56, en dicho documento). Los adyuvantes adecuados se discuten de la columna 3, línea 63 a la columna 4, línea 21, en dicho documento e incluyen un plastificante, un pigmento, una carga, un agente humectante, un lubricante, un agente antiestático o un antiespumante. Los adyuvantes "humectantes" adecuados se discuten, por ejemplo en la columna 4, líneas 4-10, y se describen como "agentes tensioactivos del tipo de Span y Tween..."

35 **[0024]** La patente de los EE. UU. n° 5.935.599, Dadey, concedida el 10 de agosto de 1999, describe sistemas de administración de fármacos que usan liposomas asociados a polímeros (PAL). En un PAL, un liposoma se "compleja de manera no covalente con un polímero aniónico que tiene varias fracciones ácidas" (véase, por ejemplo, la columna 3, líneas 13-14, en dicho documento). El PAL se mezcla después con un agente terapéutico para formar la composición del fármaco deseada. El liposoma puede comprender, por ejemplo, un fosfolípido como lecitina (véase, por ejemplo la columna 3, líneas 32-33 en dicho documento). Los polímeros aniónicos adecuados se discuten, por ejemplo, en la columna 9, líneas 6-42, e incluyen, por ejemplo, polímeros formados a partir de monómeros que contienen ácidos, como ácido acrílico (véase, por ejemplo la columna 9, líneas 6-9, en dicho documento).

40 **[0025]** La presente invención alivia los problemas encontrados en la técnica anterior al proporcionar una composición más sencilla y un procedimiento de formulación más fácil, así como al proporcionar una administración más fácil.

50 **[0026]** Por lo tanto, un objetivo primario de la presente invención es proporcionar un nuevo sistema de administración y adyuvante vacunal.

55 **[0027]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un adyuvante vacunal especialmente útil para la administración de vacunas por vía mucosa.

60 **[0028]** Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un adyuvante vacunal que permita la administración de la vacuna con el alimento o el agua de los animales.

[0029] Además, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un adyuvante vacunal que pueda administrarse cómodamente y de manera prácticamente simultánea a un gran número de animales.

65 **[0030]** Además, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la incorporación del antígeno en un sistema de administración vacunal con un daño mínimo para los epítomos vacunales.

[0031] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento y medios sencillos para la preparación de un sistema de administración vacunal que no requiera condiciones rigurosas, como temperaturas elevadas o disolventes orgánicos o detergentes.

5 **[0032]** Estos y otros objetivos, características y ventajas serán evidentes después del examen de la descripción siguiente y las reivindicaciones de la invención a continuación.

RESUMEN DE LA INVENCION

10 **[0033]** La presente invención describe una composición que comprende un antígeno vacunal y un adyuvante que incluye lecitina y un polímero que es un polímero o copolímero acrílico. El polímero acrílico preferido es un polímero de ácido poliacrílico.

15 **[0034]** La lecitina y el polímero se hidratan en disolución salina o en agua y se mezclan para formar el adyuvante. La mezcla de la lecitina y el polímero forma una matriz o estructura reticular, que es efectiva para la retención o encapsulación del antígeno vacunal.

20 **[0035]** Además, las fuertes propiedades mucoadhesivas y adsorptivas de la combinación de polímero y lecitina mejoran la adsorción del antígeno vacunal sobre las superficies mucosas. Además, la composición de lecitina mejora la absorción (Swenson, E. S. y W. J. Curatolo, © Means to Enhance Penetration (2) Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar groups: mechanisms of potential toxicity. Advanced Drug Delivery Reviews, 1992, 8: 39-92), lo que ayuda a poner el antígeno en contacto con el tejido linfático subyacente.

25 **[0036]** La composición adyuvante de esta invención hace posible la vacunación a través de una superficie mucosa, como las superficies de la cavidad oral, intestinales, nasales, rectales o vaginales. La vacuna puede administrarse en forma de píldora o comprimido, en forma de pasta o en forma líquida mediante un cuentagotas o una jeringa sin aguja. La composición adyuvante permite un procedimiento de vacunación por medio del alimento y/o el agua. La composición puede usarse también de manera tradicional como inyectable. La invención proporciona procedimientos para la preparación y el uso de la composición.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

35 **[0037]** La presente invención describe un adyuvante vacunal que cuando se mezcla con un antígeno o hapteno y se administra a un humano o un animal induce una respuesta inmunitaria al antígeno de mayor intensidad que cuando el antígeno se administra solo. La presente invención incluye también vacunas que comprenden un antígeno o grupo de antígenos y un adyuvante nuevo descrito en este documento, que comprende una combinación de lecitina y un polímero, que es preferentemente un polímero acrílico. La presente invención comprende también procedimientos para la preparación y el uso del mismo.

40 **[0038]** La presente invención ofrece la ventaja de permitir la administración de la vacuna directamente sobre una superficie mucosa. Al hacerlo, la vacuna estimula una respuesta inmunitaria protectora que ayuda a evitar la interferencia de los anticuerpos maternos circulantes que pueden estar presentes en un recién nacido o un bebé, por ejemplo.

45 **[0039]** Un "antígeno" se define en este documento como un compuesto que cuando se introduce en un animal o un humano resulta en la formación de anticuerpos e inmunidad mediada por células.

50 **[0040]** Un "adyuvante" se define en este documento como un compuesto o compuestos que cuando se usan en combinación con antígenos vacunales específicos en formulaciones aumentan las respuestas inmunitarias resultantes o las alteran o modifican de otra manera.

55 **[0041]** Una "vacuna" se define en este documento como una composición de fracciones antigénicas que consta normalmente de agentes infecciosos vivos modificados (atenuados) o inactivados o de alguna parte de los agentes infecciosos que se administra en el cuerpo, de la manera más frecuente con un adyuvante, para producir una inmunidad activa.

