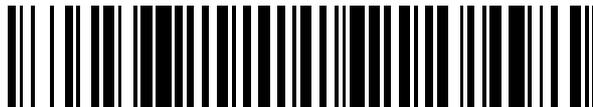


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 296**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2008 E 08771428 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2164510**

54 Título: **Composiciones de vacuna en emulsión que comprenden antígeno y un adyuvante en la fase acuosa**

30 Prioridad:

**20.06.2007 US 936571 P**

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

**14.11.2013**

73 Titular/es:

**ZOETIS W LLC (100.0%)  
100 Campus Drive  
Florham Park NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**LUTZ, DAVID LEON;  
RODENBERG, JEFFREY HAROLD;  
DIEHL, EVAN JAMES y  
KUMAR, MAHESH**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 429 296 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

Composiciones de vacuna en emulsión que comprenden antígeno y un adyuvante en la fase acuosa

### Antecedentes de la invención

#### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a formulaciones de vacuna de agua en aceite, a procedimientos de preparación de las formulaciones y al uso de dichas formulaciones para la vacunación de animales.

#### Técnica anterior

10 La piedra angular de muchos programas de control de enfermedades infecciosas es la inducción de inmunidad específica mediante la vacunación, ya sea con microorganismos vivos o inactivados o sus productos. Un procedimiento de vacunación eficaz permite el desarrollo de un estado de memoria inmunitaria en un animal para un antígeno, que conduce a una respuesta inmunitaria rápida y enérgica en el animal al entrar en contacto posterior con el antígeno. Algunos antígenos, sin embargo, son sólo débilmente inmunogénicos. Tales antígenos pueden ser incapaces de inducir una respuesta inmunitaria suficiente para proporcionar una protección eficaz para el animal a una exposición posterior, o pueden requerir la administración de agentes adicionales que aumenten la inmunogenicidad para proporcionar una protección efectiva.

15 La inmunogenicidad de un antígeno se puede aumentar mediante su administración en una mezcla con sustancias, llamadas adyuvantes, que aumentan la respuesta contra el antígeno, ya sea por acción directa sobre el sistema inmunitario o mediante la modificación de las características farmacocinéticas del antígeno, aumentando con ello el tiempo de interacción entre el último con el sistema inmunitario.

20 Las emulsiones a base de agua y aceite (por ejemplo, emulsiones de agua-en-aceite, aceite-en-agua, agua-en-aceite-en-agua) se pueden usar como adyuvantes en vacunas. Las emulsiones de agua-en-aceite se usan comúnmente como adyuvantes en vacunas para animales, por ejemplo, en las vacunas de aves de corral. En general, para hacer una emulsión de agua-en-aceite, se añade lentamente un antígeno en la fase acuosa a un vehículo de aceite mineral en la presencia de uno o más agentes emulsionantes, dando como resultado micelas que constan de gotitas de aceite dentro de las cuales reside el antígeno. Se cree que el componente oleoso induce la migración de las células inmunitarias al sitio de inyección, y también sirve para proteger el antígeno y ampliar el período de tiempo durante el que las células inmunitarias procesen el antígeno. El resultado final es una mayor respuesta inmunitaria en comparación con la simple inyección de antígeno por sí mismo.

25 A veces se usan adyuvantes que consisten en polímeros acrílicos como alternativa a las emulsiones a base de aceite en formulaciones de vacunas. Un ejemplo de polímero acrílico es un polímero hidrosoluble de ácido acrílico reticulado con polialilsacarosa que también se conoce como Carbopol. La patente US-5.026.546, por ejemplo, se refiere al uso de bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA) como un adyuvante de la vacuna y la adición de Carbopol para mejorar la solubilidad en agua del DDA.

30 Ambas emulsiones a base de aceite y polímeros acrílicos tienen claras ventajas cuando se usan como adyuvantes en las formulaciones de la vacuna. La combinación de emulsiones de agua-en-aceite y polímeros acrílicos, sin embargo, se habría desaconsejado ya que se espera que los polímeros acrílicos tales como Carbopol serían altamente reactivos en asociación con una emulsión de aceite. Por ejemplo, el documento US-5.026.546, descrito anteriormente, menciona el uso de Carbopol, pero no proporciona ninguna sugerencia de uso de DDA y/o Carbopol en emulsiones agua-en-aceite o aceite-en-agua. Además, con respecto a adyuvantes para ciertas especies tales como aves de corral, se han evitado los polímeros acrílicos debido a su alta reactividad percibida en general. El documento WO 2004/058142 divulga una vacuna que comprende un sistema adyuvante que comprende un polímero de ácido acrílico y una emulsión de aceite-en-agua. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de adyuvantes novedosos que proporcionen las ventajas combinadas de polímeros acrílicos y emulsiones agua-en-aceite sin los inconvenientes de la reactividad adversa causada por los polímeros acrílicos en el animal vacunado.

#### Breve resumen de la invención

35 La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la formulación de composiciones de vacuna en emulsión a base de aceite con un polímero acrílico tal como Carbopol en la fase acuosa aumenta significativamente la respuesta inmunitaria generada por la composición de vacuna en comparación con las composiciones de vacuna en emulsión a base de aceite que no incluyen un polímero acrílico. Por otra parte, mediante la formulación de un polímero acrílico en la fase acuosa de una emulsión de agua-en-aceite, se evitó la reactividad adversa esperada del polímero acrílico en el animal.

40 Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden emulsiones de agua-en-aceite. Las emulsiones de agua-en-aceite de la invención comprenden un componente oleoso y un componente acuoso. El componente acuoso comprende al menos un antígeno y al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA). La presente invención también

incluye procedimientos para vacunar a un animal, comprendiendo dichos procedimientos la administración a un animal de una composición de vacuna de la invención.

5 Otros aspectos de la invención incluyen procedimientos para la preparación de composiciones de vacuna que comprenden emulsiones de agua-en-aceite. Los procedimientos de la invención comprenden emulsionar un componente oleoso con un componente acuoso, en los que el componente acuoso comprende al menos un antígeno y al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).

Las características anteriores y muchas otras ventajas acompañantes de la invención se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se toma conjuntamente con los dibujos que se acompañan.

#### 10 **Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento ilustrativo para la preparación de una composición de vacuna en emulsión de la presente invención.

La **Figura 2** muestra los títulos de IH (inhibición de la hemaglutinación) de la sangre de pavos inoculados con una formulación de vacuna en emulsión de agua-en-aceite que contiene antígeno de la gripe aviar H5N3 inactivado.

15 La **Figura 3** muestra los títulos de IH de la sangre de pavos de control y pavos inoculados con vacunas en emulsión de agua-en-aceite que contienen antígeno de la gripe aviar H5N3 inactivado y sin adyuvante, Carbopol<sup>®</sup>, Carbopol<sup>®</sup> + DDA, CMC, HPMC o Al(OH)<sub>3</sub> (reHydragel<sup>®</sup>). Los niveles de título de IH marcados como "presangrado" eran de 3 pavos no vacunados.

#### **Descripción detallada de la invención**

20 La presente invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden una emulsión. La emulsión comprende un componente oleoso y un componente acuoso. El componente acuoso comprende al menos un antígeno y al menos un adyuvante. El adyuvante puede comprender un polímero acrílico y/o DDA.

##### Emulsiones

25 Los diferentes tipos de emulsiones usados en preparaciones de vacunas incluyen emulsiones de agua-en-aceite, aceite-en-agua y agua-en-aceite-en-agua. Un tipo preferido de emulsión para su uso en el contexto de la presente invención es una emulsión de agua-en-aceite. Una emulsión de agua-en-aceite puede incluir además uno o más tensioactivos solubles en aceite, uno o más tensioactivos solubles en agua, adyuvantes adicionales, componentes de la fase acuosa adicionales, estabilizadores en emulsión, o combinaciones de los mismos. Los procedimientos para preparar emulsiones de agua-en-aceite son conocidos en la técnica y se describen en otra parte de la presente memoria.

