

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 267**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06710759 .9**
96 Fecha de presentación: **26.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1843787**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2007**

54 Título: **COMBINACIÓN DE LÍPIDOS Y DE ÓXIDO NITROSO COMO ADYUVANTE PARA POTENCIAR DE LA EFICACIA DE VACUNAS.**

30 Prioridad:
28.01.2005 ZA 200500856

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
**NORTH-WEST UNIVERSITY
1 HOFFMAN STREET, JOON VAN ROOY
BUILDING
2531 POTCHEFSTROOM, ZA**

72 Inventor/es:
**GROBLER, Anne y
KOTZE, Abraham Frederik**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 267 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

Combinación de lípidos y de óxido nitroso como adyuvante para potenciar de la eficacia de vacunas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas (expresión que, en el presente documento, se pretende que incluya preparaciones veterinarias) para usar en la prevención de enfermedades mediante inoculación contra organismos infecciosos que afectan al cuerpo del animal (expresión que, en el presente documento, se pretende que incluya el cuerpo humano).

Antecedentes de la invención

10 En el documento EP93912877.3 y la patente de EE.UU. 5,633,284 y sus equivalentes se divulga que las composiciones dermatológicas o tópicas que comprenden la combinación de óxido nitroso [N₂O] al menos un ácido graso, o éster de alquilo inferior del mismo, en un medio vehículo dermatológicamente aceptable, son útiles en el tratamiento de varias enfermedades de piel, de músculo y de articulaciones. En ellos también se divulga que dichas combinaciones podrían incluir de forma beneficiosa también ingredientes activos adicionales. A este respecto, se mencionan específicamente los siguientes ingredientes activos: solución de alquitrán, colágeno, nicotinamida, ácido nicotínico, lanolina, vitamina E, salicilato de metilo, árnica y antihistamínicos antagonistas de H₁, de los que sólo se menciona específicamente el cloruro de difenhidramina. En el documento WO97/17978 y la patente de EE.UU. 6,221,377 y sus solicitudes y patentes correspondientes se divulga además que la acción de fármacos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos se puede potenciar administrando dichos fármacos junto con un medio que comprende óxido nitroso y al menos un ácido graso de cadena larga seleccionado del grupo que consiste en ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma linolénico, ácido araquidónico y cualquiera de los ésteres de alquilo de C₁ a C₆ de dichos ácidos grasos de cadena larga, mezclas de dichos ácidos y mezclas de dichos ésteres. El medio puede comprender la mezcla conocida como éster etílico de vitamina F y, opcionalmente, además puede comprender ácido eicosapentanoico [C20:5 ω 3] y ácido decosahecanoico [C22:6 ω 3].

25 En el documento WO 02/05850 se divulga que el efecto de fármacos anti-infecciosos se puede potenciar mediante la formulación de los mismos en el mismo medio vehículo.

En el documento WO 02/05851 se divulga que el efecto de agentes conocidos que afectan al sistema nervioso central y/o periférico se puede potenciar forma similar mediante su formulación en el mismo medio vehículo.

En el documento 02/05849 se divulga que el mismo medio vehículo puede usarse de forma beneficiosa para el transporte de compuestos de ácido nucleico a través de las membranas celulares.

30 Los antígenos para usar en la formación de vacunas no están entre los ingredientes activos mencionados en las patentes y solicitudes de patentes mencionadas anteriormente que son capaces de formularse con un efecto beneficioso con la ayuda del medio vehículo divulgado.

35 No se habría entendido que las divulgaciones mencionadas anteriormente sugieren que la combinación de óxido nitroso y ácido graso tiene alguna contribución de adyuvante en el efecto preventivo contra enfermedades causadas por agentes infecciosos. Dentro del contexto de la divulgación en la familia de patentes mencionadas anteriormente, más probablemente el destinatario citado habría entendido, como lo ha hecho el inventor, el papel de los agentes anti-infecciosos en el tratamiento de pacientes que ya sufren una infección.

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que el medio citado anteriormente y los medios relacionados pueden, por sí solos, actuar como adyuvante, de modo que potencian la inmunogenicidad de las vacunas conocidas.

40 Con el término "vacuna", como se usa en el presente documento, se pretende indicar su significado ampliado como compuesto(s) que contribuyen a la prevención de enfermedades infecciosas por cualquier procedimiento o mecanismo de sensibilización del cuerpo y que incluya formulaciones basadas en virus, basadas en péptidos, basadas en bacterias, basadas en VLP y basadas en compuestos sintéticos, pero excluirán los agentes anti-infecciosos usados para el tratamiento de la enfermedad.

45 La exclusión de agentes anti-infecciosos del ámbito de la presente invención se introduce sin por ello conceder que las patentes y solicitudes mencionadas anteriormente contienen ninguna divulgación de de propiedades preventivas algunas de dichos compuestos excluidos. . Cabe esperar que el grueso restante de la materia objeto de la presente invención contribuirá en gran medida a la accesibilidad de las vacunas para la prevención de un amplio abanico de infecciones, a costes significativamente reducidos en casos tales como la hepatitis B.

50 Con la expresión "vacuna terapéutica" también se pretende abarcar vacunas que sirven para prevenir y/o tratar una infección existente provocando y/o potenciando una respuesta inmunitaria específica frente al agente infeccioso sin el uso de agentes antimicrobianos, antifúngicos o antivirales. Por tanto, se pretende que la expresión se entienda en el sentido más amplio de la respuesta inmunitaria, es decir todos los compuestos que contribuyen a producir o potenciar una respuesta inmunitaria contra organismos microscópicos y submicroscópicos. Con este término se

pretende además incluir específicamente todos los antígenos o agentes nativos y sintéticos que entran dentro de la clase 26 (agentes biológicos) de la clasificación farmacológica empleada en el Índice Mensual de Especialidades Médicas ("MIMS") publicado por Times Media en Sudáfrica. Por tanto, se pretende incluir:

- 5 vacunas antibacterianas;
 vacunas antifúngicas;
 vacunas antivirales (incluidas vacunas antirretrovirales);
 agentes anti-protozoicos; y
 y vacunas anti-espiroquetas.

10 El hallazgo de la capacidad de adyugar de los medios mencionados anteriormente se hace contra la base del hecho de que parece no haber una sugerencia anterior en la literatura del efecto de que el propio óxido nitroso o la adición de óxido nitroso a los ácidos grasos de cadena larga usados en la formulación a la que se ha hecho referencia anteriormente, tiene un efecto estimulador adicional sobre la inmunogenicidad de las vacunas.

15 El hallazgo de la capacidad de adyugar de los medios mencionados anteriormente se hace contra la base del hecho de que parece no haber una sugerencia anterior en la literatura del efecto de que el propio óxido nitroso o la adición de óxido nitroso a los ácidos grasos de cadena larga usados en la formulación a la que se ha hecho referencia anteriormente, tiene un efecto estimulador adicional sobre la inmunogenicidad de las vacunas.

20 En los últimos años se ha producido un incremento del interés en el desarrollo de nuevos sistemas vacunales para fines profilácticos y terapéuticos. Las estrategias de formulación y el uso de adyuvantes que pueden afectar a la respuesta inmunitaria en términos cuantitativos y cualitativos han atraído gran parte de la atención de aquéllos familiarizados con los problemas en la liberación de fármacos. Los esfuerzos anteriores se han centrado en las vacunas parenterales y en el papel de las tecnologías de liberación controlada con énfasis en las microesferas biodegradables¹⁻³.

25 El objetivo principal de la vacunación es prevenir la enfermedad. Históricamente, la vacunación es la única estrategia que ha conducido a la eliminación de una enfermedad viral, concretamente la viruela. Aunque la biología de la mayoría de los patógenos es menos favorable que la viruela al desarrollo de vacunas, algunas vacunas protegen, en grados variables, a seres humanos y animales contra patógenos relacionados. Se ha observado una relación indirecta entre la inmunogenicidad de la vacuna y la seguridad. Las respuestas inmunitarias humanas a las vacunas peptídicas sintéticas y recombinantes administradas con adyuvantes convencionales tienden a ser malas, por lo que existe la urgente necesidad de adyuvantes eficaces para vacunas para potenciar la inmunogenicidad y las propiedades inmunoestimulantes de las vacunas, aunque incluso vacunas imperfectas podrían proporcionar salud pública y beneficios económicos, además de mayores conocimientos para las estrategias preventivas y terapéuticas. Aunque los microbicidas pueden ampliar útilmente las opciones de prevención y servir como valiosos prototipos para el desarrollo de vacunas, no está claro que éstas se puedan liberar de forma sostenible a todas las personas en riesgo.

35 En general, las campañas vacunales dirigidas contra enfermedades tales como la hepatitis C han sido un fracaso en lo referente a afectar a la incidencia de la enfermedad. Para maximizar la salud pública y los beneficios económicos puede ser necesario apuntar a la inmunización universal de niños y animales jóvenes. Esto implica la necesidad de un nivel de seguridad extremadamente alto en comparación con las vacunas ampliamente usadas administradas a los niños de todo el mundo. Estas consideraciones han favorecido el uso de vacunas basadas en partes relativamente pequeñas de los patógenos.

40 Por supuesto, existe un potencial mucho mayor en las vacunas que se ha demostrado que son capaces de inducir respuestas inmunitarias potencialmente relevantes que en las que no lo son. Estudios con animales y mediciones de laboratorio de las respuestas inmunitarias humanas se pueden usar para proporcionar "correlaciones de protección" que aceleren investigaciones y desarrollo adicionales.

45 Las vacunas usan principalmente una forma no dañina del patógeno, o algún componente del mismo, para inducir una respuesta inmunitaria protectora que implique una o ambas ramas del sistema inmunológico: Inmunidad humoral y/o mediada por células. La inmunidad humoral se basa en anticuerpos y en las células B que los producen. Los anticuerpos reconocen una diana específica, normalmente una subparte de una proteína del organismo infeccioso. Los anticuerpos "neutralizantes" desempeñan un papel importante en la lucha contra las infecciones, mientras que las células T citotóxicas o CD8+ desempeñan un papel fundamental en la inmunidad mediada por células. Las células T citotóxicas pueden destruir la mayoría de las células infectadas por patógenos, que se identifican por la presencia de fragmentos muy pequeños de proteínas del patógeno que se muestran sobre la superficie de la célula, unidos a las proteínas celulares. Las células T colaboradoras (células CD4) reconocen fragmentos de patógenos que se muestran sobre la superficie de células presentadoras de antígeno (CPA) especializadas. Estas producen proteínas que activan las células B y/p las células T citotóxicas. Cuando el sistema inmunitario se activa mediante vacunación se producen células T de memoria y, en ocasiones, células B de memoria. Estas células permiten una rápida y eficaz respuesta inmunitaria cuando encuentran el patógeno, de modo que previenen la infección y/o la enfermedad.

Un obstáculo fundamental que ha evitado el desarrollo de programas eficaces de inmunización masiva es la incapacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora adecuada. Por ejemplo, para las vacunas contra patógenos intracelulares se requiere inmunidad mediada por células, caracterizada por la actividad de los linfocitos T citotóxicos. Tal respuesta puede ser extremadamente difícil de producir, especialmente mediante subunidades de proteínas solubles recombinantes. Esta deficiencia se debe a la incapacidad de estos antígenos para acceder a la maquinaria de la vía de procesamiento de antígeno adecuada. Tras una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes a dicho procesamiento, así como la realización de que los sistemas de liberación pueden afectar, cuantitativa y cualitativamente, a la respuesta inmunitaria resultante, la última década ha sido testigo de intensos esfuerzos de investigación en este campo⁴⁻⁸. Actualmente, las nuevas formulaciones contienen, en su mayoría, un vehículo que transporta los antígenos a las células presentadoras de antígeno.

Ejemplos de vehículos son, en general, particulados, por ejemplo emulsiones, micropartículas iscosm y liposomas, y emulsiones microfluidizadas de escualeno en agua⁴⁻⁸. La función principal de dichos sistemas de liberación es dirigir los antígenos diana asociados a las células presentadoras de antígeno (CPA), incluidos macrófagos y células dendríticas. Se ha demostrado que una serie de adyuvantes que son partículas de dimensiones definidas (<5 micrómetros) son eficaces en la potenciación de la inmunogenicidad de los antígenos débiles en modelos animales. Dos adyuvantes nuevos que poseen un potencial significativo para el desarrollo de vacunas nuevas incluyen una microemulsión de aceite en agua y micropartículas poliméricas.

