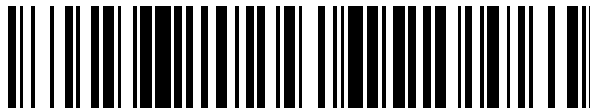


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 740**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2012 PCT/FR2012/051648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13007956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2012 E 12744086 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2731622**

54 Título: **Composición de vacuna con unas nanopartículas de hidróxido de aluminio**

30 Prioridad:

13.07.2011 FR 1156398

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

22.01.2018

73 Titular/es:

**SANOFI PASTEUR (100.0%)
2, avenue Pont Pasteur
69367 Lyon Cedex 07, FR**

72 Inventor/es:

**MATHIEU, YANNICK;
LEBEAU, BÉNÉDICTE;
VALTCHEV, VALENTIN;
PATARIN, JOËL;
GARINOT, MARIE;
HAENSLER, JEAN y
SAUZEAT, ELISABETH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 650 740 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de vacuna con unas nanopartículas de hidróxido de aluminio

5 La presente invención se refiere al campo de las vacunas y más particularmente a las composiciones de vacuna que comprenden al menos un adyuvante. En particular, la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende unas nanopartículas filtrables de forma estéril que comprenden pseudo-boemita y poliacrilato (PAA).

10 Se conoce desde hace mucho tiempo en la técnica anterior que el aluminio es interesante como adyuvante para las vacunas. Numerosas vacunas comercializadas lo contienen, o bien en forma de hidróxido, o bien en forma de fosfatos; no reflejando estas denominaciones por otro lado exactamente la composición química de los productos correspondientes: los hidróxidos de aluminio son más bien unos oxihidróxidos, y los fosfatos de aluminio rara vez son fosfatos puros, pero contienen muy a menudo otros iones, en particular sulfatos, así como hidróxidos. Aunque estos adyuvantes a base de aluminio, también denominados geles de aluminio, han mostrado toda su ventaja para
15 aumentar la respuesta inmunitaria inducida por un antígeno, presentan no obstante algunos inconvenientes. Desde un punto de vista industrial, las suspensiones tradicionales de hidróxido o de fosfato de aluminio no permiten, a causa del tamaño demasiado grande de las partículas, proceder al final de la producción a una esterilización por filtración, y requieren por lo tanto recurrir a un procedimiento de producción que se desarrolle en condiciones asépticas. Por otro lado, en el caso de algunos modos de administración, en particular la vía intradérmica, se ha
20 culpado al aluminio de llevar a un efecto de tatuaje en el lugar de administración.

El documento WO2007052058 divulga una composición de vacuna que comprende un adyuvante que puede comprender unas sales de aluminio o unas partículas que comprenden un polímero tal como policianoacrilato. Por lo tanto es deseable poder disponer de composiciones de vacuna que comprendan aluminio a fin de beneficiarse de sus poderes adyuvantes, evitando al mismo tiempo sus inconvenientes. Para este fin, la presente invención propone
25 una composición de vacuna que comprende al menos un antígeno y un adyuvante, caracterizada por que el adyuvante comprende unas nanopartículas filtrables de forma estéril que comprenden la pseudo-boemita y poliacrilato.

30 La presente invención tiene también por objeto la utilización de nanopartículas filtrables de forma estéril que comprenden pseudo-boemita y poliacrilato para la preparación de una composición de vacuna que comprende al menos un antígeno.

35 En particular, la invención tiene por objeto la utilización de tales nanopartículas que permiten aumentar la respuesta inmunitaria inducida durante la administración de dicha composición de vacuna.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de una composición de vacuna que comprende al menos un antígeno y un adyuvante, según el cual:

40 * se preparan unas nanopartículas filtrables de forma estéril que comprenden la pseudo-boemita y poliacrilato,

* se filtran dichas nanopartículas mediante un filtro esterilizante,

* se añade a dichas nanopartículas al menos un antígeno de vacuna, y

45 * opcionalmente, se procede si es necesario a una filtración suplementaria.

50 Gracias al objeto de la invención, es posible obtener un adyuvante de vacuna que induce menos reacción de reactogenecidad que las suspensiones de aluminio utilizadas clásicamente, en particular después de la administración por vía intradérmica (ID) y que permiten efectuar al final del procedimiento de fabricación una esterilización por filtración.

Otras ventajas de la invención aparecerán durante la siguiente descripción.

