

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 006 465**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C08F 220/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2017 PCT/US2017/037745**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017 WO17218819**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2017 E 17736804 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3471760**

54 Título: **Nuevas formulaciones inmunogénicas que comprenden adyuvantes poliméricos de ácido poliacrílico lineales o ramificados**

30 Prioridad:

17.06.2016 US 201662351492 P

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

18.03.2025

73 Titular/es:

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH (50.00%)

**Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE y
SANOFI PASTEUR (50.00%)**

72 Inventor/es:

**RIGAUT, GUILLAUME;
PARISOT, ALEXIS, GUY, ANDRÉ, LUCIEN;
DE LUCA, KARELLE;
ANDREONI, CHRISTINE, MICHELE, PIERRETTE;
REMOLUE, LYDIE;
GARINOT, MARIE;
COTTE, JEAN-FRANCOIS;
PROBECK-QUELLEC, PATRICIA;
HAENSLER, JEAN;
CHAMBON, VÉRONIQUE y
TALAGA, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 006 465 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

Nuevas formulaciones inmunogénicas que comprenden adyuvantes poliméricos de ácido poliacrílico lineales o ramificados

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense nº 62/351.492, presentada el 17 de junio de 2016.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

Cualquier solicitud anterior y todos los documentos citados en ella o durante su tramitación ("documentos citados de la solicitud") y todos los documentos citados o referenciados en los documentos citados de la solicitud, y todos los documentos citados o referenciados aquí ("documentos citados aquí"), y todos los documentos citados o referenciados en los documentos citados aquí, junto con las instrucciones, descripciones, especificaciones de producto y hojas de producto del fabricante para cualquier producto mencionado aquí pueden emplearse en la práctica de la invención. La cita o identificación de cualquiera de dichos documentos en esta solicitud no constituye una admisión de que dicho documento esté disponible como técnica anterior a la presente invención, y no refleja ninguna visión de la validez, patentabilidad y/o requerimiento de dichos documentos de patente citados. Todas las secuencias a las que se hace referencia aquí mediante los números de acceso de GenBank son los que figuran en GenBank a la fecha de presentación de la presente solicitud.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención pertenece al campo de las vacunas. En particular, la invención se refiere a adyuvantes particulares y composiciones adyuvantes, y a procedimientos para preparar dichos adyuvantes y composiciones adyuvantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Ya se ha propuesto el uso de polímeros que incluyen unidades de ácido acrílico como adyuvante en la composición de vacunas. En la mayoría de los casos, los polímeros de ácido poliacrílico recomendados como adyuvantes son polímeros reticulados. Por ejemplo, los documentos US 3.790.665 y US 3.919.411 describen el uso de un polímero de ácido acrílico reticulado con un sacárido de polialilo, como adyuvante. En el documento US 7.163.926 también se describen adyuvantes correspondientes a polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes. Este tipo de polímeros se comercializan con el nombre CARBOPOL®. El uso de CARBOPOL 974P, 934P y 971P, que son polímeros reticulados con un Mw elevado (es decir, alrededor de 3 millones para 974P, según los datos proporcionados por el fabricante), se describe en los documentos US 7.163.926, EP 1.058.558 y WO 2009/118523.

Algunos esfuerzos de investigación se han centrado en el uso de polímeros de ácido poliacrílico lineales que tienen un peso bajo, o en copolímeros de ácido acrílico/éster de ácido acrílico:

El documento WO 2005/065712 propone un complejo que comprende un polímero de distribución de peso molecular estrecha que incluye unidades derivadas de un ácido acrílico o una sal del mismo, y una sustancia que tiene una actividad farmacológica contra un organismo patógeno o un cáncer, o uno o más antígenos o inmunógenos. El polímero puede ser un homopolímero o un copolímero de un ácido acrílico o ácido metacrílico o una sal del mismo. Se recomienda un peso molecular de 100.000 o menos.

Los documentos US 6.610.310 y EP 0 804 234 describen el uso de un polímero que tiene unidades monoméricas repetitivas constitutivas aniónicas y unidades monoméricas repetitivas constitutivas hidrófobas. En particular, la patente EP0804234 describe el uso de un polímero que consiste parcialmente en unidades de ácido acrílico (unidades repetitivas constitutivas aniónicas) y unidades de éster de ácido acrílico (unidades repetitivas constitutivas hidrófobas) como adyuvante de vacuna en una disolución acuosa. En estos documentos se compara el polímero de ácido poliacrílico CARBOPOL® 907 con sus polímeros de ácido poliacrílico parcialmente esterificados homólogos recomendados, y proporciona una respuesta inmune más pobre. De manera similar, las publicaciones de L. Hilgers et al., en Vaccine, 2000, 18, 3319-3325 y Vaccine 1998 Vol. 16, No. 16, 1575-1581, también describen el uso de dichos polímeros esterificados, y enseñan que el uso de ésteres de alquilo de ácido poliacrílico proporciona una mejor respuesta inmune en la mayoría de los casos. CARBOPOL® 907 es un polímero de ácido poliacrílico que hoy en día ya no está disponible y cuyas características no se pueden determinar de forma fiable. Pertenece a la familia CARBOPOL, que son conocidos como polímeros reticulados. Este polímero tiene un peso molecular medio ponderal Mw que difiere de un documento a otro: la publicación de Vaccine, 1998 Vol. 16, No. 16, páginas 1575 a 1581, proporciona un peso molecular medio ponderal Mw de 450 kDa sin precisión respecto al método utilizado para su determinación. No menciona su índice de polidispersidad. Por el contrario, "Liquid Detergents", serie de tensioactivos Science, vol. 67, página 147 (1996, CRC Press, Editorial: Kuo-Yann Lai), proporcionó para

el mismo polímero un peso molecular medio ponderal Mw de 603,3 kDa, determinado por técnica cromatográfica por permeación en gel (GPC), y un índice de polidispersidad IP de 4,124. Existe duda sobre las características del CARBOPOL® 907. Además, la mayoría de las veces, los datos de Mw proporcionados por los productores difieren del Mw que se puede determinar mediante métodos estandarizados, como se muestra en los ejemplos de la presente solicitud de patente.

Además de las incertidumbres en cuanto a las características precisas de los adyuvantes poliméricos existentes, existe una necesidad constante de desarrollar nuevos adyuvantes con propiedades de seguridad y eficacia mejoradas. La presente descripción satisface dichas necesidades al proporcionar formulaciones inmunológicas y de vacunas seguras y efectivas que comprenden adyuvantes de polímero de ácido acrílico no reticulado.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la descripción proporciona formulaciones que comprenden una nueva clase de polímeros como adyuvante de vacuna. Como se describe aquí, esta clase de polímeros ha demostrado seguridad y eficacia en formulaciones adyuvantes en una amplia variedad de antígenos, para uso en la administración de una amplia variedad de especies animales. Esta clase de polímeros produce propiedades adyuvantes ventajosas, en comparación con otras familias de polímeros de ácido poliacrílico utilizados en la técnica anterior.

En una realización del primer aspecto, la invención proporciona una familia de polímeros que es particularmente eficaz como adyuvante. En una realización particular, la invención proporciona una clase de polímeros que inesperadamente promueve fuertes respuestas Th-1, además de respuestas Th-2.

Además, algunos polímeros seleccionados según la invención conducen a una composición adyuvante y, como resultado, a una composición de vacuna. En una realización particular, las composiciones de vacuna de la presente descripción son más seguras, particularmente en cuanto a reproducibilidad y reducción de contaminantes, que a menudo son incompatibles con la estabilidad del almacenamiento de la vacuna. En una realización más particular, los polímeros seleccionados también son estables y esterilizables mediante autoclave.

En este contexto, la invención se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso como adyuvante en una composición de vacuna, caracterizada por que dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 350 a 650 kDa y comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente de unidades de ácido acrílico. En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado puede comprender menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico.

En particular, dicha sal de polímero de ácido poliacrílico está compuesta exclusivamente por unidades que son una sal de ácido acrílico o está compuesta exclusivamente por unidades que son la forma de ácido libre de ácido acrílico y de unidades que son una sal de ácido acrílico.

Ventajosamente, dicha sal de polímero de ácido poliacrílico comprende menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001%, p/p de agentes oxidantes, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y/o comprende menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico.

En una realización más particular, dicho polímero de ácido poliacrílico es una sal con Na⁺.

En realizaciones particulares, dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un índice de polidispersidad menor o igual a alrededor de 4, preferiblemente menor o igual a alrededor de 2,5.

En realizaciones particulares, dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5; o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2.

En algunas realizaciones, una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado puede tener una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7.

Ventajosamente, dicha sal de polímero de ácido poliacrílico comprende menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico.

Según realizaciones ventajosas, dicha sal de polímero de ácido poliacrílico se diafiltra y se esteriliza.

Ventajosamente, la sal de polímero de ácido poliacrílico descrita en la invención se utiliza para mejorar la respuesta inmune Th1 obtenida con la composición de vacuna. La respuesta inmune Th1 es mayor que la respuesta inmune Th1 obtenida cuando se utilizan como adyuvante sales poliméricas de ácido poliacrílico de menor peso molecular Mw.

Otro aspecto de la invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico descrito en la invención, que comprende las siguientes etapas sucesivas:

- a) obtener una disolución de un polímero de ácido poliacrílico,
- b) purificar la disolución del polímero de ácido poliacrílico, con el fin de eliminar impurezas, y
- c) esterilizar la disolución purificada del polímero de ácido poliacrílico.

La invención también se refiere a un procedimiento para el almacenamiento de una disolución de la sal de polímero de ácido poliacrílico descrita en la invención, que comprende dicho procedimiento de preparación, seguido de una etapa de almacenamiento de la sal farmacéuticamente aceptable obtenida del polímero de ácido poliacrílico, en disolución.

En un tercer aspecto, la invención también se refiere a una composición de vacuna que comprende al menos un agente de vacuna (por ejemplo, un inmunógeno o un ácido nucleico que codifica un inmunógeno) y, como adyuvante, una sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico descrito en la invención. En una realización particular, el inmunógeno puede seleccionarse entre: patógenos inactivados, patógenos atenuados, antígenos de subunidades, antígenos purificados, antígenos no purificados, o antígenos producidos de forma recombinante utilizando células bacterianas, de levadura, vegetales, de insectos o animales, vectores de expresión que incluyen plásmidos, y similares. Los antígenos pueden purificarse por medios bien conocidos en la técnica, incluidos, pero no limitados a, ultrafiltración, ultracentrifugación, filtración en gel por exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, y purificación con PEG. El patógeno puede ser de origen bacteriano, viral, protozoario, o fúngico, o el inmunógeno puede constituir una antitoxina.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende al menos un agente de vacuna y una sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico descrito aquí como un adyuvante, para uso en un método para inducir una respuesta inmune en una vacuna contra un patógeno, que comprende administrar la composición de vacuna de la presente invención a la vacuna.

Se observa que en esta descripción, y particularmente en las reivindicaciones, términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende", y similares, pueden tener el significado atribuido a dichos términos en la ley de patentes de EE. UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que les atribuye la ley de patentes de EE. UU., por ejemplo permiten elementos no explícitamente enumerados, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

La expresión "alrededor de", como se utiliza aquí, significa aproximadamente, en la región de, más o menos, o en torno a. Cuando la expresión "alrededor de" se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, la expresión "alrededor de" se utiliza aquí para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor expuesto en una variación del 10%. En un aspecto, la expresión "alrededor de" significa más o menos 20% del valor numérico del número con el que se está utilizando. Por lo tanto, alrededor de 50% significa en el intervalo de 45%-55%. Los intervalos numéricos aquí citados por puntos finales incluyen todos los números y fracciones incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4, y 5). También se debe entender que se presume que todos los números y fracciones de los mismos están modificados por la expresión "alrededor de".

Estas y otras realizaciones se describen o son obvias y están comprendidas en la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Una descripción completa y habilitante de la presente invención, incluyendo su mejor modo, para una persona con conocimientos normales en la técnica, se expone más particularmente en el resto de la memoria descriptiva, incluyendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La FIG. 1 es un gráfico que muestra los títulos de anticuerpos (IgG1 e IgG2a) para ratones OF1 inmunizados en D0, D21 y D35 con 2,5 µg de PS5-rEPA por ratón por inyección, inyectado solo o co-inyectado con 200 µg de CARBOPOL, PAA20 o PAA225000;

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes (GMT) de sueros de grupos de ratones C57BL/6 inmunizados con 2 µg de hCMV-gB y emulsión de escualeno, PAA3000, PAA6000, PAA50000, PAA60000, PAA20 o PAA225000, medido en fibroblastos MRC5;

5 La FIG. 3 es un gráfico que muestra la GMT para los grupos de la FIG. 2, según lo determinado por seroneutralización en células ARPE-19 (células epiteliales humanas);

La FIG. 4 es un gráfico que muestra los anticuerpos IgG1 séricos dirigidos contra el antígeno hCMV-gB para los grupos de la FIG. 2, según lo determinado por ELISA;

10 La FIG. 5 es un gráfico que muestra los anticuerpos IgG2c séricos dirigidos contra el antígeno hCMV-gB para los grupos de la FIG. 2, según lo determinado por ELISA;

15 La FIG. 6 es un gráfico que muestra los niveles de citocina IL5 para los grupos de la FIG. 2, medidos utilizando el kit CBA Flex set;

La FIG. 7 es un gráfico que muestra los niveles de citocinas IFNγ para los grupos de la FIG. 2, medidos utilizando el kit CBA Flex set;

20 La FIG. 8 es un gráfico que presenta la serología de la rabia para grupos caninos vacunados con rabia inactivada + PAA225000; AF03; PAA60000; o emulsión de Escualeno;

25 La FIG. 9 es un gráfico que presenta la serología de CIV para grupos caninos vacunados con gripe recombinante vectorizada con viruela del canario + (1) PBS; (2) CARBOMER (4 mg/ml); (3) PAA60000 (4 mg/ml); o (4) PAA225000 (4 mg/ml). El grupo 5 recibió sólo PBS (es decir, ni antígeno de gripe recombinante ni adyuvante);

30 La FIG.10 es un gráfico que presenta una expansión de los datos serológicos del día 41 que se muestran en la FIG.9;

35 La FIG. 11 es un gráfico que muestra el título medio de anticuerpos antigripales determinado por SRH para grupos equinos vacunados con vCP1533+vCP2242 (cada uno de los cuales porta un gen HA del virus de la gripe) y una de las siguientes toxinas del tétano: (A) CARBÓMERO (4 mg/ml); (B) PAA60000 (4 mg/ml); (C) PAA225000 (4 mg/ml); (D) ADVAX1 (20 mg/ml); (E) ADVAX2 (20 mg/ml). El grupo (F) recibió sólo PBS (es decir, ni antígeno ni adyuvante);

La FIG. 12 es un gráfico que muestra la serología del tétanos para cada grupo equino hasta D35. Grupos: iguales a los representados en la FIG.11;

40 La FIG.13 es un gráfico que muestra los resultados de la serología del tétanos equino hasta el D63;

La FIG. 14 es un gráfico que muestra la serología media de SpaA para cada grupo porcino (hasta D59). Grupos: (G1) SpaA + TS6; (G2) SpaA + PAA60000; (G3) SpaA + PAA225000; SpaA-FlaB-His + PBS; (G5) SpaA-FlaB-His + PAA225000; (G6) PBS.

45

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 Otros objetos, características y aspectos de la presente invención se describen o son obvios a partir de la siguiente descripción detallada. Cualquier persona con conocimientos normales en la técnica debe entender que la presente discusión es sólo una descripción de realizaciones ejemplares y no pretende limitar los aspectos más amplios de la presente invención, aspectos más amplios que están incorporados en la construcción ejemplar.

Características del polímero de ácido poliacrílico

55 El polímero utilizado en la invención es un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, pero no es un polímero reticulado. Por "polímero de ácido poliacrílico" nos referimos a un polímero que está compuesto exclusivamente de unidades de ácido acrílico. Así, en forma de una sal, dicha sal de polímero de ácido poliacrílico está compuesta exclusivamente por unidades correspondientes a una sal de ácido acrílico o está compuesta exclusivamente por unidades correspondientes a la forma de ácido libre del ácido acrílico y por unidades correspondientes a una sal de ácido acrílico.

60 Un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado se obtiene por polimerización de únicamente ácido acrílico como monómero. La polimerización, en la mayoría de los casos, se lleva a cabo mediante polimerización por radicales, utilizando un agente oxidante como iniciador o catalizador. Los agentes oxidantes más utilizados son el persulfato (peroxidisulfato), por ejemplo el persulfato de sodio o de potasio. Los polímeros de ácido poliacrílico ramificados se describen, por ejemplo, en Macromolecules 2011, 44, 5928-5936. Cuando el polímero según la invención es lineal, su

65

pendiente de Mark Houwink es mayor o igual a 0,7 (Yan J.K., Pei J.J., Ma H.L., Wang Z.B. 2015. Effects of ultrasound on molecular properties, structure, chain conformation and degradation kinetics of carboxylic curdlan. Carb. Polymers. 121, 64-70).

5 Por "sal farmacéuticamente aceptable" del polímero de ácido poliacrílico, se entiende la sal de formas aniónicas del polímero con catión o cationes, en particular con catión o cationes monovalentes, que son farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de catión monovalente son los cationes de metales alcalinos, tales como Na⁺ o K⁺, o los cationes amonio tal como NH₄⁺. En una disolución acuosa con un pH de 5,5 a 8, por ejemplo cercano a 7, los grupos ácidos del polímero de ácido poliacrílico estarán en forma aniónica, formando una sal con un catión que también estará presente en la disolución acuosa. En el polímero, podemos tener unidades de ácido acrílico con el grupo ácido en la forma ácida libre, y otras unidades con el grupo ácido en la forma aniónica formando una sal. Dependiendo del pH, los grupos ácidos del polímero pueden estar exclusivamente en forma de ácido libre o, en casos de sal, los grupos ácidos del polímero pueden estar exclusivamente en forma de sal, o algunos grupos ácidos pueden estar en forma ácida y otros en forma de sal. Las sales preferidas de los polímeros de ácido poliacrílico de la invención son sales con Na⁺. Así pues, cualquiera que sea la realización descrita en la invención, el polímero de ácido poliacrílico estará preferiblemente en forma de sal sódica, y, en ese caso, todas las características (Mw, IP, contenidos de monómero y persulfato...) se referirán a la sal (es decir, la sal sódica) del polímero de ácido poliacrílico.

20 En la memoria descriptiva de la presente solicitud de patente, esta "sal farmacéuticamente aceptable de polímero de ácido poliacrílico" se denominará simplemente "sal de polímero de ácido poliacrílico", y es preferiblemente una sal de sodio de polímero de ácido poliacrílico.

25 La sal de polímero de ácido poliacrílico puede estar en forma sólida (precipitado o polvo) o preferiblemente en una formulación líquida. Una formulación líquida incluirá la sal de polímero de ácido poliacrílico y una disolución acuosa. Preferiblemente, dicha formulación tiene un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0. Este pH se puede obtener mediante la incorporación de una base, como NaOH, en la disolución acuosa. La disolución acuosa puede ser una disolución acuosa amortiguada, obtenida con un amortiguador tal como un amortiguador de fosfato, un TRIS (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico), histidina, o amortiguador de citrato. La formulación líquida también puede comprender una o varias sales adicionales, tal como NaCl.

30 Según la invención, se propone utilizar como adyuvante una sal de polímero de ácido poliacrílico o una formulación líquida de una sal de polímero de ácido poliacrílico, caracterizada por que dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 350 a 650 kDa y comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente de unidades de ácido acrílico, y por tener una de las siguientes características, cualquier combinación de tales características, o incluso todas las siguientes características si no se excluyen entre sí:

- 40 • la sal de polímero de ácido poliacrílico o la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico comprende menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001%, p/p de agentes oxidantes, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y/o menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico;
- 45 • la sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un índice de polidispersidad menor o igual a 4, preferiblemente menor o igual a 2,5;
- 50 • la sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4, o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4;
- 55 • la sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5, o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2;
- 60 • la sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7;
- la sal de polímero de ácido poliacrílico o la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico comprende menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico.

En particular, se propone utilizar como adyuvante una sal de polímero de ácido poliacrílico o una formulación líquida de una sal de polímero de ácido poliacrílico, en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, y se caracteriza por:

- 5
 - un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005%, preferiblemente menor que 0,001%, p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- 10
 - un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005%, preferiblemente menor que 0,001%, p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- 15
 - un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005%, preferiblemente menor que 0,001%, p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- 20
 - un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005%, preferiblemente menor que 0,001%, p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- 25
 - un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005%, preferiblemente menor que 0,001%, p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- 30
 - un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005%, preferiblemente menor que 0,001%, p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- 35
 - un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005%, preferiblemente menor que 0,001%, p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o

En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso según la descripción, puede diafiltrarse.

40 Ventajosamente, la sal de polímero de ácido poliacrílico bajo la formulación líquida se diafiltra.

Ventajosamente, la sal de polímero de ácido poliacrílico o la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico se esteriliza. Cuando la sal de polímero de ácido poliacrílico o la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico se diafiltra, la esterilización ocurre después de la diafiltración.

45 Según la invención, el peso molecular medio ponderal M_w se obtiene mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Ventajosamente, se utilizarán tres detectores después de la columna de cromatografía de exclusión por tamaño: un detector de dispersión de luz en ángulo recto, un detector de índice de refracción, y un viscosímetro diferencial de cuatro capilares. Los procedimientos detallados que se proporcionan en los ejemplos se utilizan preferiblemente según la invención para la determinación del M_w , IP (índice de polidispersidad), concentración de polímero, y pendiente de Mark Houwink. El dn/dc utilizado para la determinación de M_w se determina preferiblemente utilizando el detector de índice de refracción con un panel de polímeros de ácido poliacrílico de concentración conocida.

50 El contenido de persulfato y el contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal se puede determinar mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección conductimétrica. Preferentemente, se podrá utilizar el protocolo que se detalla en los ejemplos, en particular en el apartado B de "1.2 Determinación de persulfatos y monómeros de acrilato".

60 **Preparación y almacenamiento del polímero de ácido poliacrílico**

En la materia prima del polímero de ácido poliacrílico, hay un contenido de monómero residual que corresponde al contenido de ácido acrílico o sal de acrilato que no se polimerizó. En la polimerización del polímero de ácido poliacrílico, se utiliza un iniciador de polimerización, un persulfato, como catalizador para iniciar la polimerización. En la materia prima del polímero de ácido poliacrílico, puede quedar un contenido residual de iniciador de polimerización que no se ha consumido por el procedimiento de polimerización.

Los polímeros de ácido poliacrílico que se comercializan a menudo carecen de especificaciones sobre el contenido de monómeros residuales y agente o agentes oxidantes, así como sobre su Mw preciso y su contenido de oligómeros.

