

Organización y
Digitalización CSA Ltda

DCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-144676

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE WYETH LLC

DOMICILIO ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDONEZ

22. BOGOTÁ, D.C., _____

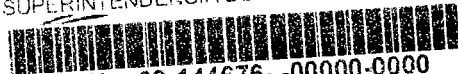
(FORMA P-10)

Título, Poder, Censura, no pago Explotación
Pm 20-01-2010

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144676- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 15:38:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR bión
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE

(71)

Nombre: WYETH LLC.

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número 79.143.366 Usaquén TP 20281

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: DIEHL, Evan James; LUTZ, David Leon; RODENBERG, Jeffrey Harold; KUMAR, Mahesh

Dirección: 1050 Newton Road Apt. 2 Iowa City, Iowa 52242 (US); 307 South Ash Street Harcourt, Iowa 50544 (US);
2741 North 7th Street Fort Dodge, Iowa 50501 (US); 2910 22nd Avenue, North Fort Dodge, Iowa 50501 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/067433

Fecha 19-06-2008

Publicación Internacional No. WO 2008/157659

Fecha 24-12-2008

6

Título (54)

COMPOSICIONES PARA VACUNA EN EMULSIÓN QUE COMPRENEN ANTÍGENO Y
UN ADYUVANTE EN LA FASE ACUOSA (Folio 109)

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/00; A61K 39/145

8

Prioridad

SI

☒ X

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

20/06/2007

(31) Número de Solicitud

60/936,571

9

Comprobante de pago No.

09-88,866; 09-80,591; 09-72,833; 09-80,444
09-88,683

Fecha Diciembre 17, 2009

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos

11

FIGURA CARATERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDONEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

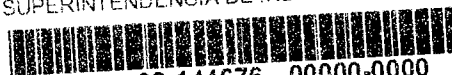
2009/016

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 88,866
 FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144676-00000-0000

Fecha: 2009-12-17 15:38:15
 Tra. 11 PATENTEIYII
 Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR NUEVASCR
 Eve: 378 FASENACIONALI
 Folios: 85

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MYER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	53918196	25/11/2009	70,018,300.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2009/016

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 88,683

FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Nc. 09-144676- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 15:38:15 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
KER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	53918196	25/11/2009	70,018,300.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	4,000.00
		TOTAL :	\$ 4,000.00

SON: CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

2009/015

5

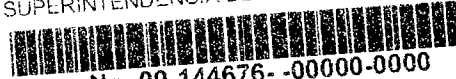
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 80,444

FECHA : OCTUBRE 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144676- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 15:38:15
Tra: 11 PATENTEIYII
Act: 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eva: 378 FASENACIONALI
Folios: 85

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	121953904	26/10/2009	56,821,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20,000.00
		TOTAL :	\$ 20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

2009/014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 72,833
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144676- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 15:38:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

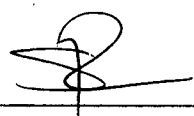
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	49,000.00
		TOTAL :	\$ 49,000.00

SON: CUARENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

2009/015

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 80,591

FECHA : OCTUBRE 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144676- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 15:38:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	121953904	26/10/2009	54,321,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		85 EXAMEN DE PATENTABILIDAD DE INVEN	452,000.00
		TOTAL :	\$ 452,000.00

SON: CUATROCIENTOS CINCUENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:		
(51) Clasificación Internacional : A61K 39/00; A61K 39/145				
(71) Solicitante(s) WYETH LLC.				
(72) Inventor(es) DIEHL, Evan James; LUTZ, David Leon; RODENBERG, Jeffrey Harold; KUMAR, Mahesh				
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ				
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) País	
	60/936,571	20-06-2007	US	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 20-01-2010		(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 24-12-2008		
Fecha de presentación de la solicitud: 19-06-2008		No. Publicación : WO 2008/157659		
No. de solicitud PCT/US2008/067433				
Título: COMPOSICIONES PARA VACUNA EN EMULSIÓN QUE COMPRENDEN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE EN LA FASE ACUOSA				
(57) Resumen: Se utilizan formulaciones de vacuna en emulsión que contienen un antígeno y un adyuvante en la fase acuosa para la vacunación de animales en donde el adyuvante es un polímero acrílico y/o bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA). Estas formulaciones se pueden preparar al mezclar una fase acuosa que contiene el antígeno y adyuvante con una fase aceitosa en la presencia de un emulsificador.				
CONTINUA AL RESPALDO ...				

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/00; A61K 39/145	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) WYETH LLC.	
(30) Prioridad	(31) No. 60/936,571	32) Fecha 20-06-2007	(33) País US
		(72) Inventor(es) DIEHL, Evan James; LUTZ, David Leon; RODENBERG, Jeffrey Harold; KUMAR, Mahesh	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 20-01-2010		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 24-12-2008
	Fecha de presentación de la solicitud: 19-06-2008		N° publicación: WO 2008/157659
	No. de solicitud PCT/US2008/067433		
(54) Título: COMPOSICIONES PARA VACUNA EN EMULSIÓN QUE COMPRENDEN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE EN LA FASE ACUOSA			

Reivindicación(es):

1. Una composición de vacuna que comprende una emulsión agua en aceite,

en donde dicha emulsión comprende un componente de aceite y un componente acuoso; y

en donde dicho componente acuoso comprende por lo menos un antígeno y por lo menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT **X** MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional : A61K 39/00; A61K 39/145

(71) Solicitante(s) **WYETH LLC.**

(72) Inventor(es) DIEHL, Evan James; LUTZ, David Leon; RODENBERG, Jeffrey Harold; KUMAR, Mahesh

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

32)

Fecha

(33)

País

60/936,571

20-06-2007

US

(85) Fecha inicio fase nacional: 20-01-2010

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 24-12-2008

Fecha de presentación de la solicitud: 19-06-2008

N° publicación: WO 2008/157659

No. de solicitud PCT/US2008/067433

(54) Título: **COMPOSICIONES PARA VACUNA EN EMULSIÓN QUE COMPRENDEN ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE EN LA FASE ACUOSA**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 December 2008 (24.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/157659 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/067433

(22) International Filing Date: 19 June 2008 (19.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/936,571 20 June 2007 (20.06.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940
(US).

(71) Applicants and

(72) Inventors: LUTZ, David Leon [US/US]; 307 South Ash
Street, Harcourt, Iowa 50544 (US). RODENBERG, Jef-
frey Harold [US/US]; 2741 North 7th Street, Fort Dodge,
Iowa 50501 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DIEHL, Evan
James [US/US]; 1050 Newton Road, Apt. 2, Iowa City,
Iowa 52242 (US). KUMAR, Mahesh [US/US]; 2910
22nd Avenue, North, Fort Dodge, Iowa 50501 (US).

(74) Agent: COTTINGHAM, Frank, R.; Wyeth, Patent Law
Department, Five Giralda Farms, Madison, New Jersey
07940, (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report

(54) Title: EMULSION VACCINE COMPOSITIONS COMPRISING ANTIGEN AND ADJUVANT IN THE AQUEOUS PHASE

(57) Abstract: Emulsion vaccine formulations containing an antigen and an adjuvant in the aqueous phase are used for the vac-
cination of animals wherein the adjuvant is an acrylic polymer and/or dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA). These
formulations can be prepared by mixing an aqueous phase containing the antigen and adjuvant with an oil phase in the presence of
an emulsifier.



WO 2008/157659 A1

EMULSION VACCINE COMPOSITIONS COMPRISING ANTIGEN AND ADJUVANT IN THE AQUEOUS PHASE

BACKGROUND OF THE INVENTION

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to water-in-oil vaccine formulations, processes of making the formulations and the use of such formulations for the vaccination of animals.

BACKGROUND ART

[0002] The cornerstone of many infectious disease control programs is induction of specific immunity by vaccination with either live or inactivated microorganisms or their products. An effective vaccination procedure allows the development of a state of immunologic memory in an animal for an antigen, which leads to a rapid and robust immunological response in the animal, upon subsequent contact with the antigen. Some antigens, however, are only weakly immunogenic. Such antigens may be unable to induce an immune response sufficient to provide an effective protection for the animal upon subsequent challenge, or may require administration with additional agents that boost immunogenicity to provide effective protection.

[0003] The immunogenicity of an antigen can be increased by administering it in a mixture with substances, called adjuvants, which increase the response against the antigen either by directly acting on the immune system or by modifying the pharmacokinetic characteristics of the antigen and thereby increasing the interaction time between the latter with the immune system.

[0004] Emulsions made from water and oil (e.g., water-in-oil, oil-in-water, water-in-oil-in-water emulsions) can be used as adjuvants in vaccines. Water-in-oil emulsions are commonly used as adjuvants in animal vaccines, e.g., in poultry vaccines. In general, to make a water-in-oil emulsion, an aqueous phase antigen is

slowly added to a mineral oil carrier in the presence of one or more emulsifying agent(s), resulting in micelles consisting of oil droplets within which the aqueous antigen resides. It is believed that the oil component induces the migration of immune cells to the injection site, and also serves to protect the antigen and extend the period of time for the immune cells to process the antigen. The end result is an enhancement of the immune response as compared to simply injecting the antigen by itself.