La vía parenteral sigue siendo la vía más frecuente usada para la administración de antígenos. No obstante, la inducción de una reacción inmunitaria local eficiente depende de la presencia de patógenos de transmisión por aire o por alimentos en las superficies mucosas, cuya presencia puede dar lugar a la producción de anticuerpos neutralizantes. Además, los productos administrados mediante jeringuilla son, de forma inherente, más caros que los que se pueden tomar por boca o, por ejemplo, como un nebulizador nasal. El peligro de la reutilización de las agujas en los países subdesarrollados es un factor agravante.

Los tejidos de la mucosa ase topan con la mayoría de los antígenos que entran en el huésped y las infecciones del intestino, el tracto respiratorio y el tracto urogenital son la causa más frecuente de mortalidad y morbilidad en seres humanos². Con la vacunación en la mucosa, es posible estimular ambas ramas del sistema inmunitario y proporcionar respuestas tanto humoral (de anticuerpos) como mediada por células (linfocitos citotóxicos)¹. A pesar de la urgencia de una vacuna mucosa eficiente, su introducción sigue estando obstaculizada por la degradación de antígenos durante el transporte y la baja captación por el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). Para sortear estos problemas, los antígenos para la liberación de vacunas en la mucosa se pueden asociar con o co-administrar con un adyuvante que actúa de forma simultánea como sistema de liberación eficiente^{3,9}.

Dado que parte del MALT tiene sus propias barreras específicas, cada vía de administración tiene su propio sistema de liberación de vacunas. En primer lugar, la vacunación oral se complica debido a la degradación de los antígenos por el entorno ácido en el estómago y las enzimas del intestino. Además, los antígenos solubles no siempre son captados de forma eficiente por las células M del tejido linfoide asociado con el intestino (GALT). Atrapando el antígeno en adyuvantes microparticulados, el antígeno puede estar protegido contra la degradación en su camino al tejido de la mucosa y dirigido de forma eficiente a las células M y captado por ellas¹⁰⁻¹³.

La vacunación nasal se complica principalmente por el rápido aclaramiento del antígeno y la baja captación por el tejido linfoide asociado nasal (NALT). Para el transporte del antígeno a través de la barrera epitelial nasal se pueden seguir tres enfoques diferentes: co-administración del antígeno con un adyuvante que contribuye a la respuesta inmunitaria, pero es al mismo tiempo absorbible por la mucosa nasal, co-administración del antígeno con un potenciador de la absorción o atrapamiento en un sistema microparticulado para estimular las células M, que también están presentes en NALT, para internalizar el antígeno^{14,15}.

En el pasado se han explorado numerosas estrategias para producir respuestas inmunitarias protectoras. Estas incluyen:

- a) Vacunas atenuadas vivas- un patógeno defectuoso que no sería dañino para los sujetos; por ejemplo virus con delección de nef. Estos tipos de vacunas no son seguras de usar en algunos casos.
- b) Vacunas inactivadas o "muertas". Estas no se han evaluado del todo todavía en cuanto a su capacidad para proteger contra los patógenos. Por ejemplo, los virus de la exposición cultivados en células equivalentes a las del huésped y las cepas vacuinales pueden o no desprender sus proteínas de la cubierta durante la inactivación. Este tipo de vacuna se ilustra en el desarrollo de un virus de la rabia más eficaz.
- c) Vacunas con subunidades recombinantes – o vacunas peptídicas- buscan estimular anticuerpos frente al patógeno simulando las proteínas sobre su superficie (p. ej., la vacuna propuesta contra la hepatitis B). Las vacunas de subunidades investigadas hasta la fecha han sido específicas de cepa y han producido malas respuestas de anticuerpos. Reciente investigación sobre adyuvantes ha abierto nuevas áreas de investigación de vacunas con cubierta, con algunas vacunas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes eficaces contra una serie de cepas de patógenos.
- d) Vacunas de vectores recombinantes- incorporan genes o partes de genes del patógeno en vacunas establecidas usando sistemas de liberación. Los sistemas de liberación pueden incluir virus vivos pero no dañinos, tal como los virus la viruela del canario. Se ha demostrado que las vacunas de vectores producen

respuestas de células T citotóxicas específicas de patógeno en los sujetos. Estas pueden potenciarse con sensibilización con vacuna de ADN.

e) Vacunas de ADN y replicones- implican secuencias genéticas inyectadas en los sujetos para inducir la expresión de antígenos por las células. En el caso de los replicones, estas secuencias están envueltas en una

f) Vacunas de combinación o “vacunas de sensibilización y refuerzo”. Estas entrañan estrategias para la combinación de os o mas vacunas diferentes para ampliar o intensificar las respuestas inmunitarias. Ejemplos incluyen un vector con un antígeno para sensibilizar una respuesta de células T con un refuerzo de subunidad para producir anticuerpos o liberación de ADN, seguido de un vector con genes o secuencias génicas que expresan el(los) mismo(s) gen(es) o secuencia(s) génica(s). Es posible que dos vacunas diferentes se administren al mismo tiempo, de modo que una actúa más rápidamente que la otra. Esto tendría como resultado un efecto de “sensibilización-refuerzo” a partir de una única dosis.

g) un reciente desarrollo importante en el diseño de vacunas es el uso de genes sintéticos para maximizar su expresión en las células humanas. Esta técnica se ha usado en el diseño de vacunas para el VIH que potencian las respuestas inmunitarias en animales y, en la actualidad, al menos tres vacunas que usan esta técnica han entrado en estadios tempranos de los ensayos clínicos. Es importante darse cuenta de que las pruebas de las respuestas inmunitarias en sujetos no necesariamente significan que la vacuna evita la infección. La prevención de la infección se tiene que confirmar en ensayos animales y humanos. Los problemas indicados anteriormente asociados con las vacunas han conducido a las investigaciones asociadas con la presente invención.

La tecnología basada en ácidos grasos/óxido nitroso comprende una única formulación de tipo emulsión de submicrómetros dentro de la que se forman estructuras vesiculares o partículas estables. Se ha destacado en, entre otros, el documento WO97/17978 al que se ha hecho referencia anteriormente, que el óxido nitroso es un gas natural que también se produce sintéticamente, que también se conoce con el nombre trivial de “gas de la risa”, y que se ha estado usando durante muchos años como anestesia y analgésico inhalados, particularmente en odontología.

Se sabe que el óxido nitroso es soluble en agua y se ha notificado que, a 20 °C y a 2 atmósferas de presión, un litro del gas se disuelve en 1,5 litros de agua, véase The Merck Index 10th Ed. p. 6499.

No parece que haya ninguna sugerencia en la literatura, aparte de en las patentes y solicitudes de patentes a las que se ha hecho referencia anteriormente, las soluciones de óxido nitroso podrían tener algún efecto sobre el hombre o animales. Por lo que el presente solicitante tiene entendido, asimismo, nunca se ha sugerido que el óxido nitroso se pueda usar junto con los ácidos grasos como adyuvante para potenciar la respuesta inmunitaria contra enfermedades específicas del antígeno.

En el campo farmacéutico, se sabe que los antígenos se pueden formular en las denominadas formulaciones basadas en lípidos. Ninguna de estas formulaciones basadas en lípidos se usa en combinación con óxido nitroso, al contrario que la presente invención en la que la combinación de óxido nitroso y ácidos grasos y ésteres de los mismos forma la base del sistema adyuvante en microemulsión. Como se mostrará más adelante, la investigación ha confirmado el papel esencial del óxido nitroso en la estimulación de la respuesta inmunitaria. La combinación de de óxido nitroso y ácidos grasos como adyuvante para vacunas de acuerdo con la presente invención tal como se describe en el presente documento muestra diferencias significativas con las basadas en solo los ácidos grasos.

Objeto de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar preparaciones farmacéuticas, como se define en las reivindicaciones, de dichos adyuvantes junto con antígenos cuyas preparaciones tienen como resultado una respuesta inmunológica potenciada específica, tal como un incremento de los anticuerpos neutralizantes específicos, en comparación con la acción de formulaciones adyuvantes conocidas que contienen los mismos antígenos.

Afirmaciones de la invención

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una preparación farmacéutica adecuada para usar como vacuna, que comprende un antígeno, que está formulado con un adyuvante, en el que el adyuvante comprende una solución de óxido nitroso en un disolvente vehículo farmacéuticamente aceptable para el gas y que incluye al menos un ácido graso o éster u otro derivado adecuado del mismo seleccionado del grupo que consiste en ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico [C20: 5w3], ácido decosahexaenoico [C22: 6w3], ácido ricinoleico y los derivados de los mismos seleccionados del grupo que consiste en los ésteres de alquilo de C1 a C6 de los mismos, los ésteres glicerol-poliethylenglicol de los mismos y el producto de la reacción de aceites naturales hidrogenados compuestos en su mayor parte por aceites basados en ácido ricinoleico, tales como aceite de ricino, con óxido de etileno.

El antígeno se puede seleccionar del grupo constituido por todos los posibles antígenos.

En una forma preferida de la invención, los antígenos usados en el procedimiento o formulación pueden comprender uno cualquiera o más de los diferentes tipos de antígenos como se ha definido en el presente documento,

concretamente: péptidos, virus inactivados, bacterias inactivadas y partículas similares a virus (VLP) o cualquier combinación de los mismos.

- 5 El antígeno puede ser cualquier antígeno adecuado para producir una respuesta inmunogénica contra el agente causal de una dolencia, o infección por un agente, seleccionado del grupo que consiste en: Bacilo de Calmette-Guérin, de cólera, Haemophilus de tipo B, meningococos, Pertussis, neumococos, tétanos, tífus, difteria, hepatitis A, hepatitis B, gripe, sarampión, paperas, poliomielitis, rabia, rubeola, encefalitis transmitida por garrapatas, varicela y fiebre amarilla.

Por tanto, la invención se refiere a los siguientes tipos de vacunas:

- 10 Vacunas bacterianas
 Vacuna contra el bacilo de Calmette-Guérin
 Vacuna percutánea contra el bacilo de Calmette-Guérin
 Vacuna contra el cólera
 Vacuna conjugada contra Haemophilus tipo B
 Vacuna contra el polisacárido meningocócico
- 15 Vacuna contra Pertussis
 Vacuna contra el polisacárido neumocócico
 Vacuna contra el tétanos
 Vacuna contra la fiebre tifoidea (cepa T y 21a), vivos (oral)
 Vacuna contra el polisacárido a fiebre tifoidea
- 20 Vacuna contra la fiebre tifoidea
 Toxoides bacterianos
 Vacuna contra la difteria
 Vacuna contra el tétanos
 Vacunas virales
- 25 Familia de vacunas contra la hepatitis (inactivada, péptidos, VLP)
 Vacuna contra el papilomavirus humano (VLP)
 Vacuna inactivada contra la gripe (virión entero)
 Vacuna inactivada contra la gripe (virión dividido)
 Vacuna inactivada contra la gripe (antígeno de superficie)
- 30 Vacuna contra el sarampión, organismos vivos
 Vacuna contra las paperas, organismos vivos
 Vacuna inactivada contra la poliomielitis
 Vacuna contra la poliomielitis, organismos vivos (oral)
 Vacuna contra la rabia
- 35 Vacuna contra la rubeola, organismos vivos
 Vacuna contra la encefalitis transmitida por garrapatas, inactivada
 Vacuna contra la varicela, organismos vivos
 Virus contra la fiebre amarilla
 Vacunas mixtas
- 40 Vacuna contra la difteria y el tétanos
 Vacuna contra la difteria, el tétanos y pertussis
 Vacuna contra la difteria, el tétanos y pertussis (componente acelular)
 Vacuna conjugada contra la difteria, el tétanos y pertussis (componente acelular) y el Haemophilus tipo B
- 45 Vacuna inactivada contra la difteria, el tétanos y pertussis (componente acelular) y difteria, el tétanos y pertussis (componente acelular) y poliomielitis
 Vacuna la hepatitis A (inactivada) y la hepatitis B (péptidos)
 Vacuna contra el sarampión, las paperas y la rubeola, organismos vivos
- 50 Se prevé que la lista se extienda a medida que se desarrollan antígenos nuevos o formas diferentes de antígenos y nuevas combinaciones.