##### Composiciones de vacuna

35 Como se usa en la presente memoria, una "composición de vacuna" es una composición que se puede usar para provocar inmunidad protectora en un receptor. Por lo tanto, después de que un sujeto haya sido vacunado con un antígeno, una vacuna previene, retrasa o reduce la intensidad del desarrollo de una enfermedad en el sujeto expuesto a la misma o a un antígeno relacionado con respecto a un sujeto no vacunado. La inmunidad protectora proporcionada por una vacuna puede ser inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) o inmunidad celular o ambos. La vacunación puede, por ejemplo, eliminar o reducir la carga de un patógeno o de células infectadas, o producir cualquier otro alivio medible de una infección. La vacunación también puede reducir la carga tumoral en un sujeto inmunizado (vacunado).

40 El término "inmunidad protectora", como se usa en la presente memoria, se refiere a la inmunidad adquirida contra un antígeno cuando un sujeto ha sido expuesto al antígeno dando lugar a una respuesta inmunitaria (ya sea activa/adquirida o pasiva/innata o ambas) en el sujeto que conduce a la inactivación y/o reducción de la carga del antígeno y la creación de la memoria inmunitaria (por ejemplo, linfocitos T o B de memoria).

45 La inmunidad protectora proporcionada por la vacunación puede ser parcial o proporcionada en sólo una fracción de los sujetos vacunados. Por lo tanto, una vacuna puede inducir inmunidad protectora en una parte de la población inmunizada, ya que algunas personas pueden no desarrollar una respuesta inmunitaria robusta o protectora, o, en algunos casos, ninguna respuesta inmunitaria. Esta incapacidad puede deberse a la constitución genética del individuo o a un trastorno de inmunodeficiencia (bien adquirida o congénita) o inmunosupresión (por ejemplo, debido al tratamiento con quimioterapia o al uso de fármacos inmunosupresores, por ejemplo, para prevenir el rechazo de órganos o inhibir un trastorno autoinmunitario). Las vacunas que proporcionan protección a una parte de la población inmunizada son sin embargo útiles y se consideran eficaces.

## Adyuvantes

El término "adyuvante" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que refuerza la respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno cuando se administra conjuntamente con ese antígeno.

5 El reforzamiento de la respuesta inmunitaria mediada por un adyuvante puede ser evaluada por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo sin limitación uno o más de los siguientes: (i) un incremento en el número de anticuerpos producidos en respuesta a la inmunización con la combinación de adyuvante/antígeno en comparación con los producidos en respuesta a la inmunización con el antígeno solo, (ii) un aumento en el número de linfocitos T que reconocen el antígeno o el adyuvante, (iii) un aumento en el nivel de una o más citoquinas tipo I y (iv) la protección *in vivo* después de la exposición *in vivo*.

10 Se cree que una respuesta inmunitaria puede ser mejorada, si cualquier parámetro medible de la inmunorreactividad específica de antígeno (por ejemplo, título de anticuerpos o la producción de linfocitos T) se incrementa al menos un 10 % cuando un sujeto se expone a un antígeno y a un adyuvante en comparación con un sujeto expuesto al antígeno solo. En ciertas formas de realización de la presente invención, una respuesta inmunitaria se intensifica si cualquier parámetro medible de la inmunorreactividad específica de antígeno se aumenta en al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 125 %, al menos el 150 %, al menos el 175 %, al menos el 200 %, al menos el 225 %, al menos el 250 %, al menos el 275 %, al menos el 300 %, al menos el 350 %, al menos el 400 %, al menos el 450 %, al menos el 500 % o al menos el 1.000 %.

20 El adyuvante es preferiblemente un polímero acrílico, bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA) o una combinación de un polímero acrílico y DDA. El adyuvante es preferiblemente un adyuvante soluble en agua o dispersable en agua.

25 Un polímero acrílico, tal como se usa en la presente memoria, es cualquier polímero o copolímero que contiene un resto acrílico. Polímeros acrílicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, ácido poliacrílico, ácido metacrílico, metacrilato, acrilamida, acrilato, acrilonitrilo y ésteres alquílicos del ácido poliacrílico. Ejemplos de copolímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, poli(acrilamida-co-metacrilato de butilo), ácido acrílico-metacrílico, acrílico-acrilamida y poli(metacrilato). Ejemplos de copolímeros acrílicos comercialmente disponibles incluyen, Carbopol (BF Goodrich Co., Cleveland, Ohio), Carboset, (BF Goodrich Co., Cleveland, Ohio), Neocryl (Avecia, Inc., Wilmington, Del.) y Eudragit (Rohm Tech, Inc., Malden, MA). Un polímero acrílico particularmente útil para su uso en las emulsiones de la presente invención es el Carbopol, que también se denomina y es conocido en la técnica, genéricamente como un polímero soluble en agua de ácido acrílico reticulado con polialilsacarosa.

30 Polímeros acrílicos específicos que pueden incluirse en la fase acuosa de las emulsiones de agua-en-aceite de la presente invención incluyen polímeros de alquil-ácido poliacrílico ("alquil-APA"), como se describe en la patente US-6.340.464 y las referencias citadas en el mismo. Ejemplos de polímeros de alquil-APA incluyen decil-APA (C10-APA), octil-APA (C8-APA), butil-APA (C4-APA) y metil-APA (C1-APA). (Véase, por ejemplo, la patente US-6.340.464, Tabla I). Alternativamente, el octil-APA, puede ser denominado "octil-alquil-APA" u "OA-APA."

35 En ciertas realizaciones de la invención, el componente acuoso comprende también lecitina. En el contexto de la presente invención, la lecitina puede ser cualquier lecitina, por ejemplo, material lipoidal de lecitina, tales como fosfatidilcolina, que se puede usar para formar liposomas. Los fosfolípidos, lisofosfolípidos, glicolípidos y lípidos neutros comprenden la composición típica de la lecitina. Las lecitinas son moléculas que, cuando están completamente hidrolizadas, dan dos moléculas de ácido graso y una molécula de glicerol, una de ácido fosfórico y un compuesto nitrogenado básico, que es por lo general colina. Los ácidos grasos obtenidos a partir de lecitinas por hidrólisis son por lo general, pero no se limitan a, los ácidos oleico, palmítico y esteárico. El ácido fosfórico puede estar unido al glicerol ya sea en la posición  $\alpha$  o en la posición  $\beta$ , formando ácido  $\alpha$ -glicerofosfórico o ácido  $\beta$ -glicerofosfórico, respectivamente y produciendo las correspondientes series de lecitinas que se conocen como  $\alpha$ -lecitinas y  $\beta$ -lecitinas. Los ejemplos de adyuvantes que comprenden lecitina y un polímero acrílico se describen, por ejemplo, en la patente US-6.676.958.

40 En las composiciones de vacuna de la presente invención, el polímero acrílico y/o DDA se puede usar conjuntamente con uno o más adyuvantes adicionales. Ejemplos de adyuvantes adicionales incluyen, pero no se limitan a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, MF59 o SAF; geles minerales tales como hidróxido de aluminio (alumbre, por ejemplo,  $\text{Al}(\text{OH})_3$  reHydragel<sup>®</sup> disponible en Reheis, Berkeley Heights, NJ), sales de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio) o sales de calcio (por ejemplo, fosfato de calcio); adyuvantes de microorganismos, tales como la toxina del cólera (CT), la toxina de la tos ferina, toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT), toxinas mutantes (por ejemplo, LTK63 o LTR72), bacilo de Calmette-Guerin (BCG), lipopolisacáridos (LPS), micobacterias, la toxina del tétanos, *Corynebacterium parvum*, motivos CpG de ADN, dipéptido de muramilo o monofosforil lípido A; adyuvantes particulados tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOM), liposomas, microesferas biodegradables o saponinas (por ejemplo, QS-21); citoquinas tales como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 o GM-CSF; adyuvantes sintéticos tales como copolímeros de bloque no iónicos o tensioactivos, análogos de péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina [Thr-MDP], N-acetil-nor-muramil-L-

alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-[1'-2'-dipalmitoil-glicero-3-hidroxifosforiloxi]-etilamina), polifosfacenos, polinucleótidos sintéticos, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de hidrocarburos o hemocianinas de lapa de ojo de cerradura (KLH). Adyuvantes adicionales incluyen CMC (carboximetilcelulosa) y HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa).