Se propone purificar sistemáticamente la materia prima de polímero de ácido poliacrílico adquirida que se utilizará para la preparación de una composición adyuvante, con el fin de evitar el riesgo de tener contenidos residuales de dichos compuestos que pueden ser perjudiciales, considerando la estabilidad de las composiciones adyuvantes y las composiciones de vacuna que contienen el adyuvante y/o la toxicidad de la composición de vacuna. Adicionalmente, según la invención, se identificó que un contenido importante de persulfato es perjudicial para la estabilidad del polímero bajo tratamiento térmico, e impide la esterilización por autoclave.

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una sal farmacéuticamente aceptable de polímero de ácido poliacrílico como se define en el párrafo "Características del polímero de ácido poliacrílico", que comprende las siguientes etapas sucesivas:

- a) obtener una disolución de un polímero de ácido poliacrílico,
- b) purificar la disolución del polímero de ácido poliacrílico, con el fin de eliminar impurezas, y
- c) esterilizar la disolución purificada del polímero de ácido poliacrílico.

En algunas realizaciones, un procedimiento de preparación según la descripción puede ser tal que el polímero de ácido poliacrílico de la disolución de la etapa a) tenga un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 300 a 550 kDa.

En las etapas a), b) y c), la disolución puede ser una disolución del polímero de ácido poliacrílico directamente en forma de la sal farmacéuticamente aceptable deseada, o al menos parcialmente, en la forma de su forma de ácido libre. Si en la etapa a) la disolución es una disolución del polímero de ácido poliacrílico en su forma de ácido libre, se puede realizar una salificación después de la purificación de la etapa b) y la esterilización de la etapa c) realizada sobre la disolución de la sal farmacéuticamente aceptable deseada. También es posible realizar la esterilización de la etapa c) sobre la disolución del polímero de ácido poliacrílico en su forma de ácido libre, y realizar una salificación después de la esterilización.

En cualquier etapa, si se requiere una salificación, ésta se puede obtener mediante la introducción de una base, como NaOH o KOH, en la disolución, dependiendo de la sal deseada.

Por ejemplo, la purificación y/o la esterilización se llevan a cabo en una disolución de una sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico. Esta disolución es, por ejemplo, una disolución acuosa amortiguada, en particular con un amortiguador de fosfato o con un amortiguador TRIS, Hepes, histidina o citrato. La disolución acuosa de la sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico también puede comprender una o varias sales adicionales, tal como NaCl. En tales casos, el procedimiento según la invención, para la preparación de una sal farmacéuticamente aceptable de polímero de ácido poliacrílico como se define en el párrafo "Características del polímero de ácido poliacrílico", comprende las siguientes etapas sucesivas:

- a) obtener una disolución de la sal farmacéuticamente aceptable seleccionada de un polímero de ácido poliacrílico,
- b) purificar la disolución de la sal de polímero del ácido poliacrílico, con el fin de eliminar impurezas, y
- c) esterilizar la disolución purificada obtenida de la sal de polímero de ácido poliacrílico.

Ventajosamente, el polímero de ácido poliacrílico de la disolución de la etapa a) tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7. Cuando está en disolución, el polímero de ácido poliacrílico está en forma de una sal, y esta pendiente de Mark Houwink se refiere a la sal de polímero de ácido poliacrílico.

La purificación eliminará las moléculas pequeñas. La purificación puede realizarse mediante diálisis, diafiltración, ultrafiltración, o cromatografía de exclusión por tamaño. La diafiltración y la ultrafiltración utilizan filtración de flujo cruzado (también denominada filtración de flujo tangencial) en una membrana porosa. Una disolución que contiene el polímero de ácido poliacrílico circula sobre la membrana: una parte de la disolución que incluye las moléculas pequeñas se elimina en el permeado que pasará a través de la membrana. Otra parte de la disolución, denominada retenido, que incluye el polímero poliacrílico purificado, circulará por la superficie de la membrana. El retenido puede circular en un bucle de circulación, y ser diafiltrado o ultrafiltrado varias veces. Se añade disolvente (normalmente un amortiguador acuoso o una disolución acuosa salina) al retenido que circula, para reemplazar el volumen de permeado, a la misma velocidad que el caudal de permeado, de modo que el volumen del retenido permanece constante. El tamaño de las moléculas eliminadas está determinado por el corte de la membrana. Ventajosamente, se pueden utilizar membranas con un corte de 1 a 80 kDa, preferiblemente de 2 a 50 kDa. Este tipo de membranas se encuentran disponibles, por ejemplo, en Merck Millipore. El corte de una membrana se clasifica según su límite de

ES 3 006 465 T3

5 peso molecular nominal (NMWL) o su límite de peso molecular (MWCO). Por ejemplo, una membrana de UF con un peso molecular de 30 kD excluirá una proteína de prueba con un peso molecular de 30 kiloDaltons. El noventa por ciento de esa proteína de prueba permanecerá en el retenido y el 10 por ciento pasará al permeado, lo que dará como resultado una concentración de la proteína si no se añade disolución amortiguadora o salina al retenido durante el procedimiento.

Normalmente, el caudal de circulación del retenido es de 50 a 80 L/H/m². La presión transmembrana (TMP) es, por ejemplo, de 0,9 +/- 0,1 bar.

10 Así, la purificación en la etapa b) puede llevarse a cabo mediante diálisis, diafiltración, ultrafiltración, o cromatografía de exclusión por tamaño. La purificación puede realizarse en una disolución que contenga de 2 a 50 mg/ml, preferiblemente de 10 a 30 mg/ml del polímero de ácido poliacrílico. Cuando, en la disolución, el polímero está en forma de una sal, esta concentración se refiere a la sal del polímero.

15 Ventajosamente, la purificación se lleva a cabo mediante diafiltración con una membrana que tiene un corte de 1 a 80 kDa, preferiblemente de 2 a 50 kDa.

20 En algunas realizaciones, el procedimiento de preparación según la descripción se puede caracterizar por que la purificación se lleva a cabo en condiciones que permiten la obtención de un polímero de ácido poliacrílico en disolución caracterizado por que dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 350 a 650 kDa y comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico y por tener:

25 • menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de agentes oxidantes, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación, y/o menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación,

30 • menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación,

35 • para la sal de polímero de ácido poliacrílico: un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2.

40 Preferiblemente, la purificación se lleva a cabo en condiciones que permitan la recuperación de un polímero de ácido poliacrílico en disolución, caracterizada por que dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 350 a 650 kDa y comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente de unidades de ácido acrílico y por tener:

45 • preferiblemente menos de 0,001% p/p de persulfatos, con respecto a la materia seca total de la disolución obtenida después de la purificación (en particular por diafiltración), o más generalmente, menos de 0,005%, preferiblemente de 0,001% p/p de agentes oxidantes, basado en la materia seca total de la disolución obtenida después de la purificación (en particular por diafiltración), y/o

50 • menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal, basado en la materia seca total de la disolución obtenida después de la purificación (en particular por diafiltración).

55 En algunas realizaciones, un procedimiento de preparación según la descripción puede ser tal que la purificación se lleva a cabo en condiciones que permitan la obtención de un polímero de ácido poliacrílico en disolución que tiene:

60 • menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de agentes oxidantes, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación, y/o menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación,

• menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación,

- para la sal de polímero de ácido poliacrílico: un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2.

El peso molecular medio ponderal Mw del polímero de ácido poliacrílico recuperado está en el intervalo de 350 a 650 kDa, y su índice de polidispersidad puede ser menor o igual a 4.

El dispositivo de purificación se elegirá para eliminar las impurezas deseadas. Por ejemplo, cuando se utiliza ultrafiltración o diafiltración para purificación, el corte de la membrana se elegirá en función de las impurezas a eliminar. Con un corte de al menos 20 kDa, esencialmente, las moléculas pequeñas como persulfatos y monómeros se eliminan mediante filtración cruzada. Con un corte mayor que 20 kDa, también se eliminan moléculas de mayor tamaño como los oligómeros y, como resultado, la purificación conduce a una disminución del IP y a un aumento del Mw.

- Preferentemente, la diafiltración o ultrafiltración se lleva a cabo con un corte para la membrana utilizada, o más generalmente la purificación se lleva a cabo en condiciones, que permiten la recuperación de un polímero de ácido poliacrílico en disolución que tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 350 a 650 kDa, que comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en la materia seca total de la disolución obtenida después de la purificación (en particular por diafiltración), y estando el polímero de ácido poliacrílico compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico y:
 - un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2, y
 - preferiblemente menos de 0,001% p/p de persulfatos, con respecto a la materia seca total de la disolución obtenida después de la purificación (en particular por diafiltración), o más generalmente, menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de agentes oxidantes, basado en la materia seca total de la disolución obtenida después de la purificación (en particular por diafiltración), y/o
 - menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal, basado en la materia seca total de la disolución obtenida después de la purificación (en particular por diafiltración).

Ventajosamente, la disolución obtenida después de las etapas de purificación contiene de 2 a 50 mg/ml de la sal de polímero de ácido poliacrílico, en particular al menos 10 mg/ml de la sal de polímero de ácido poliacrílico.

El resultado principal del procedimiento de purificación es la eliminación de moléculas pequeñas, tales como el agente oxidante (es decir, persulfato) y los monómeros de acrilato.

Al llevar a cabo sistemáticamente dicha etapa de purificación, se pueden definir mejor las características de la composición polimérica que se utiliza como adyuvante, y la composición es más segura y más estable. El contenido de monómeros de ácido acrílico, sospechosos de ser embriotóxicos y teratogénicos, se reduce considerablemente.

Como se ha explicado anteriormente, dependiendo del dispositivo utilizado (en particular, del corte de la membrana), la diafiltración, la diálisis, la ultrafiltración o la cromatografía de exclusión por tamaño también conducen al aumento del peso molecular medio ponderal del polímero de ácido poliacrílico obtenido y a la disminución de su índice de polidispersidad (IP). De hecho, dependiendo de la técnica utilizada, y en particular del corte de la membrana utilizada, en diafiltración, diálisis y ultrafiltración, o de las características de permeación del gel utilizado en la cromatografía de exclusión por tamaño, también se eliminan oligómeros y, como consecuencia, el Mw aumentará y el IP disminuirá. En estos casos, la composición de la sal de polímero está incluso más controlada.

La esterilización puede realizarse mediante filtración o filtraciones esterilizantes, o preferiblemente, mediante autoclave. La filtración esterilizante se realiza en una membrana con un poro de 0,2 µm. La eliminación del agente oxidante permite el uso de la esterilización por autoclave recomendada por las Farmacopeas. La esterilización en autoclave se puede realizar a una temperatura de 100 a 150 °C y durante un tiempo de 5 minutos a una hora. Con la etapa de purificación, el polímero obtenido es más estable en el tiempo y más resistente al tratamiento térmico.

En algunas realizaciones, el procedimiento de preparación, según la descripción, se puede caracterizar por que la esterilización se lleva a cabo en un autoclave.

En algunas realizaciones, el procedimiento de preparación según la descripción se puede caracterizar por que la purificación y la esterilización se llevan a cabo en una disolución de la sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico.

En algunas realizaciones, el procedimiento de preparación según la descripción se puede caracterizar por que la purificación se realiza en una disolución que contiene de 2 a 50 mg/ml de la sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico.

5 La invención también se refiere a un procedimiento para el almacenamiento de una disolución de una sal farmacéuticamente aceptable de polímero de ácido poliacrílico como se define en el párrafo "Características del polímero de ácido poliacrílico", que comprende el procedimiento de preparación como se define según la invención, seguido de una etapa de almacenamiento de la sal farmacéuticamente aceptable obtenida del polímero de ácido poliacrílico, en disolución. El período de almacenamiento puede durar de 1 día a 2 años. La temperatura de almacenamiento estará, la mayor parte del tiempo, en el intervalo de 0 a 30 °C, en particular a 2-8 °C o a temperatura ambiente, generalmente alrededor de 22 °C. El almacenamiento puede realizarse directamente después de la etapa c) de esterilización.

15 Este almacenamiento del adyuvante en forma líquida es muy ventajoso y evita manipulaciones adicionales, en comparación con un almacenamiento en forma seca que necesita una resuspensión/dilución del polímero para la preparación de la composición de vacuna.

20 En particular, cuando la disolución líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico comprende menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de agentes oxidantes, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y/o menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, la disolución es particularmente estable.

25 La etapa de almacenamiento se lleva a cabo colocando la disolución de la sal de polímero de ácido poliacrílico en un recipiente y almacenándola. Durante el almacenamiento, la disolución almacenada, por ejemplo, contiene de 2 a 50 mg/ml de sal de polímero de ácido poliacrílico. Se puede realizar una etapa de dilución o de concentración para obtener la concentración deseada, por ejemplo después de la etapa b) del procedimiento de preparación. Durante el almacenamiento, la sal de polímero de ácido poliacrílico puede estar, por ejemplo, en una disolución acuosa o en una disolución acuosa amortiguada. El pH de la disolución almacenada suele estar entre 5,5 y 8, y más preferiblemente entre 6,5 y 7,5 (por ejemplo, alrededor de 7). Se puede mantener un pH estable mediante el uso de un amortiguador, por ejemplo un amortiguador de Tris, un amortiguador de citrato, un amortiguador de fosfato, un amortiguador de Hepes, o un amortiguador de histidina.

35 La disolución acuosa también puede comprender una o varias sales adicionales, tal como NaCl. El almacenamiento puede realizarse manteniendo la disolución de sal de polímero de ácido poliacrílico alejada de la luz. Para ello se puede utilizar un recipiente oscuro u opaco.

Uso de polímero de ácido poliacrílico como adyuvante

40 La invención también se refiere a la sal de polímero de ácido poliacrílico, como se define en la invención, cualquiera que sea la realización descrita en relación con el párrafo anterior "Características del polímero de ácido poliacrílico", para su uso como adyuvante en una composición de vacuna o para uso como adyuvante de un agente de vacuna para generar una respuesta inmune en un individuo, en particular en un ser humano.

45 También es un objeto de la invención una composición adyuvante para vacuna, que comprende una disolución acuosa de una sal farmacéuticamente aceptable de polímero de ácido poliacrílico, como se define en la invención, cualquiera que sea la realización descrita en relación con el párrafo anterior "Características del polímero de ácido poliacrílico".

50 "Adyuvante", como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que modula la inmunogenicidad de una composición de vacuna. Una composición de vacuna incluye clásicamente un agente de vacuna que puede ser un antígeno o un vector (vector viral recombinante vivo o ácido nucleico) que codifica un antígeno. Más precisamente, un adyuvante modula la inmunogenicidad del antígeno presente o codificado por el ácido nucleico presente en la composición. "Modular la inmunogenicidad" incluye mejorar la magnitud y/o la duración de una respuesta inmune inducida por el antígeno, e incluye en particular la mejora de la respuesta de anticuerpos (especialmente anticuerpos neutralizantes del virus o anticuerpos bactericidas) y/o la mejora de las respuestas inmunes celulares (mejora de las respuestas de células T CD4+ y/o CD8+).

60 El polímero seleccionado según la invención presenta diferentes ventajas, como lo muestran los ejemplos. Por ejemplo, en comparación con polímeros lineales o ramificados análogos de menor peso molecular, conducen a respuestas inmunes aumentadas.

65 Los linfocitos CD4+, también llamados células T "auxiliares", son mediadores de la respuesta inmunitaria. Clásicamente, dos tipos de respuestas de células T auxiliares CD4+ efectoras, denominadas Th1 y Th2, se caracterizan mediante el perfil de citocinas y la subtipificación de anticuerpos. El uso del polímero de ácido poliacrílico, como se define en la invención, tiene la ventaja de promover fuertes respuestas Th-1 (se obtuvieron resultados sobre anticuerpos anti-IFN- γ , anti-TNF- α y anti-IgG2a en ratones) además de las respuestas Th-2 (se obtuvieron resultados

sobre anticuerpos anti-IL-4, anti-IL-5 y anti-IgG1 en ratones) que son comúnmente inducidas por adyuvantes humanos de la técnica anterior (sales de aluminio, emulsiones de aceite en agua). La inducción de una fuerte inmunidad Th-1 es importante para combatir infecciones virales y bacterianas intracelulares, así como el cáncer, ya que las respuestas inmunes Th-1 apoyan la activación de los macrófagos y de otras células asesinas (por ejemplo, linfocitos T CD8+ o linfocitos T citotóxicos) para exterminar patógenos intracelulares, células infectadas y células tumorales.

La sal de polímero de ácido poliacrílico de la invención y el agente de vacuna pueden formularse en una misma composición, en particular en una composición acuosa, o en dos composiciones diferentes y mezclarse justo antes de la administración.

También es posible disponer de una composición de vacuna en forma de kit de partes. La composición de vacuna puede incluir dos viales: uno contiene el agente de vacuna y el otro contiene la sal de polímero de ácido poliacrílico. En particular, la sal de polímero de ácido poliacrílico en una formulación líquida está contenida en un primer vial, y el agente de vacuna en una forma secada por congelación o liofilizada, en particular el antígeno seleccionado en una forma secada por congelación o liofilizada, está contenido en un segundo vial. La formulación de la sal de polímero de ácido poliacrílico se utilizará para rehidratar el agente de vacuna, en particular el antígeno seleccionado.

En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso según la descripción, se puede usar para mejorar la respuesta inmune Th1 obtenida con la composición de vacuna.

La invención también se refiere a la sal de polímero de ácido poliacrílico, como se define en la invención, cualquiera que sea la realización descrita en relación con el párrafo anterior "Características del polímero de ácido poliacrílico", para su uso como adyuvante en una composición de vacuna que potencia la respuesta inmune Th1 obtenida y/o que equilibra las respuestas inmunes Th1 y Th2 obtenidas. En particular, la sal de polímero de ácido poliacrílico, como se define en la invención, se utiliza como adyuvante de un agente de vacuna para aumentar la respuesta inmune en un individuo, en particular en un ser humano, y mejorar la respuesta inmune Th1 obtenida y/o equilibrar las respuestas inmunes Th1 y Th2 obtenidas.

Composición de vacuna y agente de vacuna

En algunas realizaciones, la composición de vacuna según la descripción puede comprender al menos un agente de vacuna que es un antígeno o un vector, tal como un vector viral o un ácido nucleico, que expresa un antígeno.

La composición de vacuna según la invención puede comprender cualquier agente de vacuna que pueda usarse en una vacuna, tal como un antígeno o un vector (vector viral vivo o ácido nucleico, incluyendo ADN y ARN) que codifica un antígeno.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a una composición inmunológica o de vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un componente antigénico, un portador farmacéutica o veterinariamente aceptable, y un adyuvante que comprende o consiste esencialmente en un polímero de ácido poliacrílico (PAA) no reticulado que tiene un Mw de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa que comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico y tiene un índice de polidispersidad de menos de alrededor de 4 o menos de alrededor de 2.

En algunas realizaciones, el PAA puede tener un Mw de alrededor de 400 kDa a alrededor de 600 kDa.

En algunas realizaciones, el PAA puede tener un Mw de alrededor de 400 kDa a alrededor de 500 kDa.

A los efectos de la presente invención, el término "antígeno" se refiere a cualquier molécula que contenga uno o más epítomos (ya sean lineales, conformacionales o ambos) que provoquen una respuesta inmunológica. El o los antígenos que se pueden utilizar en una composición de vacuna según la invención pueden ser un microorganismo entero vivo, atenuado, muerto, inactivado o no infeccioso, un extracto o una fracción de un microorganismo, una forma de subunidad de un antígeno natural, una forma recombinante o una forma híbrida. Cuando se trata de una forma de subunidad, la naturaleza del antígeno tiene poca importancia. El antígeno puede ser un péptido, una proteína, una glicoproteína, un polisacárido, un glicolípido, una lipoproteína, un lipopéptido, una VLP (partícula similar a un virus) ... etc.

El agente de vacuna presente en la composición es un antígeno o un vector (virus recombinante o ácido nucleico) que codifica un antígeno utilizado o adecuado para ser utilizado para el tratamiento o prevención de diversas enfermedades que pueden afectar a seres humanos o animales distintos de los seres humanos, en particular incluyendo: difteria, tétanos, polio, rabia, tos ferina, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, fiebre amarilla, fiebre tifoidea, varicela, sarampión, paperas, rubéola, encefalitis japonesa, gripe, meningitis, cólera, infecciones causadas por Rotavirus, Norovirus, Rinovirus, Virus Sincitial Respiratorio, Virus del Herpes Simple, Virus del Papiloma, virus del citomegalovirus, Virus del Nilo Occidental, Virus del Dengue, Virus Chykungunya, VIH (SIDA), enfermedades bacterianas causadas por

estreptococos, *Chlamydia trachomatis* y *pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* y meningitidis, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus influenzae* tipo B, listeriosis, shigelosis, salmonelosis, tuberculosis, enfermedad de Lyme, cáncer, enfermedades parasitarias tales como malaria, leishmaniasis, enfermedad de Chagas, esquistosomiasis...etc.

5 Los antígenos pueden ser de naturaleza bacteriana, viral o parasitaria. Entre los antígenos que son adecuados para el objeto de la invención, se citan los antígenos bacterianos procedentes de *Clostridium tetani*, *Clostridium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella* sp, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* y *pneumoniae* o *Streptococcus* sp, los antígenos virales procedentes del virus de la hepatitis A, B o C, del virus de la gripe, del rinovirus, del virus sincitial respiratorio, del virus del Nilo occidental, del virus de la rabia, del poliovirus, del virus del VIH, del virus del dengue, del virus de la encefalitis japonesa, del virus de la fiebre amarilla, del citomegalovirus o del virus del herpes, los antígenos parasitarios procedentes en particular de *Plasmodium* sp., de *Leishmania* sp. o de *Schistosoma* sp., y los antígenos tumorales. Estos antígenos pueden obtenerse mediante métodos de recombinación genética o mediante métodos de extracción bien conocidos por los expertos en la técnica.

En particular, el agente de vacuna presente en la composición es un antígeno o un vector (virus recombinante o ácido nucleico) que codifica un antígeno procedente de *Staphylococcus aureus* o del citomegalovirus.

20 En dicha realización, una composición de vacuna puede estar en una disolución acuosa amortiguada, en particular con un amortiguador de fosfato o en un amortiguador de TRIS, Hepes, histidina o citrato.

La composición de vacuna para uso en la invención puede ser una composición destinada a la inmunización contra un solo patógeno o cáncer, es decir, que comprende uno o más agentes de vacuna, en particular uno o más antígenos, de un solo patógeno o cáncer, o puede ser una composición destinada a la inmunización contra varios patógenos o cánceres.

25 La composición de vacuna para uso en la invención puede incluir también uno o varios agentes de vacuna específicos, en particular uno o varios antígenos de una única enfermedad, pero que pertenecen a diferentes categorías de esta enfermedad (múltiples serotipos o cepas, o clados, dependiendo de la naturaleza del agente).