En función del antígeno específico, el adyuvante puede incluir el ácido eicosapentaenoico [C20: 5] o ácido decosaheptaenoico [C22: 6ω3] o modificaciones de estos ~~compuestos~~ ácidos grasos de cadena larga adicionales a al menos uno de los otros componentes del medio vehículo definido anteriormente.

- 55 El producto de reacción de los aceites naturales hidrogenados compuestos principalmente por aceites basados en ácido ricinoleico con óxido de etileno se produce, preferentemente, a partir de aceite de ricino cuyo contenido en ácido graso se sabe que está compuesto principalmente por ácido ricinoleico. El producto se puede modificar en cuando a hidrogenación, etilación y la adición de grupos, tales como polietilenglicol. Una serie de estos productos está comercializada por BASF con la descripción de la marca de calidades Cremophor.
- 60 El disolvente vehículo para el gas óxido nitroso puede ser agua o cualquiera de los alcoholes, éteres, aceites o

5 polímeros farmacéuticamente aceptables, tales como polietilenglicol o similares. El aceite puede ser aceite orgánico o mineral. El aceite orgánico puede ser un aceite esencial basado en ácidos grasos de cadena larga que tienen entre 14 y 22 átomos de carbono en el ácido graso. El aceite puede ser de origen natural o sintético y, si es de origen natural puede ser un aceite vegetal o un aceite animal. Como aceites vegetales, se prefieren los ricos en ácido gamma linolénico [GLA] y como aceite animal se puede usar la crema láctea.

En la forma preferida de la invención, la solución es una solución acuosa saturada con óxido nitroso. El componente de aceite y el componente acuoso pueden estar envasados por separado y solo se mezclan directamente antes de la administración. Preferentemente, el agua es desionizada y purificada para que esté libre de microbios y endotoxinas.

10 Cuando la formulación que contiene el antígeno tiene que estar en una presentación líquida (incluido un líquido encapsulado) para administración oral o en nebulizador nasal o bronquial o pulmonar o en una formulación inyectable, de modo que la formulación puede incorporar, como parte del medio de administración, agua u otro líquido aceptable en el que se disuelve el óxido nitroso y en el que el(los) ácido(s) graso(s) o éster(es) de los mismos se disuelven o suspenden o emulsionan junto con el antígeno formulándose con los mismos. Asimismo, cuando el antígeno se va a administrar al paciente aplicándose como crema, pomada, nebulizador, loción tópica, bucal o vaginal, o como un supositorio, la formulación usada para fabricar dicha crema, pomada, nebulizador, loción o supositorio puede incorporar, junto con el antígeno formulado con los mismos, una cantidad de agua u otro líquido que contiene, y preferentemente que está saturado con, óxido nitroso, el(los) ácidos grasos de cadena larga o ésteres de los mismos y el antígeno formulado con los mismos, y, además, dichos excipientes y vehículos adicionales tal como se usan convencionalmente en el comercio farmacéutico al fabricar dichas formas de dosificación.

25 El disolvente vehículo para el gas óxido nitroso puede, en una formulación alternativa, de acuerdo con la invención, ser esencialmente no acuosa y estar compuesta por al menos un ácido graso o éster del mismo seleccionado del grupo consistente en ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico [C20:5 ω 3], ácido decosahexaenoico [C22:6 ω 3], y ácido ricinoleico y los derivados de los mismos seleccionados del grupo que consiste en los ésteres de alquilo de C1 a C6 de los mismos, los ésteres glicerol-polietilenglicol de los mismos y el producto de la reacción de aceites naturales hidrogenados o no hidrogenados compuestos en su mayor parte por aceites basados en ácido ricinoleico, con óxido de etileno.

30 Una formulación adecuada para aplicación transdérmica, bien inyectable, pomada, crema o loción, o en forma de un parche cutáneo que proporciona un depósito para la formulación, también es una forma preferida de la formulación de acuerdo con la invención.

35 El componente de ácido graso esencial de la composición comprende, preferentemente, una mezcla de ésteres de los ácidos grasos indicados anteriormente. Por tanto, en la forma más preferida de la invención, el componente de ácido graso de la composición está constituido por el complejo conocido como vitamina F y, a este respecto, se prefiere usar la forma éster de la vitamina F conocida como éster etílico de vitamina F. Este producto está disponible comercialmente con la descripción comercial de Vitamin F Ethyl Ester CLR 110 000 Sh.L. U./g de CLR Chemicals Laboratorium Dr. Kurt Richter GmbH of Berlín, Alemania. La distribución típica del ácido graso de este producto es la siguiente:

40	<C ₁₆ :	0
	C ^{16.0} :	8,3 %
	C _{18.0} :	3,5 %
	C _{18.1} :	21,7 %
	C _{18.2} :	34,8 %
	C _{18.3} :	28,0 %
45	>C ₁₈ :	1,6 %
	Desconocido:	2,1 %

También se prefiere añadir a la formulación los ácidos grasos de cadena larga conocidos como ácido eicosapentaenoico [C20:5 ω 3] y ácido decosahexaenoico [C22:6 ω 3]. Dichas combinaciones de producto ~~est~~ disponibles en Croda con el nombre comercial "Incromega".

50 Los análisis microscópicos mostraron que la formulación del antígeno con un adyuvante como se ha descrito en el presente documento dan lugar a la formación de microestructuras, dentro de las cuales, o fijadas a ellas, está el antígeno contenido en una forma estable y a partir de las que se liberan en el lugar de la acción.

Es un aspecto adicional de la invención que la formulación se puede preparar de modo que se adapte para administración mucosa y, en particular, para administración nasal. De este modo incluirá inmunogenicidad mucosa.

55 La invención no se ha demostrado todavía mediante trabajos empíricos aplicables a todos los antígenos. No obstante, en cuanto a dichos antígenos que ya se han formulado con el adyuvante mencionado anteriormente de la invención, y evaluado mediante procedimientos diferentes para la potenciación prevista de la inmunogenicidad y vías de administración diferentes, todavía no se ha observado ningún resultado negativo a pesar de la diversidad biológica y química de los antígenos que se han investigado. Por tanto, el solicitante tiene confianza, sobre la base

de estas observaciones preliminares con respecto a los productos que representan una serie de clases de dichos antígenos, en que la invención encontrará aplicación general a lo largo de todo el espectro de antígenos abarcados por estos términos tal como se definen en el presente documento y de los que más adelante se exponen algunos ejemplos.

- 5 Es parte de las postulaciones del presente solicitante por las cuales se busca encontrar una comprensión de la invención y a las que no desea quedar ligado en esta etapa, que aunque el medio de administración de la presente invención sirve para transportar el antígeno adyuvado formulado de un modo más eficaz a través del cuerpo humano o animal, dicho adyuvante también desempeña un papel importante en transferir, por cualquier mecanismo todavía no explicado, el antígeno a las células del sistema inmunitario para producir, de este modo, una respuesta inmunitaria eficaz. A este respecto, el solicitante cree que la presente invención encontrará aplicación general a pesar de la variedad de tipo, mecanismo y aplicación de los antígenos.

Hipótesis preliminar del mecanismo de operación

- 15 El mecanismo por el cual se consigue potenciar la acción de inmunogenicidad por la presente invención está actualmente en investigación. Algunas observaciones a este respecto se han registrado anteriormente. Además, se ha registrado que observaciones preliminares apuntan a algunas posibles explicaciones adicionales. De nuevo, el solicitante no desea quedar ligado a ninguna de las explicaciones provisionales que puede presentar en este momento. No obstante, se registra que parecería que los ácidos grasos de cadena larga usados en la formulación, junto con el óxido nitroso de la preparación de acuerdo con la invención, o al menos algunos de estos componentes, forman, durante el proceso de fabricación de la formulación, pequeñas vesículas estables o microesponjas, en adelante en el presente documento denominadas "partículas basadas en ácido graso".

1. Las características estructurales de la formulación de la preparación:

- 25 El óxido nitroso y los ácidos grasos de cadena larga insaturados que forman parte del medio de administración se formulan mezclándose con los antígenos designados, para formar las partículas que contienen el antígeno. Las partículas contienen una fase lipídica que es de naturaleza adyuvante, (a) polímero(s) sintético(s) que es de naturaleza polimérica, y un gas, óxido nitroso, que parece activar o potenciar la combinación de estas partículas. Varias de las características de las partículas contribuyen a su acción como adyuvante eficaz de vacunas:

La capacidad de atropamiento y la eficiencia de liberación de las partículas;

La naturaleza polifilica de las partículas, las partículas están bien adaptadas para atrapar la combinación de moléculas hidrófilas e hidrófobas, tal como en el atropamiento de antígenos y moléculas inmunoestimuladoras.

- 30 La dirección pasiva de las partículas y la afinidad entre partículas y estructuras lipídicas, como rápidos lipídicos en membranas celulares; y

Las partículas parecen no conllevar peligro para la seguridad o toxicidad.

Estas características, así como los resultados obtenidos con algunos antígenos usados junto con las partículas, se tratarán más adelante.

35 2. La composición, el número y el tamaño de las partículas;

- Los resultados obtenidos con la presente invención y la literatura en relación con este campo indican que diferentes vías de administración requieren tamaños diferentes de partícula para la liberación de una vacuna eficaz. Además, el tipo y cantidad de antígeno cargado en las partículas y las capacidades de absorción de las partículas están determinados, en gran medida, por la composición, el número y el tamaño de las partículas. Los tamaños de los diversos tipos de antígenos (compárese, por ejemplo, péptidos y virus) difieren considerablemente y tienen que adaptarse. Por tanto, la capacidad para manipular de forma reproducible el tamaño y el número de las partículas es importante. La relación entre el tamaño y el número de las partículas en la presente invención parece no ser directamente proporcional, pero se puede manipular mediante

- 45 • El grado de saturación del óxido nitroso, que se ha demostrado que tiene una influencia sobre el tamaño y el número de partículas formadas;
- La adición de varios ácidos grasos poliinsaturados;
- Un cambio en la proporción de los ácidos grasos usados;
- Un cambio en la modificación o derivatización de los ácidos grasos usados;
- La adición de moléculas biológicas, tales como péptidos; y
- 50 • El uso de polímeros sintéticos de varios tamaños.

A este respecto se han realizado dos observaciones importantes:

a) se ha descubierto que cuando los ácidos grasos de cadena larga insaturados usados tienen 20 carbonos o más, las microestructuras formadas son esféricas con subcompartimentos similares a los observados en una esponja.

Estas estructuras son estables y es creencia y observación de los inventores que los antígenos (específicamente los péptidos) se ajustan de forma ideal en estos subcompartimentos, de modo que los antígenos pueden unirse a epítomos o receptores específicos en la superficie de la célula diana. Cuando se usan ácidos grasos de cadena larga insaturados usados de 16 a 20 carbonos, la forma de las microestructuras es vesicular con un campo dinámico de movimiento de partículas autofluorescentes que rodea las vesículas.

3. Estabilidad:

Las partículas parecen permanecer estructuralmente intactas tras 24 meses a temperatura ambiente. Cualquier compuesto cargado permanece atrapado durante este tiempo. Se cree que Esta característica de estabilidad tiene gran significado en el uso de vacunas.

10 4. Ausencia de citotoxicidad:

Las partículas, a las concentraciones aplicables, no tienen una citotoxicidad o toxicidad evidente, como se ha mostrado en estudios de cultivo celular, con animales y seres humanos.

5. Mecanismo de acción:

5.1 Eficiencia de carga:

15 La eficiencia alta de carga de las partículas se puede demostrar mediante el grado elevado de atrapamiento del toxoide diftérico (TD) y virus inactivados de la rabia en partículas de acuerdo con la presente invención, como se ilustró mediante Microscopia Confocal Láser de barrido (CLSM). Los virus inactivados fueron un generoso regalo del SA State Vaccine Institute, ahora BIOVAC Institute.