- 5 Como se ilustra en los ejemplos proporcionados en la presente memoria, el uso de adyuvantes, tales como Carbopol, alquil-APA (por ejemplo, OA-APA) y/o DAD, en la fase acuosa de las vacunas en emulsión de agua-en-aceite sorprendentemente mejoró la antigenicidad de la vacunas en comparación con las vacunas en emulsión agua-en-aceite tradicionales sin adyuvantes.

#### Antígenos

- 10 El término "antígeno" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un agente que cuando se introduce en un sujeto, es reconocido por el sistema inmunitario del hospedador y es capaz de provocar una respuesta inmunitaria y generar inmunidad protectora. Los antígenos incluyen, sin limitación, "antígenos de superficie" que se expresan naturalmente en la superficie de un patógeno o en la superficie de una célula infectada, o en la superficie de una célula tumoral.

- 15 En ciertas realizaciones de la invención, el antígeno es un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser un agente infeccioso vivo o puede ser un agente infeccioso muerto o inactivado. Ejemplos de agentes infecciosos que pueden servir como antígenos en las composiciones de vacuna de la presente invención incluyen, por ejemplo, virus, bacterias, hongos, parásitos u otros microorganismos. El antígeno también puede ser un componente o producto derivado de un virus, una bacteria, un hongo, un parásito u otro microorganismo. Alternativamente, el antígeno puede ser un producto obtenido por síntesis química, proteína, polipéptido, péptido, polisacárido, glicoproteína, glicolípido, ácido nucleico o combinación de los mismos. Un experto normal en la técnica entenderá que cuando los antígenos de ácidos nucleicos se introducen en un animal, estos en última instancia darán lugar a la producción de, por ejemplo, un péptido o proteína, que a su vez provoca una respuesta inmunitaria.

- 25 Cuando se administra a un sujeto, los antígenos interactúan específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmunitario, tales como, por ejemplo, una inmunoglobulina (anticuerpo) o un receptor de antígeno de linfocitos T (TCR) para provocar una respuesta inmunitaria que conduce a la formación de células de memoria (por ejemplo, linfocitos B y T de memoria) e inmunidad protectora. Algunos antígenos requieren la co-administración con un adyuvante o vehículo para provocar una respuesta inmunitaria.

- 30 Una vacuna puede contener un componente (por ejemplo, un vector) que produce un antígeno además de o en lugar de un antígeno. Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula hospedadora con el fin de transformar al hospedador y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y/o traducción) de la secuencia introducida de un antígeno. Los vectores incluyen plásmidos, fagos y virus (por ejemplo, un virus de ARN tales como retrovirus y lentivirus).

- 35 En ciertas realizaciones de la presente invención en las que el antígeno es un agente infeccioso, el agente infeccioso puede ser un agente que es capaz de infectar un animal. Por ejemplo, el agente infeccioso puede ser capaz de infectar un ser humano, un animal aviar (por ejemplo, pollo, pavo, pato, paloma, etc.), canino, felino, bovino, porcino o equino.

- 40 Ejemplos no limitativos de agentes patógenos de enfermedades y/o afecciones para las que los antígenos pueden provocar inmunidad protectora son virus de la gripe, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la bronquitis infecciosa, rinovirus, virus de la parainfluenza, parvovirus (por ejemplo, el parvovirus del pato), adenovirus, Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, leucosis aviar, enfermedad de la bursitis infecciosa, reovirus, viruela, laringotraqueitis, enfermedad de Marek, tétanos, hepatitis B, malaria, neumonía neumocócica, rotavirus, parvovirus, coronavirus, E. coli, Salmonella, Shigella, Yersinia, Campylobacter, Clostridium, Vibrio y Giardia, Entamoeba y Cryptosporidium. Los antígenos también pueden provocar inmunidad protectora contra un tumor maligno (por ejemplo, tumores sólidos o de la sangre, como sarcomas, carcinomas, gliomas, blastomas, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfoma, leucemia y melanoma).

- 50 En ciertas realizaciones, el antígeno es un virus de la gripe, por ejemplo, un virus de la gripe inactivado. El virus de la gripe inactivado puede ser obtenido por procedimientos tradicionales o por las denominadas técnicas de "genética inversa". Ejemplos de procedimientos de genética inversa que pueden ser usadas para producir antígenos del virus de la gripe para su uso en las composiciones de vacuna de la presente invención se divulgan, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos números 6.951.754. 5.578.473. 5.820.871. 6.887.699. 6.544.785 y en las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos números 2003/0035814, 2006/0134138, 2006/0057116, 2005/0037487, 2005/0003349, 2006/0166321 y 2004/0142003.

- 55 Cualquier virus de la gripe inactivado se puede usar en el contexto de la presente invención incluyendo cualquier cepa A del virus de la gripe inactivado (por ejemplo, cepa de la gripe aviar). Los virus de la gripe pueden ser virus de la gripe recombinantes producidos por procedimientos tradicionales a base de huevo o mediante las técnicas de

genética inversa mencionadas anteriormente en esta memoria. Los virus recombinantes pueden poseer cualquier combinación de hemaglutinina (HA) y subtipos de neuraminidasa (NA). Ejemplos de virus de la gripe inactivados que se pueden usar como un antígeno en el contexto de la presente invención incluyen los virus con una hemaglutinina H1, H5, H7 o H9 combinada con cualquiera de N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. En general, el subtipo de hemaglutinina de los antígenos se elige basándose en el subtipo(s) de hemaglutinina exhibido por las cepas circulantes de la gripe infecciosas.

Cuando el antígeno es un virus de la gripe inactivado, tales como, por ejemplo, H5N3 o H5N9, la cantidad de antígeno en la composición de vacuna se expresa normalmente en términos de unidades de hemaglutinación (UHA) por dosis. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, el antígeno es un virus de la gripe inactivado y está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 50 a 1.000 UHA por dosis. En realizaciones particulares, cada dosis de la composición de vacuna contiene aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, aproximadamente 160, aproximadamente 165, aproximadamente 170, aproximadamente 175, aproximadamente 180, aproximadamente 185, aproximadamente 190, aproximadamente 195, aproximadamente 200, aproximadamente 205, aproximadamente 210, aproximadamente 215, aproximadamente 220, aproximadamente 225, aproximadamente 230, aproximadamente 235, aproximadamente 240, aproximadamente 245, aproximadamente 250, aproximadamente 255, aproximadamente 260, aproximadamente 265, aproximadamente 270, aproximadamente 275, aproximadamente 280, aproximadamente 285, aproximadamente 290, aproximadamente 295, aproximadamente 300, aproximadamente 305, aproximadamente 310, aproximadamente 315, aproximadamente 320, aproximadamente 325, aproximadamente 330, aproximadamente 335, aproximadamente 340, aproximadamente 345, aproximadamente 350, aproximadamente 355, aproximadamente 360, aproximadamente 365, aproximadamente 370, aproximadamente 375, aproximadamente 380, aproximadamente 385, aproximadamente 390, aproximadamente 395, aproximadamente 400, aproximadamente 405, aproximadamente 410, aproximadamente 415, aproximadamente 420, aproximadamente 425, aproximadamente 430, aproximadamente 435, aproximadamente 440, aproximadamente 445, aproximadamente 450, aproximadamente 455, aproximadamente 460, aproximadamente 465, aproximadamente 470, aproximadamente 475, aproximadamente 480, aproximadamente 485, aproximadamente 490, aproximadamente 495, aproximadamente 500, aproximadamente 505, aproximadamente 510, aproximadamente 515, aproximadamente 520, aproximadamente 525, aproximadamente 530, aproximadamente 535, aproximadamente 540, aproximadamente 545, aproximadamente 550, aproximadamente 555, aproximadamente 560, aproximadamente 565, aproximadamente 570, aproximadamente 575, aproximadamente 580, aproximadamente 585, aproximadamente 590, aproximadamente 595, aproximadamente 600, aproximadamente 605, aproximadamente 610, aproximadamente 615, aproximadamente 620, aproximadamente 625, aproximadamente 630, aproximadamente 635, aproximadamente 640, aproximadamente 645, aproximadamente 650, aproximadamente 655, aproximadamente 660, aproximadamente 665, aproximadamente 670, aproximadamente 675, aproximadamente 680, aproximadamente 685, aproximadamente 690, aproximadamente 695, aproximadamente 700, aproximadamente 705, aproximadamente 710, aproximadamente 715, aproximadamente 720, aproximadamente 725, aproximadamente 730, aproximadamente 735, aproximadamente 740, aproximadamente 745, aproximadamente 750, aproximadamente 755, aproximadamente 760, aproximadamente 765, aproximadamente 770, aproximadamente 775, aproximadamente 780, aproximadamente 785, aproximadamente 790, aproximadamente 795, aproximadamente 800, aproximadamente 805, aproximadamente 810, aproximadamente 815, aproximadamente 820, aproximadamente 825, aproximadamente 830, aproximadamente 835, aproximadamente 840, aproximadamente 845, aproximadamente 850, aproximadamente 855, aproximadamente 860, aproximadamente 865, alrededor de 870, aproximadamente 875, aproximadamente 880, aproximadamente 885, aproximadamente 890, aproximadamente 895, aproximadamente 900, aproximadamente 905, aproximadamente 910, aproximadamente 915, aproximadamente 920, aproximadamente 925, aproximadamente 930, aproximadamente 935, aproximadamente 940, aproximadamente 945, aproximadamente 950, aproximadamente 955, aproximadamente 960, aproximadamente 965, aproximadamente 970, aproximadamente 975, aproximadamente 980, aproximadamente 985, aproximadamente 990, aproximadamente 995 o aproximadamente 1.000 UHA.

