



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 058**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

B01F 17/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02722157 .1**

96 Fecha de presentación : **26.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1367997**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

54 Título: **Emulsiones de agua en aceite inyectables.**

30 Prioridad: **28.02.2001 EP 01200745**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2009

73 Titular/es: **Intervet International B.V.**
Wim de Korverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es: **Jansen, Theodorus;**
Schijns, Virgil, Elisabeth, Joseph, Caspar y
Hermkens, Erik

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Emulsiones de agua en aceite inyectables.

5 La presente invención se refiere a adyuvantes que comprenden emulsiones de agua en aceite, a un método para preparar estas emulsiones y a vacunas que comprenden los adyuvantes.

10 Las emulsiones de agua en aceite (ag/ac) son sistemas bifásicos que consisten en una fase oleosa continua y una fase acuosa (fase discontinua) con lo que la fase acuosa se dispersa en forma de pequeñas gotas en la fase oleosa y uno o más tensioactivos y emulsionantes. Las emulsiones ag/ac se aplican ampliamente en medicina, cosméticos y la industria de alimentos y bebidas. En medicina, las emulsiones ag/ac generalmente se usan en formulaciones farmacéuticas en forma de vehículos de agentes terapéuticos, especialmente en el caso de ingredientes activos insolubles en agua o sensibles al agua. En vacunación, las emulsiones ag/ac se usan habitualmente como adyuvantes para estimular la respuesta inmune contra antígenos diana derivados de uno o más agentes infecciosos. Uno de los adyuvantes ag/ac 15 más antiguos es el Adyuvante Completo de Freund (ACF) que contiene micobacterias en aceite mineral y Arlacel A® como tensioactivo o Adyuvante Incompleto de Freund que carece de micobacterias. Otras emulsiones ag/ac de aceites minerales o metabolizables se han desarrollado y se usan habitualmente como adyuvante en vacunación.

20 GUPTA R K ET AL: "Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 13, N° 14, 1 de octubre de 1995 (1995-10-01), páginas 1263-1276 es un artículo de revisión que describe muchas sustancias usadas como adyuvantes para vacunas humanas, entre las que se mencionan las emulsiones de agua en aceite.

25 Las emulsiones ag/ac generalmente se aplican por inyección. Para ser inyectable una composición debe ser sustancialmente fluida. Sin embargo, las emulsiones ag/ac a menudo son relativamente viscosas lo que hace muy difícil la inyección de estas emulsiones. Especialmente con emulsiones ag/ac de aceites metabolizables la viscosidad es un problema.

30 En las emulsiones ag/ac, la viscosidad en general depende de la viscosidad de la fase continua, es decir la fase oleosa. Pueden usarse diferentes aceites en los adyuvantes, tanto aceites minerales como no minerales (metabolizables). Sin embargo, aunque los adyuvantes basados en aceite generalmente aumentan la actividad inmunobiológica de las vacunas, comparadas con las vacunas no oleosas, pueden provocar reacciones locales en los sitios de inyección de las vacunas, especialmente cuando se usan aceites minerales. Esto puede estar causado por el hecho de que los aceites minerales no pueden metabolizarse por el organismo vacunado y tienden a permanecer cerca de los sitios de inyección. 35 En vista del problema de reacciones locales en el sitio de inyección, la sustitución de los aceites minerales por aceites no minerales, metabolizables, sería deseable. Sin embargo, la actividad inmunógena del adyuvante debería permanecer alta, cuando se usa el aceite mineral en lugar del aceite no mineral. Preferiblemente, la actividad inmunógena de los adyuvantes basados en aceites metabolizables sería tan alta como para los adyuvantes basados en aceites minerales, mientras que el problema de tolerancia local está prácticamente ausente.

40 Además, los adyuvantes basados en emulsión ag/ac en base de aceite no mineral deberían ser estables y deberían tener un periodo de validez aceptable.

45 Sin embargo, los aceites metabolizables y en particular los aceites (semi-) sintéticos y vegetales son viscosos a temperatura ambiente y su uso en emulsiones ag/ac conduce a una viscosidad de la emulsión que es similar a la del aceite individual. Una reducción del contenido de aceite (y, en consecuencia, un aumento en el contenido de agua) sin embargo provoca a menudo un aumento en la viscosidad de la emulsión hasta un grado tal que la inyección ya no es posible. Aparte de un efecto sobre la viscosidad, los cambios en el contenido de aceite de una emulsión ag/ac afectan a la estabilidad de la emulsión. La reducción del contenido de aceite da como resultado un área interfacial ampliada. 50 La cantidad de emulsionante (que depende del tamaño del área interfacial) será insuficiente y la emulsión se romperá. El tamaño del área interfacial depende también del tamaño de gota de la fase dispersada: un tamaño de gota reducido da como resultado un área interfacial ampliada. Pueden usarse medios mecánicos para reducir o aumentar el tamaño de gota de la fase dispersada. Comparado con un equipo de procesamiento de alta cizalla, un procesamiento a baja cizalla da como resultado un aumento en el tamaño de gota y, por lo tanto, un área interfacial reducida.