30 La sal de polímero de ácido poliacrílico de la invención y el agente de vacuna se pueden formular en una composición con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la invención, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que es fisiológicamente aceptable para su administración a un animal, y en particular a un ser humano, conservando al mismo tiempo la actividad fisiológica de la composición según la invención, es decir, su capacidad para inducir una respuesta inmune. Un vehículo farmacéuticamente aceptable ejemplar es un amortiguador de disolución salina fisiológica. Los expertos en la técnica conocen otros vehículos fisiológicamente aceptables, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.^a edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

35 El pH de la composición suele estar entre 5,5 y 8, y más preferiblemente entre 6,5 y 7,5 (por ejemplo, alrededor de 7). Se puede mantener un pH estable mediante el uso de un amortiguador, por ejemplo un amortiguador de Tris, un amortiguador de citrato, un amortiguador de fosfato, un amortiguador de Hepes, o un amortiguador de histidina. Por tanto, la composición generalmente incluye un amortiguador. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. Las composiciones pueden ser isotónicas con respecto a los seres humanos.

La composición también puede comprender una o varias sales adicionales, tal como NaCl.

50 Una composición para uso en la invención comprende una cantidad inmunológicamente eficaz del agente de vacuna. Una "cantidad inmunológicamente eficaz" es una cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es eficaz para provocar una respuesta inmune contra el antígeno utilizado o generado tras la expresión del vector y/o del ácido nucleico. Esta cantidad puede variar dependiendo de la salud y el estado físico del sujeto a tratar, su edad, la capacidad del sistema inmune del sujeto para producir anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante de la situación médica.

55 La composición de vacuna para uso en la invención también puede comprender alérgeno o alérgenos, en particular alérgeno o alérgenos para la desensibilización en el tratamiento de alergias.

60 La composición de vacuna para uso en la invención puede administrarse mediante cualquier ruta comúnmente utilizada para administrar una vacuna. Se utilizará un régimen que conduzca a la inducción de la respuesta inmune esperada. Generalmente, el calendario de vacunación incluye varias administraciones. La cantidad de la composición administrada es suficiente para producir la respuesta inmune deseada.

65 Preferiblemente, la composición de vacuna está en forma líquida considerando las buenas propiedades de estabilidad del polímero de ácido poliacrílico, que permite el uso de formas líquidas que son menos costosas de producir.

También se prefieren las inyecciones parenterales (intramuscular, subcutánea, intradérmica e intravenosa). El polímero de ácido poliacrílico no causa efectos secundarios locales aparentes después de una inyección intradérmica. Esto puede ser una ventaja sobre la mayoría de los demás adyuvantes (incluyendo las sales de aluminio), que a veces son reactogénicos por vía intradérmica.

5

A continuación se describen composiciones de vacuna preferidas para uso en la invención:

Una composición de vacuna para uso en la invención comprende al menos un agente de vacuna y una sal farmacéuticamente aceptable de polímero de ácido poliacrílico, teniendo dicha sal de polímero de ácido poliacrílico un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 350 a 650 kDa y comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico.

10

Ventajosamente, la composición de vacuna para uso en la invención comprende, por dosis, de 0,1 a 8 mg de la sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico, preferiblemente de 0,1 a 4 mg, y más preferiblemente de 0,1 a 2 mg.

15

Preferentemente, al menos un agente de vacuna es un antígeno o un vector (vector viral o ácido nucleico) que codifica un antígeno, siendo dicho antígeno un antígeno bacteriano procedente de *Clostridium tetani*, *Clostridium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella* sp, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* o *pneumoniae*, o *Streptococcus* sp; un antígeno viral procedente del virus de la hepatitis A, B o C, del virus de la gripe, del rinovirus, del virus sincitial respiratorio, el virus del Nilo Occidental, del virus de la rabia, del poliovirus, del virus del VIH, del virus del dengue, del virus de la encefalitis japonesa, del virus de la fiebre amarilla, del citomegalovirus o del virus del herpes; un antígeno parasitario procedente en particular de *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp. o *Schistosoma* sp., o un antígeno tumoral. En particular, el agente de vacuna presente en la composición es un antígeno o un vector (virus recombinante o ácido nucleico) que codifica un antígeno procedente de *Staphylococcus aureus* o del citomegalovirus.

20

25

En algunas realizaciones, una composición de vacuna según la descripción puede estar en forma líquida que tiene un pH en el intervalo de 6,0 a 8,0.

30

En una realización preferida, las composiciones de vacuna para uso en la invención están en forma líquida que tiene un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0. Por ejemplo, incluyen un amortiguador de fosfato o un amortiguador de TRIS, Hepes, histidina o citrato.

35

La sal de polímero de ácido poliacrílico presente en la composición de vacuna tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 350 a 650 kDa, comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, y tiene una de las siguientes características, cualquier combinación de dichas características, o incluso todas las siguientes características si no se excluyen entre sí:

40

- la sal de polímero de ácido poliacrílico o la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico comprende preferiblemente menos de 0,001% p/p de agentes oxidantes, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y/o menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico;

45

- la sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un índice de polidispersidad menor o igual a 4, preferiblemente menor o igual a 2,5;

50

- la sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4, o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4;

55

- la sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5, o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2;

60

- la sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7;

- la sal de polímero de ácido poliacrílico o la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico comprende menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico,

- la sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado se diafiltra y/o se esteriliza.

En particular, la sal de polímero de ácido poliacrílico presente en la composición de la vacuna se caracteriza por un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 350 a 650 kDa, comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, y tiene:

- un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico preferiblemente menor que 0,001% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico preferiblemente menor que 0,001% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico preferiblemente menor que 0,001% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7, o
- un peso molecular medio ponderal M_w en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2, un contenido de persulfatos en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico preferiblemente menor que 0,001% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y un contenido de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal en la sal de polímero de ácido poliacrílico o en la formulación líquida de la sal de polímero de ácido poliacrílico menor que 0,005% p/p, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; ventajosamente, esta sal de polímero de ácido poliacrílico tiene una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7.

La invención también se refiere a las composiciones de vacuna de la invención para uso en la generación de una respuesta inmune en un individuo, en particular en un ser humano. El objeto de la invención también abarca una composición de vacuna como se describe aquí para uso en un método para generar una respuesta inmune en un individuo, en particular en un ser humano, que comprende la etapa de administrar al individuo que lo necesita una cantidad inmunológicamente efectiva de la composición según la invención. El individuo puede ser un ser humano o un animal seleccionado entre las especies canina, felina, bovina, porcina, equina u ovina, así como los mustélidos y las especies aviares.

La invención también se refiere a las composiciones de vacuna de la invención para uso en la generación de una respuesta inmune en un individuo, en particular en un ser humano, con mejora de la respuesta inmune Th1 obtenida. La materia objeto de la invención también abarca una composición de vacuna para uso en un método para generar una respuesta inmune en un individuo, en particular en un ser humano, con mejora de la respuesta inmune Th1 obtenida, comprendiendo dicho método la etapa de administrar al individuo que lo necesita una cantidad inmunológicamente efectiva de la composición según la invención.

Preparación de la composición de vacuna

Ventajosamente, el polímero de ácido poliacrílico o la sal de polímero de ácido poliacrílico se ha sometido a una purificación, tal como diafiltración, antes de su adición a la composición de vacuna. Más precisamente, el polímero de ácido poliacrílico o la sal de polímero de ácido poliacrílico se ha sometido a una purificación, tal como diafiltración,

seguido de una esterilización, antes de su introducción en la composición de vacuna. La esterilización puede realizarse mediante filtración o filtraciones esterilizantes, o preferiblemente, mediante autoclave.

Según la invención, la composición de vacuna se puede preparar simplemente mezclando la sal de polímero de ácido poliacrílico, en particular en forma líquida en una disolución acuosa o en una disolución acuosa amortiguada, y una suspensión del o los agentes de vacuna y otro u otros componentes que pueden estar presentes en la composición. Esto se puede realizar añadiendo uno o más agentes de vacuna seleccionados a la sal de polímero de ácido poliacrílico, en particular a la sal de polímero de ácido poliacrílico en una formulación líquida en una disolución acuosa o en una disolución acuosa amortiguada, o añadiendo el polímero de ácido poliacrílico, en particular el polímero de ácido poliacrílico en una formulación líquida en una disolución acuosa o en una disolución acuosa amortiguada, a una suspensión que ya comprende el o los agentes de vacuna seleccionados. Por otra parte, en el caso en que se desee formular composiciones de vacunas que comprendan múltiples agentes de vacuna, puede preferirse realizar en primer lugar el mezclado de la sal de polímero de ácido poliacrílico con uno o más agentes de vacuna, e incorporar el o los otros después.

Alternativamente, si el agente de vacuna se formula como un producto secado por pulverización o liofilizado, la composición de la vacuna se puede obtener mediante la rehidratación del o de los agentes liofilizados directamente con la formulación (disolución acuosa o disolución acuosa amortiguada) que contiene la sal de polímero de ácido poliacrílico.

La sal de polímero de ácido poliacrílico, como se define en la invención, cualquiera que sea la realización descrita en relación con el párrafo anterior "Características del polímero de ácido poliacrílico", puede usarse en la preparación de una composición de vacuna que comprende al menos un agente de vacuna.

Un procedimiento de una composición de vacuna puede implementar el mezclado de la sal de polímero de ácido poliacrílico, como se define en la invención, cualquiera que sea la realización descrita en relación con el párrafo anterior "Características del polímero de ácido poliacrílico", con al menos un agente de vacuna.

Para mayor comodidad, se recogen aquí ciertos términos empleados en la Memoria descriptiva, los Ejemplos, y las Reivindicaciones adjuntas.

Como se utiliza aquí, el término "animal" incluye todos los animales vertebrados, incluidos los seres humanos. También incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluidas las etapas embrionaria y fetal. En particular, la expresión "animal vertebrado" incluye, pero no se limita a, seres humanos, cánidos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos); équidos (por ejemplo, caballos), bóvidos (por ejemplo, vacas, ganado), porcinos (por ejemplo, cerdos), así como también aves. Como se utiliza aquí, el término "vaca" o "ganado" se utiliza generalmente para referirse a un animal de origen bovino de cualquier edad. Los términos intercambiables incluyen "bovino", "ternero", "novillo", "toro", "novilla", "vaca" y similares. Los términos intercambiables incluyen "cochinillo", "cerda" y similares. El término "aviar", como se utiliza aquí, se refiere a cualquier especie o subespecie de la clase taxonómica avia, tal como, pero sin limitarse a, pollos (reproductores, pollos de engorde y ponedoras), pavos, patos, un ganso, una codorniz, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y ratites, incluidos el avestruz, el emú y el casuario. El término "cerdo" o "cochinillo" significa un animal de origen porcino, mientras que "cerda" se refiere a una hembra en edad y capacidad reproductiva.

Como se utiliza aquí, el término "virulento" significa un aislado que conserva su capacidad de ser infeccioso en un hospedante animal.

Como se utiliza aquí, la expresión "vacuna inactivada" significa una composición de vacuna que contiene un organismo o patógeno infeccioso que ya no es capaz de replicarse o crecer. El patógeno puede ser de origen bacteriano, viral, protozoario o fúngico. La inactivación puede lograrse mediante una variedad de métodos, incluyendo congelación-descongelación, tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con formalina), sonicación, radiación, calor, o cualquier otro medio convencional suficiente para prevenir la replicación o el crecimiento del organismo mientras se mantiene su inmunogenicidad.

Como se utiliza aquí, el término "inmunogenicidad" significa capaz de producir una respuesta inmune en un animal hospedante contra un antígeno o antígenos. Esta respuesta inmune constituye la base de la inmunidad protectora generada por una vacuna contra un organismo infeccioso específico.

Como se utiliza aquí, la expresión "respuesta inmune" se refiere a una respuesta provocada en un animal. Una respuesta inmune puede referirse a la inmunidad celular (IMC), a la inmunidad humoral, o puede involucrar ambas. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmune. Por ejemplo, una composición de vacuna de la presente invención puede inducir específicamente una mayor respuesta de interferón gamma.

Como se utiliza aquí, el término "antígeno" o "inmógeno" significa una sustancia que induce una respuesta inmune específica en un animal hospedante. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo;

una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una trozo o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmune al presentarse a un animal hospedante; una proteína, un polipéptido, un péptido, un epítipo, un hapteno, una toxina, una antitoxina; o cualquier combinación de los mismos.

5 Como se utiliza aquí, el término "multivalente" significa una vacuna que contiene más de un antígeno, ya sea de la misma especie (es decir, diferentes aislados de serotipos del virus de la fiebre aftosa), de una especie diferente (es decir, aislados tanto de *Pasteurella haemolytica* como de *Pasteurella multocida*), o una vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* y *Clostridium*).

15 Como se utilizan aquí, las expresiones "portador farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables, y se refieren a un vehículo fluido para contener antígenos de vacuna que pueden inyectarse en un hospedante sin efectos adversos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, agua esterilizada, disolución salina, glucosa, dextrosa, o disoluciones amortiguadas. Los portadores pueden incluir agentes auxiliares que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, estabilizadores (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes amortiguadores del pH, aditivos mejoradores de la viscosidad, colorantes, y similares.

20 Como se utiliza aquí, la expresión "composición de vacuna" incluye al menos un antígeno o inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inducir una respuesta inmunitaria en un hospedante. Las composiciones de vacuna se pueden administrar en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las técnicas médicas o veterinarias, teniendo en cuenta factores como la edad, el sexo, el peso, la especie y la condición del animal receptor, y la vía de administración. La vía de administración puede ser percutánea, mediante administración mucosa (por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal) o mediante vía parenteral (intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa, o intraperitoneal). Las composiciones de vacuna pueden administrarse solas, o pueden administrarse coadministradas o secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Las formas de administración pueden incluir suspensiones, jarabes o elixires, y preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), tales como suspensiones o emulsiones estériles. Las composiciones de vacuna pueden administrarse como aerosol o mezcladas con alimentos y/o agua, o administrarse en una mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua esterilizada, disolución salina fisiológica, glucosa, o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores del pH, adyuvantes, aditivos gelificantes o mejoradores de la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes, colorantes, y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Se pueden consultar textos farmacéuticos estándar, tal como "Remington's Pharmaceutical Sciences", 1990, para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación indebida.

40 El inmunógeno o antígeno adecuado para uso en la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en patógenos inactivados, patógenos atenuados, subunidades inmunogénicas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos, epítopos, haptenos), o vectores de expresión recombinantes, incluidos plásmidos que tienen insertos inmunogénicos. En una realización de la presente invención, el inmunógeno es un microorganismo inactivado o muerto. En otra realización de la invención, la composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado del grupo de patógenos aviares que incluyen, pero no se limitan a, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus del síndrome de caída de postura (EDS), o virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), virus de la gripe aviar, y combinaciones de los mismos.

50 Alternativamente, la composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno felino tal como el virus del herpes felino (FHV), el calicivirus felino (FCV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la rabia, y combinaciones de los mismos.

55 En todavía otra realización, una composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno canino que incluye, pero no se limitan a, virus de la rabia, herpesvirus canino (CHV), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippityphosa*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica*, y similares, y combinaciones de los mismos.

En todavía otra realización, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno equino, tal como el virus del herpes equino (tipo 1 o tipo 4), el virus de la gripe equina, el tétanos, el virus del Nilo Occidental, y similares, o combinaciones de los mismos.

60 En todavía otra realización, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno bovino, tal como el virus de la fiebre aftosa (FMDV), el virus de la rabia, el rotavirus bovino, el virus de la parainfluenza bovina tipo 3 (bPIV-3), el coronavirus bovino, el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), el virus sincitial respiratorio bovino (BRV), el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), *E. coli*, *P. multocida*, *P. haemolytica*, y combinaciones de los mismos.

65

En todavía otra realización, la composición comprende un agente de vacuna que incluye inmunógenos y ácidos nucleicos que codifican inmunógenos, seleccionados de un patógeno porcino tal como, pero sin limitarse a, virus de gripe porcina (SIV), circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRS), virus de la pseudorrabia (PRV), parvovirus porcino (PPV), FMDV, *M. hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *E. coli*, y similares, y combinaciones de los mismos.

Los agentes de vacuna que comprenden virus, bacterias, hongos y similares pueden producirse mediante métodos de cultivo *in vitro* utilizando medios de cultivo apropiados o líneas de células hospedantes y métodos convencionales bien conocidos por aquellos con conocimientos normales en la técnica. Por ejemplo, el PRRS puede cultivarse en una línea celular apropiada, tal como la línea celular MA-104 (véanse las patentes de EE. UU. 5.587.164; 5.866.401; 5.840.563; 6.251.404). De manera similar, el PCV-2 puede cultivarse utilizando la línea de células PK-15 (véase el documento US 6.391.314); el SIV puede cultivarse en huevos (documento US 6.048.537); y *M. hyopneumoniae* puede cultivarse en un medio de cultivo apropiado (documentos US 5.968.525; US 5.338.543).

Para obtener una composición inmunológica o de vacuna inactivada, el patógeno se inactiva preferiblemente después de la cosecha y, opcionalmente, se somete a clarificación por medio de un tratamiento químico usando, por ejemplo, formalina o formaldehído, beta-propiolactona, etilenimina, etilenimina binaria (BEI) y/o un tratamiento físico (por ejemplo, un tratamiento térmico o sonicación). Los métodos para la inactivación son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el virus de la fiebre aftosa puede inactivarse con etilenimina (Cunliffe, HR, Applied Microbiology, 1973, pág. 747-750) o mediante alta presión (Ishimaru et al., Vaccine 22 (2004) 2334-2339), el virus del PRRS puede inactivarse mediante tratamiento con beta-propiolactona (Plana-Duran et al., Vet. Microbiol., 1997, 55: 361-370) o mediante tratamiento con BEI (documento US 5.587.164); la inactivación del virus PCV-2 se puede lograr utilizando un tratamiento con etilenimina o mediante un tratamiento con beta-propiolactona (patente de EE. UU. número de serie 6.391.314); el virus de la gripe porcina se puede inactivar utilizando un detergente como Triton, o con un tratamiento con formaldehído (documento US 6.048.537); la bacteria *M. hyopneumoniae* se puede inactivar mediante un tratamiento con formaldehído (Ross R.F., más arriba), mediante un tratamiento con etilenimina o con BEI.

El patógeno inactivado puede concentrarse mediante técnicas de concentración convencionales, en particular mediante ultrafiltración, y/o purificarse mediante medios de purificación convencionales, en particular utilizando técnicas de cromatografía que incluyen, pero no se limitan a, filtración en gel, ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, o precipitaciones selectivas, en particular en presencia de PEG.

Los inmunógenos útiles en las composiciones de vacuna también incluyen vectores de expresión. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión recombinantes *in vivo* tales como un vector de polinucleótido o un plásmido (documento EP-A2-1001025; Chaudhuri P. Res. Vet. Sci. 2001, 70: 255-6), vectores de virus tales como, pero sin limitarse a, vectores de adenovirus, vectores de poxvirus tal como viruela aviar (documentos US 5,174,993; US 5,505,941; y US 5,766,599) o vectores de viruela del canario (documento US 5,756,103) o vectores bacterianos (*E. coli* o *Salmonella sp.*).

Se puede utilizar la formulación de composiciones inmunológicas multivalentes o composiciones de vacuna combinadas. Por ejemplo, los antígenos útiles en una bacterina bovina combinada elaborada según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella sp.*, particularmente *P. multocida* y *P. haemolytica*, *Haemophilus sp.*, particularmente *H. somnus*, *Clostridium sp.*, *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *E. coli*, y similares.

Una composición inmunológica o una composición de vacuna pueden usarse en métodos para inducir una respuesta inmune en un hospedante, por ejemplo un animal, comprendiendo los métodos la administración al hospedante de la composición inmunológica o la composición de vacuna según la invención. Las respuestas inmunes provocadas de esta manera son, en particular, respuestas inmunes de anticuerpos y/o celulares, y en particular, una respuesta de interferón y.

Las composiciones pueden usarse en métodos para inmunizar contra, o para prevenir o reducir los síntomas causados por, la infección de un animal con un organismo patógeno (por ejemplo, infección por un virus, bacteria, hongo, o parásito protozoario). El método es útil en animales vertebrados, incluidos, pero sin limitarse a, seres humanos, cánidos (por ejemplo, perros), félidos (por ejemplo, gatos), équidos (por ejemplo, caballos), bóvidos (por ejemplo, ganado vacuno) y porcinos (por ejemplo, cerdos), así como en aves, incluyendo, pero sin limitarse a, pollos, pavos, patos, gansos, una codorniz, un faisán, loros, pinzones, halcones, cuervos y ratites (avestruz, emú, casuario, etc.).

Estos métodos consisten en la vacunación de hembras gestantes antes del parto mediante la administración de una composición de vacuna obtenida según la invención. Estos métodos incluyen además la inducción de anticuerpos protectores generados por el protocolo de vacunación y la transferencia de estos anticuerpos protectores de las hembras preñadas vacunadas a su descendencia, para protegerla de infecciones y enfermedades.

La dosificación de la composición de vacuna obtenida según la presente invención dependerá de la especie, raza, edad, tamaño, historial de vacunación, y estado de salud del animal a vacunar. Otros factores como la concentración de antígeno, los componentes adicionales de la vacuna y la vía de administración (es decir, administración subcutánea,

intradérmica, oral, intramuscular o intravenosa) también afectarán la dosis efectiva. La dosis de vacuna a administrar es fácilmente determinable en función de la concentración de antígeno de la vacuna, la vía de administración, y la edad y condición del animal a vacunar. Cada lote de antígeno puede calibrarse individualmente. Como alternativa, se pueden utilizar ensayos metódicos de inmunogenicidad de diferentes dosis, así como estudios de LD50 y otros procedimientos de detección para determinar la dosis efectiva para una composición de vacuna sin experimentación indebida. A partir de los ejemplos presentados a continuación, será fácilmente evidente qué dosis aproximada y qué volumen aproximado serían apropiados para utilizar la composición de vacuna descrita aquí. El factor crítico es que la dosis proporcione al menos un efecto protector parcial contra la infección natural, como lo demuestra una reducción en la mortalidad y la morbilidad asociadas con la infección natural. El volumen apropiado también puede ser determinado fácilmente por una persona con conocimientos normales en la técnica. Por ejemplo, en especies aviares, el volumen de una dosis puede ser de alrededor de 0,1 ml a alrededor de 0,5 ml, y ventajosamente, de alrededor de 0,3 ml a alrededor de 0,5 ml. Para las especies felinas, caninas y equinas, el volumen de una dosis puede ser de alrededor de 0,2 ml a alrededor de 3,0 ml, ventajosamente de alrededor de 0,3 ml a alrededor de 2,0 ml, y más ventajosamente, de alrededor de 0,5 ml a alrededor de 1,0 ml. Para las especies bovina y porcina, el volumen de la dosis puede ser de alrededor de 0,2 ml a alrededor de 5,0 ml, ventajosamente de alrededor de 0,3 ml a alrededor de 3,0 ml, y más ventajosamente de 0,5 ml a alrededor de 2,0 ml.