En ciertas otras realizaciones, cada dosis de la composición de vacuna contiene aproximadamente 182 UHA, 256 UHA o 512 UHA.

#### Componente oleoso

Las composiciones de vacuna de la presente invención también incluyen un componente oleoso. Ejemplos de aceites que se pueden incluir en el componente oleoso incluyen, sin limitación, aceites terpénicos tales como escualano y escualeno; aceites vegetales tales como aceite de soja, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de jojoba, aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de albaricoque, aceite de aguacate, aceite de germen de trigo, aceite de Canola, aceite de linaza y aceite de almendras; aceites de peces como el aceite de tiburón, aceite de reloj anaranjado, aceite de lacha y aceite de hígado de bacalao; aceites animales, tales como aceite de visón, manteca de cerdo y aceite de grasa de pollo y aceites

sintéticos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, Miglyol<sup>®</sup> 840 (Sasol North America Inc., Houston, TX) y Captex<sup>®</sup> 300 (Abitec Corp., Columbus, Ohio), así como aceite mineral (disponible en Sigma-Aldrich, St Louis, MO), aceite de triglicéridos, derivados de propilenglicol y pristano. El aceite preferido de la fase oleosa es aceite mineral. También pueden usarse combinaciones de estos aceites.

## 5 Componentes adicionales

En ciertas formas de realización de la presente invención, las composiciones de vacuna pueden incluir uno o más componentes adicionales, tales como, por ejemplo, agentes tensioactivos, tampones y compuestos estabilizantes.

Agentes tensioactivos solubles en aceite incluyen Arlancel<sup>®</sup>83 (sesquioleato de sorbitán, disponible en Uniquema, New Castle, DE), Arlancel<sup>®</sup> A (monooleato de manida, disponible en Uniquema, New Castle, DE), Arlancel<sup>®</sup> 80 (disponible en Uniquema, New Castle, DE), Span<sup>®</sup> 80 (monooleato de sorbitán, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), L121 poloxámero 401 (Pluronic<sup>®</sup> L121, BASF Corp., Florham Park, NJ). Un tensioactivo soluble en aceite preferido es Arlancel<sup>®</sup> 83.

Tensioactivos solubles en agua incluyen Tween<sup>®</sup> 80 (monooleato de polioxietileno sorbitán, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Un tensioactivo soluble en agua preferido es Tween<sup>®</sup> 80.

15 Las fases acuosas pueden incluir un componente tamponador del pH tal como PBS (solución salina tamponada con fosfato), conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico), agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes.

Las emulsiones se pueden estabilizar mediante la inclusión de uno o más compuestos estabilizadores. Las clases de estabilizadores incluyen estabilizadores poliméricos y estabilizadores de bajo peso molecular. Los estabilizadores poliméricos forman geles en las fases a granel u otras estructuras en las interfaces y aumentan la viscosidad de una o más de las fases o interfaces. Los estabilizadores poliméricos incluyen, sin limitación, proteínas, almidones, gomas, celulosas, alcoholes de polivinilo, ácido poliacrílico y polivinilpirrolidona. Estos materiales se unen a la interfaz por enlaces covalentes o por interacciones electrostáticas e hidrófobas. Estos forman un "complejo interfacial" que se define como una asociación de dos o más moléculas tensioactivas en una interfaz en una relación que no existe en ninguna de las fases a granel. Ejemplos de estabilizadores de bajo peso molecular son, sin limitación, colesterol y sales de ácidos grasos de cationes divalentes tales como el estearato de aluminio.

## Procedimientos para preparar las composiciones de vacuna de la invención

La presente invención también incluye procedimientos para la preparación de composiciones de vacuna. En una realización, los procedimientos de la invención comprenden emulsionar un componente oleoso con un componente acuoso. Como se ha descrito en más detalle anteriormente, el componente acuoso de la composición de vacuna comprende al menos un antígeno y al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en un polímero acrílico y DDA. Cualquiera de los componentes oleosos, antígenos, adyuvantes y variaciones de los mismos que se describen en otra parte de la presente memoria se pueden usar en los procedimientos de la presente invención.

En una realización particular, se proporciona un procedimiento para la preparación de una composición de vacuna, en el que el procedimiento comprende: (a) combinar una solución acuosa de un antígeno con al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en un polímero acrílico y DDA para formar una mezcla de antígeno/adyuvante; (b) combinar la mezcla de antígeno/adyuvante de (a) con un componente oleoso y un emulsionante para formar una mezcla de antígeno/adyuvante/componente oleoso y (c) emulsionar la mezcla de antígeno/adyuvante/componente oleoso de (b) para formar una emulsión de agua-en-aceite, formando de ese modo una composición de vacuna.

Los procedimientos de la invención comprenden emulsionar un componente oleoso con un componente acuoso para formar, por ejemplo, una emulsión de agua-en-aceite (WO). Los procedimientos para preparar emulsiones de agua-en-aceite para composiciones de vacuna son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.109.026 y 5.744.137. En general, una fase acuosa (incluyendo opcionalmente un agente tensioactivo) y una fase oleosa (incluyendo opcionalmente un agente tensioactivo) se preparan y mezclan para formar una emulsión de agua-en-aceite.

Por ejemplo, las emulsiones de agua-en-aceite de Carbopol o Carbopol + DDA se pueden preparar de la siguiente manera: una fase acuosa se prepara mediante la mezcla de uno o más antígenos y, opcionalmente, Carbopol<sup>®</sup> o Carbopol<sup>®</sup> + DDA secuencialmente o simultáneamente en una solución acuosa para formar una mezcla homogénea. Opcionalmente puede mezclarse un agente tensioactivo soluble en agua con la mezcla acuosa que contiene antígeno. A la fase acuosa se pueden añadir componentes acuosos adicionales que incluyen adyuvantes adicionales. Un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento ilustrativo para la preparación de una formulación de vacuna de la invención se expone en la Figura 1.