60 **[0042]** El antígeno para usar en esta invención puede ser cualquier antígeno deseado incluido en la definición expuesta anteriormente. Los antígenos están disponibles en el comercio o pueden ser producidos por un experto en la técnica. La fracción antigénica que constituye la vacuna puede ser un microorganismo vivo modificado o inactivado o un producto natural purificado de un microorganismo u otra célula, incluyendo, pero sin limitarse a células tumorales, un producto sintético, una proteína, péptido, polisacárido o producto similar manipulados genéticamente o un alérgeno. La fracción antigénica puede ser también una subunidad de una proteína, péptido, polisacárido o producto similar. El antígeno puede ser también un antígeno genético, es decir, el ADN o ARN que genera una respuesta inmunitaria. Algunos representantes de los antígenos que pueden usarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a productos naturales, recombinantes o sintéticos derivados de virus, bacterias, hongos, parásitos y otros agentes infecciosos, además de enfermedades autoinmunitarias, hormonas o

antígenos tumorales que podrían usarse en vacunas profilácticas o terapéuticas y alérgenos. Los productos víricos o bacterianos pueden ser componentes que produce el organismo por escisión enzimática o pueden ser componentes del organismo producidos por técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la técnica. Debido a la naturaleza de la invención y a su modo de administración, es concebible que la invención funcione también como sistema de administración de fármacos como hormonas, antibióticos y antiviricos.

[0043] La lecitina para usar en esta invención es cualquier lecitina o, por ejemplo, material lipídico de lecitina, como fosfatidilcolina, que pueda usarse para formar liposomas. Los fosfolípidos, lisofosfolípidos, glicolípidos y lípidos neutros comprenden la composición típica de la lecitina. Las lecitinas son moléculas que cuando están totalmente hidrolizadas dan lugar a dos moléculas de ácido graso y a una molécula, respectivamente, de glicerol, de ácido fosfórico y de un compuesto nitrogenado básico, que usualmente es colina. Normalmente, los ácidos grasos obtenidos por la hidrólisis de las lecitinas son, pero no se limitan a los ácidos oleico, palmítico y esteárico. El ácido fosfórico puede estar unido al glicerol en la posición α o en la posición β , formando ácido α -glicerofosfórico o ácido β -glicerofosfórico, respectivamente y produciendo las series correspondientes de lecitinas, conocidas como α -lecitinas y β -lecitinas.

[0044] La lecitina comercial se obtiene por procesos de extracción a partir de yema de huevo, tejido cerebral o habas de soja. La ovolectina (vitelina) de los huevos y la lecitina vegetal de las habas de soja, así como la lecitina purificada de cerebro de ternero se han usado como emulsionantes, antioxidantes y estabilizantes en alimentos y preparaciones farmacéuticas. La lecitina comercial puede obtenerse de diversas fuentes, por ejemplo, Central Soya (Fort Wayne, Indiana, EE. UU.). Un experto en la técnica será capaz de determinar la lecitina apropiada para el uso deseado.

[0045] El polímero es un polímero acrílico, que es cualquier polímero o copolímero que contiene una fracción acrílica. Algunos ejemplos de polímeros acrílicos adecuados incluyen, pero no se limitan a ácido poliacrílico, ácido metacrílico, metacrilato, acrilamida, acrilato, acrilnitrilo y ésteres alquílicos de ácido poliacrílico. Algunos ejemplos de copolímeros acrílicos son poli(acrilamida-co-metacrilato de butilo), ácido acrílico-metacrílico, acrilato-acrilamida y poli(metacrilato). Algunos ejemplos de polímeros acrílicos disponibles en el comercio incluyen Carbopol (B.F. Goodrich Co., Cleveland, OH, EE. UU.), Carboset (B.F. Goodrich Co., Cleveland, OH, EE. UU.), Neocryl (Avecia, Inc., Wilmington, DE, EE. UU.) y Eudragit (Rohm Tech, Inc., Malden, MA, EE. UU.).

[0046] Algunos polímeros acrílicos, como Carbopol y Eudragit, pueden beneficiarse de la inclusión de un reticulante, como un poliéter de polialqueno o una alquilsacarosa, que sea efectivo para la unión de los polímeros. Tanto Carbopol como Eudragit están disponibles en formulaciones comerciales que incluyen un poliéter de polialqueno o alquilsacarosa como reticulantes. El polímero acrílico más preferido para su uso en esta invención es ácido poliacrílico (Carbopol), con o sin un poliéter de polialqueno como reticulante. Un experto en la técnica será capaz de determinar un polímero acrílico apropiado para un uso deseado.

[0047] Algunos ejemplos de polímeros no acrílicos adecuados son acetatoftalato de polivinilo, acetatoftalato de celulosa, metilcelulosa, polietilenglicol, alcohol polivinílico y polioxi-etileno.