[0005] Adjuvants consisting of acrylic polymers are sometimes used as alternatives to oil-based emulsions in vaccine formulations. An exemplary acrylic polymer is a water-soluble polymer of acrylic acid crosslinked with polyallyl sucrose which is also known as Carbopol. U.S. Patent No. 5,026,546, for example, refers to the use of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA) as a vaccine adjuvant and the addition of Carbopol to improve the solubility of DDA in water.

[0006] Both oil-based emulsions and acrylic polymers have distinct advantages when used as adjuvants in vaccine formulations. Combining water-in-oil emulsions and acrylic polymers, however, would have been discouraged since it is expected that acrylic polymers such as Carbopol would be highly reactive in association with an oil emulsion. For example, U.S. 5,026,546, discussed above, mentions the use of Carbopol but provides no suggestion of using DDA and/or Carbopol in water-in-oil or oil-in-water emulsions. In addition, with regard to adjuvants for certain species such as poultry, acrylic polymers have been avoided due to their perceived high reactivity in general. Thus, there exists a need in the art for novel adjuvants which provide the combined advantages of acrylic polymers and water-in-oil emulsions without the drawbacks of adverse reactivity caused by the acrylic polymers in the vaccinated animal.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] The present invention is based, in part, on the surprising discovery that formulating oil-based emulsion vaccine compositions with an acrylic polymer such as Carbopol in the aqueous phase significantly increases the immune response

14

generated by the vaccine composition as compared to oil-based emulsion vaccine compositions that do not include an acrylic polymer. Moreover, by formulating an acrylic polymer in the aqueous phase of a water-in-oil emulsion, the expected adverse reactivity of the acrylic polymer in the animal was avoided.

[0008] Thus, the present invention provides vaccine compositions comprising water-in-oil emulsions. The water-in-oil emulsions of the invention comprise an oil component and an aqueous component. The aqueous component comprises at least one antigen and at least one adjuvant selected from the group consisting of an acrylic polymer and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA). The present invention also includes methods of vaccinating an animal, said methods comprising administering to an animal a vaccine composition of the invention.

[0009] Other aspects of the invention include methods for making vaccine compositions that comprise water-in-oil emulsions. The methods of the invention comprise emulsifying an oil component with an aqueous component, wherein the aqueous component comprises at least one antigen and at least one adjuvant selected from the group consisting of an acrylic polymer and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).

[0010] The above features and many other attendant advantages of the invention will become better understood by reference to the following detailed description when taken in conjunction with the accompanying drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0011] **Fig. 1** is a flowchart showing an exemplary method for making an emulsion vaccine composition of the present invention.

[0012] **Fig. 2** shows the HI (hemagglutination inhibition) titers of the blood from turkeys inoculated with a water-in-oil emulsion vaccine formulation containing inactivated H5N3 avian influenza antigen.

[0013] Fig. 3 shows the HI titers of the blood from control turkeys and turkeys inoculated with water-in-oil emulsion vaccines containing inactivated H5N3 avian influenza antigen and no adjuvant, Carbopol[®], Carbopol[®] + DDA, CMC, HPMC, or Al(OH)₃ (reHydragel[®]). The HI titer levels marked as "prebleed" were from 3 non-vaccinated turkeys.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0014] The present invention provides vaccine compositions comprising an emulsion. The emulsion comprises an oil component and an aqueous component. The aqueous component comprises at least one antigen and at least one adjuvant. The adjuvant may comprise an acrylic polymer and/or DDA.

EMULSIONS

[0015] Different types of emulsions used in vaccine preparations include water-in-oil, oil-in-water, and water-in-oil-in-water emulsions. A preferred type of emulsion for use in the context of the present invention is a water-in-oil emulsion. A water-in-oil emulsion can further include one or more oil soluble surfactants, one or more water soluble surfactants, additional adjuvants, additional aqueous phase components, emulsion stabilizers, or combinations thereof. Methods for making water-in-oil emulsions are known in the art and are described elsewhere herein.

VACCINE COMPOSITIONS

[0016] As used herein, a "vaccine composition" is a composition that can be used to elicit protective immunity in a recipient. Thus, after a subject has been vaccinated with an antigen, a vaccine prevents, delays, or lessens the severity of the development of a disease in the subject exposed to the same or a related antigen relative to a non-vaccinated subject. Protective immunity provided by a vaccine can be humoral (antibody-mediated) immunity or cellular immunity, or both. Vaccination may, e.g., eliminate or reduce the load of a pathogen or infected cells, or produce

any other measurable alleviation of an infection. Vaccination may also reduce a tumor burden in an immunized (vaccinated) subject.

[0017] The term "protective immunity" as used herein refers to immunity acquired against an antigen when a subject has been exposed to the antigen resulting in an immune response (either active/acquired or passive/innate, or both) in the subject which leads to inactivation and/or reduction in the load of the antigen and the creation of immunological memory (e.g., memory T- or B-cells).

[0018] Protective immunity provided by vaccination may be partial or provided in only a fraction of vaccinated subjects. Thus, a vaccine may elicit protective immunity in a portion of the immunized population, as some individuals may fail to mount a robust or protective immune response, or, in some cases, any immune response. This inability may stem from the individual's genetic background or because of an immunodeficiency condition (either acquired or congenital) or immunosuppression (e.g., due to treatment with chemotherapy or use of immunosuppressive drugs, e.g., to prevent organ rejection or suppress an autoimmune condition). Vaccines that provide protection to a portion of the immunized population are nevertheless useful and are considered effective.

ADJUVANTS

[0019] The term "adjuvant" as used herein refers to a compound that enhances a subject's immune response to an antigen when administered conjointly with that antigen.

[0020] Adjuvant-mediated enhancement of the immune response can be assessed by any method known in the art, including without limitation one or more of the following: (i) an increase in the number of antibodies produced in response to immunization with the adjuvant/antigen combination versus those produced in response to immunization with the antigen alone; (ii) an increase in the number of T cells recognizing the antigen or the adjuvant; (iii) an increase in the level of one or more Type I cytokines; and (iv) *in vivo* protection after live challenge.

[0021] An immune response is believed to be enhanced, if any measurable parameter of antigen-specific immunoreactivity (e.g., antibody titer or T cell production) is increased at least 10% when a subject is challenged with an antigen and adjuvant compared to a subject challenged with the antigen alone. In certain embodiments of the present invention, an immune response is enhanced if any measurable parameter of antigen-specific immunoreactivity is increased by at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 100%, at least 125%, at least 150%, at least 175%, at least 200%, at least 225%, at least 250%, at least 275%, at least 300%, at least 350%, at least 400%, at least 450%, at least 500%, or at least 1000%.

[0022] The adjuvant is preferably an acrylic polymer, dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA), or a combination of an acrylic polymer and DDA. The adjuvant is preferably a water soluble or water dispersible adjuvant.

[0023] An acrylic polymer, as used herein, is any polymer or copolymer that contains an acrylic moiety. Exemplary acrylic polymers include, e.g., polyacrylic acid, methacrylic acid, methacrylate, acrylamide, acrylate, acrylonitrile, and alkyl-esters of polyacrylic acid. Examples of acrylic copolymers include, e.g., poly (acrylamide-co butyl, methacrylate), acrylic-methacrylic acid, acrylic-acrylamide and poly (methacrylate). Examples of commercially available acrylic polymers include, Carbopol (B. F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio), Carboset, (B. F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio), Neocryl (Avecia, Inc., Wilmington, Del.), and Eudragit (Rohm Tech, Inc., Malden, Mass.). A particularly useful acrylic polymer for use in the emulsions of the present invention is Carbopol, which is also referred to, and known in the art, generically as a water-soluble polymer of acrylic acid crosslinked with polyallyl sucrose.

[0024] Specific acrylic polymers that may be included in the aqueous phase of the water-in-oil emulsions of the present invention include alkyl-polyacrylic acid ("alkyl-PAA") polymers, as described in U.S. Patent No. 6,340,464, and references

12

cited therein. Exemplary alkyl-PAA polymers include decyl-PAA (C10-PAA), octyl-PAA (C8-PAA), butyl-PAA (C4-PAA), and methyl-PAA (C1-PAA). (See, e.g., U.S. Patent No. 6,340,464, Table I). Octyl-PAA may alternatively be referred to as "octyl-alkyl-PAA" or "OA-PAA."

[0025] In certain embodiments of the invention, the aqueous component also comprises lecithin. In the context of the present invention, the lecithin can be any lecithin, for instance, lecithin lipoidal material, such as phosphatidylcholine, that can be used to form liposomes. Phospholipids, lysophospholipids, glycolipids and neutral lipids comprise the typical composition of lecithin. Lecithins are molecules that, when completely hydrolyzed, yield two molecules of fatty acid, and one molecule each of glycerol, phosphoric acid, and a basic nitrogenous compound, which is usually choline. The fatty acids obtained from lecithins on hydrolysis are usually, but not limited to, oleic, palmitic, and stearic acids. The phosphoric acid may be attached to the glycerol in either an α - or the β -position, forming α -glycerophosphoric acid or β -glycerophosphoric acid, respectively, and producing the corresponding series of lecithins which are known as α - and β -lecithins. Examples of adjuvants comprising lecithin and an acrylic polymer are described in, e.g., U.S. Patent No. 6,676,958.