El volumen total de cada dosis de la composición de la vacuna puede ser, por ejemplo, de 0,05 ml a 2,0 ml. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el volumen de la dosis de la composición de vacuna es de aproximadamente 0,05 ml, aproximadamente 0,10 ml, aproximadamente 0,15 ml, aproximadamente 0,20 ml, aproximadamente 0,25 ml,

aproximadamente 0,30 ml, aproximadamente 0,35 ml, aproximadamente 0,40 ml, aproximadamente 0,45 ml, aproximadamente 0,50 ml, aproximadamente 0,55 ml, aproximadamente 0,60 ml, aproximadamente 0,65 ml, aproximadamente 0,70 ml, aproximadamente 0,75 ml, aproximadamente 0,80 ml, aproximadamente 0,85 ml, aproximadamente 0,90 ml, aproximadamente 0,95 ml, o aproximadamente 1,0 ml.

5

En la preparación de las composiciones de vacuna de la presente invención, se pueden usar diversas proporciones de componente acuoso (por ejemplo, el antígeno en solución acuosa combinado con adyuvante) y de componente oleoso, tal como se expone en la siguiente Tabla 1:

TABLA 1

Componente acuoso	Componente oleoso
5 %	95 %
10 %	90 %
15 %	85 %
20 %	80 %
25 %	75 %
30 %	70 %
35 %	65 %
40 %	60 %
45 %	55 %
50 %	50 %
55 %	45 %
60 %	40 %
65 %	35 %
70 %	30 %
75 %	25 %
80 %	20 %
85 %	15 %
90 %	10 %
95 %	5 %

10 Un modo de preparar una emulsión de agua-en-aceite es añadir la fase acuosa a la fase oleosa. Después, esta mezcla se agita manualmente durante 15 a 20 segundos, se emulsiona durante 20 segundos usando una sonda de alta cizalla (homogeneizador Brinkman, Brinkman Instruments, Westbury, NY) Polytron 10/35, se agita en vórtex o se mezcla de forma similar usando una técnica familiar para los expertos en la técnica.

15 Para la preparación industrial de la composición de tensioactivo que contiene vacunas en emulsión de agua-en-aceite, las fases oleosa y acuosa que contiene el tensioactivo se pueden mezclar con un homogeneizador Silverson.

Los expertos en la técnica pueden apreciar que las cantidades relativas de la fase acuosa que contiene el antígeno, la fase oleosa y los agentes tensioactivos se pueden ajustar para lograr emulsiones con propiedades deseadas específicas de viscosidad.

Uso para la vacunación de un animal

20 La presente invención también incluye los usos para la vacunación de un animal.

Las composiciones de vacuna de la invención se pueden administrar a cualquier animal, incluyendo, por ejemplo, ser humano, animales aves, caninos, felinos, bovinos, porcinos o equinos. Ejemplos de animales aves incluyen, por ejemplo, animales aviares, ya sea domésticos o salvajes, y en particular a los que se crían para la producción de carne o huevos. Sin limitación a los mismos, ejemplos de aves incluyen pollos, pavos, gansos, patos, faisanes y similares.

25

Las formulaciones de vacuna pueden administrarse mediante, sin limitación, administración transdérmica o mediante administración transmucosa, incluyendo, pero sin limitarse a, las vías oral, bucal, intranasal, oftálmica, vaginal, rectal, intracerebral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, a través escarificación (rascado a través de las capas superiores de la piel, por ejemplo, usando una aguja bifurcada), por inhalación (pulmonar) o insuflación (ya sea a través de la boca o de la nariz), o mediante la administración a células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas (CD), *ex vivo* seguido de la administración de las células al sujeto, o por cualquier otra vía estándar de inmunización.

Preferiblemente, las composiciones de vacuna de la invención pueden ser administradas por vía parenteral, es decir, por vía intravenosa (iv), subcutánea (sc), intraperitoneal (IP), intramuscular (im), subdérmica (SD) o intradérmica (id), mediante inyección directa, a través de, por ejemplo, inyección en bolo, perfusión continua, o un vector génico (por ejemplo, para administrar una vacuna en un vector a un sujeto, tales como ADN o ARN desnudo). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido.

Para la administración por inhalación, los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones de la presente invención también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención.

Las composiciones de vacuna descritas en la presente memoria se administran a un sujeto en dosis terapéuticamente eficaces, preferiblemente, con una toxicidad mínima.

El término "terapéuticamente eficaz" aplicado a los términos dosis o cantidad se refiere a una cantidad de un compuesto o composición farmacéutica o vacuna que es suficiente para dar lugar a una actividad deseada tras la administración a un animal en necesidad del compuesto, composiciones farmacéuticas o vacunas. Como se usa en la presente memoria con respecto al adyuvante y a las composiciones que contienen antígeno o vacunas, el término "cantidad/dosis terapéuticamente efectiva" se usa de forma intercambiable con el término "cantidad/dosis inmunogénicamente eficaz" y se refiere a la cantidad/dosis de un compuesto (por ejemplo, un antígeno y/o un adyuvante) o composición farmacéutica o vacuna que es suficiente para producir, una respuesta inmunitaria eficaz tras la administración a un animal.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y otros componentes de dichas composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, como se usa en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o listado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en mamíferos y más particularmente en seres humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser determinada a partir de curvas de dosis-respuesta usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de una curva de dosis-respuesta se describe, sin limitación, en el Ejemplo 4 a continuación.

La dosis de adyuvante, el antígeno (s) y otros componentes en las composiciones de vacuna debe estar en cantidades tales que la dosis de antígeno administrada continuamente o intermitentemente no exceda una cierta cantidad teniendo en cuenta los resultados en animales de experimentación y las condiciones individuales de un sujeto.

Un régimen de dosificación específica variará dependiendo del procedimiento de administración, las condiciones de un paciente o un sujeto animal tales como edad, peso corporal, sexo, sensibilidad, alimentación, período de administración, fármacos usados en combinación, gravedad de la enfermedad. La dosis apropiada y los tiempos de administración en ciertas condiciones pueden ser determinadas por un médico, según las circunstancias de cada paciente y de acuerdo con técnicas clínicas estándar.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de composiciones inmunogénicas que contienen adyuvante se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en animales de experimentación, por ejemplo, mediante la determinación de la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren las composiciones que exhiben grandes índices terapéuticos. Aunque se pueden usar composiciones terapéuticas que muestran efectos secundarios tóxicos (por ejemplo, en el tratamiento de formas graves de cáncer o infecciones potencialmente mortales), se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija tales composiciones inmunogénicas al sitio específico (por ejemplo, tejido

linfoide que media una respuesta inmunitaria, tumor o un órgano de apoyo de la replicación del agente infeccioso) con el fin de minimizar el daño potencial a otros tejidos y órganos y, con ello, reducir los efectos secundarios.

Kits que comprenden componentes para fabricar composiciones de vacuna

5 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más componentes de una formulación inmunogénica. En una realización preferida, un kit para la preparación de una composición farmacéutica o vacuna comprende al menos un antígeno, adyuvante (por ejemplo, Carbopol® o Carbopol® + DDA), una fase oleosa y una fase acuosa, comprendiendo el kit los componentes en diferentes recipientes y opcionalmente instrucciones para mezclar los componentes y/o para la administración de la composición. Cada recipiente del kit también puede incluir opcionalmente uno o más vehículos y/o excipientes y/o

10 sustancias auxiliares fisiológicamente aceptables. Asociado con este recipiente(s) puede ir una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la preparación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleje la aprobación por la agencia de la preparación, el uso o la venta para la administración humana.

15 Las composiciones de vacuna pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen un principio activo (es decir, un antígeno y/o adyuvante). El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para la administración. Las composiciones formuladas en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para la vacunación contra un patógeno indicado y/o trastorno.

20 Definiciones de biología molecular

De acuerdo con la presente invención, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas son bien conocidas y se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription and Translation* [B.D. Hames y S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); y F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

25

30 Una "molécula de ácido nucleico" (o bien "ácido nucleico") se refiere a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina, citidina o "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina: "moléculas de ADN"), o cualquiera de sus análogos fosfoéster, tales como fosforotioatos y tioésteres, ya sea en forma de cadena sencilla, o una hélice de doble cadena. Los oligonucleótidos (que tienen menos de 100 unidades constituyentes de nucleótidos) o polinucleótidos se incluyen dentro del término definido, así como hélices de doble cadena ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. Este término, por ejemplo, incluye ADN bicatenario que se encuentra, entre otros, en moléculas de ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de restricción) o circular, plásmidos y cromosomas. Al discutir la estructura de moléculas de ADN de doble cadena particulares, las secuencias pueden describirse en la presente memoria de acuerdo con la convención normal de dar sólo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sufrido una manipulación biológica molecular.