[0048] El procedimiento para la preparación del adyuvante de esta invención implica, en primer lugar, la hidratación de la lecitina y el polímero mediante la suspensión de aproximadamente el 0,0001 al 10% en peso/volumen de lecitina seca y de aproximadamente el 0,0001 al 10% en peso de polímero en disolución salina o en agua. Las concentraciones preferidas de lecitina y polímero son del 0,001 al 1,0% en peso/volumen, respectivamente. Los dos componentes pueden mezclarse entre sí por procedimientos convencionales como, por ejemplo, un mezclador Waring, un equipo de emulsión o un microfluidizador. Pueden añadirse tensioactivos (emulsionantes) para facilitar la mezcla o la emulsión de la lecitina y el polímero. Los detergentes sintéticos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Algunos ejemplos de tensioactivos apropiados incluyen monooleato de polioxietilensorbitano, monolaurato de sorbitano, estearato de sodio, tensioactivos no iónicos unidos a éteres como Laureth®4 y Laureth®23, tensioactivos de sulfato de alquilo, tensioactivos de sulfato de alquilo alcoxilado, bencenosulfonatos de alquilo, sulfonatos de alcano, sulfonatos de olefina, ácidos policarboxílicos sulfonados, glicerosulfonatos de alquilo, glicerosulfonatos de acilo graso, glicerosulfatos de oleilo graso, etersulfatos de alquilfenol y óxido de etileno, sulfonatos de parafina, fosfatos de alquilo, isotionatos como isotionatos de acilo, tauratos de *N*-acilo, amidas de ácidos grasos o taururo de metilo, succinatos y sulfosuccinatos de alquilo, mono y diésteres de sulfosuccinato, sarcosinatos de *N*-acilo, sulfatos de alquilpolisacáridos, sulfatos de alquilo primario ramificados, polietoxicarboxilatos de alquilo y ácidos grasos esterificados con ácido isetiónico y neutralizados con hidróxido de sodio. Otros ejemplos se indican en *Surface Active Agents and Detergents* (vols. I y II, de Schwartz, Perry y Berch). Los tensioactivos detergentes no iónicos adecuados se desvelan en general en la patente de los EE. UU. n° 3.929.678, Laughlin y col., concedida el 30 de diciembre de 1975, desde la columna 13, línea 14 hasta la columna 16, línea 6. Si se incluye, el emulsionante debe añadirse en una concentración en el intervalo de aproximadamente el 0,001 al 0,05% en volumen de la mezcla.

[0049] Aunque la invención misma tiene propiedades adyuvantes, también puede usarse en combinación con otros adyuvantes, como, pero sin limitarse a saponinas, fracciones de saponinas, componentes sintetizados de saponinas, complejos de estimulación inmunitaria (ISCOM), dipéptido de muramilo y análogos, polioles pluriónicos,

dimicolato de trehalosa, compuestos que contienen aminas, citocinas y derivados de lipopolisacáridos. La adición de otro adyuvante puede facilitar la estimulación de una respuesta inmunitaria de la mucosa. Si se incluyen, los adyuvantes adicionales pueden estar presentes en una concentración de hasta aproximadamente el 10% en peso de la composición, en lo que se prefiere menos de aproximadamente el 1% en peso.

[0050] La invención puede incluir también uno o más probióticos. Los probióticos son bacterias o microorganismos que son beneficiosos para la salud del individuo o el animal. Algunos ejemplos de probióticos de uso común incluyen, pero no se limitan a varias cepas beneficiosas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, etc. Si están presentes, cada uno de los organismos debe administrarse en una concentración en el intervalo de aproximadamente 10^3 a 10^8 UFC, respectivamente.

[0051] Además de todo lo anterior, como bien comprenden los expertos en la técnica, pueden emplearse otros aditivos secundarios para dotar a la composición básica de una mayor elegancia farmacéutica y/o cosmética. Por ejemplo, pueden añadirse colorantes en concentraciones muy pequeñas, así como diluyentes como alcoholes, tampones, estabilizantes, agentes humectantes, disolventes, colores, etc. Con la excepción de diluyentes como los alcoholes, que se usan en concentraciones mayores, en general las concentraciones de estos aditivos secundarios no son superiores al 0,001%-1,0% en peso.

[0052] Si se desea, los componentes adyuvantes pueden esterilizarse por autoclavado antes de la etapa de hidratación. También se ha encontrado que someter a los componentes a autoclavado o a microondas puede mejorar su capacidad de suspensión. El antígeno vacunal puede añadirse después de la formación del adyuvante o en el momento de la hidratación de los componentes del adyuvante. En el caso de comprimidos, el antígeno puede mezclarse con componentes secos de la invención adyuvante junto con otros excipientes necesarios para la formación del comprimido. Algunos ejemplos de tipos de antígenos vacunales adecuados incluyen bacterias, virus o parásitos inactivados o atenuados o subunidades de estos organismos o antígenos vacunales genómicos, por ejemplo ADN.

[0053] La concentración relativa de los componentes, incluyendo el antígeno, puede determinarse mediante el ensayo de la formulación en animales, a partir de una dosis baja de la formulación e incrementando después la dosis mientras se controla la respuesta inmunitaria. Para determinar la dosis óptima deberá considerarse lo siguiente, por ejemplo, la raza, edad, tamaño y la presencia o ausencia de anticuerpos maternos interferentes.

[0054] La concentración de una vacuna vírica atenuada comprenderá aproximadamente de 10^3 a 10^9 DICT₅₀ por animal. Preferentemente, la cantidad será de aproximadamente 10^4 a 10^7 DICT₅₀ por animal. La concentración del antígeno o subunidad antigénica inactivados puede estar en el intervalo de cantidades de nanogramos a miligramos de antígeno, en lo que se prefiere de aproximadamente 1 microgramo a 1 miligramo.

[0055] Cuando se combinan el polímero acrílico y la lecitina se forma una matriz o estructura reticular. La relación entre la lecitina y el polímero está entre 1:1.000 y 1.000:1. Las relaciones preferidas entre lecitina y polímero están entre 1:10 y 10:1. Puede ser que las proporciones relativas de lecitina y polímero acrílico sean importantes para la eficiencia de la administración de antígenos diferentes, es decir, bacterianos, víricos, parasíticos o subunidades de estos organismos. La relación óptima puede determinarse por los procedimientos convencionales de ensayo de las diferentes relaciones entre lecitina y polímero con el antígeno deseado en animales.