[0026] In the vaccine compositions of the present invention, the acrylic polymer and/or DDA may be used in conjunction with one or more additional adjuvants. Exemplary additional adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, MF59, or SAF; mineral gels such as aluminum hydroxide (alum, for example, $\text{Al}(\text{OH})_3$ reHydragel[®] available from Reheis, Berkley Heights, NJ), aluminum salts (e.g., aluminum phosphate) or calcium salts (e.g., calcium phosphate); microbially-derived adjuvants such as cholera toxin (CT), pertussis toxin, Escherichia coli heat-labile toxin (LT), mutant toxins (e.g., LTK63 or LTR72), Bacille Calmette-Guerin (BCG), lipopolysaccharides (LPS), mycobacteria, tetanus toxin, Corynebacterium parvum, DNA CpG motifs, muramyl dipeptide, or monophosphoryl lipid A; particulate adjuvants such as immunostimulatory complexes (ISCOMs), liposomes, biodegradable microspheres, or saponins (e.g., QS-21); cytokines such as IFN- γ , IL-2, IL-12 or GM-CSF; synthetic adjuvants such as nonionic block copolymers or surfactants, muramyl peptide analogues (e.g., N-acetyl-

muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine [thr-MDP], N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-[1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy]-ethylamine), polyphosphazenes, synthetic polynucleotides, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, hydrocarbon emulsions, or keyhole limpet hemocyanins (KLH). Additional adjuvants include CMC (carboxyl methylcellulose) and HPMC (hydroxypropyl methylcellulose).

[0027] As illustrated in the Examples provided herein, the use of adjuvants, such as Carbopol, alkyl-PAA (e.g., OA-PAA) and/or DDA, in the aqueous phase of water-in-oil emulsion vaccines surprisingly improved the antigenicity of the vaccines as compared to traditional water-in-oil emulsion vaccines without adjuvants.

ANTIGENS

[0028] The term "antigen" as used herein refers to an agent that when introduced into a subject, is recognized by the immune system of the host and is capable of eliciting an immune response and generating protective immunity. Antigens include without limitation, "surface antigens" that are expressed naturally on the surface of a pathogen, or the surface of an infected cell, or the surface of a tumor cell.

[0029] In certain embodiments of the invention, the antigen is an infectious agent. The infectious agent may be a live infectious agent or it may be a killed or inactivated infectious agent. Exemplary infectious agents that can serve as antigens in the vaccine compositions of the present invention include, e.g., viruses, bacteria, fungi, parasites or other microorganisms. The antigen can also be a component or product derived from a virus, bacterium, fungus, parasite or other microorganism. Alternatively, the antigen may be a product obtained by chemical synthesis, protein, polypeptide, peptide, polysaccharide, glycoprotein, glycolipid, nucleic acid, or combination thereof. One of ordinary skill in the art will understand that when nucleic acid antigens are introduced into an animal, they will ultimately lead to production of, e.g., a peptide or protein, which will in turn elicit an immune response.

[0030] When administered to a subject, antigens specifically interact with an antigen recognition molecule of the immune system, such as, e.g., an immunoglobulin (antibody) or T cell antigen receptor (TCR) to elicit an immune response leading to the formation of memory cells (e.g., memory B- and T-cells) and protective immunity. Some antigens require co-administration with an adjuvant or carrier to illicit an immune response.

[0031] A vaccine can contain a component (e.g., a vector) that produces an antigen in addition to or in place of an antigen. The terms "vector", "cloning vector", and "expression vector" mean the vehicle by which a nucleic acid sequence (e.g., a foreign gene) can be introduced into a host cell, so as to transform the host and promote expression (e.g., transcription and/or translation) of the introduced sequence of an antigen. Vectors include plasmids, phages, and viruses (e.g., a RNA virus such as retroviruses and lentiviruses).

[0032] In certain embodiments of the present invention where the antigen is an infectious agent, the infectious agent may be an agent that is capable of infecting an animal. For example, the infectious agent may be capable of infecting a human, avian (e.g., chicken, turkey, duck, pigeon, etc.), canine, feline, bovine, porcine, or equine animal.

[0033] Non-limiting examples of disease pathogens and/or conditions for which antigens can elicit protective immunity are influenza virus, Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus, rhinovirus, parainfluenza virus, parvovirus (e.g., duck parvovirus), adenovirus, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, avian leukosis, infectious bursal disease, reovirus, pox, laryngotracheitis, Marek's disease, tetanus, hepatitis B, malaria, pneumococcal pneumonia, rotavirus, parvovirus, coronavirus, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Vibrio* and *Giardia*, *Entamoeba*, and *Cryptosporidium*. Antigens can also elicit protective immunity against a malignancy (e.g., solid or blood tumors such as sarcomas, carcinomas, gliomas, blastomas, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, lymphoma, leukemia, and melanoma).

[0034] In certain embodiments, the antigen is an influenza virus, e.g., an inactivated influenza virus. The inactivated influenza virus may be obtained by traditional methods or by so-called "reverse genetics" techniques. Exemplary reverse genetics methods that can be used to make influenza virus antigens for use in the vaccine compositions of the present invention are disclosed, e.g., in U.S. Patent Nos. 6,951,754, 5,578,473, 5,820,871, 6,887,699, 6,544,785, and in U.S. Patent Appl. Publication Nos. 2003/0035814, 2006/0134138, 2006/0057116, 2005/0037487, 2005/0003349, 2006/0166321, and 2004/0142003. The contents of the aforementioned patents and patent application publications are incorporated by reference herein in their entireties.

[0035] Any inactivated influenza viruses can be used in the context of the present invention including any inactivated influenza A strain (e.g., avian influenza strain). The influenza viruses may be recombinant influenza viruses produced by traditional egg-based methods or by reverse genetics techniques mentioned hereinabove. The recombinant viruses may possess any combination of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) subtypes. Exemplary inactivated influenza virus that can be used as an antigen in the context of the present invention include viruses with an H1, H5, H7 or H9 hemagglutinin combined with any of N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 or N9. In general, the hemagglutinin subtype of the antigen is chosen on the basis of the hemagglutinin subtype(s) exhibited by circulating infectious influenza strains.

[0036] When the antigen is an inactivated influenza virus such as, e.g., H5N3 or H5N9, the amount of antigen in the vaccine composition is typically expressed in terms of hemagglutination units (HAU) per dose. For instance, in certain embodiments of the invention, the antigen is an inactivated influenza virus and is present in the vaccine composition in an amount of 50 to 1000 HAU per dose. In particular embodiments, each dose of vaccine composition contains about 50, about 55, about 60, about 65, about 70, about 75, about 80, about 85, about 90, about 95, about 100, about 105, about 110, about 115, about 120, about 125, about 130, about 135, about 140, about 145, about 150, about 155, about 160, about 165, about 170, about 175, about 180, about 185, about 190, about 195, about 200, about 205, about

210, about 215, about 220, about 225, about 230, about 235, about 240, about 245, about 250, about 255, about 260, about 265, about 270, about 275, about 280, about 285, about 290, about 295, about 300, about 305, about 310, about 315, about 320, about 325, about 330, about 335, about 340, about 345, about 350, about 355, about 360, about 365, about 370, about 375, about 380, about 385, about 390, about 395, about 400, about 405, about 410, about 415, about 420, about 425, about 430, about 435, about 440, about 445, about 450, about 455, about 460, about 465, about 470, about 475, about 480, about 485, about 490, about 495, about 500, about 505, about 510, about 515, about 520, about 525, about 530, about 535, about 540, about 545, about 550, about 555, about 560, about 565, about 570, about 575, about 580, about 585, about 590, about 595, about 600, about 605, about 610, about 615, about 620, about 625, about 630, about 635, about 640, about 645, about 650, about 655, about 660, about 665, about 670, about 675, about 680, about 685, about 690, about 695, about 700, about 705, about 710, about 715, about 720, about 725, about 730, about 735, about 740, about 745, about 750, about 755, about 760, about 765, about 770, about 775, about 780, about 785, about 790, about 795, about 800, about 805, about 810, about 815, about 820, about 825, about 830, about 835, about 840, about 845, about 850, about 855, about 860, about 865, about 870, about 875, about 880, about 885, about 890, about 895, about 900, about 905, about 910, about 915, about 920, about 925, about 930, about 935, about 940, about 945, about 950, about 955, about 960, about 965, about 970, about 975, about 980, about 985, about 990, about 995, or about 1000 HAU.

[0037] In certain other embodiments, each dose of vaccine composition contains about 182 HAU, 256 HAU or 512 HAU.

OIL COMPONENT

[0038] The vaccine compositions of the present invention also include an oil component. Examples of oils that can be included in the oil component include without limitation terpene oils such as squalane and squalene; vegetable oils such as soybean oil, olive oil, corn oil, jojoba oil, peanut oil, cottonseed oil, sunflower oil, safflower oil, sesame oil, apricot oil, avocado oil, wheat germ oil, canola oil, linseed

oil, and almond oil; fish oils such as shark oil, orange roughy oil, Menhaden oil, and cod liver oil; animal oils such as mink oil, lard oil, and chicken fat oil; and synthetic oils such as ethyl oleate, isopropyl myristate, Miglyol[®] 840 (Sasol North America Inc., Houston, TX), and Captex[®] 300 (Abitec Corp., Columbus, Ohio) as well as mineral oil (available from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), triglyceride oil, propylene glycol derivatives, and pristane. The preferred oil of the oil phase is mineral oil. Combinations of these oils may also be used.