55 En los términos de la presente invención, las nanopartículas son unas partículas cuyo tamaño permite su paso a través de un filtro esterilizante, cuyos poros tienen un diámetro de 220 nm. Las partículas tienen por lo tanto un tamaño inferior a 300 nm, ya que por deformación, tales partículas pueden pasar dentro de los poros de tamaño más pequeño. Pero de manera preferida, las partículas tienen un tamaño inferior a 220 nm, e incluso inferior a 200 nm. Tales partículas forman unas suspensiones coloidales que son transparentes. Ventajosamente, se utilizan unas
60 suspensiones cuya mayoría de partículas tienen entre 30 y 200 nm de diámetro, lo que permite filtrarlas sin demasiada pérdida de materia, con un filtro esterilizante cuyo límite de corte es 220 nm. El diámetro de las partículas es un diámetro hidrodinámico que puede medirse mediante diferentes técnicas; por ejemplo, se puede utilizar la difusión casi-elástica de la luz. Esta técnica permite medir el tamaño de las partículas en una suspensión coloidal para unos rayos que van de 1 nanómetro hasta algunos micrómetros. Las partículas en suspensión en un líquido están sometidas al movimiento browniano (agitación térmica y choques entre moléculas del líquido y partículas sólidas). El principio de una medición en difusión de la luz consiste en bombardear las partículas en la suspensión
65

coloidal por una radiación coherente y monocromática de tipo láser, después registrar las fluctuaciones de la intensidad luminosa difundida por estas partículas con la ayuda de un fotodiodo de avalancha (dispositivo que permite contar el número de fotones).

5 Estos experimentos tienen habitualmente lugar en medios muy diluidos transparentes a simple vista. En el caso de la presente invención, el diámetro de las nanopartículas se ha determinado después de la dilución (generalmente 1/10) en agua desmineralizada. El modelo del aparato utilizado era un Malvern ZetaSizer Nano ZS.

10 Según la invención, las nanopartículas son unas partículas constituidas esencialmente de pseudo-boemita con, en su superficie, poliacrilato que permite evitar la agregación de las nanopartículas después del lavado de las nanopartículas por diálisis. Según un modo particular de la invención, el poliacrilato se une a la pseudo-boemita por interacciones de tipo electrostático. Según un modo de la invención, la cantidad de poliacrilato representa una masa inferior al 10% de la masa de las nanopartículas, más particularmente una masa inferior al 9%, al 8%, al 7%, al 6%, al 5%, al 4%, al 3%, al 2%, al 1%. Según un modo de la invención, la cantidad de poliacrilato representa una masa al menos igual al 1% de la masa de las nanopartículas, más particularmente una masa superior al 2%, al 3%, al 4%, al 5%, al 6%, al 7%, al 8%, al 9%.

20 La calificación del constituyente esencial de las nanopartículas de la invención, en pseudo-boemita se puede efectuar por análisis de difracción con rayos X, que conduce a un difractograma de rayos X característico de pseudo-boemita con las principales rayas (020), (021), (130), (150), (151), y (132) observadas a 14, 28,1, 32,4, 49,3, 55,5 y 65° 2 θ ($\lambda=0,15406$ nm).

25 Se utiliza el poliacrilato ya que los polímeros utilizados deben ser biocompatibles, es decir no presentar toxicidad para el organismo al que se les administra. Además, el polímero utilizado debe ser estable a las temperaturas utilizadas durante la síntesis de las nanopartículas. El poliacrilato utilizado puede ser de diferentes pesos moleculares; puede tratarse en particular de poliacrilato de sodio o cualquier otra sal que conviene para un uso farmacéutico. Se han obtenidos buenos resultados con el poliacrilato de sodio PAA 2100 proporcionado por la compañía Fluka, así como con el PAA-60 000 de Polysciences.

30 Las partículas se preparan según un método inspirado del método descrito por S. Musić *et al.* en *Materials Chemistry and Physics*, 1999, 59, 12-19 que tiene como título «*Chemical and microstructural properties of Al-oxide phases obtained from AlCl₃ solutions in alkaline medium*». Según S. Musić *et al.*, se aumenta el pH de una solución acuosa de sal de aluminio mediante la adición de una base (NaOH) hasta un valor ligeramente superior a 11 en un lapso de tiempo de 5 minutos (control con la ayuda de un pH metro). Después de lo cual, la mezcla se agita vigorosamente durante 10 minutos y después se transfiere en un autoclave y se calienta a 160°C durante 24h. El producto (solución blanquecina y homogénea) se recupera por filtración sobre Büchner, se lava y después se seca durante una noche en un horno a 65°C. En el caso de síntesis según la presente invención, y así como se ha descrito por Y. Mathieu *et al.* en «Control of the morphology and particle size of boehmite nanoparticles synthesized under hydrothermal conditions» en *Langmuir* 2007, 23, 9435-9442, la síntesis se efectúa en presencia de poliacrilato de sodio que se añade al principio en la solución acuosa de sales de aluminio. La presencia de polímero impedirá la aglomeración de las partículas formadas. Las cantidades relativas de poliacrilato y de sal de aluminio se seleccionan a fin de permitir la solubilización del poliacrilato en la solución de sal de aluminio y obtener unas nanopartículas filtrables que convienen como adyuvante de vacuna. Se ha observado así que con el PAA 2100, era ventajoso respetar una relación molar poliacrilato de sodio sobre aluminio comprendida entre 0,43 y 0,57.