[0056] La composición adyuvante puede usarse para la administración de antígenos vacunales, como antígenos vacunales de virus, bacterias o parásitos completos, inactivados o atenuados o subunidades de tales organismos, a las superficies mucosas, como las superficies de la cavidad oral, intestinales, nasales, vaginales y rectales. El análisis por microscopía electrónica muestra que existe una afinidad física y/o química entre la lecitina y el polímero. Esta afinidad o asociación se presenta como una matriz o estructura reticular. Sin el propósito de adherirse a ninguna teoría, se cree que una estructura como esta puede funcionar como un medio de retención física o encapsulación del antígeno vacunal. Una unión semejante del antígeno se mejora además por la carga eléctrica y las propiedades hidrófilas e hidrófobas de la lecitina y los polímeros acrílicos de esta invención. Para facilitar esto, puede seleccionarse un polímero de carga eléctrica diferente en función de las propiedades aniónicas o catiónicas del antígeno. Igualmente puede seleccionarse un polímero y una lecitina de diferente hidrofobicidad en función de las propiedades lipófilas o hidrófilas del antígeno.

[0057] Si es necesario o se desea, el antígeno puede acoplarse a la matriz de lecitina y polímero acrílico con un reticulante como glutaraldehído en una concentración de aproximadamente 1 a 50 mM y, preferentemente, de aproximadamente 15 mM. Además, el antígeno puede acoplarse mediante carbodiimida soluble en agua en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 0,5 M, en lo que se prefiere aproximadamente 0,1 M, o por un procedimiento de acoplamiento mediante un reactivo heterofuncional como 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-hidroxisuccinimidilo (SPDP) en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1,0 mM y preferentemente de aproximadamente 0,2 mM. Otros agentes de acoplamiento apropiados incluyen anhídrido mixto y bencidina bisdiazotada. El reticulante se usa para mejorar las afinidades de unión de los componentes de la composición adyuvante, por ejemplo, cuando los componentes no se atraen eléctricamente entre sí.

[0058] Las fuertes propiedades mucoadhesivas y adsorptivas de la combinación de ácido acrílico y lecitina hacen también que este sea un mecanismo excelente para facilitar la adsorción del antígeno vacunal sobre las superficies mucosas. Las propiedades de absorción mejoradas del sistema adyuvante y de administración ayudan a poner el antígeno vacunal en contacto con el tejido linfático asociado a la mucosa. Por lo tanto, se genera una respuesta inmunitaria que facilitará la protección de un animal frente a procesos infecciosos o de enfermedad. Una respuesta inmunitaria robusta de la mucosa es crítica, ya que la mayoría de los organismos causantes de enfermedades infecciosas tienen acceso al animal a través de las superficies mucosas. Esta invención puede usarse también como adyuvante para vacunas inyectables.

[0059] La vacuna que comprende el adyuvante se administra a una superficie mucosa por aplicación directa, ingestión a través de la cavidad oral, inserción, inyección y por medio de otros procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Alternativamente, el adyuvante puede administrarse también como un inyectable convencional, el cual es típicamente una disolución o una suspensión líquida. Si se administra en el alimento o la bebida como vehículos, la composición de adyuvante/vacuna de esta invención se incluye generalmente en la composición vehículo en una concentración en el intervalo de aproximadamente el 0,0001 al 10% en peso/volumen (p/v) en el caso de la bebida como vehículo y en peso/peso (p/p) en el caso del alimento como vehículo, en lo que se prefiere de aproximadamente el 0,01 al 1,0% p/v o p/p, respectivamente. Si se administra como inyectable, la composición de adyuvante/vacuna debe estar presente en una concentración en el intervalo de aproximadamente el 0,02 al 2,0% en peso, en lo que se prefiere de aproximadamente el 0,1 al 0,5% en peso.

[0060] El adyuvante/vacuna puede administrarse también en otras formas de dosificación sólidas convencionales como comprimidos, cápsulas, gránulos, pastillas para chupar y supositorios vaginales o rectales. Si se administra en una forma de dosificación sólida, la composición de adyuvante/vacuna deberá constituir entre el 0,0001 y el 10% en peso de la forma de dosificación, en lo que se prefiere de aproximadamente el 0,01 al 1,0% en peso.

[0061] Además de los compuestos activos, las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener excipientes y auxiliares adecuados que faciliten el procesamiento de los compuestos activos para obtener preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. Las formas de dosificación oral abarcan comprimidos, cápsulas y gránulos. Las preparaciones que pueden administrarse por vía rectal incluyen supositorios. Otras formas de dosificación incluyen disoluciones adecuadas para administración por vía parenteral u oral y composiciones que pueden administrarse por vía bucal o sublingual.

[0062] Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se preparan de manera bien conocida en sí misma en la técnica. Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden llevarse a cabo por procedimientos de mezcla convencional, granulado, disolución o liofilización. Los procedimientos que se usen dependerán en último término de las propiedades físicas del principio activo usado.

[0063] Los excipientes adecuados son, en particular, cargas como azúcares, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo fosfato de tricalcio o hidrogenofosfato de calcio, así como aglutinantes como pasta de almidón, a partir de almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona. Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, como los almidones mencionados anteriormente, así como carboximetilalmidón, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo, como alginato de sodio. Otros auxiliares son agentes reguladores de la fluencia y lubricantes, por ejemplo, como sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, como estearato de magnesio o estearato de calcio y/o polietilenglicol. Las formas de dosificación oral pueden proporcionarse con recubrimientos adecuados que, si se desea, pueden ser resistentes a los jugos gástricos.