5.2 Absorción y Transporte:

20 Las partículas de la invención parecen actuar como mecanismo de absorción en el caso de la administración nasal y oral y como mecanismo de transporte en el caso de la administración parenteral para liberar antígenos a las células inmunocompetentes. La eficiencia de la liberación se refiere a la penetración tisular, adsorción celular, interacción entre los componentes de la membrana celular y las partículas, internalización de partículas por las células y estabilidad intracelular.

25 5.3 Liberación:

El resultado de una eficiencia de liberación alta es la liberación de antígenos, no sólo en los sitios en la membrana sino también en los sitios intracelulares, lo que tiene como resultado una mayor eficacia de dicha vacuna. Las partículas actúan en sinergia con el antígeno para alcanzar una inmunogenicidad potenciada, La tasa de liberación de las partículas está influida por su composición. Las partículas de liberación prolongada y/o controlada se pueden usar con el objetivo de combinar los elementos de sensibilización y refuerzo de la vacunación.

5.4 Flexibilidad y Elasticidad:

35 La microscopia confocal láser de barrido (CLSM) muestra que la conformación de las partículas puede cambiar a causa de su entorno. Por ejemplo, cuando las vesículas se mueven a través de barreras biológicas, como los capilares circulatorios, los cambios conformacionales para acomodar la extravasación se han visualizado mediante microscopia.

El componente de ácido graso de cadena larga insaturado contribuye a la integridad celular mediante su contribución al mantenimiento de la membrana. El componente óxido nitroso de las partículas de la presente invención potencia la fluidez de la membrana, que, posiblemente, tenga un efecto positivo sobre la adsorción, absorción y otros procesos unidos a la membrana. Se ha descubierto que la composición de la invención tiene efectos beneficiosos sobre la inmunogenicidad de los antígenos.

Se cree que estos efectos beneficiosos son atribuibles a las características dinámicas de las partículas basadas en ácidos grasos.

5.5. Relaciones dinámicas entre vesículas lipídicas:

45 Se ha demostrado que sí existen las relaciones entre partículas y lípidos y entre partículas/células. Las partículas se pueden combinar para cambiarse el tamaño a sí mismas continuamente sin perjudicar a su estabilidad. Estas características de membrana interactiva hacen que el desplazamiento de las vesículas por las células sea óptimo. A pesar de las interrelaciones de las partículas, se demostró que las partículas son estables en la sangre y en los fluidos corporales durante un máximo de 5 horas.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

50 Sin limitar de este modo el alcance de la invención, a continuación se describirán algunos ejemplos para ilustrar la

invención.

PREPARACIÓN 1

Preparación de AAG-1 para las vacunas parenterales de la rabia y del toxoide diftérico (TD) nasal

5 Etapa 1: La solución tampón aplicable al antígeno específico está saturada con óxido nitroso a presión ambiente usando un vaso de presión y un rociador. En el caso de la rabia, el tampón usado fue solución salina tamponada con fosfato (PBS), en el caso del TD para administración nasal se usó agua destilada.

10 Etapa 2: El siguiente grupo de ácidos grasos se calentó hasta 70 °C: ácido oleico al 21 %, ácido linoleico al 34 % y ácido linolénico al 28 %. Estos ácidos grasos se modificaron mediante esterificación con un grupo etileno del terminal carboxi. El ácido graso hidrogenado pegilado, ácido ricinoleico (también conocido por el nombre del INCI aceite de ricino PEG-n-Hidrogenado se calentó hasta 80 °C y se mezcló con el primer grupo de ácidos grasos a 70 °C. La proporción entre el primer grupo de ácidos grasos y el último ácido graso fue 3:1.

15 Etapa 3: La solución tampón se calentó hasta 70 °C y se mezcló con la mezcla de ácidos grasos hasta una concentración final de 1,85%. Esta mezcla de ácidos grasos constituyó el adyuvante y en el presente documento se denomina AAG-1 (P). El símbolo P indica el intervalo de tamaño en micrómetros de las partículas, que estaba entre 2 y 5 μ de tamaño, determinado mediante análisis del tamaño de la partícula en un Malvern. El AAG-1(n) se preparó a partir de AAG-1 (P) mediante sonicación (a corto plazo) o incrementando el componente de ácido ricinoleico (a largo plazo).

20 Etapa 4: atrapamiento del antígeno en el adyuvante. Los respectivos antígenos se atraparon en las diferentes formulaciones de adyuvante mediante mezclado enérgico en un Vibramix durante 3 horas (rabia) o 4 horas (TD) a temperatura ambiente.

PREPARACIÓN 2

Preparación de AAG-2 para la vacuna parenteral contra la hepatitis B

A los ácidos grasos contenidos en el AAG-1 anterior se añadió

1. dl- α -Tocoferol como anti-oxidante
- 25 2. Ácidos grasos etilados adicionales DHA (ácido decahexanoico) y EPA (ácido eicosapentanoico). A cantidad preferible de los dos ácidos grasos para la presente invención fue 0,2 %.
3. El atrapamiento del péptido de la hepatitis B se produjo mezclando durante 30 minutos en un Vibramix a temperatura ambiente.

30 Las partículas estables de tamaños bastante homogéneos que variaban de 20 nm a 50 μ m se pueden fabricar fácilmente a gran escala. El tamaño y la forma de las partículas se puede controlar de forma reproducible. El uso de AAG-1 y AAG-2 en estudios animales como atañe a la presente invención se describe más adelante. Los siguientes antígenos considerados representativos y, por tanto, demostrativos pero no exhaustivos del abanico de vacunas a la que la invención se refiere, se usaron en los estudios celulares y animales para confirmar la invención.

Un toxoide como antígeno (difteria)

35 Un virus inactivado como antígeno (rabia)

Una proteína/péptido como antígeno (Hep B)

Algunos ejemplos de los estudios y sus resultados se describen en los ejemplos siguientes:

EJEMPLO 1

40 Determinación de la capacidad de una vacuna de aag-1/td para inducir una respuesta inmunitaria sistémica tras administración oral y nasal, respectivamente

Este ejemplo atañe a la potenciación de la respuesta inmunitaria al toxoide de la difteria específicamente en una vacuna administrada por vía nasal y oral en animales en comparación con la referencia usada actualmente, una vacuna parenteral basada en hidróxido de aluminio (alumbre).

1. Objetivo del estudio:

45 El objetivo principal de este estudio era evaluar la eficacia de las formulaciones derivadas de AAG de la presente invención en la potenciación de la respuesta inmunitaria sistémica tras la administración oral y nasal del antígeno TD modelo en comparación con un antígeno administrado en

a) PBS salino

b) Alumbre por vía parenteral.

Desai y col.¹⁶ mostraron que la captación de partículas de quitosano por las células M depende del tamaño de las partículas, así como el carácter hidrofóbico/hidrofílico de las partículas. Se ha establecido que las partículas con tamaños en el rango de los nanómetros son captadas más fácilmente por las células M localizadas en las placas de Peyer. El objetivo secundario dirigido a determinar si

a) el tamaño de las partículas de AAG tenía alguna influencia sobre el incremento de la respuesta inmunitaria para el TD y

b) la respuesta inmunitaria oral o nasal era comparable a la obtenida con el uso de alumbre como adyuvante, usando la vía de administración parenteral.

2. Antecedentes del estudio:

La vía parenteral sigue siendo la vía más frecuente de administración de antígenos. Aunque la introducción de vacunas eficaces orales o nasales mejoraría el cumplimiento del paciente y disminuiría los costes y la necesidad de personal cualificado para administrar antígenos, la mayoría de las vacunas todavía tienen que administrarse por vía parenteral. A la luz de la epidemia del SIDA, sería beneficiosa una vía de administración alternativa, especialmente en los países en vías de desarrollo, como ponen de manifiesto, por ejemplo, informes recientes de dichos países en vías de desarrollo, sobre enfermeras que han inyectado hasta 170 niños en edad escolar con la misma aguja durante las campañas de inmunización. Además, la vacunación mucosa induce respuestas inmunitarias tanto locales como sistémicas, en contraste con la vacunación parenteral, que tiene como resultado la inducción de sólo una respuesta inmunitaria sistémica. Tras la inducción de una reacción inmunitaria local, los patógenos transmitidos por aire o alimentos se pueden neutralizar tras la llegada a las superficies mucosas.

La literatura revela que varios estudios sobre el diseño y aplicación de diferentes adyuvantes se han probado en un modelo de ratón. Por tanto, el modelo se ha descrito bien. Pocos de los adyuvantes analizados se encontraron comparables a los de las vacunas parenterales adyuvadas con hidróxido de aluminio actualmente usadas. Por ejemplo, los resultados de Van der ubben y col.¹⁷ sugieren que las micropartículas de quitosano eran menos eficientes en la estimulación de una respuesta inmunitaria tras la administración intranasal, ya que sólo la mitad de los ratones vacunados por vía nasal mostraban una respuesta inmunitaria.

3. Metodología general de las vacunaciones:

3.1 Vacunación nasal en ratones.

Los grupos siguientes de ratones recibieron administraciones nasales de las formulaciones.

I. Control positivo 1: 40 Lf de TD en PBS administrados por vía nasal

II. Control positivo 2: 40 Lf DT adsorbido en alumbre (hidróxido de aluminio) administrados por inyección subcutánea. Forma de dosificación registrada)

III. AAG-1(P) con 40 Lf DT

IV. AAG-1(n) con 40 Lf DT

V. Control negativo 1: AAG-1(P) sin 40 Lf DT

VI. Control negativo 2: AAG-1(P) sin 40 TD

En cada uno de los grupos se vacunó a 10 ratones SPF balb/c hembra, de 6 semanas de edad. Los ratones Balb/c se han usado previamente en estudios de vacunación oral y nasal con toxoide diftérico como antígeno y los resultados mostraron que este modelo animal es adecuado para estos estudios. La mitad de los ratones (5) fueron sacrificados mediante decapitación con el fin de obtener muestras de sangre o determinación de IgG a la semana 4. La otra mitad se trató de un modo similar la semana 6. En cada caso, el TD adsorbido en alumbre inyectado por vía subcutánea como control positivo.

Administración de vacuna: Las formulaciones nasales se administraron en un volumen de 10 µl/día (5 µl en cada fosa), La dosis total de TD se distribuyó en tres días consecutivos en las semanas 1 y 3.

Obtención de muestras: Tras la decapitación se obtuvieron sangre y lavados nasales en contenedores aplicables. No había presente un anticoagulante. El suero se preparó mediante centrifugación. Las muestras se almacenaron a -20°C.

3.2 Vacunación oral en ratones.

Los grupos siguientes de 6 ratones cada uno fueron vacunados durante el estudio:

I. Control positivo 1: 40 Lf de TD en PBS administrados por vía oral

5 II. Control positivo 2: 40 Lf DT adsorbido en alumbre (hidróxido de aluminio) administrados por inyección subcutánea. (Forma de dosificación registrada)

III. AAG-1(P) con 40 Lf TD

IV. AAG-1(n) con 40 Lf TD

V. Control negativo 1: AAG-1(P) sin 40 Lf TD

VI. Control negativo 2: AAG-1(P) sin 40 TD

10 *Administración de la vacuna:* Las formulaciones se administraron por vía oral mediante sonda intragástrica con una aguja roma. Se vacunó a los ratones tres días consecutivos las semanas 1 y 3. La dosis se dividió y el volumen total administrado fue inferior a 300 µl.

15 *Muestras de sangre:* De acuerdo con la literatura, una respuesta inmunitaria debería seguir observándose en la semana 6. Por tanto, se extrajo sangre como para el estudio nasal al final de la semana 6 para la determinación del título de IgG. Las muestras se analizaron con un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) específico del antígeno.