ADDITIONAL COMPONENTS

[0039] In certain embodiments of the present invention, the vaccine compositions may include one or more additional components such as, e.g., surfactants, buffers and stabilizing compounds.

[0040] Oil soluble surfactants include Arlacel[®] 83 (sorbitan sesquioleate, available from Uniquema, New Castle, DE), Arlacel[®] A (mannide monooleate, available from Uniquema, New Castle, DE), Arlacel[®] 80 (available from Uniquema, New Castle, DE), Span[®] 80 (sorbitane monooleate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), L121 poloxamer 401 (Pluronic[®] L121, BASF Corp., Florham Park, NJ). One preferred oil soluble surfactant is Arlacel[®] 83.

[0041] Water soluble surfactants include Tween[®] 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). One preferred water soluble surfactant is Tween[®] 80.

[0042] Aqueous phases can include a pH buffering component such as PBS (phosphate buffered saline), preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid), flavoring, coloring and sweetening agents.

[0043] Emulsions may be stabilized by inclusion of one or more stabilizers compounds. Classes of stabilizers include polymeric stabilizers and low molecular weight stabilizers. Polymeric stabilizers form gels in the bulk phases or other

24

structures at interfaces and increase the viscosity of one or more of the phases or interfaces. Polymeric stabilizers include without limitation, proteins, starches, gums, cellulose, polyvinyl alcohols, polyacrylic acid and polyvinyl pyrrolidone. These materials bind to the interface by covalent bonds or by electrostatic and hydrophobic interactions. They form an "interfacial complex" which is defined as an association of two or more surface active molecules at an interface in a relationship that does not exist in either of the bulk phases. Examples of low molecular weight stabilizers are, without limitation, cholesterol and fatty acid salts of divalent cations such as aluminum stearate.

METHODS OF MAKING THE VACCINE COMPOSITIONS OF THE INVENTION

[0044] The present invention also includes methods for making vaccine compositions. In one embodiment, the methods of the invention comprise emulsifying an oil component with an aqueous component. As described in more detail above, the aqueous component of the vaccine composition comprises at least one antigen and at least one adjuvant selected from the group consisting of an acrylic polymer and DDA. Any of the oil components, antigens, adjuvants and variations thereof that are described elsewhere herein can be used in the methods of the present invention.

[0045] In a particular embodiment, a method for making a vaccine composition is provided, wherein the method comprises: (a) combining an aqueous solution of an antigen with at least one adjuvant selected from the group consisting of an acrylic polymer and DDA to form an antigen/adjuvant mixture; (b) combining the antigen/adjuvant mixture of (a) with an oil component and an emulsifier to form an antigen/adjuvant/oil component mixture; and (c) emulsifying the antigen/adjuvant/oil component mixture of (b) to form a water-in-oil emulsion, thereby forming a vaccine composition.

[0046] The methods of the invention comprise emulsifying an oil component with an aqueous component to form, e.g., a water-in-oil (WO) emulsion. Methods for preparing water-in-oil emulsions for vaccine compositions are well known in the art.

See, e.g., U.S. Patents No. 5,109,026 and 5,744,137. In general, an aqueous phase (optionally including a surfactant) and an oil phase (optionally including a surfactant) are prepared and mixed to form a water-in-oil emulsion.

[0047] For example, water-in-oil emulsions of Carbopol or Carbopol + DDA may be prepared as follows: An aqueous phase is prepared by mixing one or more antigens and, optionally, Carbopol® or Carbopol® + DDA sequentially or simultaneously in an aqueous solution to form a homogenous mixture. A water soluble surfactant may optionally be mixed with the antigen-containing aqueous mixture. Additional aqueous components including additional adjuvants can be added to the aqueous phase. A flowchart illustrating one exemplary method for preparing a vaccine formulation of the invention is set forth in Figure 1.

[0048] The total volume of each dose of vaccine composition can be, e.g., from 0.05 mL to 2.0 mL. For example, in certain embodiments, the volume of the dose of the vaccine composition is about 0.05 mL, about 0.10 mL, about 0.15 mL, about 0.20 mL, about 0.25 mL, about 0.30 mL, about 0.35 mL, about 0.40 mL, about 0.45 mL, about 0.50 mL, about 0.55 mL, about 0.60 mL, about 0.65 mL, about 0.70 mL, about 0.75 mL, about 0.80 mL, about 0.85 mL, about 0.90 mL, about 0.95 mL, or about 1.0 mL.

[0049] In preparing the vaccine compositions of the present invention, various proportions of aqueous component (e.g., the antigen in aqueous solution combined with adjuvant) to oil component can be used, as set forth in the following **Table 1**:

TABLE 1

Aqueous Component	Oil Component
5%	95%
10%	90%
15%	85%
20%	80%
25%	75%
30%	70%
35%	65%
40%	60%

Aqueous Component	Oil Component
45%	55%
50%	50%
55%	45%
60%	40%
65%	35%
70%	30%
75%	25%
80%	20%
85%	15%
90%	10%
95%	5%

[0050] One way to prepare a water-in-oil emulsion is to add the aqueous phase to the oil phase. This mixture is then manually shaken for 15 to 20 seconds, emulsified for 20 seconds using a high-shear probe (Brinkman homogenizer, Brinkman Instruments, Westbury, N.Y.) Polytron 10/35, vortexed, or similarly mixed using a technique familiar to those skilled in the art.

[0051] For industrial preparation of the surfactant composition-containing water-in-oil emulsion vaccines, the oil and surfactant-containing aqueous phases may be mixed with a Silverson homogenizer.

[0052] Those skilled in the art can appreciate that the relative quantities of the aqueous phase containing the antigen, the oil phase, and the surfactants can be adjusted to achieve emulsions with specific desired properties of viscosity.

METHODS OF VACCINATING AN ANIMAL

[0053] The present invention also includes methods of vaccinating an animal. The methods of the invention comprise administering to an animal any of the vaccine compositions described elsewhere herein.

[0054] The vaccine compositions of the invention can be administered to any animal, including, e.g., human, avian, canine, feline, bovine, porcine or equine animals. Exemplary avian animals include, e.g., avian animals, whether domestic or wild, and particularly to those which are commercially reared for meat or egg

production. Without limitation thereto, exemplary avians include chickens, turkeys, geese, ducks, pheasants, and the like.

[0055] Vaccine formulations can be administered by, without limitation, transdermal delivery, or by transmucosal administration, including but not limited to, oral, buccal, intranasal, ophthalmic, vaginal, rectal, intracerebral, intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous routes, via scarification (scratching through the top layers of skin, e.g., using a bifurcated needle), by inhalation (pulmonary) or insufflation (either through the mouth or the nose), or by administration to antigen presenting cells, such as dendritic cells (DC), *ex vivo* followed by administration of the cells to the subject, or by any other standard route of immunization.

[0056] Preferably, the vaccine compositions of the invention can be delivered parenterally, *i.e.*, by intravenous (i.v.), subcutaneous (s.c.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), subdermal (s.d.), or intradermal (i.d.) administration, by direct injection, via, for example, bolus injection, continuous infusion, or gene gun (e.g., to administer a vector vaccine to a subject, such as naked DNA or RNA). Formulations for injection can be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative.

[0057] For administration by inhalation, the therapeutics according to the present invention can be conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoro-methane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit can be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, e.g., gelatin for use in an inhaler or insufflator can be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

[0058] Compositions of the present invention can also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas.

[0059] According to the methods of the present invention, the vaccine compositions described herein are administered to a subject at therapeutically effective doses, preferably, with minimal toxicity.

[0060] The term "therapeutically effective" applied to the terms dose or amount refers to a quantity of a compound or pharmaceutical composition or vaccine that is sufficient to result in a desired activity upon administration to an animal in need of the compound, pharmaceutical composition or vaccine. As used herein with respect to adjuvant- and antigen-containing compositions or vaccines, the term "therapeutically effective amount/dose" is used interchangeably with the term "immunogenically effective amount/dose" and refers to the amount/dose of a compound (e.g., an antigen and/or an adjuvant) or pharmaceutical composition or vaccine that is sufficient to produce an effective immune response upon administration to an animal.

[0061] The phrase "pharmaceutically acceptable," refers to molecular entities and other ingredients of such compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce untoward reactions when administered to a human. Preferably, as used herein, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in mammals, and more particularly in humans.

[0062] A therapeutically effective dose can be determined from dose-response curves using methods well known in the art. An example of a dose-response curve is described, without limitation, in Example 4 below.

[0063] The dose of adjuvant, antigen(s) and other components in vaccine compositions should be in amounts such that the dose of antigen administered continuously or intermittently will not exceed a certain amount in consideration of the results in test animals and the individual conditions of a subject.