[0064] Para este fin pueden usarse disoluciones concentradas de azúcares que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Para producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos pueden añadirse disoluciones de preparaciones de celulosa adecuadas, como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa a los recubrimientos de los comprimidos, y colorantes y pigmentos por ejemplo, para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de los compuestos.

[0065] Otras preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas hechas de gelatina y un plastificante como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los compuestos activos en forma de gránulos que pueden estar mezclados con cargas como lactosa, aglutinantes como almidones y/o lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas los compuestos activos están preferentemente disueltos o suspendidos en líquidos adecuados como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además pueden añadirse estabilizantes. Las preparaciones farmacéuticas posibles que pueden usarse por vía rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que constan de una combinación de los compuestos activos con la base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, hidrocarburos parafínicos, polietilenglicoles o alcanoles superiores. Además, también es posible usar cápsulas rectales de gelatina que constan

de una combinación de los compuestos activos con una base. El material de base posible incluye, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles o hidrocarburos parafínicos.

[0066] Las formulaciones adecuadas para administración por vía parenteral incluyen disoluciones acuosas de compuestos activos en forma soluble en agua o dispersable en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden administrarse como suspensiones de inyecciones oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones de inyecciones acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, como por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. Tales composiciones pueden comprender también adyuvantes, como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Las composiciones también pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias o por incorporación de agentes esterilizantes en las composiciones. También pueden prepararse en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o suspenderse en agua estéril, disolución salina u otro medio inyectable antes de la administración.

[0067] Además de la administración con vehículos convencionales, los principios activos pueden administrarse por diversas técnicas especializadas de administración de fármacos conocidas por los expertos en la materia, como las bombas de infusión portátiles.

[0068] El adyuvante de lecitina/polímero de esta invención desempeña diversas funciones cuando se administra por vía oral en el alimento y el agua: 1) protege al antígeno vacunal de la degradación por el ácido gástrico y las enzimas digestivas; 2) transporta el antígeno a las superficies mucosas; 3) facilita la adsorción del antígeno sobre las superficies mucosas; 4) mejora la absorción del antígeno; y 5) mejora la respuesta inmunitaria al antígeno debido a las propiedades adyuvantes de los dos componentes. En el caso de la administración a la mucosa nasal, de la cavidad oral, vaginal y rectal, el complejo de lecitina/polímero acrílico funciona como sistema para la administración y adsorción del antígeno a la superficie mucosa. Una vez adsorbido sobre la superficie mucosa y absorbido se genera una respuesta inmunitaria.

[0069] Inesperadamente, la combinación de polímero y lecitina de esta invención proporciona un sistema de administración de vacunas mejorado para antígenos vacunales. Es evidente que la invención es también un sistema mejorado para la administración de fármacos como hormonas, antibióticos y antivíricos. La presente invención proporciona un procedimiento más sencillo y eficiente para la incorporación del antígeno en un sistema de administración sin daños o con daños mínimos para los epítomos vacunales. La formulación de la vacuna puede llevarse a cabo con bajo coste y puede comercializarse fácilmente como aditivo para el alimento o el agua o como una pasta o comprimido oral. Ha de entenderse que estas formulaciones también serían efectivas en la administración del antígeno a otras superficies mucosas, como las superficies nasal, rectal y vaginal y serían efectivas como adyuvante para una vacuna inyectable. Además, las propiedades hidrófobas que facilitan la adsorción del adyuvante y el antígeno vacunal sobre las superficies mucosas proporcionan también una forma de aplicación a los alimentos animales, ya sean follaje vegetal o semillas, ambos de los cuales tienen una superficie de cera hidrófoba.

[0070] La presente invención difiere de la técnica anterior en que comprende una mezcla de lecitina y un polímero o copolímero acrílico. La invención proporciona algunas ventajas respecto a otros sistemas de administración vacunal descritos en la técnica anterior. No se prepara en condiciones rigurosas que perjudican a la sustancia, como el uso de disolventes orgánicos. No requiere elevadas temperaturas para su preparación, ni tampoco una etapa de estabilización. La invención proporciona un procedimiento más sencillo de incorporación del antígeno con un daño mínimo para los epítomos vacunales. El uso de este procedimiento de preparación más sencillo resulta en un bajo coste y facilidad de comercialización.

[0071] Los ejemplos siguientes tienen el propósito de ilustrar adicionalmente la invención y sus realizaciones preferidas.

EJEMPLO 1

Efectividad de la vacuna más el adyuvante

[0072] Se preparó una vacuna experimental con la fracción V de la albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, San Luis, MO, EE. UU.) como antígeno modelo no viviente, lecitina (Centrox P, Central Soya, Fort Wayne, IN, EE. UU.) y una resina polimérica de ácido acrílico (Carbopol 934P, B.F. Goodrich, Cleveland, OH, EE. UU.). Se preparó una segunda vacuna que solamente contenía BSA.

[0073] La lecitina y el polímero acrílico se suspendieron conjuntamente en 150 mililitros (ml) de tampón fosfato salino (PBS), cada uno a una concentración de 4 miligramos (mg) por mililitro (ml). Los componentes se dispersaron primeramente por agitación con una barra agitadora magnética y después se mezclaron adicionalmente en un mezclador Waring con un cabezal emulsionador. La mezcla se autoclavó después para esterilizar la mezcla adyuvante. La albúmina de suero bovino se disolvió en PBS a una concentración de 2 mg/ml y se esterilizó por

filtración. Una parte de adyuvante de lecitina/polímero acrílico se combinó entonces con una parte de BSA. Como conservante se añadió mertiolato (0,01%). La concentración final de los componentes de la vacuna fueron 2 mg/ml de lecitina/polímero acrílico y 1 mg/ml de BSA.