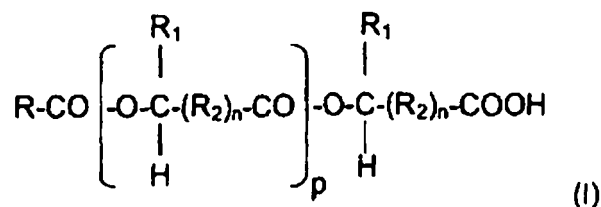
55 Estas limitaciones hacen difícil obtener emulsiones ag/ac estables y fluidas, especialmente cuando se basan en aceites metabolizables. Por tanto, hay una necesidad de encontrar otros métodos y/o medios para obtener emulsiones ag/ac estables que al mismo tiempo sean fluidas. La presente invención pretende proporcionar adyuvantes basados en emulsiones ag/ac estables que son muy adecuadas para inyección, incluso cuando se usan aceites metabolizables y 60 tienen una buena actividad adyuvante.

Sorprendentemente se ha encontrado que cuando se usan ciertos emulsionantes específicos pueden prepararse emulsiones ag/ac que son estables y proporciona una actividad adyuvante excelente incluso cuando se basan en aceites no minerales metabolizables. Las emulsiones tienen una viscosidad muy baja y, de esta manera, adecuada para 65 inyección.

La presente invención proporciona, por lo tanto, un adyuvante para usar en una formulación de vacuna, que comprende una emulsión de agua en aceite, *caracterizado por que* dicha emulsión comprende un emulsionante polimérico

que es un copolímero de bloque que tiene una fórmula general A-COOO-B-OOC-A, en la que B es el resto divalente de un polialquilenglicol soluble en agua y A es el resto de un ácido monocarboxílico complejo soluble en aceite. Dichos emulsionantes poliméricos, así como la preparación de los mismos, se han descrito en los documento GB 2002400 y WO9607689. Los emulsionantes, como se describe en el documento GB 2002400 son emulsionantes en los que A

tiene un peso molecular de al menos 500 y es el resto de un ácido monocarboxílico complejo soluble en aceite, es decir, un ácido graso. Los ácidos monocarboxílicos complejos pueden representarse por la siguiente fórmula general:



en la que

R es hidrógeno o un hidrocarburo monovalente o un grupo hidrocarburo sustituido;

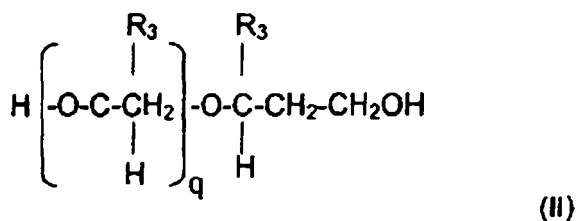
R₁ es hidrógeno o un grupo hidrocarburo C₁ a C₂₄ monovalente;

R₂ es un grupo hidrocarburo C₁ a C₂₄ divalente;

n es cero o 1;

p es un número entero de cero a 200.

Las unidades entre paréntesis en la fórmula 1 pueden ser todas iguales o pueden diferir respecto a R₁, R₂ y n. La cantidad p normalmente no tendrá el mismo valor único para todas las moléculas del ácido complejo sino que se distribuirá estadísticamente alrededor de un valor medio situado dentro del intervalo indicado, como es habitual en los materiales poliméricos. El componente polimérico B tiene un peso molecular de al menos 500 y es el resto divalente de un polialquilenglicol soluble en agua que tiene la fórmula general



en la que

R₃ es hidrógeno o un grupo alquilo C₁ a C₃;

q es un número entero de 10 hasta 500.

Las unidades repetitivas en la fórmula II de nuevo pueden ser todas iguales o pueden diferir en R₃, y la cantidad q puede variar alrededor de un valor medio.

Los hidrocarburos R, R₁ y R₂ pueden ser lineales o ramificados.

Preferiblemente en los copolímeros de bloque de fórmula A-COO-B-OOC-A, el componente B deriva de polietilenglicol y los componentes A derivan de ácido esteárico, por ejemplo ácido polihidroxiesteárico, preferiblemente de ácido poli(12-hidroxiesteárico).

De esta manera, R puede ser un grupo C₁₇H₃₅ de cadena lineal derivado de ácido esteárico y la unidad que contiene R₁ y R₂ puede derivarse de ácido 12-hidroxiesteárico; p, en este caso, preferiblemente tiene un valor de al menos 2.

Preferiblemente q puede tener un valor entre 20 y 60 más preferiblemente por encima de 23.

La proporción en peso de los componentes combinados A al componente B puede variar ampliamente y típicamente estará en el intervalo de 9:1 a 1:9.