[0064] A specific dosage regimen will vary depending on the dosage procedure, the conditions of a patient or a subject animal such as age, body weight, sex, sensitivity, feed, dosage period, drugs used in combination, seriousness of the disease. The appropriate dose and dosage times under certain conditions can be determined by a practitioner according to each patient's circumstances and according to standard clinical techniques.

[0065] Toxicity and therapeutic efficacy of adjuvant-containing immunogenic compositions can be determined by standard pharmaceutical procedures in experimental animals, e.g., by determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Compositions that exhibit large therapeutic indices are preferred. While therapeutics that exhibit toxic side effects can be used (e.g., when treating severe forms of cancer or life-threatening infections), care should be taken to design a delivery system that targets such immunogenic compositions to the specific site (e.g., lymphoid tissue mediating an immune response, tumor or an organ supporting replication of the infectious agent) in order to minimize potential damage to other tissues and organs and, thereby, reduce side effects.

KITS COMPRISING COMPONENTS FOR MAKING VACCINE COMPOSITIONS

[0066] In certain embodiments, the invention provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more ingredients of an immunogenic formulation. In a preferred embodiment, a kit for the preparation of a pharmaceutical or vaccine composition comprises at least one antigen, adjuvant (e.g., Carbopol® or Carbopol® + DDA), an oil phase, and an aqueous phase, the kit comprising the components in different containers, and optionally instructions for admixing the components and/or for administration of the composition. Each container of the kit may also optionally include one or more physiologically acceptable carriers and/or excipients and/or auxiliary substances. Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products,

which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration.

[0067] Vaccine compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device which may contain one or more unit dosage forms containing an active ingredient (*i.e.*, an antigen and/or adjuvant). The pack may, for example, comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration. Compositions formulated in a compatible pharmaceutical carrier may also be prepared, placed in an appropriate container, and labeled for vaccination against an indicated pathogen and/or condition.

MOLECULAR BIOLOGY DEFINITIONS

[0068] In accordance with the present invention there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are well-known and are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); and F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

[0069] A "nucleic acid molecule" (or alternatively "nucleic acid") refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine, or cytidine: "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine: "DNA molecules"), or any phosphoester analogs thereof, such as phosphorothioates and thioesters, in either single stranded form, or a double-stranded helix. Oligonucleotides (having fewer

than 100 nucleotide constituent units) or polynucleotides are included within the defined term as well as double stranded DNA-DNA, DNA-RNA, and RNA-RNA helices. This term, for instance, includes double-stranded DNA found, *inter alia*, in linear (e.g., restriction fragments) or circular DNA molecules, plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of DNA (*i.e.*, the strand having a sequence homologous to the mRNA). A "recombinant DNA molecule" is a DNA molecule that has undergone a molecular biological manipulation.

[0070] As used herein, the term "polypeptide" refers to an amino acid-based polymer, which can be encoded by a nucleic acid or prepared synthetically. Polypeptides can be proteins, protein fragments, chimeric proteins, etc. Generally, the term "protein" refers to a polypeptide expressed endogenously in a cell. Generally, a DNA sequence encoding a particular protein or enzyme is "transcribed" into a corresponding sequence of mRNA. The mRNA sequence is, in turn, "translated" into the sequence of amino acids which form a protein. An "amino acid sequence" is any chain of two or more amino acids. The term "peptide" is usually used for amino acid-based polymers having fewer than 100 amino acid constituent units, whereas the term "polypeptide" is reserved for polymers having at least 100 such units. Herein, however, "polypeptide" will be the generic term.

[0071] The following examples are illustrative, but not limiting, of the method and compositions of the present invention. Other suitable modifications and adaptations of the variety of conditions and parameters normally encountered in molecular biology and chemistry which are obvious to those skilled in the art in view of the present disclosure are within the spirit and scope of the invention.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

PREPARATION OF CONTROL WATER-IN-OIL EMULSION VACCINE
FORMULATION

[0072] Inactivated reverse genetics H5N3 avian influenza (Liu *et al.*, *Virology* 314:580-590 (2003)) was added to sterile saline. The mixture was allowed to stir to form a homogenous mixture. Tween[®] 80 (7.2 mL) was added to the mixture followed by mixing to form a homogeneous aqueous mixture.

[0073] The aqueous mixture was slowly added to a mineral oil/Arlacel[®] 83V mixture (720 mL), such that the aqueous mixture was 40% of the total volume and the oil mixture was 60% of the total volume, to form a water-in-oil emulsion.

EXAMPLE 2

PREPARATION OF WATER-IN-OIL EMULSION VACCINES CONTAINING AN
ADJUVANT IN THE AQUEOUS PHASE

[0074] Water-in-oil emulsions containing an adjuvant in the aqueous phase were prepared essentially as described in Example 1. Inactivated H5N3 avian influenza and 1 of the 5 adjuvants from Table 2 was added to sterile saline to a total volume of 197 mL. The mixture was allowed to stir to form a homogenous mixture. Tween[®] 80 (3.0 mL) was added to the mixture followed by mixing to form a homogeneous aqueous mixture.

[0075] The aqueous mixture was slowly added to a mineral oil/Arlacel[®] 83V mixture (300 mL), such that the aqueous mixture was 40% of the total volume and the oil mixture was 60% of the total volume, to form a water-in-oil emulsion. Thus, 5 emulsion vaccines were prepared with 5 different adjuvants.

Table 2: Adjuvants added to the Water-in-Oil Emulsion Vaccine Formulation

Adjuvant	Amount
Al(OH) ₃ reHydragel [®]	58.5 mL
Carbopol [®]	50 mL of a 2% solution
Carbopol [®] + DDA	33 mL of a 2% solution of Carbopol + 16.5 g DDA
CMC (carboxyl methylcellulose)	1 g
HPMC (hydroxypropyl methylcellulose)	1 g

EXAMPLE 3**DOSAGE DETERMINATION FOR INOCULATION OF TURKEYS**

[0076] Turkeys were inoculated with 128, 256, or 512 HAU (hemagglutination unit)/0.5 mL of vaccine without adjuvant, as described in Example 1. The HI (hemagglutination inhibition) titer of the blood from the inoculated turkeys was measured 3, 6, and 9 weeks after inoculation. The samples were tested with a hemagglutination inhibition (HI) assay (World Health Organization Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5). Results are shown in **Fig. 2**. Although each dosage gave reasonably good serological response initially, the HI titers fell dramatically soon thereafter.

EXAMPLE 4**INOCULATION OF TURKEYS WITH THE WATER-IN-OIL EMULSION VACCINE
CONTAINING AN ADJUVANT IN THE AQUEOUS PHASE**

[0077] Turkeys were inoculated with vaccines containing adjuvants in the aqueous phase as described in Example 2. Ten 1-week old turkeys were vaccinated with 0.5 mL of the vaccine (256 HAU/dose). As controls, 10 turkeys were inoculated with the formulation described in Example 1 and 10 turkeys were not inoculated. Inoculated turkeys were given a second vaccination booster of 0.5 mL of vaccine (256 HAU/dose) 3 weeks after the first vaccination. Blood serum samples from the turkeys were taken at 4, 7, and 10 weeks of age and tested using the same

hemagglutination inhibition assay used in Example 4. Table 3 provides a tabular description of the experimental protocol as described above.

Table 3: Protocol for Testing the Efficacy of Water-in-Oil Emulsion Vaccine Formulation containing an Adjuvant in the Aqueous Phase

Age of Turkeys	Activity
1 week	Bleed all turkeys. Vaccinate turkeys designated for vaccination
4 weeks	Bleed all turkeys. Revaccinate turkeys designated for vaccination
7 weeks	Bleed all turkeys.
10 weeks	Bleed all turkeys.

[0078] Results of control and experimental vaccinations are given in Table 4 and Figure 3. The results demonstrate the effectiveness of vaccines comprising the Carbopol® or Carbopol® + DDA adjuvants.

Table 4: HI Titers for 11-week old Turkeys Inoculated with a Water-in-Oil Emulsion Vaccine Formulation with or without an Adjuvant in the Aqueous Phase)

Group	256 HAU	Carbopol®	Carbopol® + DDA	vaccine w/o adjuvant	CMC	HPMC	AlOH ₃ reHydragel
HI GMT	120	222.5	232.5	133	97.14	140	82.5

(HI GMT = hemagglutination inhibition geometric mean titers)

EXAMPLE 5

ENHANCED IMMUNE RESPONSE IN TURKEYS OBTAINED USING A WATER-IN-OIL VACCINE COMPOSITION CONTAINING CARBOPOL AND DDA

[0079] In this example, vaccine compositions containing an avian influenza antigen in a water-in-oil emulsion, with or without Carbopol or Carbopol + DDA, were used to vaccinate turkeys, and the immune responses to the influenza antigen were evaluated.

[0080] The vaccine compositions used in this Example were prepared essentially using the general method outlined in Figure 1. Briefly, an aqueous solution comprising avian influenza H5N9 inactivated virus was combined with an emulsifier, with or without 0.2% Carbopol or 0.2 % Carbopol + 0.5 g/mL DDA. The resulting mixture was slowly added to mineral oil and then subjected to emulsification/homogenization to produce either a "standard emulsion" (lacking Carbopol and DDA) or a "Carbopol emulsion" or a "Carbopol + DDA emulsion." The amount of inactivated H5N9 in the final emulsions was 512 HAU (as measured by testing on the pre-inactivated viral stock) per 0.5 mL dose.