45 Antes de añadir la base, la mezcla de poliacrilato de sodio y de sal de aluminio se somete a una fase de maduración durante la cual se agita. Esta fase de maduración se efectúa ventajosamente a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. Desde un punto de vista industrial, es muy interesante poder trabajar a temperatura ambiente, en una duración corta que puede ser prolongada si fuese necesario durante los fines de semanas, por ejemplo.

50 Las sales de aluminio que permiten producir unas nanopartículas pueden ser de naturaleza diversa; puede tratarse en particular de cloruro de aluminio AlCl₃, de nitrato de aluminio Al(NO₃)₃, o también de sulfato de aluminio Al₂(SO₄)₃; preferentemente, se selecciona el cloruro de aluminio AlCl₃.

55 Las bases que se pueden utilizar para aumentar el pH de la mezcla son diversas y se pueden seleccionar en particular entre NaOH, KOH, o NH₄OH. De manera ventajosa, se efectúa la síntesis de las nanopartículas utilizando sosa NaOH.

60 Según la invención, la sosa se utiliza para aumentar el pH hasta un valor de aproximadamente 10-11 durante una operación que tarda entre 5 y 10 minutos. Durante esta fase de aumento de pH, las diferentes especies aluminicas en presencia conocen unas modificaciones, tales como disociaciones y reorganizaciones a fin de llegar a la formación de una fase más o menos cristalina.

65 Según la invención, la mezcla se somete después a un tratamiento hidrotermal durante un tiempo que puede ir de 1 a 17 horas; de manera ventajosa, a la vista del tamaño de las partículas obtenidas y de su filtrabilidad, se selecciona

un tiempo de 3 horas. Este tratamiento se efectúa o bien en modo estático, o bien bajo agitación a una temperatura comprendida entre 90°C y 200°C, más particularmente a 160°C.

5 Según la invención, las nanopartículas obtenidas son filtrables de forma estéril, lo que significa que tienen un tamaño que les permite atravesar un filtro esterilizante cuyo tamaño de poros es de 220 nm; las pérdidas observadas durante tal filtración son compatibles con obligaciones industriales. En efecto, unos ensayos efectuados sobre unos filtros PTFE (politetrafluoroetileno) 0,22 µm han mostrado que se tenía menos del 5% de pérdida en polímero y en aluminio, pudiendo este valor del 5% corresponder al margen de error de la técnica de determinación.

10 Según la invención, las nanopartículas pueden estar en suspensión en una solución salina o un tampón biológico. Se han realizado unos ensayos en particular en tampón PBS (Tampón fosfato salino), en tampón TRIS (trihidroximetilaminometano), o en una solución salina que comprende 90g/l de NaCl, 0,12g/l de Na₂HPO₄, y 0,6g/l de KH₂PO₄.

15 Según una característica particular de la invención, la suspensión que comprende las nanopartículas de pseudo-boemita y de poliacrilato comprende también un tensioactivo, en particular un tensioactivo neutro tal como el Brij[™] 58, el Pluronic[™] 123 o el Tween[™] 60, o un tensioactivo aniónico tal como el SDS (dodecilsulfato de sodio), o también un polímero tal como el PEG (polietilenglicol). Así, se puede aumentar la estabilización de las nanopartículas formadas por efecto estérico o por repulsión electrostática.

20 Según la invención, la composición de vacuna comprende al menos un antígeno.

25 Para los fines de realización de la presente invención, se ha utilizado la proteína tetánica purificada como antígeno-modelo. Después, se han llevado a cabo unos ensayos con otros antígenos, en particular unos antígenos de la gripe, el antígeno LSA3 de malaria, o también unos antígenos recombinantes de ETEC (*Enterotoxigenic Escherichia coli*). Sin embargo, la composición de vacuna según la invención puede comprender cualquier antígeno que puede utilizarse en una vacuna, ya se trate de un germen entero, de un antígeno sub-unitario, natural, recombinante, híbrido, etc. importa poco su naturaleza; el antígeno puede en efecto ser un péptido, una proteína, una glicoproteína, un polisacárido, un glicolípido, un lipopéptido, una VLP (partícula similar a virus), etc.

30 Estos antígenos son unos antígenos utilizados o susceptibles de utilizarse para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades susceptibles de afectar al mundo animal, y en particular los seres humanos, en particular: difteria, tétanos, polio, rabia, tos ferina, hepatitis A, B, C, fiebre amarilla, fiebre tifoidea, varicela, sarampión, paperas, rubeola, encefalitis japonesa, gripe, meningitis, cólera, infecciones por: rotavirus, norovirus, rinovirus, virus respiratorio sincitial, virus herpes simple, virus del papiloma, citomegalovirus, fiebre del Nilo occidental, virus del dengue, virus de Chykungunya, VIH (SIDA), las afecciones bacterianas provocadas por: estreptococos, *Chlamydia trachomatis* y *pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus influenza* de tipo B, la listeriosis, shigelosis, la salmonelosis, la tuberculosis, la enfermedad de Lyme, el cáncer, las afecciones parasitarias tales como la malaria, las leishmaniosis, etc.