ES 2 331 058 T3

Los emulsionantes más preferidos usados en los adyuvantes de acuerdo con la invención son Arlacel P135, un dipolihidroxiestearato de PEG 30. Otro emulsionante similar para usar con la invención es ATLOX®4912. Tanto Arlacel P135 como ATLOX®4912 son copolímeros de bloque (A-B-A) de polietilenglicol y ácido polihidroxiesteárico con un peso en moles de aproximadamente 5000 disponible en el mercado en ICI.

Se encontró que estos copolímeros de bloque poliméricos eran compatibles con una amplia variedad de aceites, proporcionando de esta manera un intervalo mucho más amplio de emulsiones ag/ac que tienen la estabilidad y fluidez requeridas para asegurar la administración por inyección y que los sujetos vacunados toleran muy bien. Adicionalmente el uso de estos copolímeros de bloque tipo ABA conduce a emulsiones ag/ac que tienen una estabilidad excelente durante el almacenamiento, mejorando de esta manera el periodo de validez de dichas emulsiones. Las emulsiones ag/ac resultantes eran estables y fluidas a bajas temperaturas, especialmente a 25°C.

Más importante, los adyuvantes de acuerdo con la invención, basándose en el uso del emulsionante de tipo copolímero de bloque ABA mencionado anteriormente, sorprendentemente tenían una actividad inmunoestimulante excelente (adyuvante) cuando se usaban en vacunas, mientras que no se inducían reacciones locales en el sitio de inyección.

Las emulsiones ag/ac de acuerdo con la invención pueden comprender el 0,01-15% p/p, preferiblemente el 0,05-10% p/p, más preferiblemente el 0,1-3% p/p, más preferiblemente aún el 0,3-0,5% p/p del emulsionante polimérico de acuerdo con la invención. En una realización más preferida una emulsión ag/ac de acuerdo con la invención comprende el 0,5% p/p del emulsionante polimérico de acuerdo con la invención. Si fuera necesario, pueden usarse también otros emulsionantes además del emulsionante polimérico de acuerdo con la invención en la emulsión ag/ac de acuerdo con la invención.

Las emulsiones ag/ac de acuerdo con la invención pueden comprender el 30-90%, preferiblemente el 35-60%, más preferiblemente el 40-60% en peso de aceite.

Los aceites adecuados para usar en una emulsión ag/ac de acuerdo con la presente invención son aceites no metabolizables, aceites metabolizables y mezclas de aceites metabolizables y no metabolizables. Los aceites no metabolizables que pueden usarse en los adyuvantes de acuerdo con la invención incluyen aceites minerales y aceites de parafina.

Los aceites metabolizables de acuerdo con la invención incluyen, aunque sin limitación, aceites vegetales, aceites animales, hidrocarburos naturales, aceites metabolizables sintéticos o semi-sintéticos (tales como Miglyol y Cetiol), ésteres de ácido graso de propilenglicol y ácidos grasos C₆ a C₂₄ tales como oleatos de oleílo, diésteres de ácido cáprico o caprílico y similares. Los aceites vegetales adecuados son aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite de girasol y similares. Los aceites animales adecuados son escualano y escualeno y similares.

Preferiblemente, la fase oleosa es un aceite metabolizable o una mezcla de aceites metabolizables ya que los aceites no metabolizables (aceites minerales) tienden a dar reacciones locales en los sitios de inyección. Los aceites preferidos son los aceites semi-sintéticos tales como Miglyol y Cetiol y oleatos de oleílo, ésteres de éster oleico preferiblemente oleato de etilo.

Con los adyuvantes de acuerdo con la invención pueden alcanzarse viscosidades muy bajas y las emulsiones son estables, a la vez que se obtiene una buena actividad del adyuvante y no ocurren reacciones locales en el sitio de inyección.

El adyuvante de acuerdo con la invención preferiblemente comprende emulsiones ag/ac que tienen una viscosidad menor de 450 mPa.s, preferiblemente menor de 250 mPa.s, más preferiblemente menor de 100 mPa.s cuando se ensaya en un viscosímetro Brookfield DV-I+ usando un eje tipo N° 62 durante 30 segundos a 60 r.p.m.

La fase acuosa de las emulsiones ag/ac de acuerdo con la presente invención normalmente está constituida por agua, solución salina o tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato.

El adyuvante de acuerdo con la invención puede usarse en vacunas. La vacuna normalmente comprenderá material antigénico de un agente infeccioso. Las vacunas que comprenden dichos adyuvantes y un componente antigénico derivado de un agente infeccioso son igualmente parte de la presente invención. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden comprender el componente antigénico en la fase acuosa discontinua de la emulsión.

El uso de un emulsionante polimérico que es un copolímero de bloque que tiene una fórmula general A-COO-B-OOC-A, en la que B es el resto divalente de un polialquilenglicol soluble en agua y A es el resto de un ácido monocarboxílico complejo soluble en aceite en la preparación de un adyuvante para uso en una vacuna y el uso de estos emulsionantes en vacunas es igualmente parte de la presente invención.