Puede ser preferible aplicar vacunaciones repetidas a intervalos de tiempo periódicos para mejorar la respuesta inmune inicialmente o cuando haya transcurrido un largo período de tiempo desde la última dosis. En una realización, la composición de vacuna se administra como una inyección parenteral (es decir, por vía subcutánea, intradérmica, o intramuscular). La composición puede administrarse como una dosis única o, en realizaciones alternativas, administrarse en dosis repetidas de alrededor de dos a alrededor de cinco dosis administradas en intervalos de alrededor de dos a alrededor de seis semanas, preferiblemente de alrededor de dos a alrededor de cinco semanas. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que el número de dosis y el intervalo de tiempo entre vacunaciones dependen de varios factores que incluyen, pero no se limitan a, la edad del animal vacunado, la condición del animal, la vía de inmunización, la cantidad de antígeno disponible por dosis, y similares. Para la vacunación inicial, el período generalmente será más largo que una semana, y preferiblemente será de entre alrededor de dos y alrededor de cinco semanas. En el caso de animales previamente vacunados, se puede realizar una vacunación de refuerzo, antes o durante el embarazo, con un intervalo de alrededor de una vez al año.

Una composición farmacéutica obtenida según la invención puede ser para uso en métodos para tratar un hospedante, por ejemplo un animal, comprendiendo los métodos administrar al hospedante una composición farmacéutica obtenida según la invención y que comprende al menos un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste en proteínas o péptidos, virus inactivados o atenuados, anticuerpos, alérgenos, CpG ODN, factores de crecimiento, citocinas, o antibióticos, y en particular CpG ODN o citocinas. Estas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para mejorar el rendimiento del crecimiento de un animal tal como un pollo, un cerdo, una vaca o un ganado.

En una realización, la descripción proporciona una composición inmunológica o de vacuna que comprende una formulación adyuvante, una cantidad terapéuticamente eficaz de un componente antigénico, y un portador farmacéutica o veterinariamente aceptable, en la que la formulación adyuvante comprende un polímero de ácido poliacrílico (PAA) no reticulado que tiene un peso molecular medio ponderal (AMw) de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa, que comprende menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico. En algunas realizaciones, el componente antigénico puede comprender un vector viral recombinante atenuado, un virus o microorganismo atenuado vivo natural o genéticamente modificado, un virus o microorganismo inactivado, un microorganismo coccidio, un microorganismo coccidio precoz, una subunidad proteica, un parásito unicelular, un parásito multicelular, o cualquier combinación de los anteriores.

En una realización particular, el componente antigénico puede comprender: un antígeno de coronavirus canino (C CV), un antígeno del virus del moquillo canino (CDV), un antígeno del parvovirus canino (CPV), un antígeno de la parainfluenza canina (CPI), un antígeno del calicivirus felino (FCV), un antígeno del virus de inmunodeficiencia felina (FIV), un antígeno del virus del herpes felino (FHV), un antígeno del virus de la leucemia felina (FeLV), un antígeno del cáncer (por ejemplo, Her2-neu, tirosinasa, Il-2 y similares), una *Eimeria* sp. o antígeno de la misma, *Escherichia coli* (*E. coli*) o antígeno de la misma, *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*), un antígeno del virus de la diarrea bovina (BDV), un vector de viruela del canario recombinante que contiene y es capaz de expresar *in vivo* al menos un inmunógeno protector, una glicoproteína de la rabia de longitud completa inactivada, una *Erysipelothrix* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, un antígeno protector de superficie (SpaA) de *E. rhusiopathiae*, una proteína de fusión SpaA que comprende al menos una porción de al menos un inmunógeno adicional, una proteína de fusión SpaA-FlaB, una proteína de fusión SpaA-FlaB-His, una toxina B/C de *Clostridium* (*C.*) *perfringens*, una toxina D de *C. perfringens*, una toxina de *C. septicum*, una toxina de *C. novyi*, una toxina de *C. tetani*, o cualquier combinación de los anteriores.

En algunas realizaciones, un componente antigénico puede comprender una *Eimeria* sp. o antígeno de la misma, *Escherichia coli* (*E. coli*) o antígeno de la misma, *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*), un antígeno del virus de la diarrea bovina (BDV), un vector de viruela del canario recombinante que contiene y es capaz de expresar *in vivo* al menos un inmunógeno protector, una glicoproteína de la rabia de longitud completa inactivada, una *Erysipelothrix* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, un antígeno protector de superficie (SpaA) de *E. rhusiopathiae*, una proteína de fusión

SpaA que comprende al menos una porción de al menos un inmunógeno adicional, una proteína de fusión SpaA-FlaB, una proteína de fusión SpaA-FlaB-His, una toxina B/C de *Clostridium (C.) perfringens*, una toxina D de *C. perfringens*, una toxina de *C. septicum*, una toxina de *C. novyi*, una toxina de *C. tetani*, o cualquier combinación de los anteriores.

5 En otra realización, el componente antigénico comprende o consiste en una glicoproteína de la rabia de longitud completa inactivada. El componente antigénico también puede comprender o consistir en una toxina B/C de *C. perfringens*, una toxina D de *C. perfringens*, una toxina de *C. septicum*, una toxina de *C. novyi*, una toxina de *C. tetani*, o combinaciones de las mismas. En una realización particular, la composición inmunológica o de vacuna puede comprender un componente antigénico que comprende una toxina B/C de *C. perfringens*, una toxina D de *C. perfringens*, una toxina de *C. septicum*, una toxina de *C. novyi* y una toxina de *C. tetani*. El adyuvante PAA descrito aquí proporciona "ahorro de dosis".

10 En todavía otra realización, el componente antigénico comprende un antígeno SpaA o una proteína de fusión que comprende el antígeno SpaA.

15 En otra realización, el componente antigénico comprende un virus de la viruela aviar atenuado o un plásmido de ADN que contiene y es capaz de expresar *in vivo* un gen de la gripe. El componente antigénico también puede comprender un virus de la viruela aviar atenuado o un plásmido de ADN que contenga y sea capaz de expresar *in vivo* un gen de la glicoproteína de la rabia.

20 En algunas realizaciones, un componente antigénico puede comprender *M. hyo*.

En algunas realizaciones, un componente antigénico puede comprender FIV.

25 En algunas realizaciones, un componente antigénico puede comprender un antígeno de cáncer.

En algunas realizaciones, un componente antigénico puede comprender coronavirus canino (CCV).

30 En algunas realizaciones, un componente antigénico puede comprender rotavirus bovino.

En algunas realizaciones, un componente antigénico puede comprender el virus de la gripe canina (CIV).

35 Composiciones que comprenden una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de PAA lineal o ramificado que tiene un intervalo de Mw de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa, menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en las que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, pueden usarse en un método para tratar a un bovino contra una infección causada por bacterias, que comprende administrar al animal bovino una vacuna de dichas composiciones. En realizaciones particulares, los PAA que tienen un Mw de alrededor de 450 kDa son excepcionalmente útiles para provocar en animales, incluidos los bovinos, respuestas inmunes protectoras.

40 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a una composición de vacuna de la descripción para uso en un método de tratamiento de un canino o equino contra una infección causada por gripe, comprendiendo el método administrar al canino o equino la composición de vacuna.

45 Una composición de vacuna que comprende una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de PAA lineal o ramificado que tiene un intervalo de Mw de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa, menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, puede usarse en un método para tratar a un canino o equino contra una infección causada por gripe, que comprende administrar al canino o equino dicha vacuna que comprende un plásmido de ADN o avipox que contiene y es capaz de expresar *in vivo* un antígeno de la gripe. En realizaciones particulares, el antígeno de la gripe es un gen HA.

50 Una composición de vacuna que comprende una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de PAA lineal o ramificado que tiene un intervalo de Mw de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa, menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, puede usarse en un método para tratar a un canino contra una infección causada por el virus de la rabia, que comprende administrar al canino dicha composición de vacuna que comprende glicoproteína de la rabia inactivada.

60 Vacunas aviares, incluida una vacuna contra la coccidiosis aviar, para administración *in ovo*, que pueden comprender:

un adyuvante que comprende PAA no reticulado que tiene un Mw promedio de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa; menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en el que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, y un antígeno protozoario seleccionado entre (1) una o más proteínas expresadas de forma recombinante; (2) una o más proteínas u otras macromoléculas aisladas de dicho protozoo por medios convencionales; (3) extractos o

preparaciones de células completas de dicho protozoo; y (4) coccidios inactivados, vivos o vivos precoces seleccionados entre: *Eimeria* (E.) *acervulina*, *E. adenoides*, *E. brunetti*, *E. colchici*, *E. curvata*, *E. dispersa*, *E. duodenalis*, *E. fraterculae*, *E. gallopavonis*, *E. innocua*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. meleagridis*, *E. meleagrimitis*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. phasiani*, *E. procera*, *E. tenella*, y combinaciones de los mismos.

5 En realizaciones particulares, el PAA tiene un Mw promedio de alrededor de 450 kDa.

10 Una composición de vacuna que comprende una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de PAA lineal o ramificado que tiene un intervalo de Mw de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa, menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente de unidades de ácido acrílico, puede ser para uso en un método para tratar a un bovino contra una infección causada por *E. coli* o *M. hyo*, que comprende administrar al bovino dicha composición de vacuna que comprende *E. coli* o *M. hyo*. Una composición de vacuna que comprende una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de PAA lineal o ramificado que tiene un intervalo de Mw de alrededor de 15 350 kDa a alrededor de 650 kDa, menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, puede ser para uso en un método para tratar a un cerdo contra una infección causada por *M. hyo*, que comprende administrar al cerdo dicha vacuna que comprende *M. hyo*.

20 La composición inmunológica o de vacuna puede comprender un antígeno correspondiente a un agente responsable de una infección y/o enfermedad felina. El antígeno puede comprender el virus de inmunodeficiencia felina (FIV). Una composición de vacuna que comprende una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de PAA lineal o ramificado que tiene un intervalo de Mw de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa, menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de 25 ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, puede usarse en un método para tratar a un felino contra una infección causada por FIV, que comprende administrar al felino dicha vacuna que comprende un antígeno de FIV y PAA.

30 La composición de vacuna puede comprender un antígeno de cáncer. Una composición de vacuna que comprende una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de PAA lineal o ramificado que tiene un intervalo de Mw de alrededor de 350 kDa a alrededor de 650 kDa, menos de 0,005% de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente por unidades de ácido acrílico, puede ser para uso en un método de tratamiento de un sujeto contra el cáncer, que comprende administrar al sujeto dicha composición de vacuna que comprende el antígeno de cáncer y PAA. 35

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a una composición de vacuna para uso en un método de tratamiento de un canino contra una infección causada por CCV (coronavirus canino), comprendiendo el método administrar al canino la composición de vacuna.

40 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a una composición de vacuna para uso en un método de tratamiento de un bovino contra una infección causada por rotavirus bovino, comprendiendo el método la administración al bovino de la composición de vacuna.

45 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a una composición de vacuna para uso en un método de tratamiento de un canino contra una infección causada por CIV (virus de la gripe canina), comprendiendo el método la administración al canino de la composición de vacuna.

50 Los ejemplos que se exponen a continuación, con referencia a las Figuras, resaltan las propiedades y ventajas de los polímeros utilizados en la invención. En estos ejemplos, NaPAA designa la sal sódica del polímero, sea cual sea ésta según la invención o no.

Cuando no se especifica, "peso molecular" significa "peso molecular medio ponderal".

55 **Ejemplo 1 - Materiales y métodos para la caracterización de los polímeros**

Todas las determinaciones de Mw, pendiente de Mark Houwink, IP, contenidos de monómero y persulfatos se llevaron a cabo según los procedimientos que se describen a continuación.

60 **1.1- Determinación de Mw, pendiente de Mark Houwink, e IP**

1. Productos químicos y reactivos

65 El agua se purificó en un sistema Milli-Q-UF (Millipore, Milford, MA, EE. UU.). Se preparó en nuestro laboratorio una disolución salina amortiguada con fosfato (PBS 1C; 6,5 mMol.L-1 Na₂HPO₄, 2H₂O; 1,5 mMol.L-1 KH₂PO₄; 2,7 mMol.L-1 KCl; 137 mMol.L-1 NaCl; pH 6,8). La determinación de las características de permeación en gel se realizó

con ADN (CAS número 73049-39-5) de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Francia) y sacarosa (CAS número 57-50-1) de VWR (Darmstadt, Alemania).

5 Los patrones utilizados como calibración del sistema se obtuvieron de Malvern (Malvern, Reino Unido) para Pululano 100 KDa, y de Agilent (Santa Clara, CA) para Pululano 400 KDa.

2. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con triple detección

10 Se utilizó un sistema Viscotek GPCmax VE2501 (Malvern Instrument, Malvern, Reino Unido) que comprende una bomba de HPLC con desgasificador incorporado y muestreador automático con bucle de inyección de 100 µl para realizar los análisis de HP-SEC. Para la detección de señales de SEC en línea, se utilizó un sistema detector Viscotek TDA 302 con índice de refracción, dispersión de luz en ángulo recto, y detectores de viscosímetro diferencial de cuatro capilares. Los detectores estaban en el siguiente orden: LS (dispersión de luz en ángulo recto)-RI (índice de refracción)-VIS (viscosímetro diferencial de cuatro capilares). Se colocó un prefiltro de nailon de 0,22 µm entre la columna y los detectores. Para la adquisición y análisis de datos de SEC se utilizó el programa OmniSEC 4.7. Todos los detectores se calibraron con un patrón de pululano de 100 KDa en una fase móvil de PBS 1C. La fase móvil PBS 1C se filtró a través de un filtro de nitrato de celulosa de Millipore de 0,22 µm y se desgasificó antes de su uso. La separación de muestras de NaPAA se logró a través de dos columnas A6000M (8 mm de diámetro interior x 30 cm de largo) (Malvern) conectadas en serie. La elución fue isocrática a un caudal de 0,6 ml.min⁻¹. Se inyectaron muestras de 20 100 µl con una concentración diana de NaPAA de alrededor de 0,4 mg.ml⁻¹ para medidas de Mw, IP y pendiente de Mark Houwink. El patrón de pululano de 400 kDa se utilizó como muestra de "control" para todos los análisis. El volumen vacío de la columna (V₀) y el volumen de permeación total (V_t) se determinaron mediante la inyección de ADN de alto peso molecular y sacarosa, respectivamente.

25 3. Preparación de patrones y muestras

Los patrones de pululano, ADN y sacarosa se prepararon mediante disolución de las materias primas en PBS 1C hasta concentraciones finales de 1, 0,1 y 2 mg.ml⁻¹ respectivamente. Los NaPAA se formularon y diluyeron a la concentración diana en PBS 1C.

30

4. Determinación del valor dn/dc de NaPAA y medidas de Mw, pendiente de Mark Houwink e IP.

El coeficiente dn/dc está relacionado con la masa molar según la siguiente relación (Zimm, 1948, J. chem. Phys., 16, 1099-1116):

35

$$\frac{K C}{R_{\theta}} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2 C$$

40 en la que K es la constante óptica que incluye dn/dc para un sistema de dispersión particular descrito en la siguiente ecuación, C es la concentración de NaPAA en la muestra, R_θ es el exceso de intensidad de luz dispersada en el ángulo θ, M_w es el peso molecular medio ponderal, y A₂ es el segundo coeficiente virial, que puede tomarse como cero, debido a la concentración extremadamente baja de las fracciones de muestra individuales. P(θ) es la función de dispersión de partículas que representa la dependencia angular de la intensidad de dispersión de la luz, y está relacionada con el radio de giro (R_g) de la molécula de polímero.

45

$$K = \frac{4 \pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left[\frac{dn}{dc} \right]^2$$

siendo n₀ el índice de refracción del disolvente en la muestra; N_A el número de Avogadro; λ₀ la longitud de onda del rayo láser en el vacío.

50 Para moléculas pequeñas cuyos tamaños son menores que λ₀/20, se supone que la intensidad de la luz dispersada es independiente del ángulo de dispersión, de modo que P(θ) = 1 para todos los ángulos.

La expresión resultante es ahora:

55

$$R_{\theta} = K C M_w$$

60 El dn/dc de NaPAA se calculó automáticamente mediante el software OmniSEC utilizando concentraciones conocidas crecientes de NaPAA con el sistema de detección triple de SEC de 0,4 a 1 mg.ml⁻¹. Cada concentración se inyectó por duplicado. Este experimento se ha repetido en las mismas condiciones con diferentes lotes representativos de NaPAA de concentraciones conocidas. El coeficiente dn/dc final correspondió a la media de estas determinaciones, y se determinó que era 0,172 ml.g⁻¹. Este valor dn/dc se utilizó para otras determinaciones del peso molecular.

Las determinaciones de Mw, IP y pendiente de Mark Houwink se realizaron con una disolución de la sal polimérica de ácido poliacrílico en PBS 1C, con una concentración conocida de la sal polimérica de ácido poliacrílico, por ejemplo de 0,4 mg.ml⁻¹. Como la sal de ácido poliacrílico representa más del 95% del peso seco de la sal de polímero de ácido poliacrílico, se considera que el peso de la materia seca es el peso seco de la sal de polímero de ácido poliacrílico.

La viscosidad intrínseca (IV) de un NaPAA está relacionada con su peso molecular y conformación; y se representa con el diagrama de Mark-Houwink:

$$IV = K \cdot MW^a$$

en el que "a" y "K" son constantes para un sistema soluto-disolvente dado, y el exponente "a" varía de 0 (esfera sólida) a 2 (forma de varilla).

La pendiente "a" de Mark Houwink se determinó a partir de esta fórmula $IV = K \cdot MW^a$.

Una pendiente "a" superior o igual a 0,7 significa que la NaPAA puede considerarse lineal.

El índice de polidispersidad (IP) se define como M_w/M_n , siendo M_n el peso molecular medio numérico. El M_n de NaPAA se calculó automáticamente por el software OmniSEC.

I.2 Determinación de persulfatos y monómeros de acrilato

A. En materias primas

7. Productos químicos y reactivos

El agua se purificó en un sistema Milli-Q-UF (Millipore, Milford, MA). Se prepararon disoluciones de hidróxido de sodio de 25 mM (fase A) y 200 mM (fase B) con hidróxido de sodio concentrado al 46 - 51% de Fisher Scientific (Illkirch, Francia). El hidróxido de sodio 0,1 N procedía de VWR (Darmstadt, Alemania). Los patrones utilizados para la calibración se obtuvieron de Fisher Scientific (Illkirch, Francia) para persulfato de sodio, y de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Francia) para acrilato de sodio. El patrón interno utilizado para corregir la desviación en la preparación de la muestra fue oxalato de sodio, de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Francia).

2. Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección conductimétrica

Las impurezas de acrilato y persulfato en muestras de NaPAA se analizaron simultáneamente mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC) con detección conductimétrica. Se utilizó un sistema de cromatografía iónica ICS-3000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Estaba equipado con una bomba SP-1, un muestreador automático termostatzado (5 °C), una columna termostatzada (40 °C) y un compartimento detector conductimétrico (30 °C). Se colocó una columna trampa de carbonato ATC3 RFIC (9 x 24 mm) (Thermo Fisher Scientific) delante de la columna para capturar aniones de carbonato de agua y mejorar la sensibilidad analítica global. La separación analítica se logró en una columna de intercambio aniónico AS-11HC (250x4 mm) de Dionex (Thermo Fisher Scientific) con un gradiente de elución de disolución de hidróxido de sodio de 25 mM (fase A) a 200 mM (fase B). El programa de gradiente fue: 0% B (12 min), 0-40% B (5 min), 40-100% B (8 min), 100% B (25 min), 100-0% B (1 min), 0% B (9 min). El caudal de la fase móvil fue 1 ml/min, y el volumen de inyección fue 50 µl. Se utilizó una precolumna AG-11HC (50 x 4 mm) de Dionex (Thermo Fisher Scientific) para proteger la columna analítica. Se colocó un supresor de conductividad Dionex (AERS 082540, Thermo Fisher Scientific) delante del compartimento del detector para mejorar la señal. En estas condiciones cromatográficas, los tiempos de retención para acrilato, oxalato y persulfato fueron alrededor de 4, 11 y 45 minutos respectivamente.

3. Preparación de muestras

Antes del análisis cromatográfico, se eliminaron de las muestras las especies de alto peso molecular. En resumen, las muestras de NaPAA se diluyeron diez veces con agua (lo que produjo una concentración de 10 mg/ml en NaPAA), y se añadió un patrón interno de oxalato de sodio para alcanzar una concentración de 50 µg/ml. Después, 500 µl de las muestras se centrifugaron a 14000 g durante 30 minutos a través de sucesivamente un filtro centrífugo Amicon Ultracel 0,5 ml-100k y un filtro centrífugo Amicon ultracel 0,5 ml-3k, obtenidos de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). Antes de su uso, los filtros centrífugos Amicon se lavaron con agua y NaOH 0,1 N sucesivamente para eliminar el glicerol.

4. Calibración y resultados

La cuantificación de impurezas de persulfato y acrilato se realizó mediante calibración externa preparada con patrones comerciales. Se mezclaron en agua seis concentraciones que oscilaban de 1 - 100 µg/ml de acrilato de sodio y persulfato, y se añadieron 200 µl de patrón interno de oxalato de sodio de 500 µg/ml a cada concentración. La curva de calibración siguió un modelo lineal para el persulfato y un modelo cuadrático para el acrilato. El contenido de

impurezas se expresó en % p/p (% de peso de impureza de acrilato o persulfato sobre peso seco de NaPAA), o en µg de impureza de persulfato o acrilato por gramo de materia prima de NaPAA.

B. En polímeros de NaPAA obtenidos después de la purificación

Las impurezas de persulfato y ácido acrílico residual en muestras de NaPAA después de la etapa de purificación (por diálisis, ultrafiltración o filtración en gel) se determinaron como se describió anteriormente para su determinación en las muestras de materia prima de NaPAA. Sin embargo, en las muestras purificadas, se omitió la etapa de dilución de 10 veces del procedimiento de preparación de la muestra. Para el persulfato, las condiciones cromatográficas fueron las mismas que para la materia prima de NaPAA, y el análisis se gestionó como una prueba límite con un límite de detección de 100 ng/ml. Para el acrilato, se utilizó el mismo sistema HPAEC pero la separación analítica se logró en una columna de intercambio aniónico CarboPac™ SA10 (250x4 mm) de Dionex (Thermo Fisher Scientific) con un gradiente de elución de disolución de hidróxido de sodio de 30 mM (fase A) a 200 mM (fase B). El programa de gradiente fue: 0% B (14 min), 0-100% B (6 min), 100% B (15 min), 100-0% B (1 min), 0% B (9 min). El caudal de la fase móvil fue 1 ml/min, y el volumen de inyección fue 50 µl. Se utilizó una columna CarboPac™ SA10G (50 x 4 mm) de Dionex (Thermo Fisher Scientific) para proteger la columna analítica. Se colocó un supresor de conductividad Dionex (AERS 082540, Thermo Fisher Scientific) delante del compartimento del detector para mejorar la señal. En estas condiciones cromatográficas, el tiempo de retención del acrilato fue alrededor de 11 minutos. La impureza residual de ácido acrílico se determinó a partir de una curva de calibración lineal construida utilizando un patrón externo de ácido acrílico a 20 - 500 ng/ml en PBS 1C. Los resultados se expresaron como se indicó anteriormente en % p/p (% de peso de impureza de acrilato o persulfato sobre peso seco de NaPAA), o en µg de impureza de persulfato o acrilato por ml de disolución adyuvante de NaPAA.