35 La composición farmacéutica según la invención puede ser una composición destinada a la inmunización contra un solo patógeno o cáncer, es decir que comprende uno o varios antígenos de un solo patógeno o cáncer, o bien ser una composición destinada a la inmunización contra varios patógenos o cánceres (se habla entonces de combinación de vacuna). La composición según la invención puede también comprender varios antígenos específicos de una única enfermedad, pero que pertenece a diferentes categorías del agente de esta enfermedad (varias cepas o serotipos, o clados, según la naturaleza del agente). Puede también tratarse de una composición de vacuna que comprende unos alérgenos, destinada en particular a una desensibilización en el ámbito del tratamiento de las alergias.

40 La composición de vacuna según la invención se puede administrar mediante todas las vías habitualmente utilizadas para la administración de las vacunas; sin embargo, es de un interés particular para la vía intra-dérmica. En efecto, la vía intra-dérmica, si parece muy eficaz para inducir a buenas reacciones inmunitarias, tiene como inconveniente conducir a veces a reacciones de reactogenicidad local, que pueden frenar su utilización. Gracias a las nanopartículas según la invención, fue posible realizar unas inmunizaciones por vía intradérmica teniendo muy poca o ninguna reacción de reactogenicidad, y en particular ningún efecto tatuaje así como podría haber sido con las suspensiones de aluminio de la técnica anterior.

45 Según la invención, se prepara la composición de vacuna por simple mezcla de una suspensión que comprende las nanopartículas de pseudo-boemita y de poliacrilato y una suspensión de antígenos. Esta operación puede llevarse a cabo mediante adición de los antígenos en una suspensión coloidal que comprende las nanopartículas o por adición de las nanopartículas en una suspensión que comprende ya los antígenos. Por otro lado, en el caso en el que se desea disponer de composiciones de vacuna que comprenden varios tipos de antígenos, se puede preferir efectuar en prioridad la adsorción de algunos antígenos con respecto a otros. En particular, en el caso en el que la composición de vacuna comprende una mezcla de antígenos de los cuales algunos, por razones de estabilidad o de inmunogenicidad, no deben adsorberse, puede ser preferible proceder de la manera siguiente: se saturan en primer lugar las partículas a base de aluminio con los antígenos que necesitan una adsorción o con unos iones o

excipientes presentes en la sustancia tampón antes de introducir los antígenos que no deben adsorberse.

5 Durante la preparación de las nanopartículas según la invención, es posible que haya polímero en exceso. Para eliminar este eventual exceso de polímero, es posible proceder a una etapa suplementaria, bien directamente después de la fase de preparación de las nanopartículas, o bien directamente después de la fase de mezcla con el antígeno. Esta fase de eliminación se puede realizar por diálisis o diafiltración contra el agua desmineralizada (Milli Q, Millipore), una solución salina o un tampón biológico, a través de una membrana de porosidad adecuada (de 30 a 100 kDa según el tamaño de las nanopartículas).

10 Los ejemplos siguientes ilustran unos modos de realización de la invención.

Ejemplo 1: síntesis de una suspensión coloidal de nanopartícula de pseudo-boemita

15 Se utilizó el poliacrilato de sodio (NaPa) de masa molecular 2100 proporcionado por Fluka, y el cloruro de aluminio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) proporcionado por Avocado.

20 Se disuelven 9 g de NaPa en 75 ml de una solución acuosa de AlCl_3 0,1M. La mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 24h. El pH de la mezcla estaba comprendido entre 5,5 y 5,9. Después, se añade gota a gota sosa NaOH 5M hasta la obtención de un pH de 10,5 después se agita de nuevo durante 10 minutos. Cuando el aumento de pH alcanza 9,0-9,5, la solución se ha vuelto ligeramente turbia, lo que corresponde a la precipitación de las nanopartículas de pseudo-boemita. Para obtener las nanopartículas finales, la suspensión obtenida a pH 10,5 se ha transferido en un autoclave y se ha calentado a 160°C bajo agitación suave (15 rpm) durante 3 horas.

25 Después, se lava la suspensión coloidal por diálisis frente a 5l de agua destilada gracias a un dispositivo Sartorius Slice 200 Benchtop equipado de una membrana de poliéter polisulfona de 30 kDa. La suspensión coloidal resultante se almacenó en frascos de polipropileno. Las mediciones de tamaño efectuadas han mostrado que se estaba en presencia de una población única de nanopartículas cuyo tamaño iba de 15 a 40 nm (distribución en número), con un índice de polidispersabilidad de 0,19 (análisis en intensidad). Se ha obtenido una muestra de material sólido por centrifugación a 25000 rpm durante 1 hora y se secó a 80°C durante una noche, con fines de análisis fisicoquímico.