Mediante vacunación el sistema inmune se dispara, dando como resultado una respuesta inmune protectora contra el agente infeccioso. Las vacunas pueden basarse en microorganismos vivos, atenuados, o microorganismos muertos (inactivados), así como en subunidades de microorganismos como componente antigénico. Especialmente en el caso de vacunas inactivadas o subunitarias, se usa un adyuvante para aumentar la respuesta inmune.

El material antigénico puede mezclarse con el adyuvante. En la vacuna, el material antigénico puede estar presente en la fase acuosa discontinua del adyuvante cuando se añade. Las preparaciones de vacunas basadas en un adyuvante de acuerdo con la invención pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Las emulsiones ag/ac para usar en los adyuvantes de acuerdo con la presente invención pueden usarse para preparar emulsiones de agua en aceite en agua (ag/ac/ag) basadas en gotas de la emulsión ag/ac mencionada anteriormente en una fase acuosa externa. Las emulsiones ag/ac y ag/ac/ag de acuerdo con la presente invención son adecuadas para usarlas como adyuvante en vacunas, especialmente vacunas veterinarias. Además, las emulsiones ag/ac de acuerdo con la presente invención son adecuadas para usarlas como vehículo para agentes terapéuticos, especialmente ingredientes activos insolubles en agua o sensibles al agua y complementos nutricionales. De esta manera, en un aspecto adicional la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas basadas en una emulsión ag/ac o ag/ac/ag de acuerdo con la presente invención.

Las emulsiones de acuerdo con la invención pueden prepararse usando técnicas convencionales. En general la fase acuosa, la fase oleosa, el emulsionante polimérico de acuerdo con la invención y opcionalmente otros emulsionantes se ponen juntos y se emulsionan hasta que se obtiene una emulsión estable que tiene la baja viscosidad deseada. Cuando se preparan emulsiones, debe gastarse energía para formar una interfaz entre las fases oleosa y acuosa. Por lo tanto, el equipo de emulsión incluye una amplia variedad de agitadores, homogeneizadores, molinos coloidales, mezcladoras de chorro y dispositivos ultrasónicos. Los agitadores de tamaño de producción pueden ser sistemas de agitación con forma de propulsor o con forma de paleta, con una velocidad de rotación normalmente por encima de 2000 r.p.m., que se consideran procedimientos de mezcla de baja cizalla. Otro tipo de agitador en el sitio de producción es el molino coloidal. El principio de operación del molino coloidal es el paso de las fases mixtas de una fórmula en emulsión entre un estator y un rotor de alta velocidad que gira a velocidades de 2000 a 18000 r.p.m. que se considera un procedimiento de mezcla de alta cizalla.

Las emulsiones de agua en aceite pueden procesarse en una emulsión de agua en aceite en agua (denominada también "doble emulsión"), donde las fases acuosas interna y externa están separadas por una fase oleosa. Este proceso consiste en mezclar la emulsión de agua en aceite en una fase acuosa que contiene el agente emulsionante apropiado. En estos sistemas se usan emulsionantes tanto hidrófobos como hidrófilos para estabilizar la doble emulsión.

El emulsionante polimérico de acuerdo con la invención se disuelve preferiblemente en la fase oleosa. Pueden incorporarse emulsionantes adicionales en la fase acuosa o en la fase oleosa.

En el caso de una emulsión ag/ac/ag, se prepara una emulsión ag/ac de acuerdo con la invención como una emulsión ag/ac primaria que posteriormente se añade a una segunda fase y un segundo emulsionante y se homogeniza para obtener la emulsión ag/ac/ag deseada. El segundo emulsionante requerido para preparar la emulsión ag/ac/ag es preferiblemente un emulsionante con un HLB de 10-18, o una combinación de dos o más emulsionantes de manera que se obtiene el HLB deseado. Los detalles respecto a la fabricación de emulsiones farmacéuticas pueden encontrarse, por ejemplo, en: "The Theory And Practice Of Industrial Pharmacy" (Eds: Lachman L. *et al*, Lea & Febiger, Philadelphia, EE.UU., 1970, Capítulo 16), y "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Eds: Gennaro, A.R. Mack Publishing Company, Easton, EE.UU., 1990, 18ª edición).

Las vacunas de acuerdo con la invención se administran preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo intramuscular, subcutánea o intravenosa. Sin embargo, si fuera necesario las vacunas pueden administrarse también de forma no parenteral, por ejemplo *per os*, pulverización, gotas i.o. o gotas intranasales. Las bajas viscosidades de las emulsiones usadas en los adyuvantes y/o vacunas de la presente invención son extremadamente adecuadas para administración parenteral.