Ejemplo 2 - Pruebas sobre actividades adyuvantes

1) Evaluación del efecto adyuvante del PAA según la invención en comparación con 2 PAA del estado de la técnica, con respecto al antígeno de *Staphylococcus aureus*

Se probó la actividad adyuvante de formulaciones basadas en polímeros en ratones OF1 exógamos utilizando como antígeno modelo el polisacárido tipo 5 de *S. aureus* (PS5) conjugado con exotoxina A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA).

El antígeno se preparó de la siguiente manera:

Staphylococcus aureus (cepa Reynolds) se cultivó durante 72 horas en medio de cultivo SATA-1 bajo agitación (100 rpm), y luego se inactivó mediante adición de una disolución de fenol/etanol 1/1 (v/v) hasta una concentración final de 2% p/v. Las células bacterianas se sedimentaron a 16.000 g durante 75 min. La pasta celular se suspendió a 0,5 g (peso húmedo) por ml en 50 mM Tris-2 mM MgSO₄, pH 7,5. Se añadió lisostafina (100 µg/ml), y la suspensión se incubó a 37 °C durante 4 horas bajo agitación. Posteriormente, se añadió benzonasa a una concentración de 5 U/ml, y la incubación se continuó durante 2 horas más. La mezcla de reacción se concentró mediante filtración de flujo tangencial (corte de peso molecular de 30.000 Da). El material concentrado resultante se digirió con benzonasa (5 U/ml) durante 6 horas a 37 °C y después con pronasa (a 4 U/ml) a 37 °C durante 15 horas en el amortiguador apropiado (Tris 50 mM a pH 8,0 que contiene MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1 mM). Después de la centrifugación a 5.000 g durante 30 minutos, el sobrenadante se concentró mediante filtración de flujo tangencial (MWCO 30.000 Da). Esta disolución se ajustó entonces hasta una concentración final de Tris HCl 50 mM, pH 7,5. Las alícuotas se cargaron en una columna de Q Sepharose (20 ml) equilibrada con Tris HCl 50 mM, pH 7,5. La columna se eluyó a un caudal de 2 ml/min, y se recogieron fracciones de 5 ml. La columna se lavó con 5 volúmenes del amortiguador de partida. Los polisacáridos se eluyeron entonces con un gradiente lineal de 250 ml de 0 a 0,5 M de NaCl en 50 mM de Tris HCl, pH 7,5. Las fracciones que contenían polisacáridos y ningún ácido icóico, detectado por absorción óptica a 210 nm y por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC-PAD), se dializaron y se liofilizaron.

El polisacárido purificado se activó entonces en NaCl mediante dihidrazida de ácido adípico (ADH). El pH se ajustó a 4,9, y se añadió etildimetilaminopropilcarbodiimida (EDAC). A medida que avanzaba la activación, que duró 90 minutos a temperatura ambiente, el pH se ajustó constantemente hasta un valor de 4,9 con HCl 0,1 N. La reacción se detuvo mediante adición de NaOH hasta la neutralización (pH 7,0). El polisacárido activado se dializó entonces contra una disolución acuosa de NaCl 500 mM, y después contra agua. Después, el polisacárido activado y dializado se liofilizó. El porcentaje de funcionalización se estimó en alrededor de 5,9% (p/p).

Una disolución del polisacárido activado se mezcló con la proteína transportadora (rEPA) en NaCl y EDAC. La conjugación se realizó a 4 °C, con un pH mantenido en 5,7 mediante adición de HCl 0,1 N. Después de 90 minutos, la reacción se detuvo mediante adición de NaOH 0,2 N hasta un pH de 7. Después, el antígeno conjugado se dializó contra una disolución acuosa de NaCl, y después se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de sefarsa Cl-4B equilibrada con NaCl 200 mM en un amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7,2. Se combinaron las fracciones que contenían conjugados (detectados por absorción óptica a 206 nm y 278 nm) y que se eluyen principalmente con el volumen muerto de la columna.

Las formulaciones de polímero se prepararon de la siguiente manera:

El producto denominado PAA225000 (Ref. 18613, sal sódica) se obtuvo de Polysciences Europe (Eppenheim, Alemania) en forma de disolución concentrada. Se ha diluido con agua hasta obtener una concentración de 20 mg/ml, y se ha mantenido en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. El pH se ha ajustado a 7,55 con HCl, y la disolución se ha dializado a temperatura ambiente frente a una disolución acuosa de NaCl 150 mM (3 baños consecutivos) utilizando casetes de diálisis con corte de 2 kDa (Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, Francia). Después, la disolución se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,22 µm, para su esterilización. Después, se midió el peso molecular de la sal de polímero, y es 488.550 Da. Su Mn fue 129.070 Da, y su IP 3,8.

El polímero se almacenó entonces a + 4 °C, como una disolución que comprendía 20 mg/ml de polímero en una disolución acuosa de NaCl 150 mM. Esta disolución se mezcló luego con PBS 1C concentrado 10 veces con agua estéril, para obtener una disolución salina que comprendía 2 mg/ml de sal de polímero.

El producto denominado PAA20 se obtuvo como sal de sodio de Polymer Expert (Pessac, Francia) en forma de polvo seco. Se rehidrató en agua a la concentración de 20 mg/ml, y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Después, la disolución se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,22 µm, para su esterilización. El peso molecular de la sal de polímero se midió en 100.700 Da. Su Mn fue 46.700 Da, y su IP 2,2. El polímero se almacenó entonces a + 4 °C, como una disolución que comprendía 20 mg/ml de sal de polímero en una disolución acuosa de NaCl 150 mM. Esta disolución se mezcló luego con PBS 10C y con agua estéril, para obtener una disolución salina que comprendía 2 mg/ml de sal de polímero.

CARBOPOL® 974 P (denominado CARBOPOL®), que es un polímero de PAA reticulado, con un peso molecular de varios millones de Da, se diluyó con PBS para obtener una disolución que comprendía 2 mg/ml de polímero.

Las formulaciones adyuvantes a inyectar a los animales se prepararon mezclando vol/vol la disolución de antígeno y la disolución de polímero. Cada dosis inyectada contenía 200 µg de polímero y 2,5 µg de polisacárido en disolución PBS 1C.

30 Inmunizaciones:

Se inmunizaron grupos de 5 a 10 ratones OF1, de 7 a 9 semanas, con PAA20, PAA225000 o CARBOPOL® solos (se utilizaron como controles negativos) o con las formulaciones que comprendían tanto el antígeno como el adyuvante. A un grupo de ratones se le inyectó solo PS5-rEPA. Las dosis se administraron por vía subcutánea (SC) en la región escapular los días D0, D21 y D35. Se recogieron muestras de sangre el día 42 para analizar la respuesta inmune.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos vacutainer que contenían un activador de la coagulación y un gel separador de suero (Becton Dickinson, Meylan, Francia). Los tubos se centrifugaron a 2600 g durante 20 minutos para separar el suero de las células. Los sueros se transfirieron a placas de pocillos profundos, y se inactivaron con calor a 56 °C durante 30 minutos antes de almacenarlos a -20 °C hasta su uso en ensayos posteriores.

La prueba comprendió diferentes grupos como sigue:

PBS

Carbopol®

PAA20

PAA225000

PS5-rEPA

PS5-rEPA + Carbopol®

PS5-rEPA + PAA20

PS5-rEPA + PAA225000

Las muestras de sangre se utilizaron para analizar los anticuerpos específicos IgG1 e IgG2a producidos por los ratones inmunizados.

La prueba de ELISA utilizó el polisacárido activado PS5 (PS5 conjugado con ADH: PS5-AH) como antígeno para el recubrimiento. Brevemente, las placas de ELISA se recubrieron con 100 µl por pocillo de 1 µg/ml de disolución de polisacárido activado en PBS 1C. Las placas se incubaron durante 12 horas a 4 °C, y se vaciaron invirtiéndolas. Los pocillos se bloquearon añadiendo 150 µl de amortiguador de saturación 1 (PBS 1C / Tween 0,05% p/v / albúmina

bovina 1% p/v) e incubando durante 1 h a 37 °C. Las placas de ELISA se vaciaron invirtiéndolas. Se realizaron diluciones seriadas dobles de cada suero (12 veces) directamente en placas de ELISA utilizando el amortiguador 1 como amortiguador de dilución para un volumen final de 100 µl por pocillo. Las placas se incubaron durante 90 minutos a 37 °C, y luego se lavaron 3 veces (250 µl por pocillo) con amortiguador 2 (PBS 1C/Tween 0,05% p/v). El conjugado de peroxidasa anti-IgG1 de ratón o anti-IgG2a de ratón se diluyó en amortiguador 1 (1/8000) y se utilizó como anticuerpos secundarios (100 µl por pocillo). Después de 90 minutos de incubación a 37 °C, las placas de ELISA se lavaron 3 veces con amortiguador 2 (250 µl por pocillo). La reacción se desarrolló añadiendo 100 µl de una disolución de sustrato de tetrametilbencidina a cada pocillo, y se detuvo después de 30 minutos a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de HCl 1 N. La absorbancia se midió a 450-650 nm. Los títulos de anticuerpos se expresan en unidades arbitrarias correspondientes a la dilución sérica recíproca para OD450nm = 1 utilizando el software SoftmaxPro.

Los resultados obtenidos se resumen en la FIG. 1, y muestran que:

- 1) No se midió ningún fondo en los sueros de control negativo (<1,3 Log) de ratones inmunizados con PBS 1C o con formulaciones basadas en polímeros inyectadas solas (datos no mostrados).
- 2) Se obtuvo una respuesta inmune específica contra el polisacárido PS5, principalmente una IgG1 anti-PS5 (4,8Log), después de la tercera inmunización con el conjugado PS5-rEPA solo. La respuesta de anticuerpos anti-PS5 provocada por el conjugado PS5-rEPA inyectado solo fue impulsada principalmente por Th2, con una relación IgG1/IgG2a cercana a 126.
- 3) Los títulos de IgG1 anti-PS5 no aumentaron cuando el conjugado PS5-rEPA se formuló con Carbopol®, PAA20 o PAA225000, con una media de títulos anti-PS5 cercana a 4,8Log. La coinyección de Carbopol® o PAA20 provocó un aumento de los títulos de IgG2a anti-PS5, pero estas respuestas de anticuerpos anti-PS5 todavía estaban impulsadas principalmente por Th2, con relaciones IgG1/IgG2a cercanas a 50 y 63, respectivamente. Se observó un fuerte aumento de los títulos de IgG2a anti-PS5 (4,5Log) cuando se coinyectó el conjugado PS5-rEPA con PAA225000. La coinyección de PAA225000 provocó una respuesta de anticuerpos anti-PS5 con sesgo Th1, con una relación IgG1/IgG2a cercana a 2.

En conclusión, esta prueba demostró que mientras que el antígeno solo indujo principalmente una respuesta Th2, el adyuvante según la presente invención, en comparación con los otros polímeros probados, fue capaz de inducir una respuesta inmune Th-1 mucho más pronunciada sin afectar la respuesta Th-2.

Las muestras de sangre también se analizaron para determinar su capacidad para inducir actividad opsonizante en células mononucleares periféricas humanas (hPMN). Para esta prueba, los sueros agrupados de cada grupo se analizaron en diluciones seriadas de diez veces utilizando la cepa Lowenstein (ATCC 49521) cultivada durante 20 h a 37 °C en medio TSB solo o suplementado (fase estacionaria).

Se recogió sangre periférica humana de voluntarios humanos sanos en vacutainers con heparina sódica. Se necesitaron diez mililitros por donante. Los leucocitos se aislaron mediante lisis de glóbulos rojos en un amortiguador de lisis de cloruro de amonio. Las células se lavaron dos veces en PBS 1C, y finalmente se suspendieron en 5 ml de medio OPA (RPMI-Hepes suplementado con 0,5% de BSA y 2 mM de glutamina). Después, los leucocitos grandes (principalmente hPMN (95%)) se contaron en el contador Multisizer Coulter y se ajustaron a una concentración de $0,25 \times 10^6$ /ml en medio OPA.

Después de 20 h de crecimiento, las bacterias se lavaron dos veces en PBS 1C y se resuspendieron en 5 ml de PBS 1C. La concentración de bacterias se ajustó a 10^8 UFC/ml en medio OPA.

Se realizó un ensayo de estallido oxidativo en una placa Deepwell de polipropileno de 96 pocillos. La placa se mantuvo en hielo durante la adición secuencial de los reactivos. Los reactivos se añadieron a los pocillos en el siguiente orden: 50 µl de sueros específicos inactivados por calor a la dilución determinada de 1/10 hasta 1/640, 250 µl de bacterias, 50 µl de complemento de gazapo a 1/10, 100 µl de leucocitos y 50 µl de DHR (Molecular Probe, D632) a 1 mg/ml. El volumen final de reacción fue 500 µl. Después, la placa se incubó durante 25 minutos a +37 °C bajo agitación suave y en la oscuridad. La relación final de bacterias/leucocitos grandes fue 100:1, la dilución final de sueros y complemento osciló de 1/100 a 1/6400, y la concentración final de DHR fue 0,1 mg/ml. Al final del período de incubación, la placa se colocó en hielo para detener la reacción. El análisis se realizó en el Cytomics FC500. La forma oxidada de DHR, rodamina 123, emite una fluorescencia brillante tras la excitación a 488 nm. En un diagrama de puntos (FSC/SSC), se definió un área en la gran población granular de leucocitos para diferenciar la población de PMN. Se adquirieron tres mil eventos de cada pocillo de este área. Los resultados se expresaron como porcentaje de PMN activados por fluorescencia (PMN positivos para rodamina 123) entre toda la población de PMN.

Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Antígeno	Adyuvante	Lowenstein TSB 20 h	
		Explosión oxidativa ¹	
PSS-rEPA	-	+	
	PAA20	++	
	PAA225000	+++	
	Carbopol®	++	

1% de PMN activados/población total de PMN: +++ (80%-100% a una dilución de suero 1/1000);
 ++ (80%-100% a una dilución de suero 1/100; + (30%-70% a una dilución de suero 1/100)

Estos resultados en la Tabla 1 indican:

- 1) No se detectaron PMN activados con sueros de control negativo de ratones inmunizados con PBS o con formulaciones basadas en polímeros inyectadas solas (datos no mostrados).
- 2) El conjugado PS5-rEPA generó anticuerpos séricos anti-PS5 capaces de activar débilmente las hPMN en presencia de bacterias. El porcentaje de hPMN activados que producen una explosión oxidativa se estimó entre el 30% y el 70% para una dilución de suero de 1/100.
- 3) La coinyección de PS5-rEPA con Carbopol o PAA20 aumentó ligeramente la capacidad de los anticuerpos séricos anti-PS5 para reconocer la superficie de la cepa Lowenstein de *S. aureus*. El porcentaje de hPMN activados que producen una explosión oxidativa se estimó entre el 80% y el 100% para una dilución de suero de 1/100.
- 4) La coinyección de PS5-rEPA con PAA225000 mejoró claramente (aumentó diez veces) la capacidad de los anticuerpos séricos anti-PS5 para reconocer la superficie de la cepa Lowenstein de *S. aureus*. El porcentaje de hPMN activados que producen una explosión oxidativa se estimó entre el 80% y el 100% para una dilución de suero de 1/1000.

Los sueros obtenidos con PAA225000 y PAA20, o los sueros obtenidos con ratones inmunizados con el antígeno solo, también se probaron para determinar su capacidad para exterminar la bacteria *Staphylococcus aureus* Lowenstein en presencia de PMN humanos.

Para esta prueba, se recolectó sangre completa en bolsas de citrato de sodio de donantes humanos sanos mediante EFS (Etablissement Français du Sang), y se aislaron leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN) recientes según los siguientes procedimientos. Los eritrocitos se lisaron incubando 5 ml de sangre y 45 ml de amortiguador de lisis durante 10 minutos a +20 °C. Los PMN se lavaron dos veces en amortiguador salino HEPES (HBSS sin CaMg, ref pH 7,4). La viabilidad de los PMN fue superior al 90%, como lo demostró la exclusión con azul tripán. La suspensión de PMN se diluyó hasta 10⁷ células por ml.

La cepa Lowenstein de *S. aureus* se cultivó 12 horas en medio TSB. Las células bacterianas se sedimentaron, se lavaron con medio OPA (RPMI + 5% de SVF + 0,05% de Tween 20), y se suspendieron en disolución salina normal hasta 5 × 10⁷ células por ml. Se añadieron las siguientes sustancias a cada tubo: 0,25 ml de PMN, 50 µl de suero de prueba diluido, 50 µl de células de *S. aureus* homólogas (relación 1 célula/1 bacteria), 50 µl de complemento de conejo al 0,5% p/v, y medio OPA para completar el volumen a 500 µl/pocillo. Se incluyeron en el ensayo tubos de control con *S. aureus* en presencia de PMN, suero de prueba, o complemento solo. Los tubos de ensayo se incubaron durante 1 hora a +37 °C con agitación. Las diluciones se realizaron en 3 etapas (3* diluciones 1/15), y 50 µl de las diferentes diluciones se añadieron seis veces en gelosa TSA, y se incubaron durante 12 horas. El porcentaje de supervivencia bacteriana se definió en cada punto de dilución, si era posible, mediante la fórmula: (número de bacterias viables/inóculo original) x100.

Los datos obtenidos en 2 análisis independientes se muestran en la Tabla 2 (ONS = opsonofagocitosis no específica) a continuación:

Tabla 2

Vs ONS	Prueba 1		Prueba 2	
	ONS: 7%		ONS: 14%	
Dilución de conjunto de sueros anti-PS5	1/100	1/500	1/100	1/500
PS5-rEPA	39	9	38	19

Vs ONS	Prueba 1		Prueba 2	
	ONS: 7%		ONS: 14%	
PS5-rEPA + PAA20	31	2	26	10
PS5-rEPA + PAA225000	50	23	42	18

Los resultados que se muestran en la Tabla 2 muestran que:

- 1) No se detectó muerte de bacterias con sueros de control negativo de ratones inmunizados con PBS o con formulaciones basadas en polímeros inyectadas solas (datos no mostrados).
- 2) El conjugado PS5-rEPA generó anticuerpos séricos anti-PS5 que mostraron una actividad de exterminio débil en presencia de los hPMN, con un porcentaje de exterminio bacteriano del 39% a una dilución de suero de 1/100. La actividad de exterminio de bacterias no fue mayor cuando el grupo de sueros se diluyó hasta 1/500.
- 3) La coinyección de PS5-rEPA con PAA20 no mejoró la capacidad de los anticuerpos séricos anti-PS5 para exterminar la cepa Lowenstein de *S. aureus*.
- 4) El efecto adyuvante de PAA225000 sobre la muerte de bacterias se observó en la prueba 1, con un porcentaje de muerte bacteriana del 50% frente al 39% para el PS5-rEPA sin adyuvante a una dilución de suero de 1/100, y un porcentaje de muerte bacteriana del 23% frente al 9% para el PS5-rEPA sin adyuvante a una dilución de suero de 1/500.

La conclusión general de esta prueba en relación con el antígeno de *Staphylococcus* es que el adyuvante de la presente invención mostró una eficacia superior en comparación con los adyuvantes que tienen un peso molecular menor.

2) Prueba del efecto adyuvante de diferentes polímeros sobre la respuesta inmune inducida por hCMV-gB

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto del peso molecular del polímero de ácido poliacrílico (PAA) sobre el efecto adyuvante. Esto se ha logrado utilizando como antígeno modelo una proteína recombinante que deriva de la glicoproteína gB del citomegalovirus humano (hCMV-gB).

Esta proteína recombinante fue producida por una línea CHO recombinante transfectada con un plásmido denominado 0708985pEE14.4, que contiene un gen gB modificado. Para facilitar la producción de esta proteína recombinante por la línea CHO, el gen gB, cuya secuencia se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.834.307, se modificó previamente eliminando la parte del gen que codifica la región transmembrana de la proteína gB correspondiente a la secuencia de aminoácidos entre valina 677 y arginina 752, e introduciendo 3 mutaciones puntuales en el sitio de escisión. La proteína producida por la línea CHO, denominada gBdTM, corresponde a una proteína gB truncada desprovista del sitio de escisión y de la región transmembrana.

La proteína gBdTM producida en el medio de cultivo se purificó posteriormente mediante cromatografía, y se almacenó en forma de una disolución madre que contenía >0,2 mg/ml de gBdTM en amortiguador de fosfato.

Los PAA con diferentes pesos moleculares fueron los siguientes:

PAA20 y PAA225000 según se describe y prepara en el párrafo "1) Evaluación del efecto adyuvante de PAA según la invención en comparación con 2 PAAs de la técnica anterior, en relación con el antígeno de *Staphylococcus aureus*".

PAA3000 (Ref. 06568), PAA6000 (Ref. 06567), PAA50000 (Ref. 00627) y PAA60000 (Ref. 18611) son NaPAA, y fueron proporcionados por Polysciences en forma de polvo seco (para PAA6000) o disoluciones concentradas para los demás.

PAA20 se mezcló con agua a una concentración de 20 mg/ml, y se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Después, la disolución se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,22 µm y se mantuvo almacenada a + 4 °C, como una disolución que comprendía 20 mg/ml de polímero en una disolución acuosa de NaCl 150 mM. Después, esta disolución se mezcló con PBS 10C y agua esterilizada, para obtener una disolución salina que contenía 2 mg/ml de polímero.

Los PAA de Polysciences se diluyeron con agua estéril a una concentración de 20 mg/ml, se ajustaron a un pH de alrededor de 7,4 (con excepción del PAA60000, que no se ajustó a un pH) con NaOH o HCl, y se dializaron contra NaCl 150 mM (3 baños consecutivos) utilizando casetes de diálisis con un corte de 2 kDa (Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, Francia). Después, las disoluciones se filtraron a través de una membrana de PVDF de 0,22 µm, para su esterilización. Se determinaron Mw, Mn e IP, y los polímeros se almacenaron a + 4 °C como una disolución que comprendía 20 mg/ml de sal de polímero en una disolución acuosa de NaCl 150 mM.