35

40

Como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a un polímero basado en aminoácidos, que puede ser codificado por un ácido nucleico o prepararse sintéticamente. Los polipéptidos pueden ser proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas quiméricas, etc. En general, el término "proteína" se refiere a un polipéptido expresado de forma endógena en una célula. En general, una secuencia de ADN que codifica una proteína o enzima particular se "transcribe" en una secuencia de ARNm correspondiente. La secuencia de ARNm es, a su vez, "traducida" en la secuencia de aminoácidos que forman una proteína. Una "secuencia de aminoácidos" es cualquier cadena de dos o más aminoácidos. El término "péptido" se usa por lo general para los polímeros a base de aminoácidos que tienen menos de 100 unidades constituyentes de aminoácidos, mientras que el término "polipéptido" se reserva para polímeros que tienen al menos 100 de tales unidades. En la presente memoria, sin embargo, "polipéptido" será el término genérico.

45

50

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitativos, del procedimiento y composiciones de la presente invención.

### Ejemplos

#### 55 Ejemplo 1

Preparación de una formulación de vacuna en emulsión de agua-en-aceite control

Se añadió virus de la gripe aviar H5N3 inactivado obtenido por genética inversa (Liu et al., Virology 314:580-590 (2003)) a la solución salina estéril. La mezcla se dejó en agitación para formar una mezcla homogénea. Se añadió Tween® 80 (7,2 ml) a la mezcla seguido, mezclando a continuación para formar una mezcla acuosa homogénea.

5 La mezcla acuosa se añadió lentamente a una mezcla de aceite mineral/Arlacel® 83V (720 ml), de tal manera que la mezcla acuosa fue 40 % del volumen total y la mezcla oleosa fue del 60 % del volumen total, para formar una emulsión de agua-en-aceite.

### Ejemplo 2

Preparación de vacunas en emulsión de agua-en-aceite que contienen un adyuvante en la fase acuosa

10 Las emulsiones de agua-en-aceite que contienen un adyuvante en la fase acuosa se prepararon esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Se añadieron virus de la gripe aviar H5N3 en 1 de los 5 adyuvantes de la Tabla 2 a la solución salina estéril hasta un volumen total de 197 ml. La mezcla se dejó en agitación hasta formar una mezcla homogénea. Se añadió Tween® 80 (3,0 ml) a la mezcla, mezclando a continuación hasta formar una mezcla acuosa homogénea.

15 La mezcla acuosa se añadió lentamente a una mezcla de aceite mineral/Arlacel® 83V (300 ml), de tal manera que la mezcla acuosa era 40 % del volumen total y la mezcla oleosa era 60 % del volumen total, para formar una emulsión de agua-en-aceite. Por lo tanto, se prepararon 5 vacunas en emulsión con 5 adyuvantes diferentes.

**Tabla 2: Adyuvantes añadidos a la formulación de vacuna en emulsión de agua-en-aceite**

Adyuvante	Cantidad
Al(OH) <sub>3</sub> reHydrigel®	58,5 ml
Carbopol	50 ml de una solución al 2 %
Carbopol® + DDA	33 ml de una solución al 2 % de Carbopol + 16,5 g de DDA
CMC (carboximetilcelulosa)	1 g
HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa)	1 g

### Ejemplo 3

Determinación de la dosis para la inoculación de pavos

20 Los pavos se inocularon con 128, 256 o 512 UAH (unidad de hemaglutinación)/0,5 ml de la vacuna sin adyuvante, como se describe en el Ejemplo 1. El título IH (inhibición de la hemaglutinación) de la sangre de los pavos inoculados se midió 3, 6, y 9 semanas después de la inoculación. Las muestras fueron analizadas con un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH) (Manual de Diagnóstico y vigilancia de la gripe animal de la Organización Mundial de la Salud, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5). Los resultados se muestran en la figura. 2. Aunque cada dosis estaba asociada con una respuesta serológica bastante buena al principio, los títulos de IH cayeron drásticamente poco después.

### Ejemplo 4

Inoculación de pavos con la vacuna en emulsión de agua-en-aceite que contiene un adyuvante en la fase acuosa

30 Los pavos se inocularon con las vacunas que contienen adyuvantes en la fase acuosa como se describe en el Ejemplo 2. Se vacunaron diez pavos de 1 semana de edad con 0,5 ml de la vacuna (256 UAH/dosis). Como controles, se inocularon 10 pavos con la formulación descrita en el Ejemplo 1 y 10 pavos no se inocularon. A los pavos inoculados se les dio una segunda vacunación de refuerzo de 0,5 ml de vacuna (256 UAH/dosis) 3 semanas después de la primera vacunación. Se extrajeron muestras de suero de sangre de los pavos a las 4, 7 y 10 semanas de edad y se ensayaron usando el mismo ensayo de inhibición de la hemaglutinación usado en el Ejemplo 4. La

35 Tabla 3 proporciona una descripción tabular del protocolo experimental como se describió anteriormente.

Tabla 3: Protocolo para probar la eficacia de la formulación de vacuna en emulsión de agua-en-aceite que contiene un adyuvante en la fase acuosa

Edad de los pavos	Actividad
1 semana	Extracción de sangre de todos los pavos. Vacunar los pavos designados para la vacunación.
4 semanas	Extracción de sangre de todos los pavos. Revacunar los pavos designados para la vacunación.
7 semanas	Extracción de sangre de todos los pavos.
10 semanas	Extracción de sangre de todos los pavos.

Los resultados de las vacunas control y experimentales se dan en la Tabla 4 y la Figura 3. Los resultados demuestran la eficacia de las vacunas que comprenden los adyuvantes Carbopol® o Carbopol® + DDA.

Tabla 4: Títulos IH de pavos de 11 semanas de edad inoculados con una formulación de vacuna en emulsión de agua-en-aceite con o sin un adyuvante en la fase acuosa

Grupo	256 UHA	Carbopol®	Carbopol® + DDA	Vacuna sin adyuvante	CMC	HPMC	AlOH <sub>3</sub> reHydragel
MGT IH	120	222,5	232,5	133	97,14	140	82,5
<b>(MGT IH = media geométrica de los títulos de la inhibición de la hemaglutinación)</b>							

5 **Ejemplo 5**

Respuesta inmunitaria reforzada en pavos obtenida usando una composición de vacuna agua-en-aceite que contiene Carbopol y DDA

10 En este ejemplo, se usaron composiciones de vacunas que contienen un antígeno de la gripe aviar en una emulsión de agua-en-aceite, con o sin Carbopol o Carbopol + DDA, para vacunar a los pavos y se evaluaron las respuestas inmunitarias al antígeno de la gripe.

15 Las composiciones de vacuna usadas en este Ejemplo se prepararon esencialmente usando el procedimiento general descrito en la Figura 1. Brevemente, una solución acuosa que comprende el virus de la gripe aviar H5N9 inactivado se combinó con un emulsionante, con o sin Carbopol 0,2 % o Carbopol 0,2 % + 0,5 g/ml de DDA. La mezcla resultante se añadió lentamente a aceite mineral y luego se sometió a emulsión/homogeneización para producir o bien una "emulsión estándar" (que carece de Carbopol y DDA) o una "emulsión de Carbopol" o una "emulsión de Carbopol + DDA". La cantidad de H5N9 inactivo en las emulsiones finales fue de 512 UHA (tal como se mide mediante el ensayo sobre el stock viral pre-inactivado) por dosis de 0,5 ml.