Los siguientes ejemplos son simplemente para demostrar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Una emulsión de agua en aceite que contiene los antígenos inactivados del virus Infectious Bronchitis, cepa Massachusetts y el virus de la Enfermedad de New Castle, cepa clon 30 se fabrica con una proporción agua/aceite del 50/50% p/p. Aparte de los antígenos, la fase acuosa contiene 0,01 M de PBS. La fase orgánica contiene un triglicérido de cadena media (Miglyol 840) y un 3% p/p de dipolihidroxistearato de PEG-30 (Arlacel P135) como emulsionante. Arlacel P135 se disuelve en Miglyol 840 a 60°C mientras se agita. Después de la disolución esta fase oleosa se enfría a temperatura ambiente. La fase acuosa se añade lentamente a esta fase oleosa con homogeneización a alta cizalla usando un homogeneizador de tipo Ultra Turrax. Las gotas de agua resultantes tienen un tamaño principalmente de 1 µm. La viscosidad de esta emulsión es de 115 mPa.s a 25°C y mostró suficiente estabilidad en un ensayo de estabilidad acelerada basado en almacenamiento a 37°C durante tres semanas.

ES 2 331 058 T3

Ejemplo 2

Una emulsión de agua en aceite que contenía los antígenos inactivados del virus Infectious Bronchitis, cepa Massachusetts y el virus de la Enfermedad de New Castle, cepa clon 30 se fabrica con una proporción agua/aceite del 70/30% p/p. Aparte de los antígenos, la fase acuosa contiene 0,01 m de PBS. La fase orgánica contiene un triglicérido de cadena media (Miglyol 840) y un 3% p/p de dipolihidroxiestearato de PEG-30 (Arlacel P135) como emulsionante. El Arlacel P135 se disuelve en Miglyol 840 a 60°C mientras se agita. Después de la disolución esta fase oleosa se enfría a temperatura ambiente. La fase acuosa se añade lentamente a esta fase oleosa mientras se agita a 1100 r.p.m. usando una mezcladora IKA Eurostar. Las gotas de agua resultantes tienen un tamaño principalmente entre 1 y 5 μm . La viscosidad de esta emulsión es 424 mPa.s a 25°C y mostró una estabilidad suficiente en un ensayo de estabilidad acelerada basado en almacenamiento a 37°C durante tres semanas. Pollos hembra SPF de tres semanas de edad vacunados por vía intramuscular una vez con 0,5 ml de esta vacuna mostraron un título en suero media 2log IH-VIB de 7,0 y un título en suero medio 2log IH-VEN de 4,4, nueve semanas después de la vacunación.

Ejemplo 3

Se prepara una emulsión de agua en aceite en agua usando como emulsionantes: dipolihidroxiestearato de PEG-30 (Arlacel P135) y Synperonic F127. La emulsión de agua en aceite primaria se basa en una proporción agua/aceite de 60/40% p/p. La fase acuosa contiene los antígenos inactivados del virus Infectious Bronchitis, cepa Massachusetts y el virus de la Enfermedad de New Castle, cepa clon 30. Aparte de los antígenos, la fase acuosa contiene 0,01 m de PBS. La fase orgánica contiene un triglicérido de cadena media (Miglyol 840) y un 3% p/p Arlacel P135 como emulsionante. Se disuelve Arlacel P135 en Miglyol 840 a 60°C mientras se agita. Después de la disolución esta fase oleosa se enfría a temperatura ambiente. La fase acuosa se añade lentamente a esta fase oleosa con homogeneización a alta cizalla usando un homogeneizador de tipo Ultra Turrax. Las gotas de agua resultantes tienen un tamaño principalmente entre 1 y 5 μm . La emulsión secundaria se basa en una emulsión de agua en aceite/agua de 60/40% p/p. La fase acuosa externa contiene aparte de 0,01 m PBS también un 3% p/p de Synperonic F127. La emulsión de agua en aceite se añade lentamente a esta fase acuosa con una homogeneización de cizalla media (16.000 r.p.m.) usando un homogeneizador de tipo Ultra Turrax. Las gotas de agua en aceite resultantes tienen un tamaño principalmente entre 1 y 5 μm . La viscosidad de esta emulsión ag/ac/ag es de 110 mPa.s a 25°C y mostró estabilidad durante al menos 6 meses a 2-8°C.

Ejemplo 4

Una emulsión de agua en aceite que contiene los antígenos inactivados del virus Infectious Bronchitis, cepa Massachusetts y el virus de la Enfermedad de New Castle, cepa clon 30, se fabrica con una proporción agua/aceite del 40/60% p/p. Aparte de los antígenos, la fase acuosa contiene 0,01 m de PBS. La fase orgánica contiene oleato de etilo y un 0,1% p/p de dipolihidroxiestearato de PEG-30 (Arlacel P135) como emulsionante. Se disuelve Arlacel P135 a 60°C mientras se agita. Después de la disolución esta fase oleosa se enfría a temperatura ambiente. La fase acuosa se mezcla en esta fase oleosa mientras se agita a 1300 r.p.m. durante 5 minutos usando una mezcladora IKA Eurostar. Las gotas de agua resultantes tienen un tamaño principalmente entre 1 y 5 μm . La viscosidad de esta emulsión es de 25 mPa.s a 25°C y mostró una estabilidad suficiente en un ensayo de estabilidad acelerada basado en almacenamiento a 37°C durante tres semanas.