Los pesos moleculares (Mw y Mn) y el PI de los polímeros se indican en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3

	Mw en Da	Mn en Da	Índice de polidispersidad
PAA3000	No determinado	No determinado	No determinado
PAA6000	9 050	2 940	3,1
PAA50000	133 460	56 360	2,4
PAA60000	133 760	44 500	3,0
PAA20	100 700	46700	2,2
PAA225000	488 550	129 070	3,8

Una emulsión de escualeno que contenía los mismos componentes que la emulsión de escualeno MF59® de Novartis se preparó mediante microfluidización, para comparar la actividad adyuvante de los diferentes polímeros con la del adyuvante de la técnica anterior utilizado como referencia.

Las formulaciones de adyuvantes se prepararon mezclando vol/vol la disolución de antígeno con la disolución de adyuvante.

La cantidad de adyuvante fue 200µg de polímero por dosis inyectada, o en el caso de la emulsión, la dosis final de vacuna comprendió 2,5% v/v de escualeno.

Las diferentes formulaciones probadas fueron las siguientes (gB corresponde a hCMV-gB:2µg en cada formulación)

- gB solo,
- gB + emulsión de escualeno,
- gB + PAA3000,
- gB + PAA6000,
- gB + PAA50000,
- gB + PAA60000,
- gB + PAA20 (PBS)
- gB + PAA225000

Se inmunizaron ratones C57BL/6 (8-10 por grupo) dos veces, el día 0 y el día 28, con el antígeno hCMV-gB recombinante (2 µg/inyección) combinado o no con adyuvante por vía IM (cuádriceps izquierdo bajo un volumen final de 50 µl). La prueba incluyó, como control, un grupo inmunizado con el antígeno hCMV-gB solo.

Se tomaron muestras de sangre bajo anestesia de la vena submandibular en D28 (sangrado intermedio) y después de la exsanguinación por sección carotídea el D41 de todos los animales. La anestesia se realizó con Imalgène (1,6 mg de Ketamina) y Rompun (0,32 mg de Xilazina) administrados en un volumen de 150 µl por vía intraperitoneal (IP).

Para los ensayos de respuesta humoral el D28, se recogieron 200 µl de sangre en viales que contenían activador de coágulo y separador de suero (Becton Dickinson Microtainer SST, ref 365951). Después de una noche a +4 °C, la sangre se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos, y el suero se recogió y almacenó a -20 °C hasta su análisis. El D41, se recogió 1 ml de sangre en viales que contenían activador de coágulo y separador de suero (BD Vacutainer SST ref 367783). Después de 12 horas a +4 °C, la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos, y el suero se recogió y almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Para los ensayos de respuesta celular el D41, se recolectaron bazos en condiciones estériles de 5 ratones por grupo. Los esplenocitos se aislaron de la siguiente manera: los bazos recién recolectados se disociaron con el disociador Gentlemax (Miltenyi Biotec), las suspensiones celulares se pasaron a través de un colador de células y se lavaron con medio RPMI. Los glóbulos rojos se lisaron utilizando el amortiguador de lisis de glóbulos rojos (Sigma). Después del lavado, los esplenocitos se contaron y se utilizaron inmediatamente para los ensayos celulares.

Ensayos de seroneutralización:

5 Esta técnica se utilizó para titular los anticuerpos neutralizantes funcionales presentes en los sueros de animales inmunizados con hCMV-gB. Basándose en la capacidad del citomegalovirus para infectar fibroblastos MRC5 y células ARPE-19 (células epiteliales humanas), un suero que contenga anticuerpos funcionales específicos contra HCMV-gB puede inhibir la infección viral de las células.

a. SN50 en MRC5

10 Brevemente, se cultivaron 1×10^4 fibroblastos MRC-5 en placas de fondo plano de 96 pocillos en DMEM 1% de FBS durante 1 día en una incubadora de cultivo celular con 5% de CO_2 a 37 °C. Los sueros inactivados por calor de los animales inmunizados se diluyeron en serie con 1% de FBS (suero fetal bovino) en DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) suplementado con 10% de complemento de gazapo, y se incubaron vol/vol con 3,3 log CCID50 (dosis infecciosa de cultivo celular 50%/ml de la cepa hCMV Towne durante 1 hora en la incubadora de cultivo celular. Las

15 mezclas de suero y virus se transfirieron entonces a las monocapas de células MRC-5. Después de 7 días de incubación, se eliminaron los sobrenadantes de cultivo, y las células se lavaron cuatro veces con PBS 1C y después se fijaron con 100 μl de acetona al 85% en agua durante 15 min a -20 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS 1C y se secaron al aire. Las células infectadas se detectaron mediante una reacción colorimétrica. Se añadió a los pocillos una mezcla de dos anticuerpos biotinilados específicos de hCMV (CH160 anti-IE1 y CH177 anti-gB contra las

20 proteínas del HCMV) a 0,5/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron en PBS 1C/0,05% de Tween 20 (PBST) antes de la adición de estreptavidina alcalina fosfatasa durante 1 hora a temperatura ambiente (22 °C). Las placas se lavaron en PBST y se tiñeron con 100 μl de cromógeno NBT/BCIP durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se secaron al aire y se escanearon utilizando un lector de placas ELISPOT colorimétrico (Microvision Instruments, Evry, Francia). En cada pocillo se observaron núcleos

25 teñidos de oscuro representativos del efecto citopático. La dilución del suero se considera neutralizante si no se observa ningún foco oscuro en el pocillo correspondiente. Cada dilución de suero se probó en 4 réplicas. Para cada dilución se calcula la neutralización del 50% (SN50) mediante regresión del último cuadrado. El valor SN50 (en log 10) se define como el recíproco de la dilución de suero más alta que reduce el número de pocillos infectados en un 50%. Los títulos medios de anticuerpos neutralizantes se calcularon para cada grupo de ratones.

30

b. μPRNT50 en ARPE-19

35 Brevemente, se dispensaron $2,5 \times 10^4$ células ARPE-19 en placas oscuras de 96 pocillos el día antes del ensayo de microneutralización (MN). El día D0, los sueros se inactivaron por calor a 56 °C durante 30 min. Las muestras de suero se diluyeron dos veces en serie en DMEM/F12 1% FBS, comenzando desde 1/10 hasta 1/10240 en una placa de 96 pocillos profundos, y se incubaron con 4,2 log FFU/ml de la cepa BA DrUL131-Y4 del virus HCMV durante 60 min a 37 °C en una incubadora de cultivo celular con 5% de CO_2 . Las mezclas de suero y virus se transfirieron entonces a las células ARPE-19 y se incubaron a 37 °C en una incubadora de cultivo celular con 5% de CO_2 durante 4 días.

40 El día D4, después de retirar el sobrenadante del cultivo, las células se fijaron con 100 μl de formol al 1% en PBS 1C durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron tres veces con PBS 1C y se secaron al aire a temperatura ambiente antes del análisis en el lector de placas fluorescentes Microvision para contar las células infectadas en cada pocillo.

45 Como control, se colocaron en cada placa dos pocillos de control celular (sin virus) y seis pocillos con células infectadas con la mitad de la dilución viral que contenía 4,2log FFU/ml. La media de estos seis pocillos definió el umbral de seroneutralización, determinado como el 50% del valor de la señal específica.

50 Los títulos de punto final neutralizante se definieron como el recíproco de la última dilución que cayó por debajo del valor de señal específica del 50% calculado. Los títulos neutralizantes (μPRNT50) se definieron para cada suero individual como la última dilución que indujo una reducción del 50% de las células infectadas, es decir, la última dilución que indujo menos infección celular que el valor de señal específica del 50% calculado. Se calcularon los títulos medios geométricos de anticuerpos neutralizantes para cada grupo.

55 Los resultados de GMT (título medio geométrico de anticuerpos neutralizantes) obtenidos para cada grupo de ratones inmunizados se muestran en las FIGS. 2 y 3:

60 Se observaron perfiles similares con ambos ensayos de seroneutralización en fibroblastos MRC5 y células epiteliales ARPE, independientemente del grupo analizado. No se detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes, o estos fueron bajos, en ratones inmunizados con hCMV-gB sin adyuvante (GMT=6).

El polímero de ácido poliacrílico de la presente invención dio, con diferencia, la mejor respuesta.

Respuestas de anticuerpos IgG1 e IgG2c

65

Los anticuerpos séricos IgG1 e IgG2c dirigidos contra el antígeno hCMV-gB se titularon mediante un ensayo ELISA robótico según el siguiente procedimiento.

5 Las microplacas Dynex de 96 pocillos se recubrieron durante 12 horas a 4 °C con 1 µg/pocillo de hCMV-gB, en amortiguador de carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 (Sigma). Después, las placas se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con 150 µl/pocillo de PBS Tween-leche (PBS pH 7,1, 0,05% de Tween 20, 1% (p/v) de leche desnatada en polvo (DIFCO)). Todas las incubaciones siguientes se realizaron en un volumen final de 100 µl, seguido de 3 lavados con PBS pH 7,1, 0,05% de Tween 20. Se realizaron diluciones seriadas dobles de muestras de suero en PBS-Tween-leche (comenzando desde 1/100 o 1/1000), y se añadieron a los pocillos. Las placas se incubaron durante 90 min a 37 °C. Después de los lavados, se añadió a los pocillos un conjugado de peroxidasa IgG1 o IgG2c antirratón (Southern Biotech) diluido en PBS-Tween-leche a 1/2000, y las placas se incubaron durante 90 min a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente, y se incubaron en la oscuridad durante 30 min a 20 °C con 100 µl/pocillo de una disolución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) lista para usar (TEBU). La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de HCl 1M (Prolabo). La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm-650 nm con un lector de placas (Spectra Max - Molecular Devices). Los títulos de anticuerpos IgG se calcularon utilizando el software CodUnit, para el intervalo de valores de DO de 0,2 a 3,0 a partir de la curva de titulación (suero hiperinmune de ratón de referencia colocado en cada placa). El título de IgG de esta referencia, expresado en unidades ELISA arbitrarias (UE), correspondió al log10 de la dilución recíproca, dando una DO de 1,0. El umbral de detección de anticuerpos fue 10 unidades ELISA (1,0 log10). Todos los títulos finales se expresaron en log10 (Log).

20 Los resultados se representan en las FIGs. 4 y 5:

Estos resultados muestran que el antígeno hCMV-gB adyuvado indujo mayores respuestas inmunes en comparación con el antígeno no adyuvado, tanto para los títulos de IgG1 como de IgG2c, con la excepción de PAA3000 y PAA6000 que tienen el peso molecular más bajo.

Es interesante notar que el PAA de la presente invención es particularmente eficiente para aumentar la respuesta inmune del tipo T auxiliar 1 (Th1), ya que los títulos de IgG2c son particularmente fuertes en ratones inmunizados con hCMV-gB combinado con PAA de la presente invención.

30 **Medidas de citocinas:**

Los esplenocitos de ratones inmunizados se aislaron inmediatamente después del sacrificio el día 41, se sembraron a $2,5 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 96 pocillos, y se incubaron con hCMV-gB (5 µg/pocillo), concanavalina A (0,25 µg/pocillo; control positivo) o medio solo (RPMI-GSPβ-10% de FCS; fondo). Después de 6 días de incubación, la secreción de las citocinas IL5 e IFNγ se midió utilizando el kit CBA Flex set. Los resultados se expresan como concentraciones de citocinas en pg/ml (media geométrica por grupo). El umbral para la detección positiva de citocinas fue 5 pg/ml para IL-5 y 2,5 pg/ml para IFNγ.

40 Los resultados se muestran en las FIGs. 6 y 7:

Estos resultados muestran que con el adyuvante de emulsión, el nivel de IL5 es alto mientras que el nivel de IFNγ es bajo. Curiosamente, el adyuvante de ácido poliacrílico según la presente invención induce un nivel bajo de IL5 pero un nivel alto de IFNγ, lo que es una indicación de una respuesta inmune sesgada hacia el tipo Th1. Este resultado concuerda con el resultado de la subtipificación de inmunoglobulina.

3) **Comparación de un PAA diafiltrado según la invención con su materia prima antes de la diafiltración.**

En esta prueba, se demostró que la diafiltración no afectó las propiedades adyuvantes del polímero.

Se probaron diferentes formulaciones que comprendían el antígeno hCMV-gB a 0,08 mg/ml, el cual se obtuvo como se describe en el párrafo "2) Prueba del efecto adyuvante de diferentes polímeros sobre la respuesta inmune inducida por hCMV-gB".

55 A partir de una sal de sodio de polímero de ácido poliacrílico proporcionada por Polysciences, se aplicaron dos procedimientos diferentes (preparación no diafiltrada y preparación diafiltrada).

Para la preparación no diafiltrada, el producto obtenido de Polysciences simplemente se diluyó con PBS y se filtró de forma estéril a través de una membrana con un corte de 0,2 µm. La concentración de la sal de PAA fue 17,4 mg/ml. Se determinaron Mw, IP, y la pendiente de Mark Houwink.

Para la formulación diafiltrada, el producto obtenido de Polysciences se trató según el siguiente protocolo:

65 a) mezclar la disolución acuosa proporcionada por Polysciences con PBS 1C pH 7,4 bajo agitación durante 15 minutos para obtener una disolución de PBS que comprende 14 mg/ml de polímero,

b) diafiltrar la disolución obtenida en la etapa a) frente a 5 volúmenes de PBS, con una membrana que tiene un corte de 50kDa,

c) filtrar el producto obtenido en la etapa b) sobre un filtro esterilizante de 0,2 µm.

La disolución obtenida contenía 15,9 mg/ml de la sal de PAA, con un pH de 7,3. Se determinaron Mw, IP y la pendiente de Mark Houwink.

Los valores de Mw, IP y pendiente de Mark Houwink obtenidos antes y después de la diafiltración se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

NaPAA	Mw (Da)	IP	Pendiente de Mark Houwink
diafiltrado	522,030	1,6	0,9
no diafiltrado	433,417	2,6	0,9

Los pesos moleculares Mw y el IP del polímero antes y después de la diafiltración son consistentes con el hecho de que los monómeros y los pequeños oligómeros, en particular aquellos menores de 2000 Daltons, han sido eliminados por la etapa de diafiltración.

También es importante notar que el Mw anunciado por Polysciences, que se determinó por GPC (cromatografía de permeación en gel), fue 887.000 Da, que está muy lejos del medido antes de la diafiltración.

A partir de estas dos preparaciones diferentes, se prepararon formulaciones de inmunización mezclando una de las preparaciones de polímero con la disolución de gB en la relación adecuada, para obtener dosis de 50 µl que contenían cada una 2 µg de gB y:

- 25, 50, 100 o 200 µg de sal de polímero de la formulación diafiltrada,
- o 25, 50, 100 o 200 µg de sal de polímero de la formulación no diafiltrada.

Se inmunizaron ratones C57BL/6J, de 7 semanas, dos veces por vía intramuscular el día 0 y el día 21, con una de las formulaciones preparadas. Cada preparación fue probada en un grupo de 5 ratones. Como control, un grupo de 5 ratones recibió el antígeno solo.

Las respuestas celulares (IFNγ e IL5) y humorales (subclases de anticuerpos IgG, anticuerpos seroneutralizantes) de los ratones inmunizados se monitorizaron 2 semanas después de la última inmunización (el día 35) de la misma manera como se describe en el párrafo "2) Prueba del efecto adyuvante de diferentes polímeros sobre la respuesta inmune inducida por hCMV-gB".

Los resultados mostraron que, como en la prueba anterior, el adyuvante según la presente invención indujo fuertes respuestas inmunes Th-1 acompañadas de la inducción de fuertes títulos de anticuerpos neutralizantes del virus, y que no hubo diferencia significativa entre los ratones inmunizados con una formulación diafiltrada y los ratones inmunizados con una formulación no diafiltrada.

4) Estudio de estabilidad de un PAA diafiltrado en comparación con una materia prima de PAA

Con el fin de comprobar la estabilidad de los adyuvantes de PAA según la invención, se ha realizado un estudio que analiza las variaciones del peso molecular de la sal de polímero en pruebas de envejecimiento acelerado.

Para esta prueba, se utilizó una preparación no diafiltrada y una preparación diafiltrada. La purificación se llevó a cabo mediante diafiltración con una membrana de un corte de 50 kDa, y la preparación diafiltrada resultante contenía 8 mg/ml de una sal de polímero de PAA que tenía un peso molecular de 443553 Da en PBS 1C.

Su contenido en persulfato de sodio fue menor que 0,0007% (p/p) del polímero seco; el contenido de acrilato de sodio se determinó que era 0,0011% del polímero seco.

Esta preparación se envasó en viales de vidrio y se mantuvo a +5 °C, +25 °C o +37 °C.

Los análisis se realizaron durante 24 meses a 5 °C, 9 meses a 25 °C, y 3 meses a 37 °C. Los resultados obtenidos durante este estudio de estabilidad se muestran en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5

Tº	Tiempo	Mw (Da)	IP	Pendiente de Mark Houwink
T0		443 553	2,2	0,8
5 ºC	3M+5 ºC	451 035	2,6	0,8
	6M+5 ºC	456 211	2,4	0,8
	9M+5 ºC	463 731	2,4	0,8
	12M+5 ºC	441 474	2,3	0,8
	18M+5 ºC	433 764	2,3	0,8
	24M 5 ºC	443 544	2,3	0,8
25 ºC	1M+25 ºC	442 254	2,3	0,8
	3M+25 ºC	420 513	2,5	0,8
	6M+25 ºC	454 505	2,2	0,8
Tº	Tiempo	Mw (Da)	IP	Pendiente de Mark Houwink 1
T0		443 553	2,2	0,8
	9M+25 ºC	463 731	2,4	0,8
37 ºC	1M+37 ºC	443 437	2,1	0,8
	2M+37 ºC	419 315	2,3	1 0,9
	3M+37 ºC	435 771	2,3	0,8

5 Estos resultados muestran que no hubo una disminución significativa del Mw después del almacenamiento a 5 ºC durante 24 meses, después del almacenamiento a 25 ºC durante 9 meses, y después del almacenamiento a 37 ºC durante 3 meses, y el índice de polidispersidad del polímero permaneció igual.

10 Esto contrasta con los resultados obtenidos con una composición correspondiente a una disolución acuosa que comprendía 10% p/p de sal de PAA comparable que no se había dializado, y que contenía persulfato de sodio en una concentración de 0,42% p/p con respecto a la composición de peso seco. El Mw inicial de la sal de polímero se determinó en 470.269 Da, mientras que el Mw anunciado por el proveedor, determinado por GPC, fue 351.100 Da.

15 Los resultados obtenidos durante el estudio de estabilidad para esta disolución de polímero no dializada se muestran en la Tabla 6 a continuación, y muestran que el peso molecular disminuye con el tiempo, en particular después del almacenamiento a 25 ºC y 37 ºC.

Tabla 6

Tº	Tiempo	Mw (Da)	IP	Pendiente de Mark Houwink
T0		470 269	4,3	0,8
5 ºC	3M+5 ºC	466 916	4,8	0,8
	6M+5 ºC	486 470	5,2	0,8
	9M+5 ºC	475 430	4,6	0,8
	12M+5 ºC	458 407	4,8	0,8
	18M+5 ºC	449 561	3,9	0,8
25 ºC	1M+25 ºC	398 694	4,0	0,8
T0		470 269	4,3	0,8
	3M+25 ºC	345 603	4,1	0,8
	6M+25 ºC	336 632	5,8	0,8
37 ºC	1M+37 ºC	310 019	4,0	0,8
	3M+37 ºC	302 438	3,9	0,8
	6M+37 ºC	321 482	4,2	0,8

5) Prueba que muestra el efecto perjudicial del contenido de persulfato

20

Una sal de sodio de polímero de ácido poliacrílico (proporcionada por Polysciences) se esterilizó en un autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. La concentración de la sal de PAA en la disolución fue 101,8 mg/g. La Tabla 7 a continuación muestra el Mw, la IV (viscosidad intrínseca) y la pendiente de Mark Houwink de la sal de PAA después y antes de someterla a autoclave.

5

Tabla 7

NaPAA	Mw (Da)	IV (dl/g)	Pendiente de Mark Houwink
antes de someterla a autoclave	404 784	3,5	0,9
después de someterla a autoclave	188 782	1,9	0,9

Parece que el tratamiento en autoclave provocó una disminución drástica del Mw y de la IV. Se realizó un estudio posterior para estudiar los parámetros que pueden ser responsables de esta degradación de los polímeros bajo calentamiento. Este estudio demostró que la purificación de la sal de polímero, en particular mediante diafiltración, fue capaz de estabilizar el polímero tras la esterilización en autoclave.

10

Una mezcla de polímero NaPAA y persulfato se expuso al calor, para reproducir las condiciones de esterilización en autoclave: la composición se caracterizó para el Mw de NaPAA y el contenido de persulfato antes y después de la incubación a 120 °C durante 15 minutos. En la Tabla 8 se detallan las características de la composición en términos de Mw de NaPAA y contenido de persulfato.

15

Tabla 8

20

PAA	Mw (Da)	IV (dl/g)	Contenido de persulfato % p/p sobre peso seco
PAA	434 725	1,6	<0,0005
antes de la exposición al calor			
PAA después de la exposición al calor	428 672	1,6	<0,0005
PAA + 150 ppm de persulfato de sodio)	428 477	1,6	0,07
antes de la exposición al calor			
PAA + 150 ppm de persulfato	323 160	1,4	0,07
después de la exposición al calor			

Estos resultados muestran que la presencia de persulfatos condujo a una disminución de Mw, después del tratamiento térmico. Por el contrario, un PAA con un contenido muy débil de persulfatos tuvo un Mw muy estable.

En conclusión, la estabilidad térmica de una disolución de PAA podría estar directamente relacionada con su contenido de persulfato. La etapa de diafiltración introducida en el procedimiento de la presente invención eliminó las impurezas de persulfato de las disoluciones de PAA y proporcionó disoluciones de PAA termoestables compatibles con la esterilización en autoclave.

25

30 Ejemplo 3 - PAA favorece una respuesta fuerte y disminuye la carga de antígeno

La demanda de una protección más amplia contra los patógenos del ganado requiere la adición de antígenos a las formulaciones de vacuna existentes (por ejemplo, los productos SINTOXAN®, que generalmente comprenden toxinas inactivadas y/o bacterinas más adyuvante de hidróxido de aluminio), o la formulación de vacunas separadas de un único antígeno. Dado que proporcionar vacunas combinadas es comercialmente más deseable, los solicitantes razonaron que podían añadir los nuevos antígenos manteniendo al mismo tiempo el volumen de dosis existente, siempre que pudieran identificar un adyuvante más potente con un buen perfil de seguridad.