30 La muestra se analizó por difracción de rayos X mediante un difractor STOE STADI-P que utiliza la línea $\text{K}\alpha_1$ del cobre ($\lambda=1,5406\text{\AA}$). La radiación es perfectamente monocromática gracias a la presencia de un monocromador delantero constituido de un cristal de germanio. Para este análisis, las muestras, previamente trituradas, se colocan en unos tubos de Lindemann (0,3 mm de diámetro). El tubo capilar, colocado en una cabeza goniométrica, se pone en rotación y el difractograma se registra en modo Debye-Scherrer con la ayuda de un detector lineal corto de tipo PSD (Position Sensitive Detector) que puede cubrir un intervalo angular de 11° (2θ).

35 El análisis de difracción con rayos X de la muestra secada ha dado un resultado característico de pseudo-boemita.

40 Las nanopartículas obtenidas han podido filtrarse de forma estéril sobre membrana de 0,2 μm en PVDF de Millipore, con una pérdida mínima en material (3,1%) determinada por absorción atómica.

45 Ejemplo 2: síntesis de nanopartículas de pseudo-boemita y de poliacrilato a partir de una solución de poliacrilato de sodio de masa molar 60 000

Se ha utilizado poliacrilato de sodio (NaPa) de masa molecular 60000 proporcionado por Polysciencias en forma de una solución acuosa al 35% (p/p) y cloruro de aluminio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) proporcionado por Fluka.

50 A fin de obtener 36 g de polímero, se han extraído 102,86 g de solución polimérica que contenía 66,86 g de agua.

En un vaso de precipitado, se ha introducido 7,2429 g de AlCl_3 a los que se han añadido 225,89 g de agua. Se ha añadido esta solución de aluminio a la solución polimérica, a fin de obtener 300 ml de una solución 0,1M de AlCl_3 .

55 La mezcla obtenida era blanca.

Se agitó esta mezcla fuertemente durante 24 horas.

60 Después de 24 horas, el pH de la mezcla era de 6.1. Después, se ha añadido gota a gota sosa NaOH 5M hasta un pH de 10,2.

La mezcla se ha homogeneizado bajo agitación durante 1 hora, después se ha colocado bajo agitación (1400 rpm) en un autoclave y se ha calentado a 160°C durante 3 horas.

65 La solución obtenida era ligeramente opalescente, y se ha analizado para mostrar que estaba constituida de nanopartículas que presentan por difracción de rayos X unos picos característicos de la pseudo-boemita, y un

tamaño de alrededor de 100 nm, compatible con una filtración esterilizante.

Se ha podido conservar la solución durante más de 1 año manteniendo la integridad de las nanopartículas que no se reagregan.

5 Ejemplo 3: Preparación de una composición de vacuna que comprende unas nanopartículas de hidróxido de aluminio y proteína tetánica purificada, y ensayo de filtración

10 Se ha preparado una composición de vacuna añadiendo 10 µl de una preparación de proteínas tetánicas purificadas dosificada a una concentración de 1200 unidades de floculación/ml de solución salina a 4,5 ml de una suspensión de nanopartículas de pseudo-boemita preparada según el ejemplo 1.

15 La mezcla se agitó moderadamente y después se pasó a través de una membrana de PVDF (proporcionada por Millipore) montada sobre una jeringa de plástico de 5 ml.

Se ha realizado una medición del tamaño de las nanopartículas al mismo tiempo antes, y después de la adición de proteína tetánica sobre las nanopartículas; se ha obtenido el mismo perfil de tamaño, ya sea en presencia o en ausencia de proteínas, lo que demuestra que la proteína tetánica no conduce a la agregación de las nanopartículas.

20 Asimismo, se ha determinado que la filtración conducía a una pérdida de aluminio del 3%, lo que es muy aceptable desde un punto de vista industrial.

Por lo tanto, se puede concluir que las composiciones de vacuna según la invención pueden filtrarse sin demasiada pérdida de materia sobre un filtro esterilizante de 0,22 µm.

25 Ejemplo 4: Ensayo de reactogenecidad sobre ratones de una composición según la invención que comprende unas nanopartículas y unos antígenos de la gripe, administrada por vía intradérmica

30 Se ha utilizado como modelo animal para este ensayo, unos ratones BALB/c hembra a fin de evaluar la reactogenecidad local de composiciones según la invención, comparativamente a las suspensiones de aluminio clásicas.

35 En este ensayo, el antígeno está constituido por una vacuna gripe trivalente denominada Flu ID stock que comprende las cepas fragmentadas inactivadas A/Solomon/3/2006 (H1N1), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), y B/Malaysia/2506/2004 a razón de 150 µg/ml de HA por cepa.

4 grupos de 10 ratones han recibido con 3 semanas de intervalo, por vía intradérmica, en la cara interna de la oreja, una dosis de 30 µl sub-óptima (es decir 0,3 µg de HA/cepa) de vacuna en presencia o no de un adyuvante.