5 **[0074]** A ratones CF-1 hembra de aproximadamente 18 gramos, de los laboratorios Charles River (Wilmington, MI, EE. UU.) se les inyectaron por vía subcutánea en la zona de la ingle 0,1 ml de la vacuna (0,1 mg de BSA por dosis) en los días 0 y 21. En el día 45, 24 días después de la segunda vacunación, se recogió la sangre de los ratones. La sangre se recogió mediante el corte de la arteria braquial después de la eutanasia de los ratones por dislocación cervical.

10 **[0075]** Los títulos de anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) dirigidos contra BSA en el suero sanguíneo se determinaron por un ensayo de inmunoadsorción (ELISA). Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de los títulos de anticuerpos

Grupo adyuvante	Número de ratones	Recíproco de la media geométrica del título
Ninguno	8	51.200
Lecitina/polímero acrílico	8	157.916

15 **[0076]** Los resultados demuestran que el adyuvante que comprende una combinación de lecitina y un polímero acrílico mejora de hecho la respuesta inmunitaria a un antígeno.

20 **EJEMPLO 2**

Comparación de adyuvantes vacunales individuales administrados por vía oral

25 **[0077]** Se prepararon vacunas experimentales en PBS para su administración por vía oral. Las vacunas comprendían el antígeno, la fracción V de BSA, a una concentración de 400 microgramos (μg) por ml. La vacuna 1 no contenía ningún adyuvante, solo BSA. La vacuna 2 estaba compuesta de BSA mezclada con 3 mg/ml de lecitina, Centrolax P. La vacuna 3 estaba compuesta de BSA mezclada con 3 mg/ml del polímero acrílico, Carbopol 934P. La vacuna 4 estaba compuesta de BSA mezclada con 3 mg/ml de lecitina (Centrolax P) y 3 mg/ml de polímero acrílico (Carbopol 934P). La mezcla se realizó primeramente con una barra agitadora magnética para la mesa del laboratorio y después en un mezclador Waring con un cabezal emulsionador. A todas las vacunas se les añadió un cultivo de *Lactobacillus* inmediatamente antes de la vacunación. La concentración final de *Lactobacillus* fue de 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vacuna. En los días 0, 4, 29 y 33 se administraron 0,5 ml de la vacuna por vía oral con una aguja de alimentación a los grupos de ratones CF-1 hembra de los laboratorios Charles River con un peso aproximado de 18 gramos. En el día 53, 20 días después de la cuarta vacunación, los ratones se sometieron a eutanasia y la sangre se recogió de la arteria braquial. Los títulos finales de anticuerpos IgG dirigidos contra BSA en el suero se determinaron por ELISA. Se usó una dilución inicial 1/100 de suero debido al desarrollo de color de fondo inespecífico a diluciones inferiores a 1/100. Los resultados se presentan en la tabla 2:

Tabla 2. Efecto de la composición adyuvante en la respuesta de anticuerpos dirigidos contra BSA

Composición adyuvante	N° de ratones con título $\geq 1/100$ (%)	Recíproco de la media geométrica de ratones con títulos
Ninguna	3/9 (33)	158
Lecitina	4/6 (67)	141
Polímero acrílico	6/9 (67)	8.063
Lecitina y polímero acrílico	6/9 (67)	45.614

40 **[0078]** Los títulos de anticuerpos IgG dirigidos contra BSA fueron más de cinco veces mayores al usar una combinación de lecitina y polímero acrílico como adyuvante que al usar solo el polímero acrílico y 323 mayores que al usar solo lecitina. Esto demuestra que la combinación de lecitina y polímero acrílico es mucho más efectiva en la administración del antígeno por vía oral a la superficie mucosa para su absorción por el tejido linfático que tanto la lecitina como el polímero acrílico en solitario. Aunque no todos los ratones mostraron una respuesta de anticuerpos IgG dirigidos contra BSA en el suero, los resultados demuestran claramente un efecto adyuvante sinérgico de la lecitina combinada con el polímero acrílico. Sin embargo, los ratones que no experimentaron una seroconversión pueden haber presentado una respuesta de anticuerpos IgA secretores. De hecho, la vacunación por vía oral y la vacunación por vía mucosa, en general, estimulan las células que segregan IgA en las superficies mucosas.

50 **EJEMPLO 3**

Segundo ensayo del adyuvante de lecitina/polímero por la vía oral

55 **[0079]** Se prepararon dos vacunas en PBS que comprendían el antígeno, la fracción V de BSA, a una concentración de 400 μg por ml. Una vacuna no contenía ningún adyuvante, solo BSA. La otra vacuna estaba

compuesta de BSA con 3 mg/ml de lecitina (Centrollex P) y 3 mg/ml de polímero acrílico (Carbopol 934P) como adyuvantes. La vacuna se preparó según se describe en el ejemplo 2. En los días 0, 4, 27 y 31 se administraron 0,5 ml de la vacuna por vía oral con una aguja de alimentación a los grupos de ratones CF-1 hembra de los laboratorios Charles River con un peso aproximado de 18 gramos. En el día 52, 21 días después de la vacunación, los ratones se sometieron a eutanasia y la sangre se recogió de la arteria braquial. Los títulos finales de anticuerpos IgG dirigidos contra BSA en el suero se determinaron por ELISA. Se usó una dilución inicial 1/100 de suero debido al desarrollo de color de fondo inespecífico a diluciones inferiores a 1/100. Los resultados se presentan en la tabla 3:

Tabla 3. Resultados comparativos de adyuvante respecto a control

Composición adyuvante	N° de ratones con título \geq 1/100 (%)	Recíproco de la media geométrica de ratones con títulos
Ninguna	1/12 (8)	100
Lecitina y polímero acrílico	9/11 (82)	18.812

[0080] De nuevo, este estudio demuestra que la combinación de lecitina y polímero acrílico es efectiva para la administración de antígenos a las superficies mucosas orales.