Ejemplo 5

Formulación de agua en aceite con pequeñas cantidades de Arlacel P135

Se fabrica una emulsión de agua en aceite con una proporción agua/aceite del 60/40% p/p. La fase acuosa contiene 0,01 m de tampón fosfato isotónico. La fase orgánica contiene un triglicérido de cadena meda (Miglyol 840) y un 0,05% p/p de dipolihidroxiestearato de PEG-30 (Arlacel P135) como emulsionante. Se disuelve Arlacel P135 en Miglyol 840 a 60°C mientras se agita. Después de la disolución esta fase oleosa se enfría a temperatura ambiente. La fase acuosa se añade a esta fase oleosa mientras se agita a 1100 r.p.m. durante 5 minutos usando una mezcladora IKA Eurostar. Las gotas de agua resultantes tienen un tamaño principalmente entre 1 y 5 μm . La viscosidad de esta emulsión es de 127 mPa.s a 25°C y mostraba una estabilidad suficiente en un ensayo de estabilidad acelerada basado en almacenamiento a 37°C durante tres semanas.

Ejemplo 6

Se fabrica una emulsión de agua en aceite que contiene los antígenos inactivados del virus Infectious Bronchitis, cepa Massachusetts y el virus de la Enfermedad de New Castle, cepa clon 30 con una proporción agua/aceite del 40/60% p/p. Aparte de los antígenos, la fase acuosa contiene 0,01 m de PBS. La fase orgánica contiene dicaprilcaprato de propilenglicol y un 0,1% p/p de dipolihidroxiestearato de PEG-30 (Arlacel P135) como emulsionante. Se disuelve Arlacel P135 en dicaprilcaprato de propilenglicol a 60°C mientras se agita. Después de la disolución esta fase oleosa se enfría a temperatura ambiente. La fase acuosa se mezcla en esta fase oleosa mientras se agita a 1300 r.p.m. durante 5 minutos usando una mezcladora IKA Eurostar. Las gotas de agua resultantes tienen un tamaño principalmente entre

ES 2 331 058 T3

1 y 5 μm . La viscosidad de esta emulsión es de 35 mPa.s a 25°C y mostró una estabilidad suficiente en un ensayo de estabilidad acelerada basado en almacenamiento a 37°C durante tres semanas.

5 Ejemplo 7

Variación de los tipos de aceite

Materiales

10

Aceite mineral (Marcol 52 de Exxon, EE.UU.), Eutanol G (alcohol graso de Henkel, Alemania), Cetiol PGL (Hexildecanol/Laurato de Hexildecilo de Henkel, Alemania) y miristato de isopropilo (Merck, Alemania), Estol 1526 (Triglicérido de Cadena Media de Unichema, España) y oleato de etilo (AKZO-Nobel Chemicals, Suecia) son los tipos de aceite ensayados. El oleato de etilo y el Estol 1526 usados en este ejemplo y en los siguientes ejemplos 8 y 9 contenían un 7,5% p/p de acetato de vitamina E. Arlacel P135 (ICI, RU) en una concentración del 0,25% p/p (a menos que se indique de otra manera) se usó como tensioactivo. Se mezcló Arlacel P135 en la fase oleosa mientras se calentaba a 60°C.

15

20

Tipo de antígeno aviar viral inactivado con formalina ensayado: Virus de la Enfermedad de New Castle (VEN), cepa Clon 30 (producido en huevos). La concentración total de suspensión de virus usada era del 8% p/v de la vacuna final. La fase acuosa, que contenía la suspensión de virus, se diluyó con tampón fosfato 0,01 M, pH 7,2.

Preparación de las emulsiones

25

Se ensayaron dos tipos de preparaciones. Para emulsiones de baja cizalla la mezcla de la fase acuosa en la fase oleosa se realizó a 1100-1300 r.p.m. usando una mezcladora Eurostar (IKA, Alemania) provista con una paleta impulsora. Para emulsiones de alta cizalla, se realizó la mezcla con fuerzas de alta cizalla a 20.000 r.p.m. usando un tipo Ultra Turrax T25 (IKA, Alemania). Las variaciones de la proporciones agua/aceite ensayadas fueron 60/40 y 30/70 (todo en % p/p). El tamaño de gota de la emulsión se determinó usando microscopía de interferencia a un aumento de 1000x (Olympus, modelo BX50, Japón). El tamaño de gota de las emulsiones preparadas en condiciones de baja cizalla era principalmente 1-5 μm , mientras que las emulsiones preparadas en condiciones de alta cizalla eran principalmente de aproximadamente 1 μm . Los ensayos de estabilidad física acelerada se realizaron determinando el aspecto después de almacenar las emulsiones a 37°C durante tres semanas. Ningunas de las muestras ensayadas mostró degradación de la emulsión después de tres semanas a 37°C.