40 Las composiciones administradas se han preparado de la manera siguiente:

- Grupo A Flu ID solo; se han diluido 54 µl de Flu ID stock en 756 µl de tampón PBS.

45 - Grupo B: Flu ID + AIOOH; se han añadido sucesivamente:

o 54 µl de Flu ID stock

o 604 µl de tampón PBS

50 o 152 µl de una suspensión comercial de AIOOH a 8,01 mg/ml de aluminio (Alhydrogel®)

La mezcla se ha agitado moderadamente durante 2 horas.

55 - Grupo C: Flu ID + AIPO₄; se han añadido sucesivamente:

o 54 µl de Flu ID stock

o 463 µl de tampón PBS

60 o 293 µl de una suspensión comercial de AIPO₄ a 4,15 mg/ml de aluminio (AdjuPhos®)

La mezcla ha agitado moderadamente durante 2 horas.

65 - Grupo D: Flu ID + nanoAIOOH; se han añadido sucesivamente:

- 54 µl de Flu ID stock
 - 5 µl de H₂O
- 5 ◦ 76 µl de tampón PBS concentrado 10 veces
- 675 µl de una suspensión de nanopartículas de pseudo-boemita, preparada de la manera descrita en el ejemplo 1 y que comprende 1,8 mg de Al/ml.
- 10 La mezcla se ha agitado moderadamente durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Los ratones se vigilaron cada día, y se anotó sobre una escala no oficial los edemas, los eritemas y las lesiones que aparecen en la oreja, durante 2 semanas después de cada inyección.
- 15 Sea cual sea la formulación ensayada, no se ha observado ningún eritema significativo. Asimismo, no se ha señalado ningún edema.
- Por el contrario, se ha observado en el punto de inyección unos nódulos blancos/rojizos que aparecen en los ratones que han recibido las composiciones que comprenden el aluminio clásico, ya sea con el hidróxido de aluminio, o con el fosfato de aluminio. Pero, de manera sorprendente y muy interesante, ningún nódulo es visible en los ratones que han recibido una composición según la invención.
- 20 Los resultados relativos a los números de ratones que presentan unos nódulos después de la administración de los adyuvantes que comprenden el aluminio de la técnica anterior, son ilustrados en la tabla 1 siguiente:

25 Tabla 1

Después de la 1ª inyección (D0)											
Adyuvante	D1	D2	D3	D4	D7	D8	D9	D10	D11	D15	
AIOOH	0/10	0/10	0/10	0/10	6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	
AIPO₄	0/10	1/10	2/10	3/10	6/10	9/10	9/10	9/10	10/10	9/10	
Después del recuerdo (D21)											
Adyuvante	D22	D23	D24	D25	D28	D29	D30	D31	D32	D35	D39
AIOOH	5/10	9/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	9/10
AIPO₄	9/10	9/10	8/10	7/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

- 30 Es particularmente interesante constatar que, a pesar del hecho de que las cantidades de aluminio sean las mismas (45 µg) en todos los grupos, el hecho de formularla en nanopartículas según la invención hace este aluminio mucho mejor tolerado.
- Ejemplo 5: ensayo de inmunogenicidad sobre ratones de una composición según la invención que comprende unas nanopartículas y unos antígenos de la gripe, administrada por vía intradérmica
- 35 En este ensayo, se ha evaluado la inmunogenicidad de las composiciones según la invención, en comparación con composiciones que comprenden aluminio clásico, ya sea AIOOH o AIPO₄, pero también frente a una composición que no comprende aluminio sino únicamente polímero.
- 40 En este ensayo, como en el ejemplo anterior, el antígeno estaba constituido por una vacuna de la gripe trivalente denominada Flu ID stock que comprende las cepas fragmentadas inactivadas A/Solomon/3/2006 (H1N1), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), y B/Malaysia/2506/2004 a razón de 150 µg/ml de HA por cepa. El lote de vacuna Flu ID stock utilizado para esta ensayo era el mismo que aquel utilizado en el ejemplo anterior.
- 45 El ensayo se ha realizado sobre ratones BALB(c hembras repartidos en 5 grupos de 9. Cada ratón ha recibido, con 3 semanas de intervalo, por vía intradérmica, en la cara interna de la oreja, una dosis de 30 µl sub-óptima (es decir 0,3 µg de HA/cepa) de una composición tal como se describe a continuación, en función de su grupo de pertenencia.
- Las composiciones administradas se han preparado de la manera siguiente:
- 50 - Grupo A Flu ID solo; se han diluido 54 µl de Flu ID stock en 756 µl de tampón PBS.
- Grupo B: Flu ID + AIPO₄; se han añadido sucesivamente:
- 55 ◦ 54 µl de Flu ID stock
- 463 µl de tampón PBS

ES 2 650 740 T3

- 293 µl de una suspensión comercial de AlPO_4 a 4,15 mg/ml de aluminio (AdjuPhos[®])

La mezcla se ha agitado en un vórtice durante 10 segundos.