4. Diseño, Cálculos y Evaluación estadística:

20 i) Diseño experimental: El diseño experimental del estudio tanto nasal como oral fue un diseño paralelo en el que los animales se dispusieron de acuerdo con los grupos de tratamiento y se administra un tratamiento por animal experimental.

ii) Número de grupos de animales experimentales: El número de animales está de acuerdo con estudios previamente publicados y se trató y confirmó con el Departamento de Estadística de la North-West University, Sudáfrica,

25 iii) Asignación aleatoria de los animales experimentales en grupos Todos los ratones tenían aproximadamente la misma edad y un tamaño físico comparable. Los animales se dividieron aleatoriamente en grupos de 10 para el estudio nasal y de 6 para el estudio oral. Los ratones se introdujeron en contenedores numerados. El tratamiento se asignó aleatoriamente a cada grupo animal. El estudio no era enmascarado, ya que el mismo investigador preparó y administró el toxoide, recogió las muestras y realizó el análisis. Todas las administraciones y recogidas se supervisaron y comprobaron por un investigador cualificado. Los estudios orales y nasales, incluido el análisis, fueron realizados por dos investigadores diferentes con el fin de disminuir la probabilidad de cualquier posible sesgo.
30 Las variables de fondo se minimizaron lo más posible mediante medidas tales como usar un único lote de ratones del suministrador, usando el mismo equipo de laboratorio para todos los análisis y obteniendo muestras de sangre y lavados nasales del mismo día de todos los ratones. Los estudios orales y nasales incluyeron, cada uno, sus propios controles (véase los grupos control negativo). En la instalación de cría se monitoriza a los animales y se toman precauciones para que permanezcan libres de patógenos.

35 iv) Procedimientos estadísticos: El análisis de las muestras tomadas se realiza con un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), que es un ensayo sensible y específico ampliamente usado en el análisis de muestras biológicas. En los estudios tanto orales como nasales, los títulos de IgG (respuesta inmunitaria sistémica) obtenidos con los ensayos de ELISA se compararon estadísticamente con los controles con $p < 0,05$. Los dos tratamientos se compararon entre sí mediante la prueba de Pearson.

40 5. Resultados:

5.1 Vacunación nasal

45 Los estudios realizados con la formulación adyuvante AAG-1, que implica la asociación del antígeno TD preparado como se indica en la Preparación 1 de la presente invención, mostraron una potenciación espectacular de la eficacia de la vacuna en comparación con la formulación control positivo PBS-TD. Las respuestas inmunitarias obtenidas fueron comparables con las observadas para la administración parenteral adyuvada con alumbre.

La Tabla 1 refleja los resultados obtenidos para una de las diluciones en serie den ensayo ELISA:

Tabla 1: IgG a una dilución de 1:320							
Semana 4	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5	Media	Desvi. Est.
AAG-1 (u)	20480	10240	10240	40960	5120	17408	14299,4
AAG-1 (n)	20480	2560			20480	27136	10346,1
PBS	0	40	0	0	0	8	17,,9
Alumbre	5120	20480	20480	20480	20480	17480	6869,2
Semana 6							
AAG-1 (u)	2560	1096.	20480	20480	20480	20992	13594,5
AAG-1 (n)	2560	2560	5120	20480	5120	7168	7550,9
PBS	320	80	320	0	0	144	138,6
Alumbre	10240	20480	20480	40960	5120	19456	13738,4

5 Como cabía esperar, los controles negativos no mostraron respuesta de anticuerpos en ningún momento, local o sistémicamente. El control positivo (PBS salino con antígeno) mostró una pequeña, pero observable, respuesta inmunitaria sistémica, reflejada por el título de IgG determinado. Por desgracia, dos de los ratones del grupo AAG-1 (n) de la semana 4 murieron debido al procedimiento de inoculación. Las muertes no estaban relacionadas con el adyuvante específico usado.

La figura 1 ilustra la respuesta inmunitaria sistémica contra el TD tal como reflejan los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el TD encontrados en la sangre tras 4 y 6 semanas. Los títulos se indican en el eje Y en la escala logarítmica.

10 La figura 2 ilustra la potenciación de la producción de anticuerpo específico debido a la formulación del antígeno TD con los adyuvantes. El control positivo PBS-TD se usó como referencia y divisor. La potenciación relativa a este control positivo fue >2000 veces para alumbre y AAG-(P) y > 1000 veces para AAG-1(n) 4 semanas después de la inoculación inicial. A la semana 6, la potenciación de la respuesta había disminuido a poco más de 500 veces en el caso de alumbre y AAG-1(P) y 200 veces en el caso de AAG-1(n). Estos resultados confirman que el tamaño de las partículas desempeña un papel en el grado de respuesta inmunitaria sistémica producida tras la administración nasal. La covarianza entre la respuesta inmunitaria basada en alumbre y basada en AAG-1(P) fue 676800.7901, mientras que entre la respuesta basada en alumbre y basada en AAG-1(n) fue 377679. Las diferencias estadísticas entre el control OBS-TD y los tres grupos adyuvados fueron inferiores a 0,05 en cada caso.

5.2 Vacunación oral

20 Los resultados de la vacunación oral indican que las respuestas inmunitarias observadas son mucho menores que en el caso de la vacunación nasal, pero la potenciación es, no obstante, estadísticamente significativa en el caso de alumbre y AAG-1(n), como se muestra en la figura 3 más adelante:

25 Los resultados confirman la importancia del tamaño de las partículas de adyuvante. En contraste con la administración nasal, la respuesta inmunitaria sistémica se potenció 40 veces mediante las partículas de tamaño nano de la presente invención, pero solo 2 veces por las partículas de tamaño micro. La potenciación del anticuerpo específico fue menor tras la administración oral que tras la vacunación nasal, posiblemente por algunas de las razones siguientes: Se determina la potenciación relativa al control positivo PBS-TD, que fue 2,9 veces mayor en el estudio oral, y el toxoide diftérico es sensible al pH bajo, al que se expuso en el estómago. No obstante, la respuesta de la vacuna basada en alumbre también es significativamente mejor que tras la administración nasal y se administró por vía parenteral y, por tanto, no se expuso a factores tales como un pH bajo. Por tanto, estos dos estudios indican que la vacunación nasal tiene como resultado una respuesta inmunitaria mejor que la vacunación oral para este toxoide concreto. No obstante, la vacunación con toxoide basado en alumbre y basado en AAG-1 (n) condujo a una respuesta estadísticamente significativa (> 10 UA/ml) que cumple los requisitos internacionales de la Organización Mundial de la Salud para la eficacia de la vacuna de la difteria (nivel A >0,01 UA/ml es protector en el ser humano de acuerdo con la OMS).

6. Conclusiones:

El AAG se administró por la vía nasal y oral como solución, que contenía micro o nanopartículas dentro de las que

queda atrapado el toxoide. No se observó ninguna respuesta para AAG-1(P) o AAG-1(n) sin cargar en el estudio oral o nasal. Tras la vacunación con el control positivo, PBS-TD, la respuesta inmunitaria fue baja y no cumplió los requisitos. Además, solo dos de los 5 ratones en el estudio nasal y 1 de los 6 ratones en el estudio oral mostraron alguna respuesta inmunitaria tras la vacunación con PBS-TD.

- 5 El papel desempeñado por los adyuvantes en la potenciación de la eficacia de una vacuna está claramente ilustrado en estos estudios. La vacunación parenteral basada en alumbre tuvo como resultado una respuesta inmunitaria sistémica significativa, similar a la descrita en la literatura. De forma similar, tanto AAG-1(P) como AAG-1(n) mostraron respuestas inmunitarias sistémicas comparables y estadísticamente significativas tras la administración nasal, mientras que AAG-1(n), pero no AAG-1(P), mostró una respuesta inmunitaria comparable y estadísticamente significativa tras la administración oral.

Los resultados de estos estudios sugieren que la presente invención deberá permitir el uso de la administración nasal para vacunación en lugar de la vía parenteral, alejando la necesidad de agujas e eyectables. Por tanto, la invención contribuirá a vacunas más seguras, más baratas y más ecológicas.

EJEMPLO 2

- 15 **Determinación de la potenciación de la eficacia de una vacuna de la rabia basada en aag-1 en comparación con la de una vacuna comercial:**

Los estudios animales del EJEMPLO 1 mostraron que el AAG-1 adyuvante basado en ácido graso descrito en la presente invención es eficaz en la potenciación de la respuesta inmunitaria específica sistémicamente (anticuerpos IgG) contra la difteria tras administración nasal y oral. Todos los ratones vacunados con TD asociado con nano o micropartículas de AAG-1 produjeron suficientes anticuerpos neutralizantes como para quedar protegidos contra los efectos de la toxina diftérica.

Este ejemplo atañe a la potenciación de la respuesta inmunitaria a virus de la rabia inactivado para la formulación de una vacuna de la rabia con una eficacia mayor que la de la vacuna parenteral comercialmente disponible usada actualmente. La liberación eficaz del antígeno de la rabia mediante administración parenteral se investigó en estudios animales usando la formulación de la vacuna de la rabia mostrada anteriormente. Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal o subcutánea el virus de la rabia inactivado (control) o virus inactivado asociado con AAG, se expuso y se midió su supervivencia.

1. Objetivos del estudio:

El objetivo principal de estas investigaciones era la determinación de la eficacia de la presente invención como adyuvante parenteral. El ejemplo 1 descrito anteriormente no abordó la eficacia del adyuvante basado en ácidos grasos para la administración parenteral. Estos estudios atañen a una comparación directa de la capacidad de adyugar del adyuvante de acuerdo con la presente invención y el adyuvante alumbre usado comercialmente,

Los objetivos secundarios del estudio incluyeron:

- Ejemplo 1 describió un sistema de modelo con un modelo de antígeno. En este ejemplo, el antígeno investigado es el usado en la industria para la preparación de vacunas comerciales.
- Uno de los objetivos era expandir el número de animales por estudio y confirmar la repetibilidad de la potenciación de la eficacia observada en animales.
- Determinar si el número de dosis se puede reducir en la invención descrita.
- determinar si el propio adyuvante basado en ácido graso contribuye a la respuesta inmunitaria.

2. Antecedentes del estudio

La rabia es una encefalitis viral aguda, progresiva e incurable que afecta a seres humanos y a animales 1-3. Los agentes causales son virus de ARN neurotrófico de la familia de Rhabdoviridae, género Lyssavirus que usan carnívoros, como especies de mamífero, como huéspedes. La transmisión del virus se produce principalmente a través del mordisco del animal y, una vez que el virus se ha depositado en heridas periféricas, se produce el paso centrípeto hacia el sistema nervioso central. Tras la replicación viral, se produce una diseminación centrífuga de los principales portales de salida, las glándulas sudoríparas, creando un canal para la infección del siguiente huésped¹⁻³.

A pesar de los continuos intentos de intervención médica, la rabia conserva el dudoso honor de ser la enfermedad infecciosa con la mayor proporción de casos-muertes³. Al menos 50.000 personas mueren de rabia anualmente, más de 10 millones reciben vacunación postexposición contra esta enfermedad, mientras que más de 2,5 billones de personas viven en regiones en las que la rabia es endémica. Estas cifras son una subestimación, ya que a algunas de las regiones endémicas no se puede acceder fácilmente, por lo que hay menos informes. Una encuesta rudimentaria indica que una persona muere de la enfermedad cada 15 minutos y más de otras 300 están expuestas. La infección en seres humanos por animales con rabia casi siempre es fatal una vez que han aparecido los síntomas

de la enfermedad. Aunque los periodos de incubación medios son de 1-3 meses, se ha documentado aparición de la enfermedad días o años tras la exposición. Los niños de 5-15 años de edad presentan particular riesgo.

5 La rabia se encuentra en todos los continentes excepto en la Antártida. Más del 99 % de todas las muertes humanas por rabia se producen en Asia, África y Sudamérica; solo India comunica 30.000 muertes anuales. Desde una perspectiva global, dada la amplia distribución, los problemas para la salud pública, las implicaciones veterinarias y las cargas económicas, la rabia es la zoonosis viral más importante⁵. La OMS anima encarecidamente la realización de estudios diseñados sobre la viabilidad y el impacto de incorporar las vacunas modernas contra la rabia en los programas de inmunización temprana de lactantes y niños en las comunidades en las que la rabia es un importante problema de salud.

10 El procedimiento de control más eficiente y rentable es la vacunación. Históricamente se obtuvieron muchas vacunas de la rabia de tejido cerebral infectado. Aunque relativamente barata, hay varios niveles de eficacia. La potencia y la seguridad de las vacunas de la rabia han mejorado considerablemente en los últimos 20 años, con el desarrollo de la propagación en cultivo celular. No obstante, en muchos países la única vacuna disponible es de origen de tejido nervioso de ovejas, cabras o roedores lactantes.