[0081] En un estudio independiente, 4/10 ratones que habían recibido esta misma vacuna presentaron una media geométrica del título de 1/1.345 seis semanas después de una única vacunación. Esto demuestra el potencial de la composición adyuvante, una vez optimizada, para generar una respuesta inmunitaria de larga duración.

EJEMPLO 4

Administración de una vacuna por vía intranasal

[0082] Se prepararon dos vacunas experimentales en PBS para su administración por vía intranasal, que comprendían el antígeno BSA a una concentración de 500 μ g/ml. Una vacuna estaba compuesta solo de BSA. La segunda vacuna estaba compuesta de BSA con una combinación de 3 mg/ml de lecitina (Centrollex P) y 3 mg/ml del polímero acrílico, Carbopol 934P, como adyuvantes. La lecitina y el polímero acrílico se mezclaron primeramente con una barra agitadora magnética para la mesa del laboratorio y después en un mezclador Waring con un cabezal emulsionador. Después se añadió el BSA y se volvió a mezclar con el cabezal emulsionador. Los ratones se vacunaron en los días 0 y 20. Un volumen de 40 μ l que contenía 20 μ g de BSA se aplicó a la nariz mientras la boca se mantenía cerrada. Al inhalar el ratón, la vacuna penetró en la nariz. En el día 41, 21 días después de la segunda vacunación, los ratones se sometieron a eutanasia y la sangre se recogió mediante el corte de la arteria braquial. Los títulos de anticuerpos dirigidos contra BSA se determinaron por ELISA. La dilución inicial del suero fue de 1/100 debido al desarrollo de color de fondo inespecífico a diluciones inferiores. Los resultados se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Resultados comparativos de adyuvante respecto a control

Composición adyuvante	N° de ratones con título \geq 1/100 (%)	Recíproco de la media geométrica de ratones con títulos
Ninguna	0/11 (0%)	0
Lecitina y polímero acrílico	7/12 (58%)	269

[0083] Ninguno de los ratones (0/11) vacunados solamente con BSA experimentó una seroconversión. El antígeno BSA solo, administrado por vía intranasal no consiguió estimular una respuesta de anticuerpos en el suero en ninguno de los ratones. En comparación, 7 de 12 ratones, o el 58%, desarrollaron títulos de anticuerpos IgG dirigidos contra BSA en el suero tan elevados como 1/3.200 después de la vacunación por vía intranasal con BSA en combinación con la invención, compuesta de lecitina y un polímero acrílico. El hecho de que no todos los ratones experimentaran una seroconversión sugiere que estos ratones que no presentaron un título mayor que 1/100 no inhalaban la suficiente vacuna o, quizás, nada de ella. De hecho, se observó que algo de la vacuna o quizás la mayor parte, resbaló fuera de la nariz o fue expulsada de esta al exhalar el ratón. Aún así, los resultados de este estudio muestran que la invención, compuesta de lecitina y un polímero acrílico, funciona efectivamente como un adyuvante para la administración de un antígeno vacunal por vía intranasal.

EJEMPLO 5

Uso del adyuvante con la vacuna en cerdos

[0084] El adyuvante con una combinación de 2 mg/ml de lecitina (Centrollex P) y 2 mg/ml de un polímero acrílico (Carbopol 934P) se usó como diluyente para el virus de la pseudorrabia vivo modificado (ML-PRV) para cerdos. Este adyuvante como diluyente y un diluyente de control compuesto de agua estéril se usaron para rehidratar ML-PRV liofilizado. El ML-PRV se rehidrató inmediatamente antes de la vacunación. Se vacunaron grupos de 10 lechones destetados de 6 semanas de edad en los días 0 y 21. El suero sanguíneo se recogió en los días -2, 20, 28 y 48 para detectar serológicamente anticuerpos neutralizantes dirigidos contra PRV en el suero. Las respuestas de anticuerpos dirigidos contra PRV de los lechones en los distintos grupos de vacunación se muestran

en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados en cerdos

Adyuvante como diluyente	Media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes del virus en los días indicados después de la primera vacunación			
	Día 2	Día 20	Día 28	Día 48
Control sin vacunar	0	0	0	0
Agua	0	4	34	21
Lecitina/polímero acrílico	0	6	69	52