30

35

Inmunización de los animales

40

Se vacunaron grupos de pollos hembra de tres semanas de edad sin patógeno específico (SPF) (n = 8-10) por vía intramuscular con 0,5 ml de las vacunas en el músculo mamario. Las muestras de sangre para los ensayos serológicos se tomaron en las semanas 3, 6, 9 y 12 después de la vacunación. Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación del virus (IH) para ND se realizaron para determinar los niveles de los títulos de anticuerpo en suero antivirales.

45

Los niveles en suero de anticuerpos específicos para VEN se determinaron mediante un ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Las diluciones en suero de dos veces en serie se prepararon en placas de microtitulación y se mezclaron con un volumen igual que contenía 8 unidades de hemaglutinación/50 μl de antígeno de VEN. Los títulos se expresaron como la inversa de la mayor dilución que da la inhibición completa de la hemaglutinación. Las muestras se consideraron positivas a una inhibición de la hemaglutinación a dilución $\geq 1:2$.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 331 058 T3

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Resultados

TIPO DE ACEITE	PROPORCIÓN AGUA/ACEITE (% p/p)	PROCESO DE EMULSIÓN	TÍTULOS 2LOG IH DE VEN			
			3 SEM.	6 SEM.	9 SEM.	12 SEM.
Eutanol G	30/70	Baja cizalla	9,5	7,8	6,6	6,5
Eutanol G	30/70	Alta cizalla	9,2	8,0	6,7	6,5
Eutanol G	60/40	Baja cizalla	10,1	8,3	7,3	6,9
Miristato de isopropilo	30/70	Baja cizalla	6,1	5,3	4,8	4,7
Miristato de isopropilo	30/70	Alta cizalla	5,8	6,1	4,1	4,9
Miristato de isopropilo	60/40	Baja cizalla	6,5	6,1	4,8	4,8
Miristato de isopropilo	60/40	Alta cizalla	4,0	4,0	2,9	2,7
Cetiol PLG	30/70	Baja cizalla	7,8	6,7	5,8	5,1
Cetiol PLG	30/70	Alta cizalla	8,4	7,5	6,7	6,2
Cetiol PLG	60/40	Baja cizalla	6,9	6,9	6,0	5,2
Cetiol PLG	60/40	Alta cizalla	6,0	6,4	5,8	5,4
Aceite Mineral	30/70	Baja cizalla	8,8	9,7	9,2	8,1
Aceite Mineral	30/70	Alta cizalla	9,3	9,2	8,8	8,9
Aceite Mineral	60/40	Baja cizalla	9,5	9,7	9,5	9,5
Aceite Mineral	60/40	Alta cizalla	8,9	9,9	8,9	8,7
Oleato de etilo	40/60*	Baja cizalla	9,7	8,4	7,1	6,9
Estol 1526	40/60*	Baja cizalla	9,3	8,9	5,4	6,2
* Cantidad de Arlacel P135 = 0,1% p/p						

Ejemplo 8

*Variación de la proporción agua-aceite**Materiales*

Oleato de etilo (AKZO-Nobel Chemicals, Suecia) es el tipo de aceite ensayado. Arlacel P135 (ICI, RU) en una concentración del 0,5% p/p se usó como tensioactivo. Las variaciones de las proporciones agua/aceite ensayadas fueron 40/60, 50/50, 60/40 y 70/30 (todas en % p/p).

Tipo de agentes aviarios virales inactivados con formalina ensayados: Infectious Bronchitis (VIB), cepa Massachusetts 41 (producido en huevos). La concentración total de la suspensión de virus usada fue del 10% p/v de la vacuna final. La fase acuosa, que contenía la suspensión de virus, se diluyó con tampón fosfato 0,01 M, pH = 7,2.

Preparación de las emulsiones: véase el ejemplo 7.

Inmunización de los animales

Se vacunaron grupos de pollos hembra de tres semanas de edad sin patógeno específico (SPF) (n = 8-10) por vía intramuscular con 0,5 ml de las vacunas en el músculo mamiario. Las muestras de sangre para los ensayos serológicos se tomaron en las semanas 3, 6, 9 y 12 después de la vacunación. Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación del virus (IH) para VIB se realizaron para determinar los niveles de títulos de anticuerpo en suero antivirales.