5

- Grupo C: Flu ID + AIOOH; se han añadido sucesivamente:

- 54 µl de Flu ID stock

10

- 595 µl de tampón PBS

- 161 µl de una suspensión comercial de AIOOH a 7,53 mg/ml de aluminio (Alhidrogel[®])

La mezcla se ha agitado en un vórtice durante 10 segundos.

15

- Grupo D: Flu ID + nanopartículas de pseudo-boemita; se han añadido sucesivamente:

- 54 µl de Flu ID stock

20

- 5 µl de H_2O

- 76 µl de tampón PBS concentrado 10 veces

25

- 675 µl de una suspensión de nanopartículas de pseudo-boemita, preparada de la manera descrita en el ejemplo 1 y que comprende 1,8 mg de Al/ml.

La mezcla se ha agitado en un vórtice durante 10 segundos.

30

- Grupo E: Flu ID + polímero; se han añadido sucesivamente:

- 54 µl de Flu ID stock,

- 5 µl de H_2O

35

- 76 µl de tampón PBS concentrado 10 veces,

- 675 µl de una solución a 17 mg/ml de PaNa (poliacrilato de sodio) de masa molar 2100 proporcionada por Fluka

La mezcla se ha agitado en un vórtice durante 10 segundos.

40

Se han vigilado los ratones durante todo el ensayo.

Se han extraído unas muestras sanguíneas de cada ratón a D42, es decir 3 semanas después de la 2ª inyección, por sección de la carótida. Las muestras se trataron a fin de aislar el suero para efectuar los ensayos de respuesta humoral.

45

Se han extraído además los bazos de 6 ratones por grupo a fin de efectuar los ensayos de respuesta celular.

Los ensayos realizados son unas determinaciones ELISA, unos ensayos de inhibición de la hemaglutinación, así como unos ELISPOT.

50

Las determinaciones ELISA se realizaron de manera clásica, a fin de determinar las cantidades de IgG1 y de IgG2a séricas específicas de la cepa A/H1N1. El límite de detección de los anticuerpos es de 20 (1.3 log₁₀) unidades ELISA. Todos los títulos se expresan en log₁₀ de unidades ELISA. Para cada grupo de animales, se ha calculado la media geométrica así como el intervalo de confianza al 95% correspondiente.

55

El ensayo de inhibición de la hemaglutinación permite apreciar los anticuerpos funcionales presentes en el suero de los animales inmunizados. Mide la capacidad de los anticuerpos inducidos a inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo por el virus gripal estudiado. El título de inhibición de la hemaglutinación o HI (Haemagglutination Inhibition) es la inversa de la última dilución para la cual no se observa hemaglutinación. Para cada grupo de animales, se ha calculado la media geométrica así como el intervalo de confianza al 95% correspondiente. Esto frente a cada una de las 3 cepas presentes en la composición administrada.

60

Las determinaciones ELISPOT se realizan a partir de las células esplénicas recientemente aisladas, puestas a incubar durante la noche y reestimuladas con una mezcla de las 3 cepas de la composición de vacuna o por un

65

péptido 9-mer que corresponde a un epítipo de clase I (epítipo CD8) de la proteína NP. Las respuestas celulares son expresadas en número de células que segregan IL-5 o IFN- γ específicas de la gripe, para 10^6 esplenócitos.

5 Durante la reestimulación con el péptido específico de la gripe, no se ha detectado, por ELISPOT ninguna célula T CD8+ que segregan IL-5 o IFN- γ ; esto sea cual sea el grupo de ratones considerado.

En lo que se refiere a la reestimulación *in vitro* por los antígenos de la gripe, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2 siguiente, en la que los intervalos de confianza del 95% se indican entre corchetes:

10 Tabla 2

Grupo considerado	Número de células segregadoras de IL-5 / 10^6 esplenócitos	Número de células segregadoras de IFN- γ / 10^6 esplenócitos
A: Flu ID solo	24 [12 - 48]	2 [0 - 17]
B: Flu ID + AlPO ₄	17 [6 - 45]	2 [0 - 32]
C: Flu ID + AlOOH	46 [19 - 115]	13 [5 - 38]
D: Flu ID + nanopartículas	197 [79-491]	79 [30-205]
E: Flu ID + poliacrilato	80 [42-151]	8 [1- 81]

15 Estos resultados muestran que, de manera sorprendente, gracias a las nanopartículas según la invención, es posible obtener una respuesta celular, en particular una estimulación de las células segregadoras de IL-5 así como unas células segregadoras de IFN- γ .

Desde un punto de vista estadístico, según un modelo mixto con ajuste de Dunnett, las nanopartículas son consideradas como haber aumentado significativamente el número de células segregadoras de IL-5 y de IFN- γ , de 8,2 veces ($p < 0,001$) y de 39,5 veces ($p = 0,002$), respectivamente, lo que no es el caso de los adyuvantes a base de aluminio de la técnica anterior.