- 5 **[0085]** Este estudio demostró que el adyuvante que comprende una combinación de lectina y un polímero acrílico funciona como adyuvante para un virus vacunal ML, en este caso el virus vacunal ML de la pseudorrabia porcina. El título de anticuerpos neutralizantes del virus dirigidos contra PRV para ML-PRV, que es en sí mismo un antígeno muy bueno sin adyuvantes y se usa comercialmente sin adyuvantes, fue dos veces superior al usar la lecitina/polímero acrílico en lugar de agua.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un antígeno vacunal y un adyuvante, en que el adyuvante comprende lecitina y un polímero; en que el polímero se selecciona entre un polímero acrílico, un copolímero acrílico y mezclas de los mismos; y en que el adyuvante se prepara por un procedimiento que comprende las etapas de:
- 5 hidratación de la lecitina y el polímero en disolución salina o en agua y
- mezcla de la lecitina y el polímero para formar el adyuvante;
- 10 en que la mezcla de la lecitina y el polímero forma una matriz o estructura reticular.
2. Una composición según la reivindicación 1, en que la lecitina y el polímero están en una relación de 1:10 a 10:1
- 15 3. Una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en que el polímero es un polímero acrílico seleccionado entre: ácido poliacrílico, ácido metacrílico, metacrilato, acrilamida, acrilato, acrilnitrilo, poli(acrilamida-co-metacrilato de butilo), ácido acrílico-metacrílico, acrilato-acrilamida, poli(metacrilato) y ésteres alquílicos de ácido poliacrílico.
- 20 4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que incluye polímeros acrílicos que están reticulados.
5. Una composición según la reivindicación 4, en que los polímeros acrílicos reticulados están reticulados con un reticulante seleccionado entre: un poliéter de polialqueno y una alquilsacarosa.
- 25 6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que las concentraciones de la lecitina y el polímero en la composición son en cada caso del 0,0001 al 10% en peso.
- 30 7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que la concentración de la lecitina y el polímero en la composición es en cada caso del 0,001 al 1,0% en peso.
8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que el antígeno vacunal comprende una sustancia inactiva o atenuada seleccionada entre: bacteriana, vírica, parasítica, ADN y subunidades estructurales de estos organismos.
- 35 9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende además una sustancia seleccionada entre: conservantes, tensioactivos y probióticos.
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que incluye además uno o más ingredientes secundarios en una concentración en el intervalo del 0,001 al 1,0% en peso.
- 40 11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende además un reticulante para unir el antígeno al adyuvante.
- 45 12. Una composición según la reivindicación 11, en que el reticulante comprende un compuesto seleccionado entre: glutaraldehído, carbodiimida, anhídrido mixto y becídina bisdiazotada.
- 50 13. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que incluye además un adyuvante adicional seleccionado entre: saponinas, fracciones de saponinas, fracciones de saponinas sintetizadas, ISCOM, polioles plurónicos, dipéptido de muramilo, dimicolato de trehalosa, derivados de lipopolisacáridos y citocinas.
14. Una composición según la reivindicación 13, en que el adyuvante adicional está presente en una concentración de hasta el 10% en peso de la composición.
- 55 15. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que está liofilizada.
16. Un adyuvante que comprende lecitina y un polímero; en que el polímero se selecciona entre un polímero acrílico, un copolímero acrílico y mezclas de los mismos; en que el adyuvante se prepara por un procedimiento que comprende las etapas de:
- 60 hidratación de la lecitina y el polímero en disolución salina o en agua y
- mezcla de la lecitina y el polímero para formar el adyuvante, en que la mezcla de la lecitina y el polímero forma una matriz o estructura reticular.

17. Un adyuvante según la reivindicación 16, en que la lecitina y el polímero están en una relación de 1:10 a 10:1.
18. Un procedimiento para la preparación de un adyuvante según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en que dicho procedimiento comprende las etapas de:
- 5 hidratación de la lecitina y el polímero en disolución salina o en agua y
- mezcla de la lecitina y el polímero para formar el adyuvante.
19. Un procedimiento según la reivindicación 18, en que la lecitina y el polímero se mezclan poniendo la lecitina y el polímero en un mezclador.
- 10 20. Un procedimiento según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en que la lecitina y el polímero se mezclan en presencia de tensioactivos.
- 15 21. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 que incluye además la etapa de someter el adyuvante a microondas o a autoclavado.
22. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en que se hidratan del 0,001 al 10% en peso de lecitina seca y del 0,001 al 10% en peso de polímero.
- 20 23. Un procedimiento para la preparación de una composición que comprende un antígeno vacunal y un adyuvante, en que dicho procedimiento comprende un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 y que incluye además la etapa de adición del antígeno.
- 25 24. Un procedimiento según la reivindicación 23, en que el antígeno se añade durante la etapa de hidratación.
25. Una composición según la reivindicación 1 para usar en un procedimiento para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.
- 30 26. Uso de un antígeno vacunal y un adyuvante para la preparación de una vacuna para la inducción de una respuesta inmunitaria al antígeno en un humano o un animal por administración por vía mucosa, en que el adyuvante comprende lecitina y un polímero; en que el polímero se selecciona entre un polímero acrílico, un copolímero acrílico y mezclas de los mismos; y en que el adyuvante se prepara por un procedimiento que comprende las etapas de:
- 35 hidratación de la lecitina y el polímero en disolución salina o en agua y
- mezcla de la lecitina y el polímero para formar el adyuvante; en que la mezcla de la lecitina y el polímero forma una matriz o estructura reticular.
- 40 27. Uso según la reivindicación 26, en que la lecitina y el polímero están en una relación de 1:10 a 10:1.
28. Uso según la reivindicación 26 o la reivindicación 27, en que la administración de la vacuna por vía mucosa es la administración a una superficie mucosa seleccionada entre: las superficies mucosas de la cavidad oral, intestinales, nasales, vaginales y rectales.
- 45 29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en que la vacuna se incluye en un alimento o una bebida.
- 50 30. Uso según la reivindicación 29, en que la composición de alimento o bebida comprende la vacuna en una concentración del 0,0001 al 5,0% en peso.
31. Uso según la reivindicación 29, en que la composición de alimento o bebida comprende la vacuna en una concentración del 0,01 al 1,0% en peso.
- 55 32. Uso según un cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en que la vacuna está en una forma de dosificación seleccionada entre: comprimido, cápsula, gránulos, suspensión, disolución, supositorio y pastilla para chupar.
- 60 33. Uso según la reivindicación 32, en que la forma de dosificación comprende la vacuna en una concentración del 0,0001 al 5,0% en peso.

34. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en que la vacuna está en una forma de dosificación que es una formulación inyectable.

35. Uso según la reivindicación 34, en que la forma de dosificación comprende la vacuna en una concentración de aproximadamente el 0,2 al 2,0% en peso.