35

Es importante destacar que, como bien sabe una persona experta en las técnicas de vacunas e inmunología, no se puede predecir de antemano si una especie molecular funcionará o no como un adyuvante inmunogénico seguro y eficaz. Además, incluso después de que se hayan establecido las propiedades adyuvantes de una nueva molécula, debido a la naturaleza impredecible de estas técnicas, un experto no puede esperar razonablemente tener éxito en la aplicación del nuevo adyuvante a diferentes situaciones. Las variables que influyen en si una nueva formulación funcionará o no como una vacuna segura y protectora incluyen, pero no se limitan a: 1) tipo/presencia de adyuvante; 2) tipo/naturaleza del antígeno (péptido, ácido nucleico, virus muerto, bacterina, etc.); 3) vía de administración; 4) tipo/cepa del patógeno diana; y 5) especie diana que se va a vacunar. Por consiguiente, la seguridad y eficacia de un nuevo adyuvante de vacuna debe demostrarse mediante al menos varias combinaciones de estas variables antes de poder extraer conclusiones significativas en cuanto a su aplicabilidad general.

40

45

En el presente caso, en el que el tipo de antígeno estaba compuesto en gran medida por bacterias inactivadas, los solicitantes razonaron que el nuevo adyuvante más potente y que ahorrara dosis tendría que ser resistente a la lipasa. Desafortunadamente, los compuestos que permiten que una formulación sea resistente a la lipasa a menudo pueden provocar reacciones indeseables en el sitio de administración. Por tanto, era necesario lograr un buen equilibrio entre la seguridad, la eficacia y la estabilidad de la vacuna.

5

Se prepararon vacunas experimentales SINTOXAN® (Merial Brasil - *C. perfringens* B/C; *C. perfringens* D; *C. septicum*; *C. novyi*; *C. tetani*), y se probaron en ratones, cobayas y conejos. A modo de ejemplo, el diseño y los resultados del estudio con cobayas se presentan en las Tablas 9 y 10, respectivamente.

10

Tabla 9. Enfoque de ahorro de dosis utilizando el adyuvante de ácido poliacrílico PAA225000

	(% de la vacuna estándar)	Preadsorción de antígeno en hidróxido de aluminio	Dosis de PAA (mg/dosis)
Vacuna base	1	Sí	0
A	0,2	Sí	1
B	0,2	Sí	2
C	0,2	Sí	3
D	0,2	Sí	4
E	0,2	No	4

Tabla 10. Resumen de la eficacia de formulaciones inmunogénicas ahorradoras de dosis

	Yola m	Novy i	Beta Epsil on	Septic um	Sordel lii	Chauvo n	Haemolitic um	pH	Form a libre (mg/ml)	AP* (mg/ml)	Estabilidad ed	Seguridad ed
Especifici dad	> 2 2,5 U/ml	> 2 3,5 U/ml	> 2 10 U/ml	> 2,2 U/ml	> 2,5 U/ml	> 2,1 U/ml	> 2,87,5% **	5,5 a 7,5	≤ 1,6	3,2 a 2,6	* Estétil * Según	
Método	SV	SV	SV	SV	SV	es. es.	ID es.	Potenciomé tro	UV	Grado		
Técnica	CM T	CM T	CM T	CM T	CM T	CM T	CM T	CFQ T	CFQ T	CFQ T	CM T	CM T
Base	<1,2 5	<1,2 5	>25 5	8	>5	100	100	7,3	0,8	3,2	OK	OK
A	<1,2 5	3,5- 6	20- 25	>8	1,3- 2,5	100	100	7,8	0,5	ND	OK	OK
B	<1,2 5	1	>8	2,5	1	100	100	8,1	0,4	ND	OK	OK
C	<1,2 5	1-2	15- 20	2,5-4	1,3- 2,5	100	87,5	8,3	0,4	ND	OK	OK
D	<1,2 5	3,5	15	1-2,5	1,25	100	100	8,5	0,4	ND	OK	OK
E	<1,2 5	6	20	4	>5	100	100	7,3	1,2	0	OK	OK

La seguridad fue buena para cobayas, ratones y conejos, y, como se indica en la Tabla 10, la eficacia fue buena, particularmente con formulaciones que carecían de hidróxido de aluminio (véanse, por ejemplo, las columnas *Novyi*, *Septicum* y *Sordellii*; comparando E frente a D). Estos resultados fueron bastante sorprendentes, ya que la expectativa razonable podría haber sido que una combinación de hidróxido de aluminio y el nuevo adyuvante polimérico (Grupo E) superaría a la nueva formulación de solo polímero (Grupo D).

Ejemplo 4 - PAA favorece una respuesta protectora en caninos cuando se formula con vacunas clásicas inactivadas o recombinantes

Estudio de la rabia inactivada. Las vacunas se prepararon según la Tabla 11, y los resultados se presentan en la FIG. 8. Todos los adyuvantes probados parecen ser seguros para uso en perros, y todos ellos indujeron seroconversión el día 7, con títulos positivos que se mantuvieron hasta 70 días después de la vacunación. PAA 225000 fue el adyuvante más eficaz para mejorar la inmunogenicidad a corto plazo de la rabia inactivada.

Tabla 11. Formulaciones de vacunas antirrábicas inactivadas (IMRAB® de Merial más diferentes adyuvantes)

Grupos (6/grp)	Antígeno 1 x SC (cantidad por dosis)	Adyuvante (cantidad por dosis)
A	Vacuna antirrábica inactivada (glicoproteína de la rabia 5,6 µg/ml)	PAA225000 (4 mg/ml)
B		PAA60000 (4 mg/ml)
C		*AF03 (2,5 %)
D		**Emulsión de escualeno (SE) (2%)

*AF03 es un adyuvante alternativo basado en emulsión de escualeno, producido mediante inversión de fase (véase J. Pharm. Sciences, Vol 101, Número 12, 2012, y aquí incorporado como referencia en su totalidad).

** La emulsión de escualeno se prepara mediante homogeneización a alta presión para formar una emulsión de aceite en agua.

5 *Estudio sobre la gripe vectorizada con viruela del canario.* Se prepararon formulaciones de vacuna contra la gripe vectorizada con viruela del canario y se probaron en 5 grupos, cada uno de los cuales contenía 7 perros (Tabla 12), y los resultados se presentan en la FIG. 10. Se detectaron altos niveles de células productoras de IFN γ en todos los grupos en el D14, D27 y D41. De manera similar a la tendencia observada para la formulación clásica de vacuna inactivada anterior, los antígenos de gripe vectorizados con viruela del canario parecen estar mejor adyuvados por el PAA de mayor peso molecular (es decir, PAA225000). vCP2242 está completamente descrito y habilitado por el documento US 7.425.336 (a Meril) Pero brevemente aquí, vCP2242 es un ALVAC recombinante que contiene un gen HA optimizado en codones de un virus de la gripe equina (EIV) H3N8, en el que el gen HA se inserta en los loci C5 de ALVAC. Los solicitantes afirman que los resultados descritos aquí respaldan la conclusión general de que los vectores de viruela del canario recombinantes son compatibles con el PAA no reticulado de la presente descripción y están bien adyuvados por éste (véase, por ejemplo, la FIG. 9).

15 **Tabla 12.** Formulaciones de vacuna contra la gripe canina vectorizada con viruela del canario

Grupos (7/grp)	Antígeno SC D0 y D21 (por dosis)	Adyuvante (cantidad por dosis)
1	Título de vCP2242 5,73 log ₁₀ TCIC ₅₀	PBS
2		CARBÓMERO (4 mg/ml)
3		PAA60000 (4 mg/ml)
4		PAA225000 (4 mg/ml)
5	PBS	

Ejemplo 5 - PAA no reticulado es un adyuvante eficaz para vacunas equinas

20 *Estudio de gripe equina vectorizada con viruela del canario + toxina tetánica.* A los equinos se les administraron las formulaciones según la Tabla 13. Como se indica a continuación y en las FIGS. 11-13, PAA actúa como adyuvante potente de dos antígenos no relacionados para provocar en los equinos una respuesta inmunológica protectora.

Tabla 13. Vacuna contra la gripe equina vectorizada con viruela del canario + formulaciones antitetánicas

Grupo	Vacunación D0 y D35, 1 ml, IM (cuello)		Monitorización clínica**	Toma de muestra de sangre
	Antígeno	Adyuvante		
A (n=8)	vCP1533 y vCP2242: 6,3 log ₁₀ FAID ₅₀ /ml (cada uno)	Carbómero (4 mg/ml)	(4 DO*, D0+5/6h, D1, D2, D3	DO*, D6/7, D13/14
B (n=8)		PAA60000 (4 mg/ml)		
C (n=8)		PAA225000 (4 mg/ml)		
D (n=8)	Toxina tetánica (100 Lf/ml)	ADVAX1 (20 mg/ml)	D35*, D35+5/6h, D36, D37, D38	D35*, D48/49, D62/63
E (n=8)		ADVAX2 (20 mg/ml)		
F (n=2)	N/A	N/A	D0 y D35	

Grupo	Vacunación D0 y D35, 1 ml, IM (cuello)		Monitorización clínica**	Toma de muestra de sangre
	Antígeno	Adyuvante		
Los adyuvantes AD VAX™ derivan de inulina (Vaccine. 2012 agosto 3;30(36):5373-81; véase también el documento US 2014/0314739, de Vaxine Pty Ltd.). ADVAX1 es una suspensión estéril sin conservantes de micropartículas de delta inulina a 20 mg/ml en un amortiguador de bicarbonato, mientras que ADVAX2 incluye además 10 µg de dinucleótido CpG por 1 mg de delta inulina.				

5 **Resultados.** Para el día 14, todos los animales PAA225000 tenían títulos protectores $\geq 0,05$ UI/ml. El día 14, 6 de los 8 animales del grupo de la vacuna con adyuvante de carbómero todavía tenían valores $< 0,05$ UI/ml. En consecuencia, la formulación de vacuna con adyuvante PAA225000 produjo una seroconversión significativamente mejor que la formulación inmunológica con adyuvante carbómero. Para el día 49 (después de la segunda vacunación), los títulos en el grupo PAA225000 fueron significativa y efectivamente altos en todos los animales.

Ejemplo 6 - PAA es un adyuvante eficaz para vacunas porcinas

10 **Estudio del antígeno porcino "SpaA".** "SpaA" se refiere al "antígeno protector de superficie" de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, que es un patógeno que infecta a los porcinos y otros animales, incluidos los caninos. *Erysipelothrix rhusiopathiae* es una bacteria grampositiva, catalasa negativa, con forma de bastón, no formadora de esporas, no ácido-alcohol resistente, y no móvil. En los cerdos, *E. rhusiopathiae* causa la "enfermedad de la piel de diamante".
 15 "TS6" significa una emulsión de aceite en agua descrita, por ejemplo, en el documento US 7.371.395 (a Merial). TS6 se formula añadiendo alrededor de una (1) parte de un componente acuoso que contiene antígeno a alrededor de dos (2) partes de un componente oleoso, y emulsionando después los dos componentes para formar la emulsión final.

Tabla 14. Definiciones de grupos y tratamientos

Grupo	Número	Tratamiento
G1	7	Antígeno SpaA (150 ¹ µg/dosis) + TS6
G2	7	Antígeno SpaA (100 µg/dosis) + PAA60000
G3	7	Antígeno SpaA (100 µg/dosis) + PAA225000
G4	7	Antígeno SpaA-FlaB-His (196 ² µg/dosis) + PBS
G5	7	Antígeno SpaA-FlaB-His (196 ² µg/dosis) + PAA225000
G6	7	PBS

¹150 µg de SpaA en 2/3 del volumen de tratamiento (tt) significa 100 µg de SpaA por 1/1 del volumen de tt.

²196 µg de la proteína de fusión SpaA equivalen a 100 µg de la proteína SpaA solitaria.

En consecuencia, la cantidad efectiva de SpaA administrada a cada grupo fue 100 µg.

20 Si bien G1 produjo los mejores resultados, es notable que gran parte del volumen de la dosis para emulsiones de aceite en agua es absorbido por componentes no antigénicos (como se mencionó anteriormente, hay una relación de 2:1 de componentes oleosos a componentes antigénicos acuosos).

25 Como se describe aquí, los solicitantes han descubierto por primera vez que ciertos intervalos de peso molecular del polímero de ácido poliacrílico (PAA) no reticulado (es decir, lineal y ramificado) son particularmente adecuados para adyugar el efecto de antígenos inmunogénicos, así como para provocar respuestas inmunológicas independientes de los antígenos. Es importante destacar que los solicitantes han descubierto sorprendentemente que estos adyuvantes de PAA no reticulados fueron ampliamente útiles en muchos tipos de antígenos diferentes: un vector viral recombinante
 30 atenuado; una glicoproteína de la rabia clásicamente inactivada; una subunidad peptídica SpaA; y toxinas bacterianas. Además, los adyuvantes de PAA descritos funcionaron bien en múltiples tipos de animales. En consecuencia, los solicitantes sostienen que los PAA no reticulados descritos representan un "adyuvante universal" novedoso e inventivo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso como adyuvante en una composición de vacuna, caracterizada por que dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 350 a 650 kDa y comprende menos de 0,005% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico, y en la que el polímero de ácido poliacrílico está compuesto exclusivamente de unidades de ácido acrílico.
- 10 2. Una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha sal de polímero de ácido poliacrílico está compuesta exclusivamente por unidades de ácido acrílico que son una sal de ácido acrílico, o está compuesta exclusivamente por unidades de ácido acrílico que son la forma de ácido libre de ácido acrílico y por unidades de ácido acrílico que son una sal de ácido acrílico.
- 15 3. Una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que:
- (i) comprende menos de 0,005% p/p de agentes oxidantes, preferiblemente menos de 0,001% p/p de agentes oxidantes, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico;
- 20 (ii) comprende menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico;
- (iii) dicho polímero de ácido poliacrílico es una sal con Na⁺;
- (iv) comprende menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o en forma de sal, basado en el peso seco total de dicha sal de polímero de ácido poliacrílico; y/o
- 25 (v) está en una formulación líquida que tiene un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0, preferiblemente formulada en una disolución acuosa amortiguada, obtenida con un amortiguador tal como un amortiguador de fosfato, un amortiguador de TRIS, Hepes, histidina o citrato.
- 30 4. Una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene:
- (i) un índice de polidispersidad menor o igual a 4, preferiblemente menor o igual a 2,5; y/o
- (ii) una pendiente de Mark Houwink mayor o igual a 0,7.
- 35 5. Una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha sal de polímero de ácido poliacrílico tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5; o tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2.
- 40 6. Una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que está diafiltrada y/o esterilizada.
- 45 7. Una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico lineal o ramificado, para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que se utiliza para potenciar la respuesta inmune Th1 obtenida con la composición de vacuna.
- 50 8. Una composición de vacuna que comprende al menos un agente de vacuna y, como adyuvante, una sal farmacéuticamente aceptable de polímero de ácido poliacrílico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 55 9. La composición de vacuna según la reivindicación 8, caracterizada por que comprende, por dosis, de 0,1 a 8 mg de la sal farmacéuticamente aceptable del polímero de ácido poliacrílico, preferiblemente de 0,1 a 4 mg, y más preferiblemente de 0,1 a 2 mg.
- 60 10. La composición de vacuna según la reivindicación 8 o 9, caracterizada por que el al menos un agente de vacuna es un antígeno o un vector, tal como un vector viral o un ácido nucleico, que expresa un antígeno, preferiblemente en la que el antígeno es un antígeno bacteriano procedente de *Clostridium tetani*, *Clostridium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella* sp, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* o *pneumoniae*, o *Streptococcus* sp; o es un antígeno viral procedente del virus de la hepatitis A, B o C, del virus de la gripe, del virus respiratorio sincitial, del rinovirus, del virus del Nilo Occidental, del virus de la rabia, del virus de la polio, del virus del VIH, del virus del dengue, del virus de la encefalitis japonesa, del virus de la fiebre amarilla, del citomegalovirus o del virus del herpes; o es un antígeno parasitario procedente de *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp. o *Schistosoma* sp.; o es un antígeno tumoral.
- 65

11. La composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizada por que el al menos un agente de vacuna es un antígeno o un vector tal como un virus recombinante o un ácido nucleico que codifica un antígeno, originándose dicho antígeno a partir de *Staphylococcus aureus* o del citomegalovirus.
- 5 12. La composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para uso en la generación de una respuesta inmune en un individuo, en particular en un ser humano, con potenciación de la respuesta inmunitaria Th1 obtenida y/o con un equilibrio entre las respuestas inmunes Th1 y Th2 obtenida.
- 10 13. Un procedimiento para la preparación de una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de ácido poliacrílico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las siguientes etapas sucesivas:
a) obtener una disolución de un polímero de ácido poliacrílico,
b) purificar la disolución del polímero de ácido poliacrílico, con el fin de eliminar impurezas, y
c) esterilizar la disolución purificada del polímero de ácido poliacrílico.
- 15 14. Un procedimiento de preparación, según la reivindicación 13, caracterizado por que:
(i) el polímero de ácido poliacrílico de la disolución de la etapa a) tiene un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 300 a 550 kDa;
(ii) la purificación se lleva a cabo mediante diálisis, diafiltración, ultrafiltración, o cromatografía de exclusión por tamaño, preferiblemente en el que la purificación se lleva a cabo mediante diafiltración con una membrana de un corte de 1 a
20 80 kDa, o de 2 a 50 kDa; y/o
(iii) la esterilización se realiza en autoclave.
- 25 15. El procedimiento de preparación, según la reivindicación 13 o 14, caracterizado por que la purificación se realiza en condiciones que permiten la obtención de un polímero de ácido poliacrílico en disolución que tiene:
- menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de agentes oxidantes, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación, y/o menos de 0,005%, preferiblemente menos de 0,001% p/p de persulfatos, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación,
30 - menos de 0,005% p/p de monómero de ácido acrílico en forma de ácido libre o forma de sal, basado en el peso seco total de dicho polímero de ácido poliacrílico obtenido después de la purificación,
- para la sal de polímero de ácido poliacrílico: un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 4; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo de 380 a 620 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2,5; o un peso molecular medio ponderal Mw en el intervalo
35 de 400 a 600 kDa y un índice de polidispersidad menor o igual a 2.