[0081] Four groups of turkeys were used in this Example, each group consisting of 20 one-week-old commercial white turkeys. The experimental design is summarized in the following table 5:

TABLE 5

Treatment Group	Vaccine Composition	# turkeys / route / vol.
1	Standard Emulsion	20 / IM / 0.5 mL
2	Carbopol Emulsion	20 / IM / 0.5 mL
3	Carbopol + DDA Emulsion	20 / IM / 0.5 mL
4	Non-vaccinated Controls	20 / n.a. / n.a.

IM = intramuscular administration (turkeys were vaccinated intramuscularly in the breast).

[0082] The birds in groups 1, 2 and 3 were administered the corresponding vaccine compositions at one week of age followed by a booster vaccination at 4 weeks of age. Blood samples were collected at the time of the initial vaccination and at the time of the booster vaccination and at three-week intervals thereafter (*i.e.*, at 7, 10, 13, 16 and 19 weeks of age). The samples were tested with a hemagglutination inhibition (HI) assay (World Health Organization Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5). The HI assay was performed using a beta-propiolactone (BPL) inactivated H5N9 antigen stock.

[0083] The results of the HI assays (expressed in terms of geometric mean titers (GMT)) are shown in the following table 6:

TABLE 6

Treatment Group	Hemagglutination Inhibition GMT** at:					
	3 wpv1	3 wpv2	6 wpv2	9 wpv2	12 wpv2	15 wpv2
1 (standard emulsion)	26	111	74	26	18	25
2 (Carbopol)	36	453	333	187	118	83
3 (Carbopol + DDA)	36	67	51	28	29	33
4 (nonvaccinated control)	5	5	5	5	5	5

wpv1 = weeks post vaccination 1; wpv2 = weeks post vaccination 2

** For calculation of GMT, an individual bird titer that was negative at 1:10 (the lowest dilution tested) was assigned a value of 5.

[0084] Turkeys vaccinated with H5N9 antigen + Carbopol emulsion (Group 2) or with H5N9 antigen + Carbopol + DDA emulsion (Group 3) exhibited higher HI GMTs as compared to birds vaccinated with H5N9 antigen only standard emulsion (Group 1). Further, the higher level of serologic response in turkeys administered the Carbopol inclusive emulsion lasted for the duration of the study to 15 weeks after booster vaccination (turkeys at 19 weeks of age).

[0085] In this Example, a general enhancement of serologic response was observed to avian influenza in turkeys administered a water-in-oil vaccine emulsion inclusive of Carbopol or Carbopol + DDA in the aqueous phase. This enhancement occurred with a conventional low-pathogenic H5N9 isolate, similar to the results observed utilizing the reverse genetics origin low-pathogenic H5N3 isolate (Example 4). Therefore, the enhanced immune response can be attributed to the adjuvant and is apparently applicable to a variety of antigens.

EXAMPLE 6

ENHANCED IMMUNE RESPONSE IN DUCKS OBTAINED USING A WATER-IN-OIL VACCINE COMPOSITION CONTAINING CARBOPOL

[0086] In this example, vaccine compositions containing an avian influenza antigen in a water-in-oil emulsion, with or without Carbopol in the aqueous phase, were used to vaccinate four different breeds of ducks, and the immune responses to the influenza antigen were evaluated.

[0087] The vaccine compositions used in this Example were prepared essentially using the general method outlined in Figure 1. Briefly, an aqueous solution comprising reverse genetics avian influenza H5N3 inactivated virus ("rg-H5N3," see Example 1) was combined with an emulsifier, with or without 0.2% Carbopol. The resulting mixture was slowly added to mineral oil and then subjected to emulsification/homogenization to produce either a "standard emulsion" (lacking Carbopol) or a "Carbopol emulsion" (containing 0.2% Carbopol in the aqueous phase). The amount of rg-H5N3 in the final emulsions was 256 HAU per 0.5 mL dose.

[0088] In this Example, four different breeds of duck were used: Pekin, Mallard, Khaki Campbell and Golden Hybrid 300. Each breed of duck was subdivided into three different treatment groups as shown in the following table 7:

TABLE 7

Breed	Treatment Group	Vaccine Composition	Number of Ducks per Treatment Group
Pekin	1	Standard Emulsion	20
	2	Carbopol Emulsion	20
	3	Nonvaccinated Controls	10
Mallard	1	Standard Emulsion	20
	2	Carbopol Emulsion	20
	3	Nonvaccinated Controls	10
Khaki Campbell	1	Standard Emulsion	20
	2	Carbopol Emulsion	20
	3	Nonvaccinated Controls	10
Golden Hybrid 300	1	Standard Emulsion	20
	2	Carbopol Emulsion	20
	3	Nonvaccinated Controls	10

[0089] The ducks in treatment groups 1 and 2 were vaccinated subcutaneously in the back of the neck with 0.2 mL total volume of the corresponding emulsion vaccine composition at day of age ("primary vaccination"). At three weeks of age, the ducks were boosted with 0.5 mL of the same vaccine subcutaneously in the back of the neck.

[0090] Blood samples were collected at the time of the primary vaccination and at three-week intervals thereafter, *i.e.*, at 3 weeks after the primary vaccination ("3 WPV1") and at 3, 6, 9 and 12 weeks after the booster vaccination ("3 WPV2," "6 WPV2," "9 WPV2," and "12 WPV2."). The samples were tested with a hemagglutination inhibition (HI) assay (World Health Organization Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5). The HI assay was performed using a beta-propiolactone (BPL) inactivated H5N3 antigen stock.

[0091] Sera collected from representative ducks of each breed at day-of-age (prior to vaccination) was free of HI detectable antibody to avian influenza. (Data not shown.) The results of the HI assays (expressed in terms of geometric mean titers (GMT)) for the remaining time points are shown in the following table 8:

TABLE 8

Breed	Treatment Group	Hemagglutination Inhibition GMT** at:				
		3 WPV1	3 WPV2	6 WPV2	9 WPV2	12 WPV2
Pekin	1 (standard emulsion)	9	14	12	7	6
	2 (Carbopol)	17	180	80	52	50
	3 (nonvaccinated)	5	5	5	5	5
Mallard	1 (standard emulsion)	8	90	36	20	24
	2 (Carbopol)	34	170	120	97	67
	3 (nonvaccinated)	5	5	5	5	5
Khaki Campbell	1 (standard emulsion)	11	115	42	16	16
	2 (Carbopol)	29	238	138	76	57
	3 (nonvaccinated)	5	5	5	5	5
Golden Hybrid 300†	1 (standard emulsion)	17	126	83	72	75
	2 (Carbopol)	28	107	50	38	25
	3 (nonvaccinated)	5	5	5	5	5

WPV1 = weeks post vaccination 1; WPV2 = weeks post vaccination 2.

† It is suspected that the 'standard emulsion' results and 'Carbopol' results for Golden Hybrid 300 ducks were inadvertently switched at some point during the experiment.

** For calculation of GMT, an individual bird titer that was negative at 1:10 (the lowest dilution tested) was assigned a value of 5.

[0092] The results presented above show that water-in-oil vaccine compositions formulated with Carbopol in the aqueous phase produced significantly greater immune responses in most breeds of duck tested as compared to water-in-oil vaccine compositions formulated without Carbopol in the aqueous phase. These

results further confirm that water-in-oil vaccine compositions comprising an acrylic polymer (e.g., Carbopol) in the aqueous phase provide superior immune responses as compared to conventional water-in-oil vaccine compositions.

* * *

[0093] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, this invention is not limited to the particular embodiments disclosed, but is intended to cover all changes and modifications that are within the spirit and scope of the invention as defined by the appended claims.

[0094] All publications and patents mentioned in this specification are indicative of the level of skill of those skilled in the art to which this invention pertains. All publications and patents are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A vaccine composition comprising a water-in-oil emulsion,
wherein said emulsion comprises an oil component and an aqueous component; and
wherein said aqueous component comprises at least one antigen and at least one adjuvant selected from the group consisting of an acrylic polymer and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).
2. The vaccine composition of claim 1, wherein said at least one adjuvant is an acrylic polymer.
3. The vaccine composition of claim 2, wherein said acrylic polymer is a polymer of acrylic acid crosslinked with polyallyl sucrose.
4. The vaccine composition of claim 2, wherein said acrylic polymer is an alkyl-polyacrylic acid ("alkyl-PAA") adjuvant.
5. The vaccine composition of claim 4, wherein said alkyl-PAA adjuvant is selected from the group consisting of decyl-PAA, octyl-PAA, butyl-PAA and methyl-PAA.
6. The vaccine composition of claim 5, wherein said alkyl-PAA adjuvant is octyl-PAA.
7. The vaccine composition of claim 1, wherein said at least one adjuvant is dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).
8. The vaccine composition of claim 1, wherein said aqueous component comprises both an acrylic polymer and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).