Ensayos para anticuerpos en suero

Los niveles en suero de anticuerpos específicos para VIB se determinaron por un ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Se prepararon diluciones en suero de dos veces en serie en placas de microtitulación y se mezclaron con un volumen igual que contenía 8 unidades de hemaglutinante/50 μ l de antígeno de VIB. Los títulos se expresaron como la inversa de la mayor dilución que da la inhibición completa de la hemaglutinación. Las muestras se consideraron positivas a una inhibición de la hemaglutinación a dilución $\geq 1:16$.

Resultados

PROPORCIÓN AGUA/ACEITE (% p/p)	PROCESO DE EMULSIÓN	TÍTULOS 2LOG IH DE VEN			
		3 SEMANAS	6 SEMANAS	9 SEMANAS	12 SEMANAS
40/60	Alta cizalla	5,5	10,1	10,1	10,3
40/60	Baja cizalla	4,1	10,4	10,9	9,6
50/50	Baja cizalla	4,8	10,7	10,7	8,8
60/40	Baja cizalla	6,0	11,1	9,5	9,8
70/30	Baja cizalla	5,4	10,6	10,2	9,7

Ejemplo 9

*Variación de la cantidad de tensioactivo**Materiales*

Oleato de etilo (AKZO-Nobel Chemicals, Suecia) es el tipo de aceite ensayado. Las proporciones agua/aceite ensayadas fueron 40/60% p/p. Arlacel P135 (ICI, RU) se usó como tensioactivo. Las cantidades de Arlacel P135 ensayadas fueron del 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5%, 10% (todas en % p/p). El tipo de antígeno aviar viral ensayado fue el Virus de la Enfermedad de New Castle, cepa d-12 (atenuado). La concentración total de la suspensión de virus usada fue del 10% p/v de la vacuna final. La fase acuosa, que contenía la suspensión de virus, se diluyó con tampón fosfato 0,01 M, pH = 7,2.

ES 2 331 058 T3

Preparación de las emulsiones

5 Arlcel P135 se disuelve en oleato de etilo a 60°C mientras se agita. Después de la disolución esta fase oleosa se enfría a temperatura ambiente. La mezcla de la fase acuosa en la fase oleosa se realizó a 1100-1300 r.p.m. usando la mezcladora Eurostar (IKA, Alemania) provista con una paleta impulsora. El tamaño de gota de la emulsión se determinó usando microscopía de interferencia a un aumento de 1000x (Olympus, modelo BX50, Japón). El tamaño de gota de las emulsiones fue principalmente 1-5 μm .

Resultados

10 Estas emulsiones se usaron para vacunación *in ovo*. Todas las emulsiones mostraron una inyectabilidad aceptable. También los resultados del ensayo de eclosionabilidad fueron aceptables (entre el 80 y el 95%).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Adyuvante para usar en una formulación de vacuna, que comprende una emulsión de agua en aceite, **caracterizado** por que dicha emulsión comprende un emulsionante polimérico que es un copolímero de bloque que tiene una fórmula general A-COO-B-OOC-A, en la que el componente B es el resto divalente de un polialquilenglicol soluble en agua y los componentes A son el resto de un ácido monocarboxílico complejo soluble en aceite.

2. Adyuvante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que los componentes A tienen un peso molecular de al menos 500 y el componente B tiene un peso molecular de al menos 500.

3. Adyuvante de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** por que el componente B se deriva de polietilenglicol y los componentes A se derivan de ácido polihidroxiesteárico, preferiblemente de ácido poli(12-hidroxiesteárico).

4. Adyuvante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** por que el emulsionante polimérico es Arlacel P135 o ATLOX 4912.

5. Adyuvante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** por que la emulsión comprende 0,01-15% p/p del emulsionante polimérico.

6. Adyuvante de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** por que la emulsión comprende un 0,3-0,5% p/p del emulsionante polimérico.

7. Adyuvante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** por que el aceite es un aceite metabolizable.

8. Adyuvante de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** por que el aceite es un aceite semi-sintético u oleato de olefio.

9. Adyuvante para uso en una formulación de vacuna, que comprende una emulsión de agua en aceite en agua (ag/ac/ag), **caracterizado** por que dicha emulsión (ag/ac/ag) se basa en una emulsión de agua en aceite que comprende un emulsionante polimérico que es un copolímero de bloque que tiene una fórmula general A-COO-B-OOC-A, en la que el componente B es el resto divalente de un polialquilenglicol soluble en agua y los componentes A son el resto de un ácido monocarboxílico complejo soluble en aceite.

10. Vacuna que comprende un adyuvante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un componente antigénico derivado de un agente infeccioso.

11. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 10 en la que el componente antigénico está comprendido en la fase acuosa discontinua de la emulsión.

12. Uso de un emulsionantes polimérico que comprende un copolímero de bloque que tiene una fórmula general A-COO-B-OOC-A, en la que el componente B es el resto divalente de un polialquilenglicol soluble en agua y los componentes A son el resto de un ácido monocarboxílico complejo soluble en aceite, en la preparación de un adyuvante para usarlo en una formulación de vacuna.