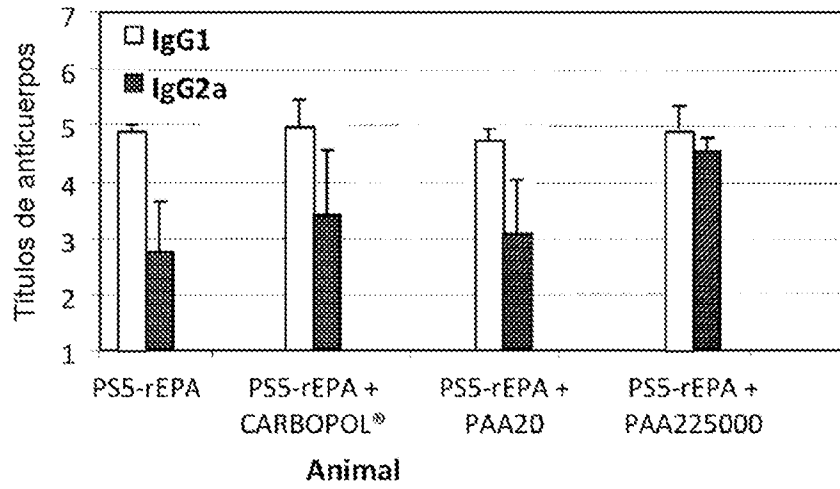


FIG. 1

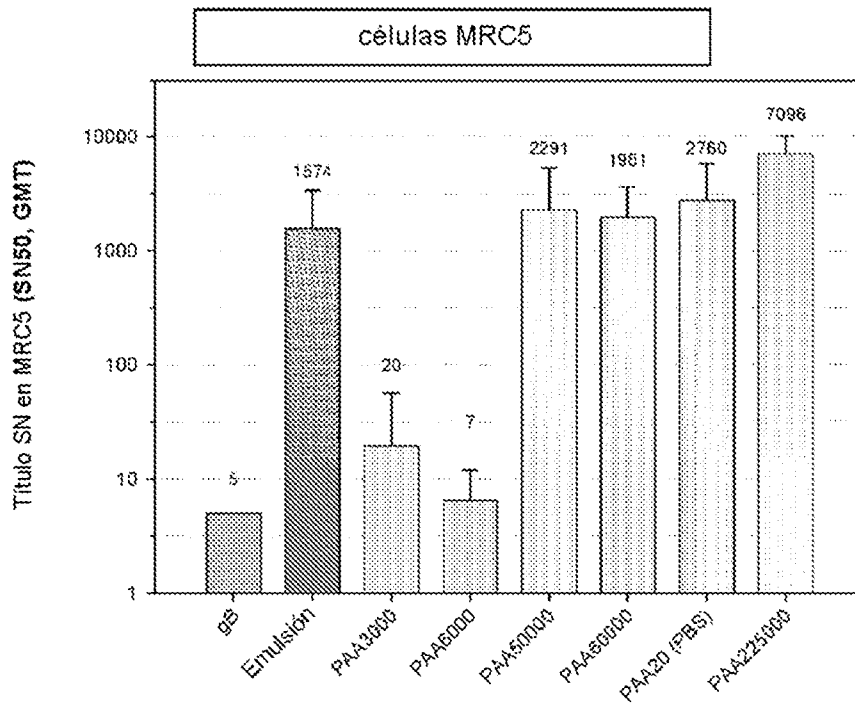


FIG. 2

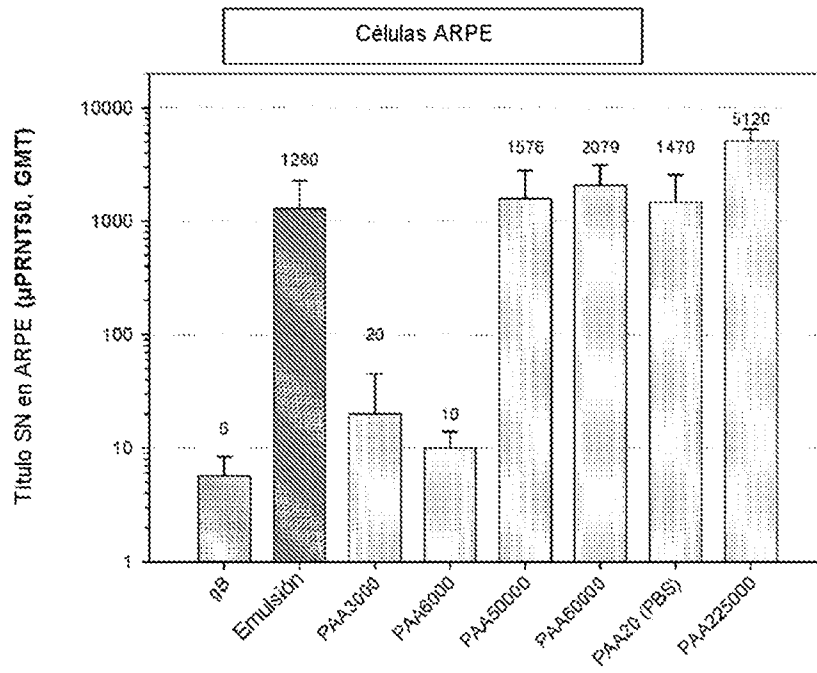


FIG. 3

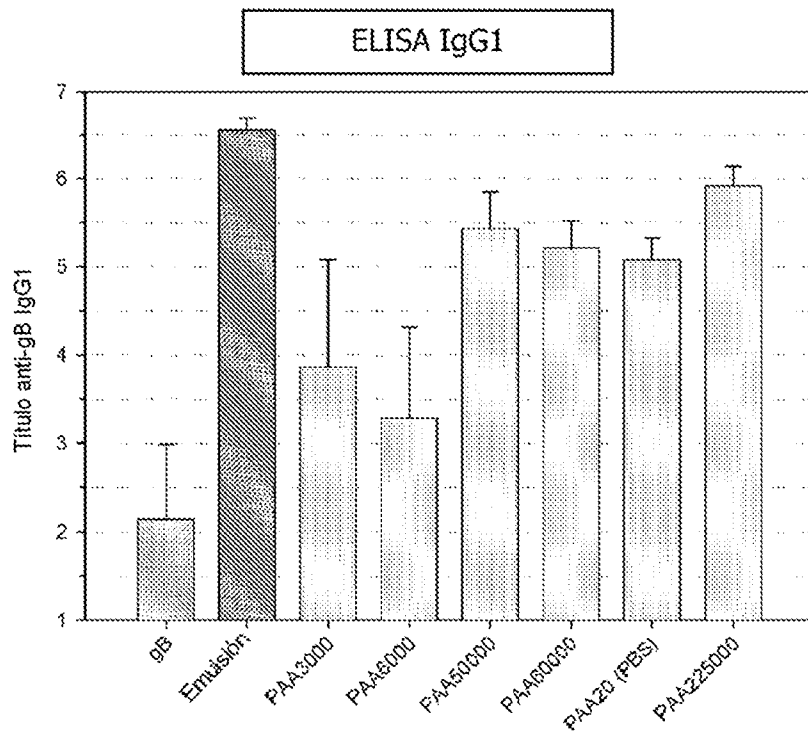


FIG. 4

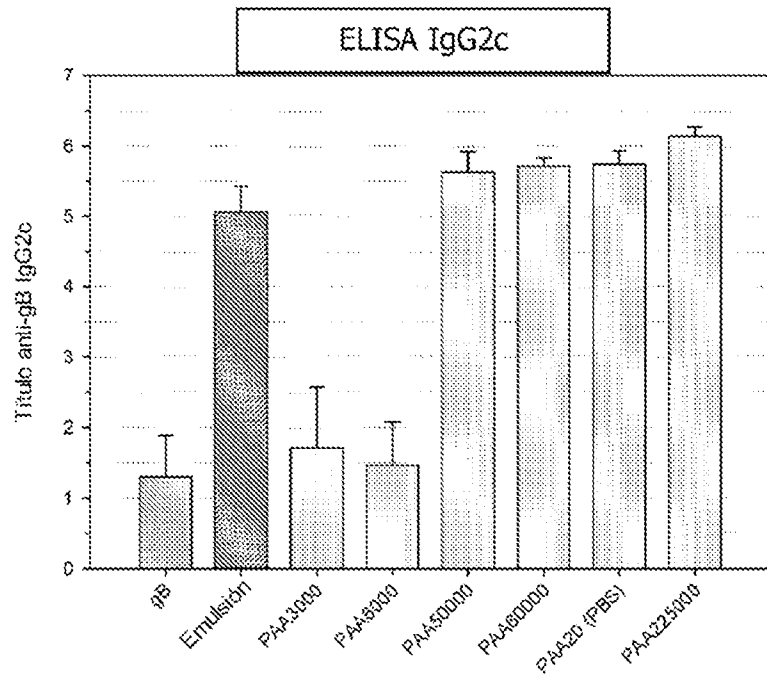


FIG. 5

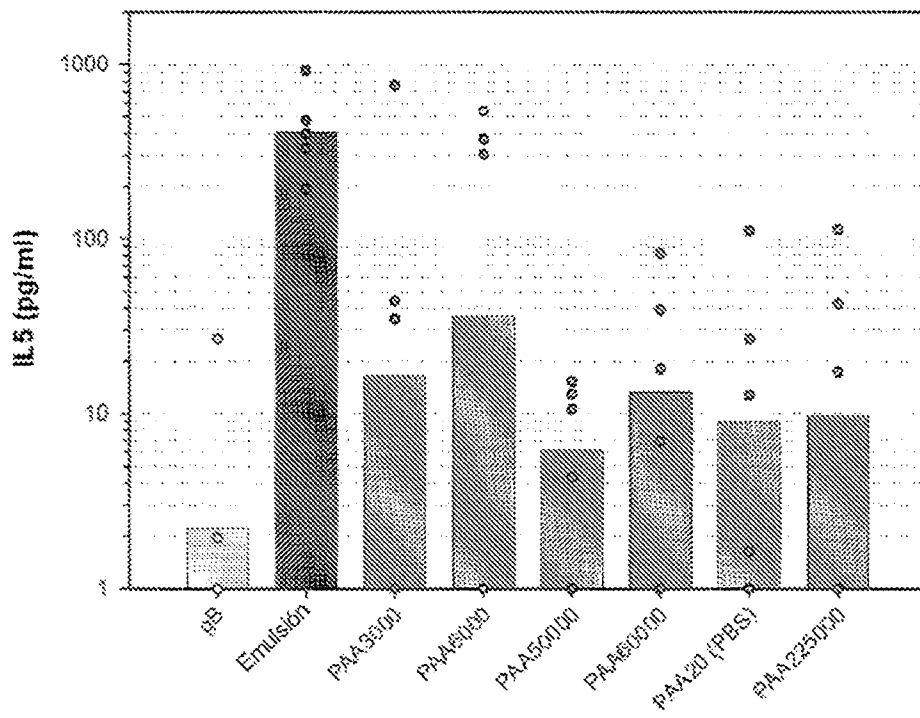


FIG. 6

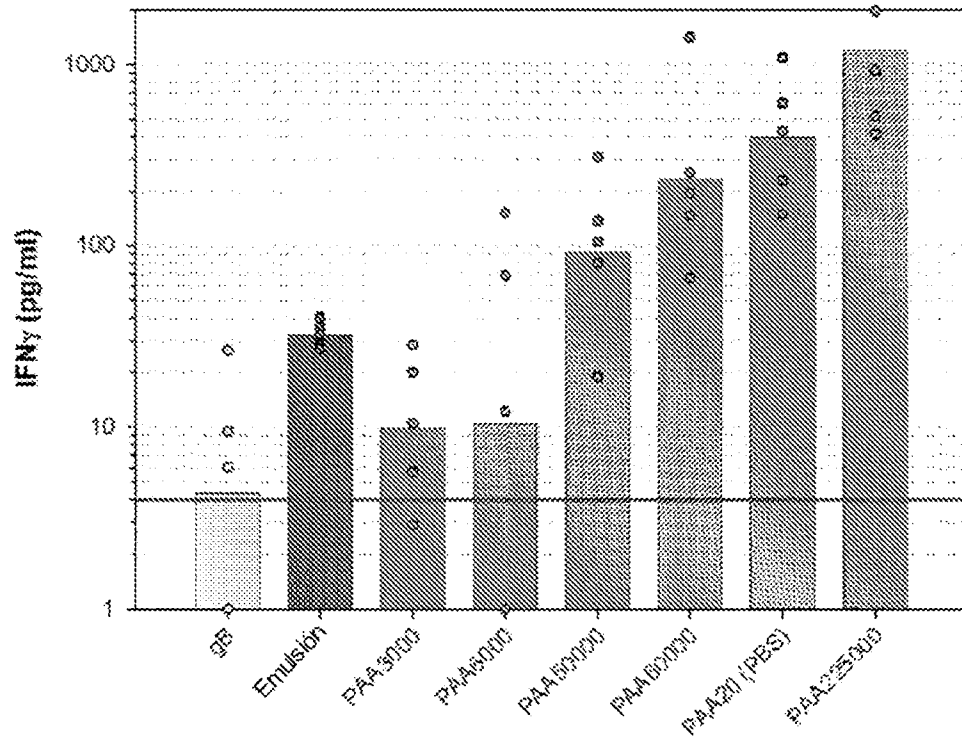


FIG. 7

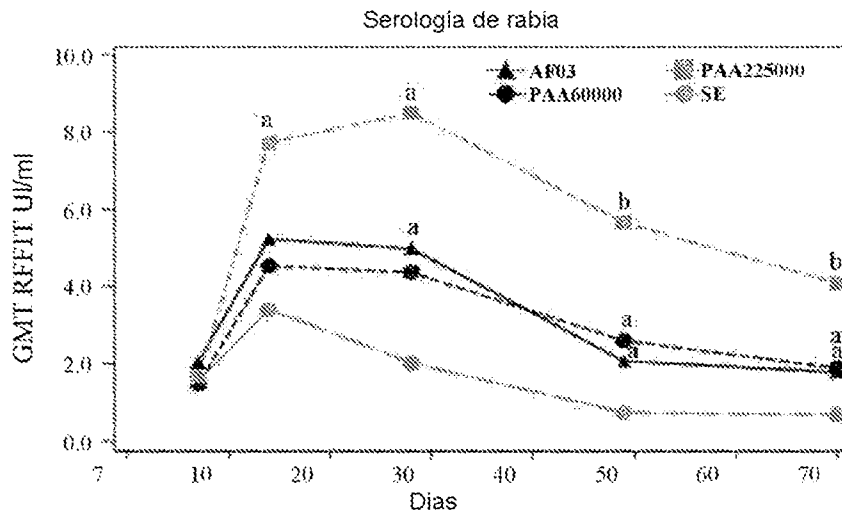


FIG. 8

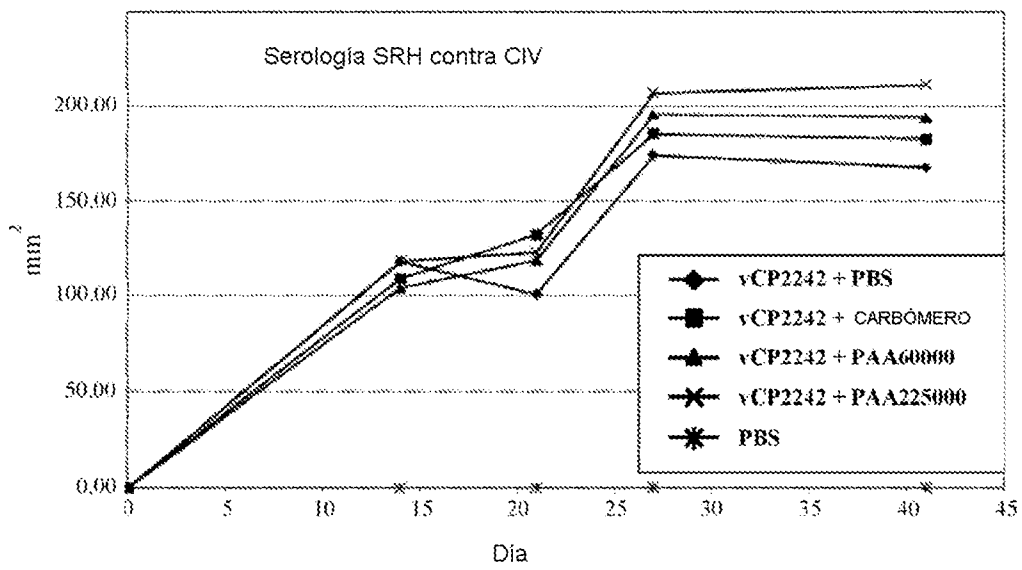


FIG. 9

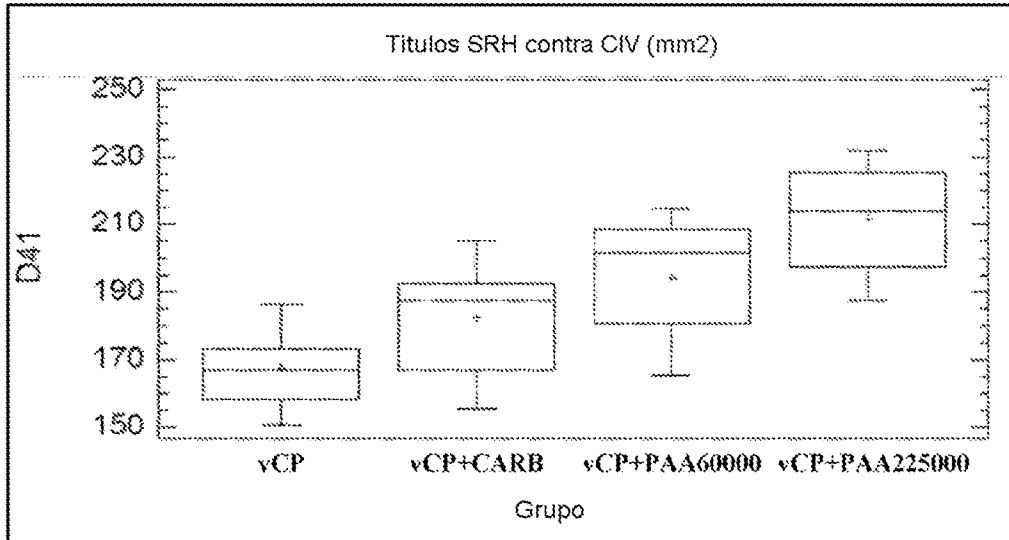


FIG. 10

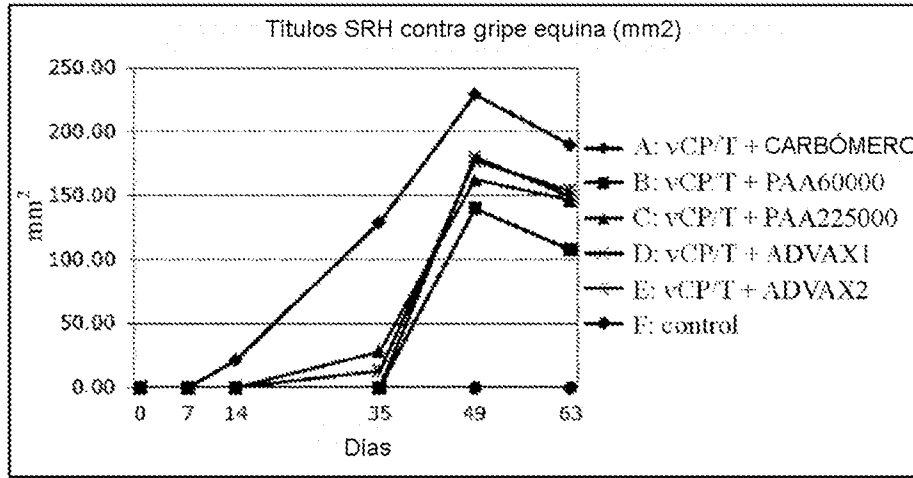


FIG. 11

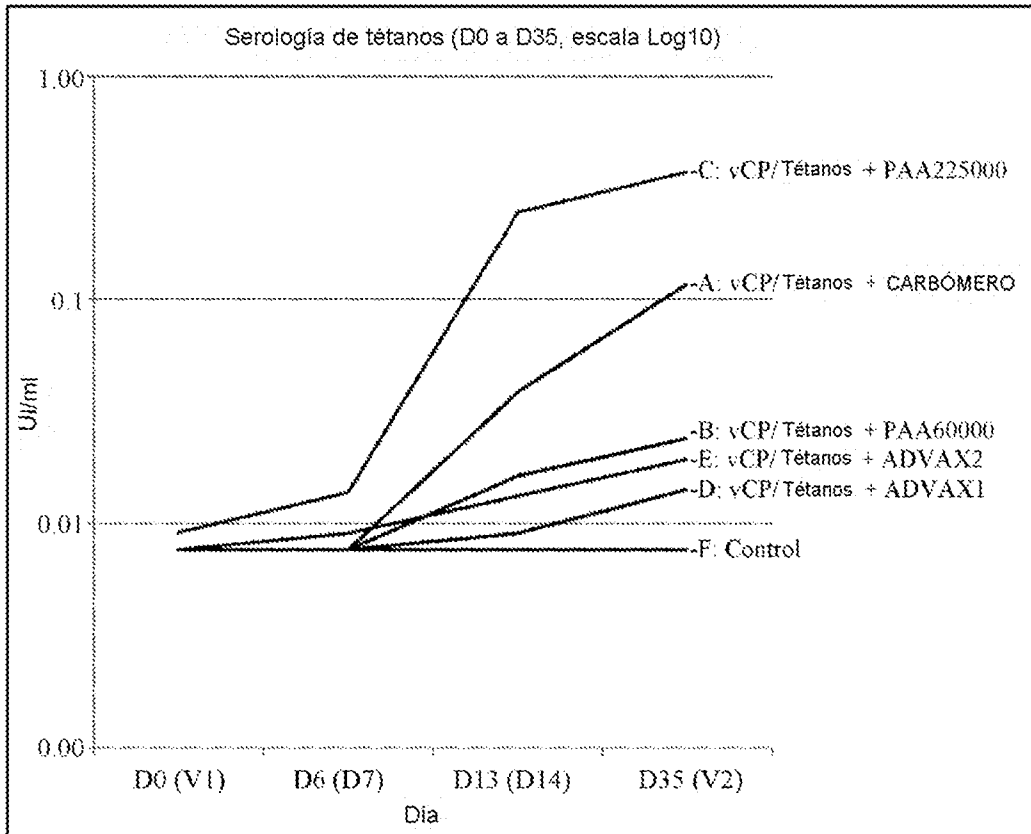


FIG. 12

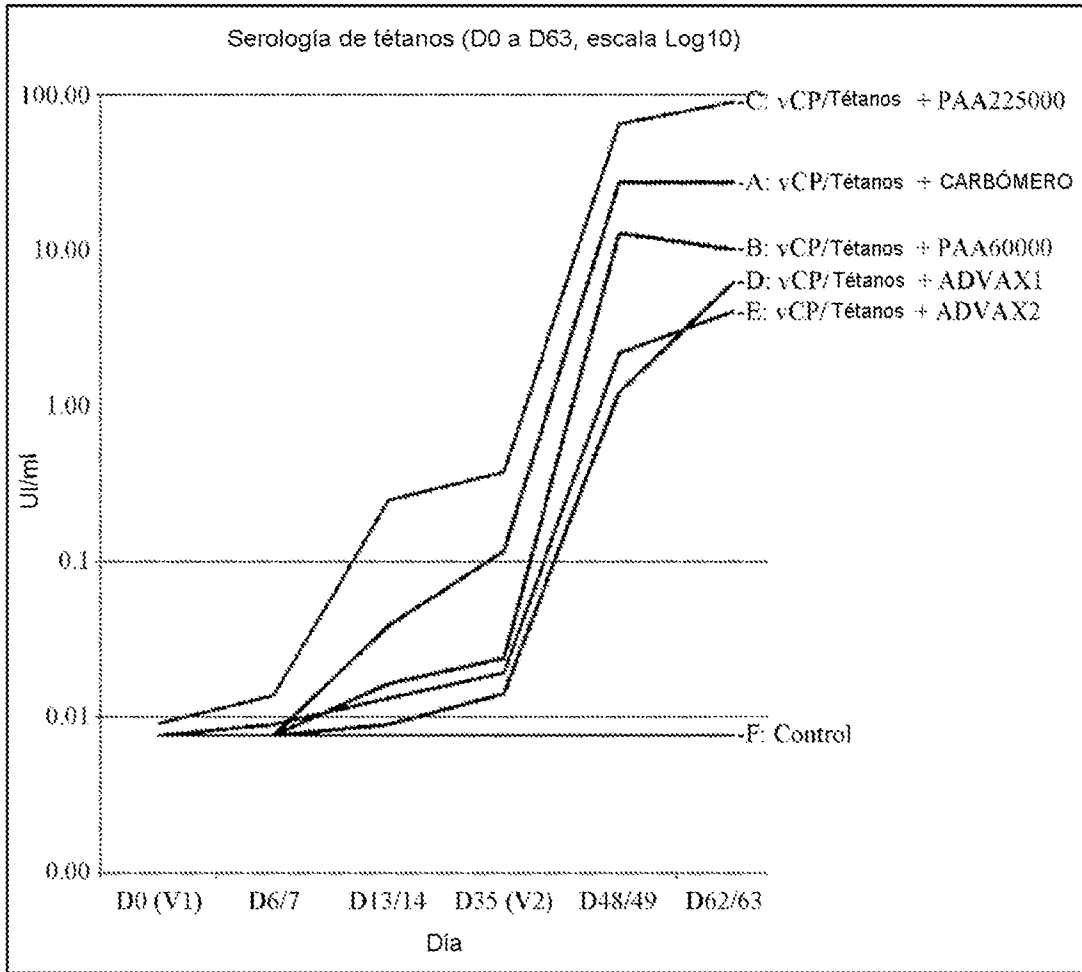


FIG. 13

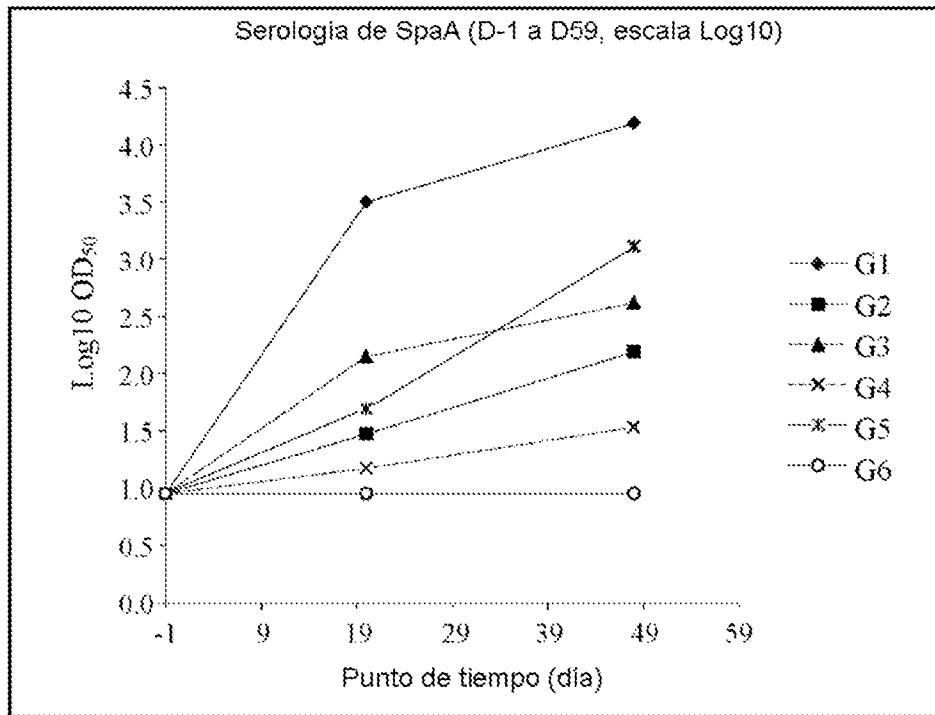


FIG. 14