9. The vaccine composition of claim 7, wherein said acrylic polymer is a polymer of acrylic acid crosslinked with polyallyl sucrose.
10. The vaccine composition of claim 1, wherein said at least one antigen is an infectious agent.
11. The vaccine composition of claim 10, wherein said infectious agent is a live infectious agent.
12. The vaccine composition of claim 10, wherein said infectious agent is a killed or inactivated infectious agent.
13. The vaccine composition of claim 10, wherein said infectious agent is a virus, bacterium, fungus, or parasite.
14. The vaccine composition of claim 1, wherein said at least one antigen is a peptide, polypeptide, or nucleic acid.
15. The vaccine composition of claim 10, wherein said infectious agent is a virus.
16. The vaccine composition of claim 10, wherein said infectious agent is an agent that is capable of infecting an avian, canine, feline, bovine, porcine, or equine animal.
17. The vaccine composition of claim 16, wherein said infectious agent is an agent that is capable of infecting an avian animal.
18. The vaccine composition of claim 15, wherein said virus is an influenza virus.
19. The vaccine composition of claim 1, wherein said oil component comprises mineral oil.

20. The vaccine composition of claim 1, wherein said composition further comprises one or more emulsifier.
21. The vaccine composition of claim 1, wherein said aqueous component further comprises lecithin.
22. A method of vaccinating an animal, said method comprising administering to the animal the vaccine composition of claim 1.
23. The method of claim 22, wherein the animal is an avian, canine, feline, bovine, porcine, or equine animal.
24. A method for making a vaccine composition, said method comprising emulsifying an oil component with an aqueous component,
wherein said aqueous component comprises at least one antigen and at least one adjuvant selected from the group consisting of an acrylic polymer and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).
25. The method of claim 24, wherein said at least one adjuvant is an acrylic polymer.
26. The method of claim 25, wherein said acrylic polymer is a polymer of acrylic acid crosslinked with polyallyl sucrose.
27. The method of claim 24, wherein said at least one adjuvant is dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).
28. The method of claim 24, wherein said aqueous component comprises both an acrylic polymer and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).

29. The method of claim 28, wherein said acrylic polymer is a polymer of acrylic acid crosslinked with polyallyl sucrose.
30. A method for making a vaccine composition, said method comprising:
- (a) combining an aqueous solution of an antigen with at least one adjuvant selected from the group consisting of an acrylic polymer and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA) to form an antigen/adjuvant mixture;
 - (b) combining said antigen/adjuvant mixture of (a) with an oil component and an emulsifier to form an antigen/adjuvant/oil component mixture; and
 - (c) emulsifying said antigen/adjuvant/oil component mixture of (b) to form a water-in-oil emulsion, thereby forming a vaccine composition.
31. The method of claim 30, wherein said at least one adjuvant is an acrylic polymer.
32. The method of claim 31, wherein said acrylic polymer is a polymer of acrylic acid crosslinked with polyallyl sucrose.
33. The method of claim 30, wherein said at least one adjuvant is dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).
34. The method of claim 30, wherein in (a), said aqueous solution of said antigen is combined with both an acrylic polymer and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA).
35. The method of claim 34, wherein said acrylic polymer is a polymer of acrylic acid crosslinked with polyallyl sucrose.
36. The method of claim 30, wherein said oil component comprises mineral oil.