Se usaron cuatro grupos de pavos en este ejemplo, consistiendo cada grupo en 20 pavos comerciales de una semana de edad. El diseño experimental se resume en la siguiente tabla 5:

20 TABLA 5

Grupo de Tratamiento	Composición de la vacuna	Nº Pavos / ruta / vol.
1	Emulsión estándar	20 / IM / 0,5 ml
2	Emulsión con Carbopol	20 / IM / 0,5 ml
3	Emulsión con Carbopol + DDA	20 / IM / 0,5 ml
4	Controles no vacunados	20 / n.a. / n.a.

IM = intramuscular (los pavos fueron vacunados por vía intramuscular en el pecho).

25 A las aves de los grupos 1, 2 y 3 se les administraron las composiciones de vacuna correspondientes a una semana de edad seguido de una vacunación de refuerzo a las 4 semanas de edad. Las muestras de sangre se recogieron en el momento de la vacunación inicial y en el momento de la vacunación de refuerzo y a intervalos de tres semanas a partir de entonces (es decir, a los 7, 10, 13, 16 y 19 semanas de edad). Las muestras fueron analizadas con un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH) (Manual de Diagnóstico y vigilancia de la gripe animal de la Organización Mundial de la Salud, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5). El ensayo de IH se realizó usando un stock de antígeno H5N9 inactivado con beta-propiolactona (BPL).

Los resultados de los ensayos de IH (expresado en términos de media geométrica de los títulos (MGT)) se muestran en la siguiente tabla 6:

30 TABLA 6

Grupo de tratamiento	Inhibición de Hemaglutinación MGT ** a:					
	3 spv1	3 spv2	6 spv2	9 spv2	12 spv2	15 spv2
1 (emulsión estándar)	26	111	74	26	18	25
2 (Carbopol)	36	453	333	187	118	83
3 (Carbopol + DDA)	36	67	51	28	29	33
4 (control no vacunado)	5	5	5	5	5	5

spv1 = semanas postvacunación 1; spv2 = semanas postvacunación 2

\*\* Para el cálculo de la MGT, a un título individual de un ave que fue negativo a 1:10 (la dilución más baja ensayada) se le asignó un valor de 5.

5 Los pavos vacunados con antígeno H5N9 + emulsión de Carbopol (Grupo 2) o con antígeno H5N9 + emulsión de Carbopol + DDA (Grupo 3) exhibieron mayores MGT de IH en comparación con las aves vacunadas con antígeno H5N9 sólo en emulsión estándar (Grupo 1). Además, el mayor nivel de respuesta serológica en los pavos a los que se administró la emulsión que contenía Carbopol se mantuvo durante toda la duración del estudio hasta 15 semanas después de la vacunación de refuerzo (pavos de 19 semanas de edad).

10 En este Ejemplo, se observó una mejora general de la respuesta serológica al virus de la gripe aviar en pavos a los que se había administrado una vacuna en emulsión de agua-en-aceite que incluía Carbopol o Carbopol + DDA en la fase acuosa. Esta mejora se produjo con un aislado de H5N9 convencional de baja patogenicidad, similar a los resultados observados usando el aislado de H5N3 de baja patogenicidad obtenido por genética inversa (Ejemplo 4). Por lo tanto, la respuesta inmunitaria mejorada puede ser atribuida al adyuvante y al parecer es aplicable a varios antígenos.

**Ejemplo 6**

Respuesta inmunitaria reforzada en patos obtenida usando una composición de vacuna agua-en-aceite que contiene Carbopol

15 En este ejemplo, se usaron composiciones de vacuna que contienen un antígeno de la gripe aviar en una emulsión de agua-en-aceite, con o sin Carbopol en la fase acuosa para vacunar a los patos y se evaluaron las respuestas inmunitarias al antígeno de la gripe.

20 Las composiciones de vacuna usadas en este Ejemplo se prepararon esencialmente usando el procedimiento general descrito en la Figura 1. Brevemente, una solución acuosa que comprende el virus de la gripe aviar H5N3 inactivado obtenido por genética inversa se combinó con un emulsionante, con o sin Carbopol 0,2 %. La mezcla resultante se añadió lentamente a aceite mineral y luego se sometió a emulsión/homogeneización para producir o bien una "emulsión estándar" (que carece de Carbopol y DDA) o una "emulsión de Carbopol" (que contiene Carbopol 0,2 % en la fase acuosa). La cantidad de rg-H5N3 en las emulsiones finales fue 256 UHA por 0,5 ml de dosis.

25 En este ejemplo, se usaron cuatro razas diferentes de pato: Pekin, ánade real, Khaki Campbell y Golden Hybrid 300. Cada raza de pato se subdividió en tres grupos de tratamiento diferentes, como se muestra en la tabla 7 siguiente:

TABLA 7

Raza	Grupo de Tratamiento	Composición de la vacuna	Número de patos por grupo de tratamiento
Pekin	1	Emulsión estándar	20
	2	Emulsión de Carbopol	20
	3	Controles no vacunados	10
Ánade real	1	Emulsión estándar	20
	2	Emulsión de Carbopol	20
	3	Controles no vacunados	10
Khaki Campbell	1	Emulsión estándar	20
	2	Emulsión de Carbopol	20
	3	Controles no vacunados	10
Golden Hybrid 300	1	Emulsión estándar	20
	2	Emulsión de Carbopol	20
	3	Controles no vacunados	10

30 Los patos de los grupos de tratamiento 1 y 2 se vacunaron por vía subcutánea en la parte posterior del cuello con 0,2 ml de volumen total de la composición de vacuna en emulsión correspondiente el día de edad ("vacunación primaria"). A las tres semanas de edad, los patos fueron reforzados con 0,5 ml de la misma vacuna por vía subcutánea en la parte posterior del cuello.

Las muestras de sangre se recogieron en el momento de la vacunación primaria y a intervalos de tres semanas a partir de entonces, es decir, a las 3 semanas después de la vacunación primaria ("3 SPV1") y a las 3, 6, 9 y 12 semanas después de la vacunación de refuerzo ("3 SPV2", "6 SPV2", "9 SPV2" y "12 SPV2"). Las muestras fueron

analizadas con un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH) (Manual de Diagnóstico y vigilancia de la gripe animal de la Organización Mundial de la Salud, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5). El ensayo de IH se realizó usando un stock de antígeno H5N3 inactivado con beta-propiolactona (BPL).

5 Los sueros recogidos de patos representativos de cada raza al día de edad (antes de la vacunación) estaba libre de anticuerpos anti-virus de gripe aviar detectables por IH. (Datos no mostrados.) Los resultados de los ensayos de IH (expresado en términos de media geométrica de los títulos (MGT)) para los puntos temporales restantes se muestran en la siguiente tabla 8:

TABLA 8

Raza	Grupo de Tratamiento	Inhibición de la hemaglutinación MGT** a:				
		3 SPV1	3 SPV2	6 SPV2	9 SPV2	12 SPV2
Pekin	1 (emulsión estándar)	9	14	12	7	6
	2 (Carbopol)	17	180	80	52	50
	3 (no vacunados)	5	5	5	5	5
Ánade real	1 (emulsión estándar)	8	90	36	20	24
	2 (Carbopol)	34	170	120	97	67
	3 (no vacunados)	5	5	5	5	5
Khaki Campbell	1 (emulsión estándar)	11	115	42	16	16
	2 (Carbopol)	29	238	138	76	57
	3 (no vacunados)	5	5	5	5	5
Golden Hybrid 300	1 (emulsión estándar)	17	126	83	72	75
	2 (Carbopol)	28	107	50	38	25
	3 (no vacunados)	5	5	5	5	5

SPV1 = semanas postvacunación 1; SPV2 = semanas postvacunación 2.  
 † Se sospecha que los resultados de la "emulsión estándar" y los resultados de "Carbopol" de los patos Golden Hybrid 300 se cambiaron inadvertidamente en algún momento durante el experimento.  
 Para el cálculo de la MGT, a un título individual de un ave que fue negativo a 1:10 (la dilución más baja ensayada) se le asignó un valor de 5.