15 La OMS ha apoyado la suspensión completa de las vacunas de tejido neural no purificado en los países en vías de desarrollo para el 2006, que se reemplazarán con vacunas de cultivo celular. El único modo en el que esto pueda ser posible es en los países en los que se tiene acceso a una cara vacuna de cultivo celular de alta calidad y barato. Un régimen de vacunación con cultivo celular estándar (p. ej., el calendario Essen) consiste en la administración de una vacuna los días 0, 3, 7, 14 y 28 en el deltoides o en la cara anterior del muslo en niños. Un régimen intradérmico
20 típico (8-0-4-0-1-1) consiste en la vacuna administrada a los ocho: Sitios el día 0, seguido por cuatro inoculaciones intradérmicas del día 7 y la vacuna en un sitio los días 28 y 29.

25 Las vacunas usadas para la profilaxis postexposición intradérmica han incluido vacunas de células diploides humanas, vacunas de la rabia de células vero, vacunas de células de embrión de pollo purificadas y vacunas de células de embrión de pato purificadas. Después de Aventis Pasteur, el South African Biovac Institute (BI) es el segundo laboratorio del mundo en haber adaptado un virus de la rabia para crecer en células diploides humanas (HDC). La vacuna HDC se considera el "patrón de referencia". Produce altos títulos serológicos en pacientes y no contiene tejido animal extraño, de modo que da lugar a menos efectos adversos, pero es caro de producir. Las vacunas HDC con una mayor eficacia reducirán los costes. Las vacunas de la rabia HDC son antígenos débiles y su potencia se puede potenciar mediante el uso de adyuvantes⁷. La mayoría de las vacunas de la rabia no están
30 formuladas con adyuvante, aunque el RVA (vacuna de la rabia adsorbida sobre fosfato de aluminio) está disponible en EE.UU. No obstante, un estudio reciente en animales en el que se comparó el efecto de las vacunas de la rabia que contienen adyuvante de aluminio y adyuvante sin aluminio no mostró ninguna ventaja a tener el adyuvante presente⁸. No obstante, el uso de adyuvantes adecuados puede ser el mejor modo de incrementar la potencia de las vacunas de la rabia de HDC como se usa habitualmente para otras vacunas virales inactivadas⁷. En estudios
35 preliminares, el adyuvante basado en ácido graso del presente documento tuvo como resultado una potenciación espectacular de los niveles de protección (incremento por 9 del título de anticuerpos en comparación con la vacuna de la rabia sin adyuvante) contra la rabia en ratones, usando el antígeno HDC.

3. Metodología general

40 Se realizaron varios estudios in vitro con animales y comparativos con diferentes formulaciones del virus de la rabia inactivado. La potencia de la vacuna de la rabia se determinó mediante el uso de experimentos de exposición en ratones (NIH prueba⁹), en lugar de pruebas in vitro basadas en el contenido del antígeno¹⁰, dado que los ensayos in vitro no pueden detectar la disminución de la potencia de las vacunas de la rabia parcialmente degradadas por calor¹¹. La evaluación de la potencia de las vacunas de la rabia inactivadas ha sido sujeto de gran investigación; la más usada es la prueba de la potencia del NIH, que proporciona resultados variables pero es la única prueba
45 aceptada actualmente por la OMS¹². Esta prueba animal dura 30 días e implica la inmunización de ratones con antígenos de prueba y de referencia, seguido de exposición intracerebral con una cepa estándar de la vacuna de la rabia. Los virus de la rabia se cultivaron en fibroblastos pulmonares y después fueron inactivados por el SA State Vaccine Institute de acuerdo con nuevos procedimientos desarrollados por el Dr. Woolf Katz. El procedimiento para cultivar el virus no forma parte de la presente invención. En general, los virus de la rabia inactivados, se inyectó a los
50 ratones por vía intraperitoneal o subcutánea con cada una de las dos vacunas. Un tercer grupo de ratones, inyectados con tampón fosfato, se usó como control. Se administraron seis diluciones (hasta una dilución de 1:2500) de cada una de las vacunas a 10 ratones (60 ratones en total para cada vacuna) el día 1 y la inoculación se repitió el día 15. Tras otros 14 días, se expuso a los ratones a una inyección intracerebral del virus de la rabia vivo. Los ratones sin resistencia o con una respuesta inmunitaria débil contra el virus murieron en un par de días. Más
55 adelante se describe un estudio animal típico.

3.1 Preparación de las muestras:

Se usaron diluciones en serie de 1/20, 1/100, 1/500 y 1/2500 de la vacuna en la mayoría de los estudios, para determinar la potencia de la vacuna. La potencia de la vacuna es directamente proporcional al número de ratones protegidos contra la muerte en cada una de las diluciones en serie. Los resultados de los tres estudios condujeron al

diseño del estudio descrito más adelante. Este estudio de animales contenía los siguientes grupos de ratones:

I. Control positivo 1: Vacuna estándar: Dos (2) viales de la vacuna estándar se reconstituyen en agua (proporcionada con la vacuna) y se diluyen en PBS con las diluciones en serie anteriores a administrar dos veces según el procedimiento de vacunación estándar para los ratones.

5 II. Vacuna de prueba 1: AAG-1 diluido en PBS: 2 viales de la vacuna estándar se reconstituyen en AAG-1 y se diluyen en PBS con las diluciones en serie anteriores a inyectar dos veces según el procedimiento de vacunación estándar para los ratones.

10 III. Vacuna de prueba 2: AAG-1 diluido en PBS: 2 viales de la vacuna estándar se reconstituyen en AAG-1 y se diluyen en PBS con las diluciones en serie anteriores a inyectar una vez según el procedimiento de vacunación estándar para los ratones.

IV. Vacuna de prueba 3: 2 viales de la vacuna estándar se reconstituyen en AAG-1 y se diluyen en AAG-1 con las diluciones en serie anteriores a inyectar una vez según el procedimiento de vacunación estándar para los ratones.

15 V. Control positivo 2: La vacuna adyuvada con alumbre con una eficacia elevada proporcionada al BIOVAC Institute se diluyó de acuerdo con las diluciones en serie anteriores a inyectar dos veces según el procedimiento de vacunación estándar para los ratones. VI-VIII: Grupos control negativo que no reciben vacunación.

3.2 Administración de vacuna y exposición:

20 Los ratones se dividieron en grupos de 10 ratones por jaula. Cada grupo recibió una de las diluciones de una de las preparaciones vacunales según el procedimiento de ensayo de la vacuna de la rabia descritos del NIH y el programa de administración de la vacuna indicado en la tabla 2. Tres grupos de ratones no recibieron ninguna preparación de vacuna y se usaron como control negativo y para la titulación del virus de exposición (CVS) el día 14. En este estudio se usó un total de 180 ratones balb/c. Todos los grupos contenían 4 subgrupos cada uno para las 4 diluciones en serie, para cada uno de los cuales 10 ratones balb/c se vacunaron y fueron expuestos, por tanto 32 ratones por grupo.

Tabla 2: Administración y programa de exposición

Grupo	Día de la inyección 0	Día de la inyección 7	Día de la exposición 4
I	0,5 ml i.p.	0,5 ml i.p.	CVS
II	0,5 ml i.p.	0,5 ml i.p.	CVS
III	0,5 ml i.p.	Sin inyección	CVS
IV	0,5 ml i.p.	Sin inyección	CVS
V	0,5 ml i.p.	0,5 ml i.p.	CVS
VI-VIII	Sin inyección	Sin inyección	TITULACIÓN de CVS

25 A las administraciones de las diferentes vacunas les siguió una exposición intracerebral con el virus vivo tras dos semanas con diluciones aplicables de virus infecciosos vivos CVS en todos los ratones, de acuerdo con la prueba NIH.

4. Resultados

30 La medición de las potencias relativas de las preparaciones de adyuvante usando la prueba NIH (BI) se determina por la supervivencia de los ratones. La Figura 4 más adelante ilustra la supervivencia de ratones para las cuatro diluciones en serie diferentes de cada grupo.

35 Las potencias relativas determinadas para los grupos se expresan como UI/ml de acuerdo con las recomendaciones de la OMS y se reflejan en la figura 5. Los ratones no vacunados y aquéllos con una respuesta inmunitaria mala murieron en 6 días (la barra pequeña indica el grupo, no la supervivencia del animal); la mayoría de los ratones a los que se inoculó la vacuna basada en aluminio actual murió, mientras que solo dos de los ratones que recibieron la dilución más baja (1:2500) de la vacuna basada en AAG murieron. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las especificaciones de la OMS. (WHO. Vacuna contra la rabia Human Gene Therapy 2004: http://www.who.int/rabies/vaccines/human_vaccines/en [Date of use: 27 Jan 2004]).

La OMS requiere una potencia relativa de 2,5 UI/ml para una vacuna de la rabia,

5. Conclusión

La vacunación de la rabia presenta tres problemas importantes. La dosis repetida (5x), la administración parenteral y la mayoría de todo el desarrollo de una vacuna de cultivo celular con alta eficacia. El adyuvante basado en ácido graso descrito en el presente documento proporciona un adyuvante con un índice inmunogénico significativamente mayor, usando antígeno preparado en cultivo celular.

Los resultados de los estudios previos y los representados en el presente documento ilustran que:

a) de las vacunas probadas que contienen el antígeno HDC, sólo los que contienen el adyuvante de ácido graso descrito en la presente invención respondieron a las normas indicadas por la OMS.

b) el mayor índice inmunogénico de la vacuna puede facilitar menos inoculaciones tal como se ilustra con los ratones del grupo IV, que recibieron el antígeno basado en AAG-1, diluido con AAG-1 solo una vez y siguió dando lugar a la supervivencia más elevada y a la protección de los ratones. La disminución del número de inoculaciones debería limitar los costes e incrementar la facilidad para el usuario.

c) la vacuna basada en AAG es, por tanto, mucho más eficaz que la vacuna disponible y muestra una actividad inmunoestimuladora inherente y parece actuar como refuerzo a pesar de la ausencia de antígeno, una vez que el animal fue sensibilizado con la primera inoculación de AAG-1 y el antígeno.

d) La vacuna basada en AAG responde a los requisitos internacionales para esta vacuna específica en términos de eficacia y seguridad. La vacuna basada en AAG es una media de 7 a 9 veces más eficaz que la vacuna basada en hidróxido de aluminio.

e) Este estudio fue repetible y se validó en términos del propio estudio y la significación estadística de los resultados. La liberación eficaz de los antígenos mediante administración parenteral se confirmó en estudios animales similares usando la formulación de la vacuna de la rabia.

f) El papel del propio AAG en la potenciación de la eficacia de la vacuna de la rabia se determinó comparando la eficacia de la vacuna de la rabia basada en AAG diluida con tampón fisiológico y la eficacia de la vacuna basada en AAG que ilustra que el adyuvante de AAG tiene propiedades inmunoestimulantes inherentes.

g) El papel del óxido nítrico se ilustró mediante el estudio de liofilización y reconstitución, con el vacío usado para la liofilización, todo el óxido nítrico se elimina. La reconstitución de la vacuna de AAG tiene como resultado una vacuna en la que no hay presente óxido nítrico. Los resultados indican que la eficacia de esta vacuna es similar a la de la vacuna adyuvada con alumbre, pero no casi tan eficaz como las vacunas basadas en AAG que contienen óxido nítrico.

h) La posibilidad de que la potenciación de la eficacia de la vacuna se debía a los pirógenos contenidos en la formulación basada en AAG, se excluyó de forma similar por el hecho de que la vacuna de la rabia reconstituida basada en AAG y liofilizada no muestra dicha potenciación. La vacuna reconstituida todavía contendrá los pirógenos, pero el cambio en la estructura del AAG debido al proceso de liofilización tuvo como resultado la pérdida de eficacia de la vacuna.

Los estudios animales similares con diferentes brazos se repitieron 4 veces. El adyuvante formulado contiene componentes que se han reconocido como farmacéuticamente seguros. Por tanto, existe una oportunidad de usar este antígeno de cultivo de células diploides humanas (HDC) junto con el adyuvante para desarrollar una vacuna de la rabia de alta calidad, costes bajos e inmunológicamente eficaz. Usando este adyuvante, la administración de la vacuna también se puede expandir a otras vías de administración, eliminando el uso de la vía parenteral.