Se observa además que el poliacrilato solo ha aumentado la secreción de IL5 sólo de 3,3 veces ($p = 0,027$), al límite de la significatividad.

25 Los resultados relativos a los ensayos de respuesta humoral son recogidos en la tabla 3 siguiente en la que, cada vez, los intervalos de confianza del 95% son puestos entre corchetes.

Tabla 3

Grupo considerado	HI frente a H1N1	HI frente a H3N2	HI frente a B	IgG1 frente a H1N1 (log10)	IgG2a frente a H1N1 (log10)
A: Flu ID solo	101	127	17	4,8	4,3
	[52 - 194]	[66 - 244]	[6 - 46]	[4,4 - 5,2]	[3,9 - 4,6]
B: Flu ID + AlPO ₄	1881	1097	593	6,4	4,4
	[1096 - 3229]	[654 - 1842]	[301 - 1165]	[6,2 - 6,7]	[3,9 - 4,9]
C: Flu ID + AlOOH	1185	1185	640	6,4	4,1
	[637 - 2207]	[603 - 2331]	[353 - 1161]	[6,1 - 6,6]	[3,4 - 4,8]
D: Flu ID + nanopartículas	1185	1613	508	6,1	5,1
	[676 - 2078]	[1017 - 2558]	[228 - 1130]	[5,9 - 6,4]	[4,7 - 5,4]
C: Flu ID + poliacrilato	93	148	13	5,0	4,1
	[49 - 177]	[90 - 243]	[4 - 38]	[4,8 - 5,3]	[3,7 - 4,5]

30 Desde un punto de vista estadístico, el aumento de los títulos HI y de los títulos en IgG1 obtenidos con las nanopartículas se ha considerado significativo frente a títulos obtenidos con la vacuna sola según un modelo mixto con ajuste de Dunnet (11,7 veces para el título HI anti-H1N1 con $p < 0,001$; 12,7 veces para el título HI anti-H3N2 con $p < 0,001$; 29,9 veces para el título anti-B con $p < 0,001$; 20,0 veces para el título IgG1 anti-H1N1 con $p < 0,001$ y 6,3 veces para el título IgG2a anti-H1N1 con $p = 0,008$).

Estos resultados muestran la capacidad de las nanopartículas según la invención a inducir una respuesta humoral después de 2 inmunizaciones por vía intradérmica. Se puede destacar que el polímero solo no tiene este poder adyuvante.

40 Por otro lado, sólo las nanopartículas según la invención conducen a un aumento de la respuesta en IgG2a, lo que significa que el perfil de la respuesta inmunitaria está más orientado hacia una respuesta de tipo TH1 que los otros adyuvantes a base de aluminio.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de vacuna que comprende al menos un antígeno y un adyuvante, caracterizada por que el adyuvante comprende unas nanopartículas que comprenden pseudo-boemita y poliacrilato, teniendo dichas nanopartículas un tamaño que permite su paso a través de un filtro esterilizante cuyo límite de corte es de 220 nm.
- 10 2. Composición de vacuna según la reivindicación 1, caracterizada por que el núcleo de la nanopartícula está constituido esencialmente de pseudo-boemita, y porque el poliacrilato se sitúa esencialmente en la superficie de las nanopartículas.
3. Composición de vacuna según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la pseudo-boemita representa al menos el 90% de la masa de las nanopartículas.
- 15 4. Composición de vacuna según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el tamaño de las nanopartículas es inferior a 300 nm, ventajosamente inferior a 220 nm.
5. Composición de vacuna según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende al menos un antígeno de la gripe.
- 20 6. Composición de vacuna según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende al menos una proteína tetánica.
7. Nanopartículas que comprende pseudo-boemita y poliacrilato, teniendo dichas nanopartículas un tamaño que permite su paso a través de un filtro esterilizante cuyo límite de corte es de 220 nm, para su utilización en una composición de vacuna que comprende al menos un antígeno.
- 25 8. Nanopartículas según la reivindicación anterior, caracterizadas por que la composición de vacuna está destinada a administrarse por vía intradérmica.
- 30 9. Nanopartículas según una de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizadas por que la composición de vacuna comprende al menos un antígeno de la gripe.
10. Nanopartículas según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizadas por que dichas nanopartículas permiten aumentar la respuesta inmunitaria inducida durante la administración de dicha composición de vacuna.
- 35 11. Procedimiento de preparación de una composición de vacuna según una de las reivindicaciones 1 a 6, según el cual:
- 40 * se preparan unas nanopartículas que comprenden pseudo-boemita y poliacrilato, teniendo dichas nanopartículas un tamaño que permite su paso a través de un filtro esterilizante cuyo límite de corte es de 220 nm,
- * se filtran dichas nanopartículas mediante un filtro esterilizante,
- 45 * se añade a dichas nanopartículas al menos un antígeno de vacuna.
12. Procedimiento de preparación según la reivindicación anterior, caracterizado por que se realiza una filtración suplementaria después de la adición de dicho antígeno de vacuna.