10 Los resultados presentados anteriormente muestran que las composiciones de vacuna de agua-en-aceite formuladas con Carbopol en la fase acuosa producían unas respuestas inmunitarias significativamente mayores en la mayoría de las razas de patos analizadas en comparación con las composiciones de vacuna de agua-en-aceite formuladas sin Carbopol en la fase acuosa. Estos resultados confirman además que las composiciones de vacuna de agua-en-aceite que contiene un polímero acrílico (por ejemplo, Carbopol) en la fase acuosa proporcionan respuestas inmunitarias superiores en comparación con composiciones de vacuna de agua-en-aceite  
 15 convencionales.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de vacuna que comprende una emulsión de agua-en-aceite,  
en la que dicha emulsión comprende un componente oleoso y un componente acuoso; y  
en la que dicho componente acuoso comprende al menos un antígeno y al menos un adyuvante seleccionado  
del grupo que consiste en un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un adyuvante es un polímero acrílico.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que dicho polímero acrílico es un polímero de ácido acrílico  
reticulado con polialilsacarosa.
4. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que dicho polímero acrílico es un adyuvante alquil-ácido  
poliacrílico ("alquil-APA").
5. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en la que dicho adyuvante alquil-APA se selecciona del grupo  
que consiste en decil-APA, octil-APA, butil-APA y metil-APA.
6. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un adyuvante es bromuro de dimetil  
dioctadecil amonio (DDA).
7. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho componente acuoso comprende tanto un  
polímero acrílico como bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
8. La composición de vacuna de la reivindicación 7, en la que dicho polímero acrílico es un polímero de ácido acrílico  
reticulado con polialilsacarosa
9. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un antígeno es un agente infeccioso.
10. La composición de vacuna de la reivindicación 9, en la que dicho agente infeccioso es un agente infeccioso vivo.
11. La composición de vacuna de la reivindicación 9, en la que dicho agente infeccioso es un agente infeccioso  
muerto o inactivado.
12. La composición de vacuna de la reivindicación 9, en la que dicho agente infeccioso es un virus, una bacteria, un  
hongo o un parásito.
13. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un antígeno es un péptido, un  
polipéptido o un ácido nucleico.
14. La composición de vacuna de la reivindicación 9, en la que dicho agente infeccioso es un agente que es capaz  
de infectar un animal aviar, canino, felino, bovino, porcino o equino.
15. La composición de vacuna de la reivindicación 12, en la que dicho agente infeccioso es un virus de la gripe.
16. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho componente oleoso comprende aceite mineral.
17. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además uno o más  
emulsionantes.
18. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho componente acuoso comprende además  
lecitina.
19. La composición de vacuna de la reivindicación 1 para su uso en la vacunación de un animal.
20. La composición de vacuna para su uso según la reivindicación 19, en la que el animal es en un animal aviar,  
canino, felino, bovino, porcino o equino.
21. Un procedimiento para la preparación de una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las  
reivindicaciones 1 a 18, comprendiendo dicho procedimiento emulsionar el componente oleoso con el componente  
acuoso.
22. Un procedimiento para la preparación de una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las  
reivindicaciones 1 al 18 comprendiendo dicho procedimiento:
  - (a) combinar una solución acuosa de un antígeno con al menos un adyuvante para formar una mezcla de  
antígeno/adyuvante;
  - (b) combinar dicha mezcla de antígeno/adyuvante de (a) con un componente oleoso y un emulsionante para  
formar una mezcla de antígeno/adyuvante/componente oleoso y

(c) emulsionar dicha mezcla de antígeno/adyuvante/componente oleoso de (b) para formar una emulsión de agua-en-aceite, formando de este modo una composición de vacuna.



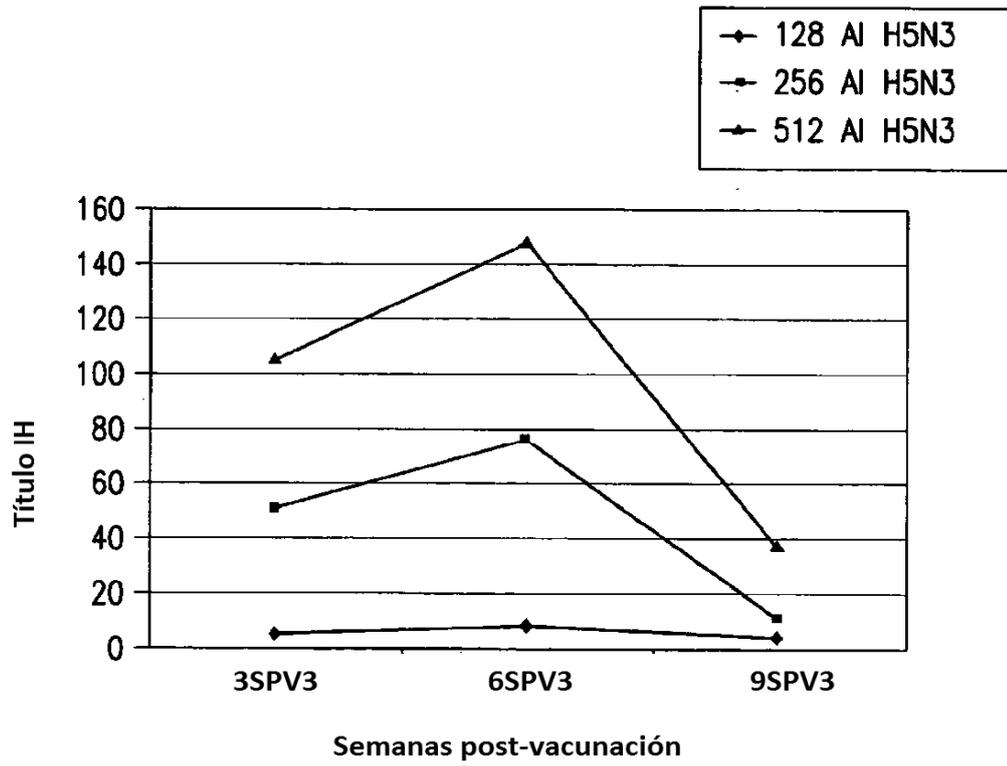
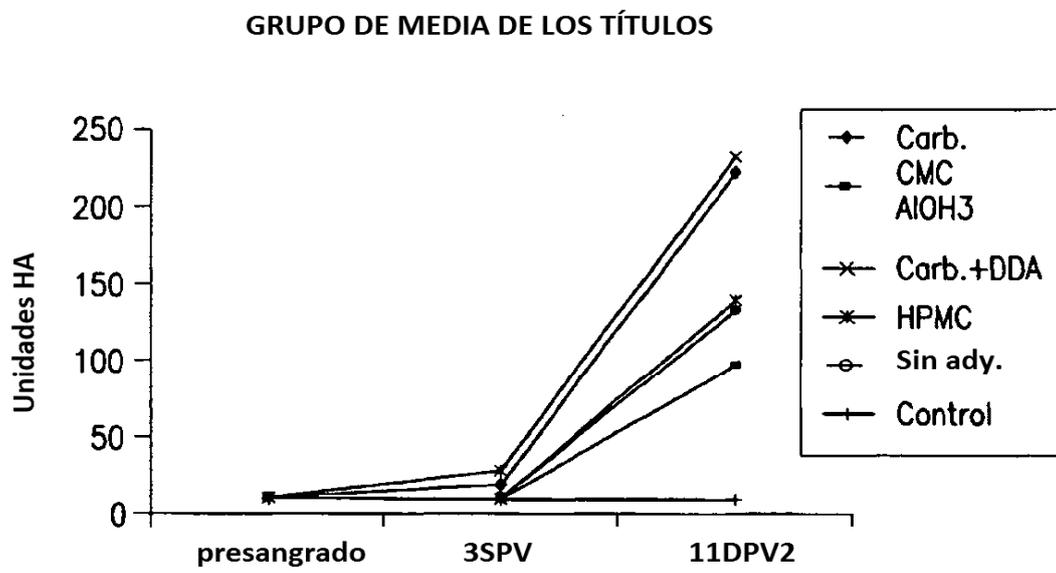


FIG.2



**FIG.3**