EJEMPLO 3

Vacuna propuesta para la hepatitis b

Se ha estimado que unos 400 millones de personas que están crónicamente infectadas con el virus de la hepatitis B (VHB)¹³. La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) está causada por un pequeño virus de ADN con cubierta que infecta al hígado, causando necrosis hepatocelular mediada por el sistema inmunitario e inflamación. La infección puede ser aguda o crónica. La gravedad clínica puede variar desde (a) asintomática y que se puede resolver completamente a (b) sintomática con enfermedad progresiva o incluso mortal o (c) insuficiencia hepática fulminante ocasional. La evolución de la infección parece estar determinada por la respuesta inmunitaria del huésped. En la mayoría de los adultos inmunocompetentes, la infección aguda conduce a una hepatitis aguda seguida del rápida aclaramiento del virus y del desarrollo de inmunidad para toda la vida. No obstante, si la infección se produce en el periodo neonatal o en los primeros años de vida, la infección con VHB suele ser persistente. La infección por hepatitis viral crónica produce graves riesgos para la salud, tales como cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular¹⁴. Las vacunas preventivas debería permitir la generación de anticuerpos neutralizantes que previenen de forma eficaz la infección en individuos inmunocompetentes. La presente invención se usó en un estudio de animales para determinar la aplicabilidad del adyuvante basado en AAG en la potenciación de la eficacia de las

vacunas de la hepatitis B.

Un antígeno de superficie (péptido) de la hepatitis B se atrapó en AAG y la eficacia se midió analizando la respuesta de anticuerpos específica obtenida tras la inoculación con PBS con péptido (control), de la vacuna basada en alumbre usada actualmente y la vacuna basada en AAG. Dos semanas después de la inoculación, los ratones (10 animales/grupo) recibieron una segunda inoculación. Se obtuvo sangre de las colas de los animales dos semanas después y se determinó el número de anticuerpos. Los anticuerpos obtenidos de los ratones inoculados con hepatitis B basada en AAG se diluyeron 1:1 para permitir la medición. La figura 6 ilustra la eficacia comparativa de la vacuna basada en AAG contra la hepatitis B en ratones. La figura 7 muestra la potencia relativa de las diferentes vacunas usando los resultados obtenidos con el antígeno peptídico solo como divisor. Rec AAG es la vacuna de la hepatitis basada en AAG liofilizada y reconstituida.

Los resultados muestran que el atrapamiento del antígeno peptídico en AAG conducía a una potenciación de la producción de anticuerpos contra la hepatitis B de más de 10 veces el observado para las vacunas basadas en alumbre y 250 veces la del antígeno sin ningún adyuvante, Como en el caso de la vacuna de la rabia propuesta, el AAG reconstruido o reconstituido mostró una respuesta similar a la de la vacuna basada en alumbre sin potenciación espectacular.

REFERENCIAS:

1. WHO. Rabies: Epidemiology, (2004) [Web:]<http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/> [Fecha de uso: 27 de Enero de 2004]
2. O'Hagan, D.T. Drug Targets Infect Disord, 1 (2001) 273-86.
3. Rupprecht, CE, Hanlon, A, and Hemachudha, T. The Lancet; Infectious Diseases, 2 (2002) 101-9.
4. Singh J, Jain DC, Bhatia R, et al. Indian Pediatr 38 (2001) 1354-60.
5. Meltzer MI, Rupprecht CE. Pharmacoeconomics 14 (1998) 365-83.
6. Dreesen DW. Vaccine 15 (Suppl) (1997) S2-S6.
7. Moingeon P, Haensler J, Lindberg A. Vaccine 19 (2001) 4363-4372.
8. Lin H and Perrin P. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 13 (1999) 133-5.
9. WHO Technical Report Series 658, Annex 2, Requirements for rabies vaccine for human use. WHO, Geneva, 1981.
10. Hulskotte EGJ, Dings MEM, Norley SG and Osterhouse ADME. Vaccine 15 (1997) 1839-1845.
11. Madhusudana SN, Shamsundarb R and Seetharamanc S. Int. J. Infect. Dis. 8 (2004) 21-25.
12. Barth R, Diderrich G and Weinmann E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. Vaccine, 1988, 6: 369-377.
13. Vaccines and Biologicals. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system; 2002 global summary
14. Tiollais, P., Pourcel, C. and Dejean, A., The hepatitis B virus. Nature 1985. 317, pp. 489-495.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación farmacéutica adecuada para su uso como vacuna, que comprende un antígeno, que está formulado con un adyuvante, en el que el adyuvante comprende una solución de óxido nitroso en un disolvente vehículo farmacéuticamente aceptable para el gas y que incluye al menos un ácido graso o éster u otro derivado adecuado del mismo seleccionado del grupo que consiste en ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico [C20: 5 ω 3], ácido decosaheptaenoico [C22: 6 ω 3], ácido ricinoleico y los derivados de los mismos seleccionados del grupo que consiste en los ésteres de alquilo de C1 a C6 de los mismos, los ésteres glicerol-polietilenglicol de los mismos y el producto de la reacción de aceites naturales hidrogenados compuestos en su mayor parte por aceites basados en ácido ricinoleico, tales como aceite de ricino, con óxido de etileno.
2. La preparación de la reivindicación 1 en la que el antígeno o antígenos usado en el procedimiento o formulación se secciona(n) del grupo de antígenos que consiste en péptidos, virus inactivados, bacterias inactivadas y partículas similares a virus (VLP).
3. La preparación de la reivindicación 1, en la que el antígeno puede ser cualquier antígeno adecuado para producir una respuesta inmunogénica contra el agente causal de una enfermedad, o infección por un agente, seleccionado del grupo que consiste en: Bacilo de Calmette-Guérin de cólera, Haemophilus de tipo B, meningococos, Pertussis, neumococos, tétanos, fiebre tifoidea, difteria, hepatitis A, hepatitis B, papilomavirus humano, gripe, sarampión, paperas, poliomielititis, rabia, rubeola, encefalitis transmitida por garrapatas, varicela y fiebre amarilla.
4. La preparación de la reivindicación 1, en el que el adyuvante incluye ácido eicosapentaenoico [C20: 5 ω 3] y/o ácido decosaheptaenoico [C22: 6 ω 3] o modificaciones de estos como ácidos grasos de cadena larga adicionales a al menos uno de los otros componentes del medio vehículo.
5. La preparación de la reivindicación 1, en el que el producto de reacción de los aceites naturales hidrogenados compuestos principalmente por aceites basados en ácido ricinoleico con óxido de etileno se produce a partir de aceite de ricino cuyo contenido en ácido graso se sabe que está compuesto principalmente por ácido ricinoleico.
6. La preparación de la reivindicación 1, en el que el disolvente vehículo para el gas óxido nitroso selecciona del grupo que consiste en agua y los alcoholes, éteres, aceites o polímeros farmacéuticamente aceptables, incluido polietilenglicol.
7. La preparación de la reivindicación 1, en el que el aceite es un aceite orgánico seleccionado del grupo que consiste en aceites esenciales basados en ácidos grasos de cadena larga que tiene entre 14 y 22 átomos de carbono en el ácido graso, incluidos aceites de origen natural o sintético e incluyendo aceites vegetales y aceites animales.
8. La preparación de la reivindicación 1, en la que la formulación que contiene el antígeno está en una presentación líquida (incluyendo un líquido encapsulado) para administración oral o en nebulizador nasal o bronquial o pulmonar o en forma de una formulación inyectable, y en el que la formulación incorpora, como parte del medio de administración, agua u otro líquido aceptable en el que se disuelve el óxido nitroso y en el que el(los) ácido(s) graso(s) o éster(es) de los mismos se disuelven o suspenden o emulsionan junto con el antígeno formulándose con los mismos.
9. La preparación de la reivindicación 1, en la que la formulación que contiene el antígeno se formula para administrar al paciente aplicándose como crema, pomada, nebulizador, loción tópica, bucal o vaginal, o como un supositorio, y en la que la formulación usada para fabricar dicha crema, pomada, nebulizador, loción o supositorio incorpora, junto con el antígeno formulado con los mismos, una cantidad de agua u otro líquido que contiene y preferentemente que está saturado con óxido nitroso, el(los) ácidos grasos de cadena larga o ésteres de los mismos y el antígeno formulado con los mismos, y, además, excipientes y vehículos adicionales tales como los usados convencionalmente en la industria farmacéutica al fabricar dichas formas de dosificación.
10. Una vacuna que comprende una preparación según la reivindicación 1, en la que la preparación incluye uno o más antígenos que la hacen adecuada para su uso como vacuna seleccionada del grupo que consiste en:
- Vacuna contra el bacilo de Calmette-Guérin
 - Vacuna contra el cólera
 - Vacuna conjugada contra el Haemophilus tipo B
 - Vacuna contra el polisacárido meningocócico
 - Vacuna contra Pertussis
 - Vacuna contra el polisacárido neumocócico
 - Vacuna contra el tétanos
 - Vacuna contra la fiebre tifoidea
 - Vacuna contra la difteria
 - Vacuna contra el tétanos
 - Vacuna inactivada contra la hepatitis A

- Vacuna contra la hepatitis B (péptido)
- Vacuna inactivada contra la gripe (virión entero)
- Vacuna inactivada contra la gripe (virión dividido)
- Vacuna inactivada contra la gripe (antígeno de superficie)
- 5 Vacuna contra el sarampión, organismos vivos
- Vacuna contra las paperas, organismos vivos
- Vacuna inactivada contra la poliomielitis
- Vacuna contra la poliomielitis, organismos vivos (oral)
- Vacuna contra la rabia
- 10 Vacuna contra la rubeola, organismos vivos
- Vacuna contra la encefalitis transmitida por garrapatas, inactivada
- Vacuna contra la varicela, organismos vivos
- Virus contra la fiebre amarilla
- Vacuna contra la difteria y el tétanos
- 15 Vacuna contra la difteria, el tétanos y pertussis
- Vacuna contra la difteria, el tétanos y pertussis (componente acelular)
- Vacuna conjugada para la difteria, el tétanos y pertussis (componente acelular) y haemophilus de tipo B
- Vacuna contra la difteria, el tétanos y pertussis (componente acelular) y la hepatitis B (péptido)
- Vacuna inactivada contra la difteria, el tétanos y pertussis (componente acelular) y la poliomielitis
- 20 Vacuna contra la hepatitis A (inactivada) y la hepatitis B (ADNr), el sarampión, las paperas y la rubéola, organismos vivos

FIGURA 1

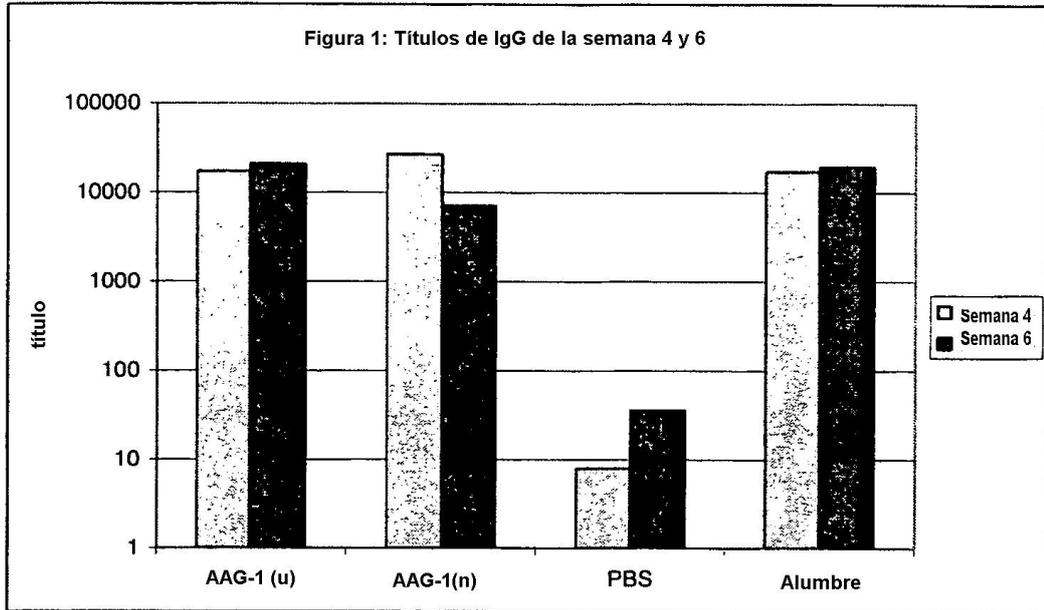


FIGURA 2

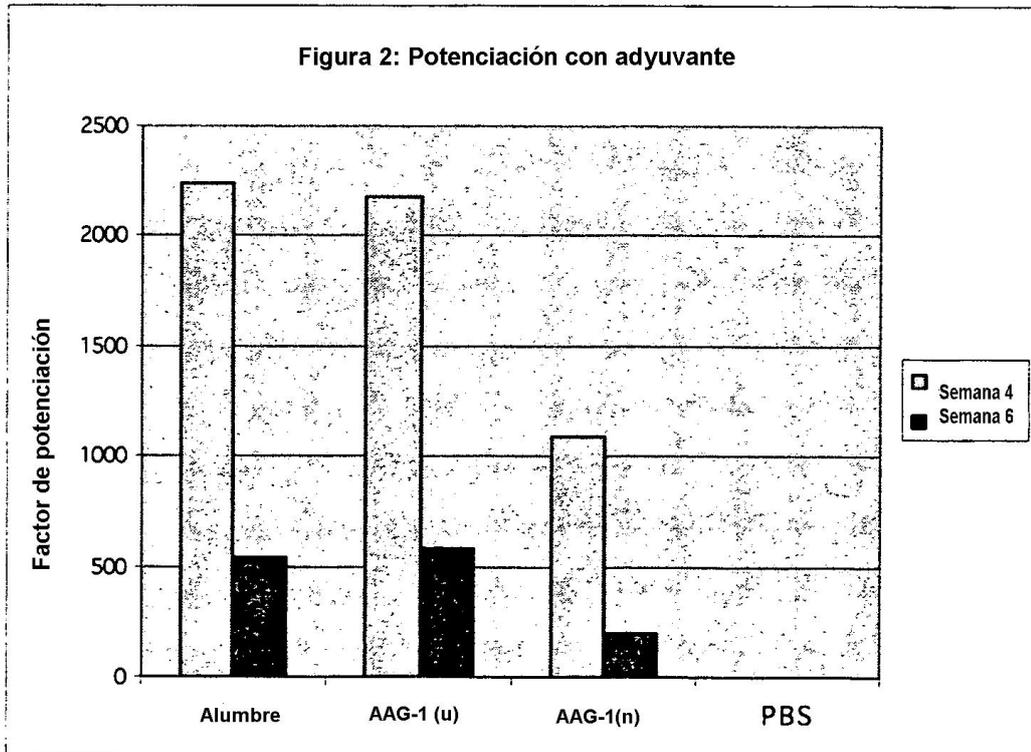


FIGURA 3

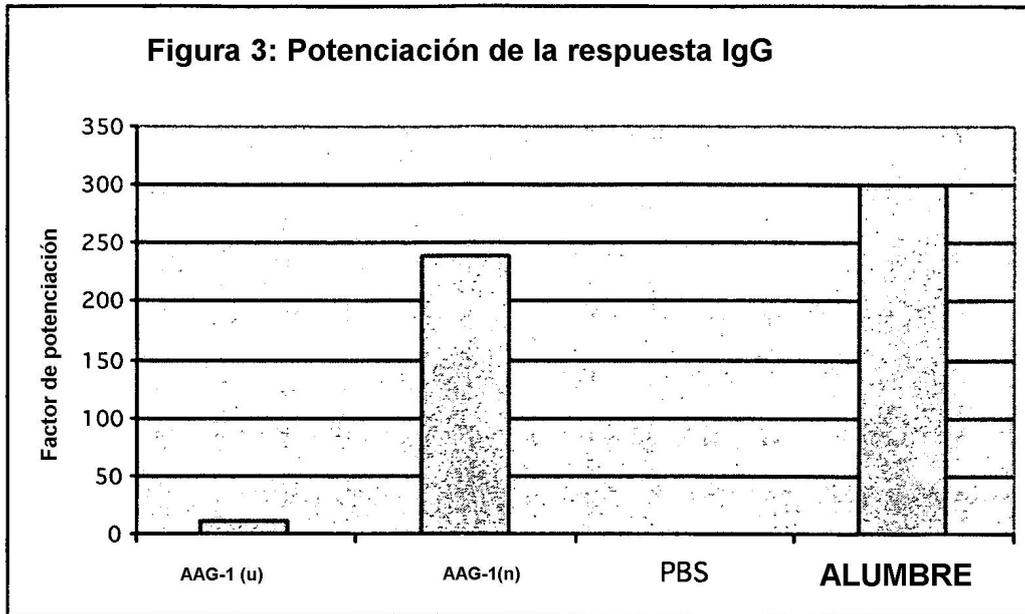


FIGURA 4

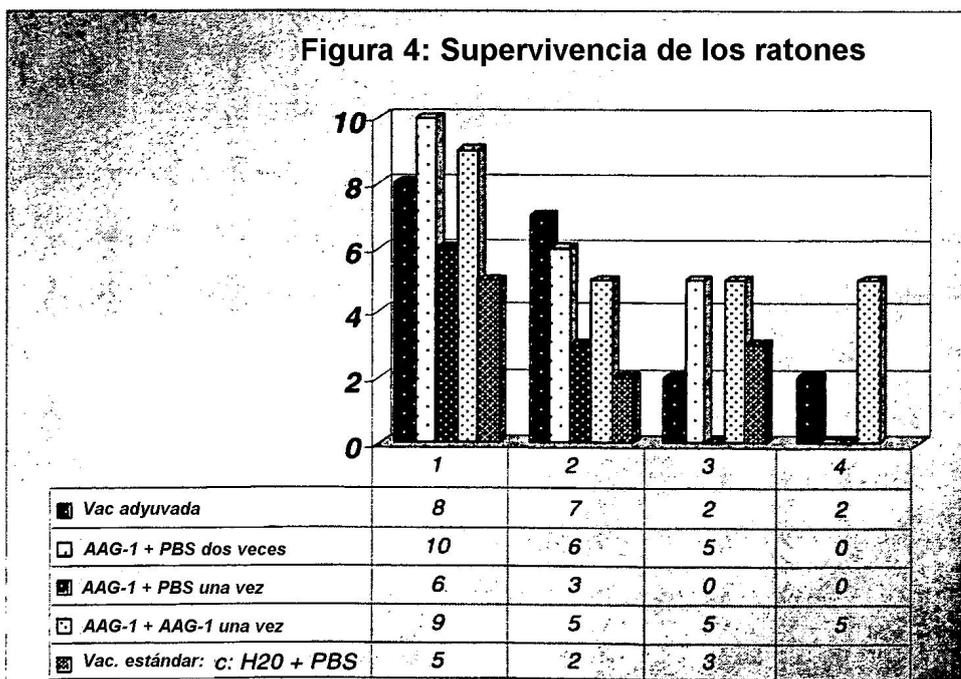


FIGURA 5

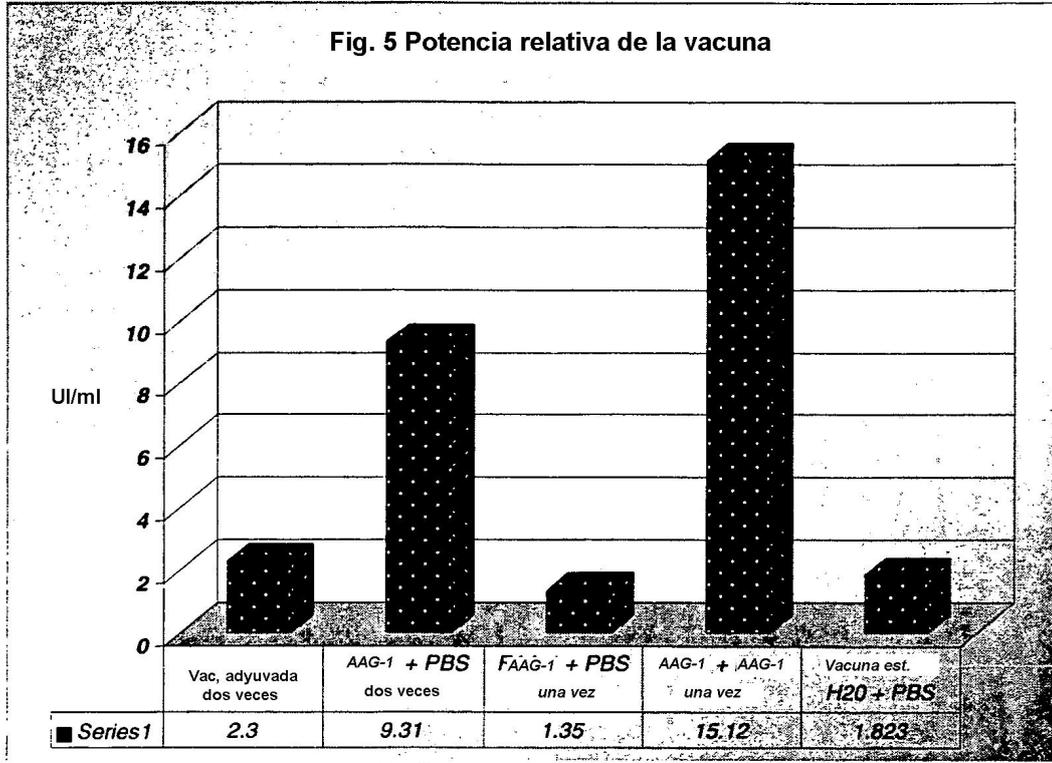


FIGURA 6

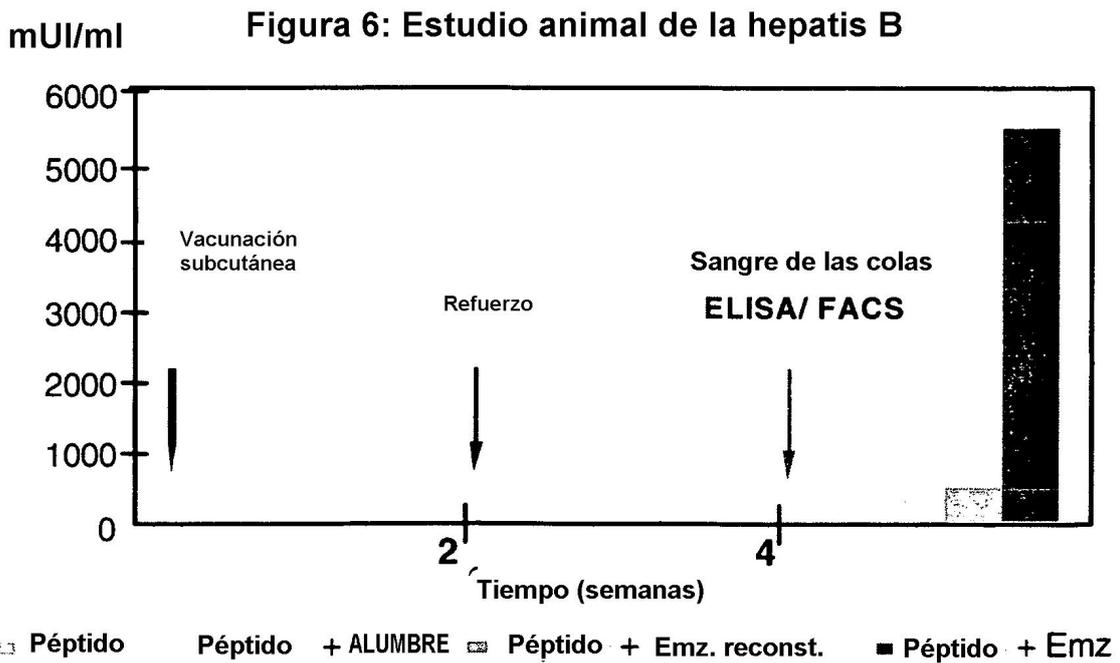


FIGURA 7