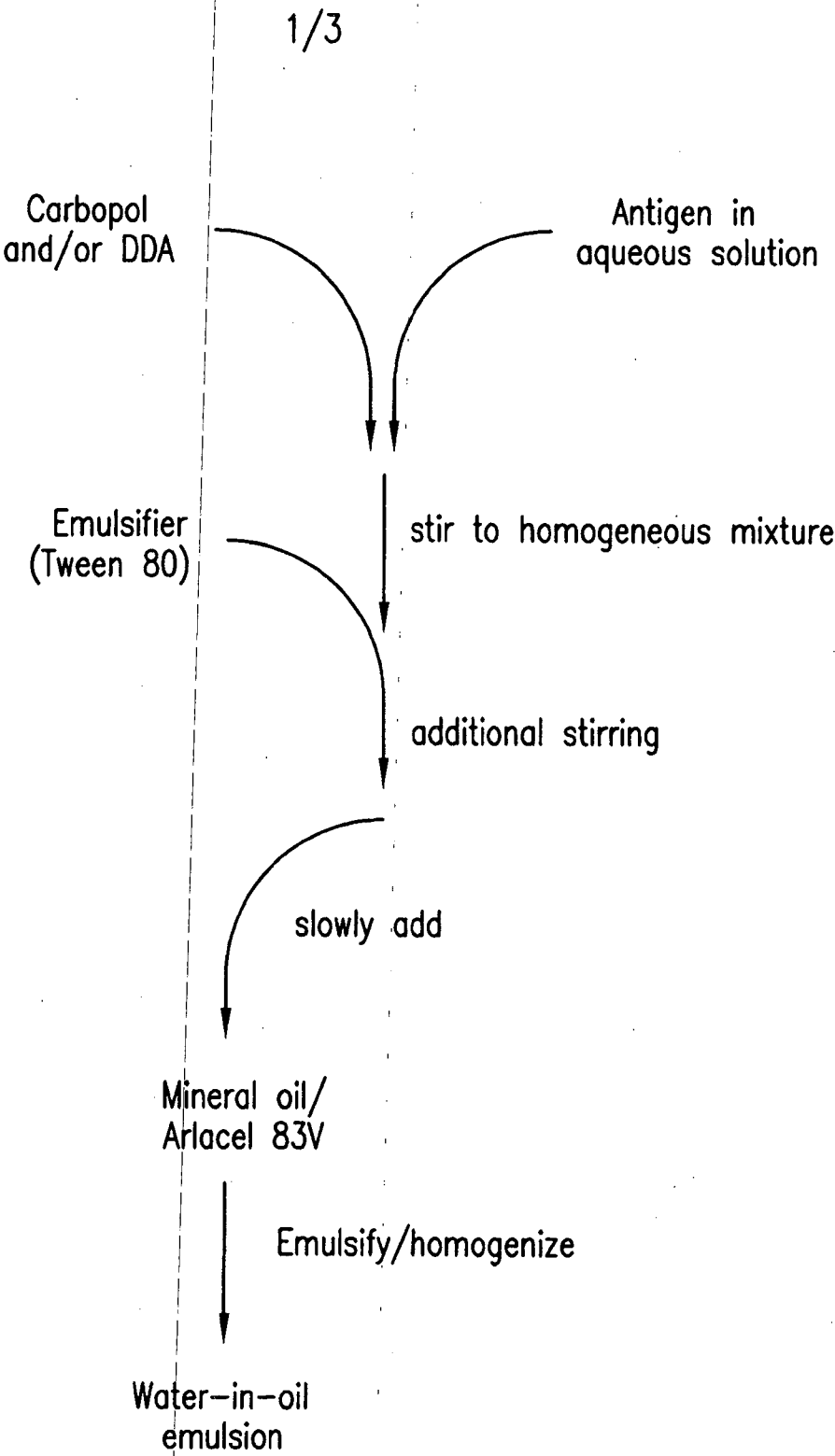


FIG. 1

2/3

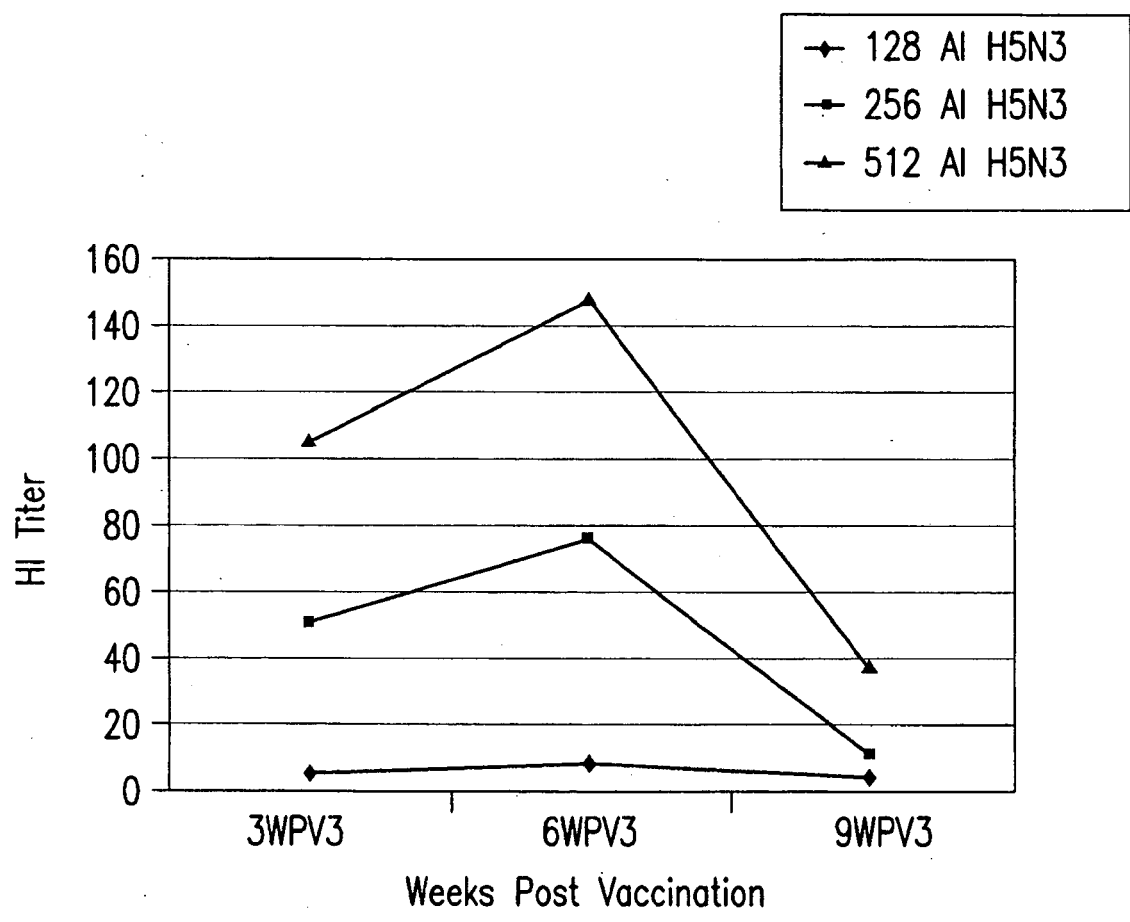


FIG.2

3/3

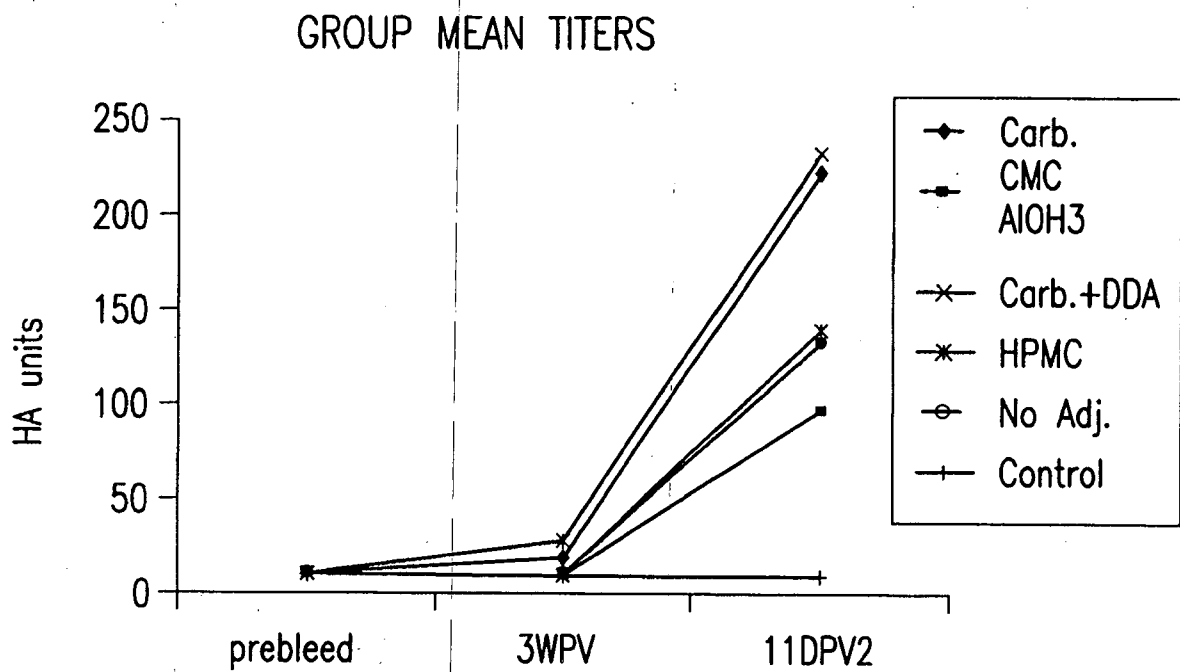


FIG.3

COMPOSICIONES PARA VACUNA EN EMULSIÓN QUE COMPRENDEN
ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE EN LA FASE ACUOSA

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con formulaciones de vacuna agua en aceite, procesos para la elaboración de las formulaciones y el uso de tales formulaciones para la vacunación de animales.

10

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

La piedra angular de muchos programas de control de enfermedades infecciosas es la inducción de la inmunidad específica mediante la vacunación con microorganismos vivos o inactivos o sus productos. Un procedimiento de vacunación efectivo permite el desarrollo de un estado de memoria inmunológica en un animal para un antígeno, lo que conduce a una respuesta inmunológica robusta y rápida en el animal, tras el contacto posterior con el antígeno. Algunos antígenos, sin embargo, sólo son débilmente inmunogénicos. Tales antígenos son incapaces de inducir una respuesta inmune suficiente para proporcionar una protección efectiva para el animal luego de la exposición posterior, o puede requerir administración con agentes adicionales que refuerzan la inmunogenicidad para proporcionar protección efectiva.

15

20

La inmunogenicidad de un antígeno se puede incrementar al administrarlo en una mezcla con sustancias, llamadas adyuvantes, que incrementan la respuesta contra el antígeno al actuar directamente en el sistema inmune o al modificar las características farmacocinéticas del antígeno e incrementar por lo tanto el tiempo de interacción entre este último y el sistema inmune.

25

30

Las emulsiones hechas de agua y aceite (por ejemplo emulsiones agua en aceite, aceite en agua, agua en aceite en agua) se pueden utilizar como adyuvantes en vacunas. Las emulsiones agua en aceite se utilizan comúnmente como adyuvantes en vacunas animales, por ejemplo, en vacunas para aves de corral. En general, para hacer una emulsión agua en aceite, se agrega lentamente un antígeno de fase acuosa al portador de aceite mineral en presencia de uno o más agentes de

35

emulsificación, lo que resulta en micelas que consiste de gotas de aceite dentro de las cuales reside el antígeno acuoso. Se considera que el componente de aceite induce la migración de las células inmunes al sitio de inyección, y también sirve para proteger el antígeno y extender el periodo de tiempo de las células inmunes para el proceso del antígeno. El resultado final es el mejoramiento de la respuesta inmune en comparación con simplemente inyectar el antígeno por si mismo.

Los adyuvantes que consisten de polímeros acrílicos se utilizan algunas veces como alternativas para emulsiones basadas en aceite en formulaciones de vacuna. Un polímero acrílico de ejemplo es un polímero soluble en agua de ácido acrílico reticulado con sacarosa polialilo que también se conoce como Carbopol. La Patente U.S. No. 5,026,546, por ejemplo, se refiere al uso de bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA) como un adyuvante de vacuna y la adición de Carbopol para mejorar la solubilidad del DDA en agua.

Las emulsiones basadas en aceite y los polímeros acrílicos tienen distintas ventajas cuando se utilizan como adyuvantes en las formulaciones de vacuna. Combinar las emulsiones agua en aceite y los polímeros acrílicos, sin embargo, se habría desalentado en razón a que se espera a que los polímeros acrílicos tales como Carbopol, serían altamente reactivos en asociación con una emulsión de aceite. Por ejemplo, la U.S. 5,026,546, discutida anteriormente, menciona el uso de Carbopol pero no proporciona sugerencia para el uso de DDA y/o Carbopol en emulsiones agua en aceite o aceite en agua. Adicionalmente, con respecto a los adyuvantes para ciertas especies tal como aves de corral, los polímeros acrílicos se evitan debido a su alta reactividad percibida en general. Así, subsiste la necesidad en la técnica para adyuvantes novedosos que proporcionen las ventajas combinadas de los polímeros acrílicos y las emulsiones agua en aceite sin las desventajas de reactividad adversa originada por los polímeros acrílicos en el animal vacunado.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que formular composiciones para vacuna en emulsión basada en aceite con un polímero acrílico tal como Carbopol en la fase acuosa incrementa significativamente la respuesta inmune generada por la composición de vacuna según se compara con las composiciones para vacuna en emulsión basada en aceite que no incluyen un

polímero acrílico. Más aún, al formular un polímero acrílico en la fase acuosa de una emulsión agua en aceite, se evita la reactividad adversa esperada del polímero acrílico en el animal.

5 Así, la presente invención proporciona composiciones para vacuna que comprenden emulsiones agua en aceite. Las emulsiones agua en aceite de la invención comprenden un componente de aceite y un componente acuoso. El componente acuoso comprende por lo menos un antígeno y por lo menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de un polímero acrílico y bromuro de dimetil
10 dioctadecil amonio (DDA). La presente invención también incluye métodos para vacunar un animal, dichos métodos comprenden administrar a un animal una composición de vacuna de la invención.

Otros aspectos de la invención incluyen métodos para elaborar composiciones para vacuna que comprenden emulsiones agua en aceite. Los métodos de la invención comprenden emulsificar un componente de aceite con un componente acuoso, en donde el componente acuoso comprende por lo menos un antígeno y por lo menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).

20 Las anteriores características y muchas otras ventajas de la invención serán mejor entendidas con referencia a la siguiente descripción detallada cuando se toma en conjunto con los dibujos acompañantes.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un método de ejemplo para elaborar una composición de vacuna en emulsión de la presente invención.

30 La figura 2 muestra los títulos HI (inhibición de hemaglutinación) de la sangre de pavos inoculada con una formulaciones para vacuna en emulsión agua en aceite que contiene antígeno de influenza aviar H5N3 inactivo.

La figura 3 muestra los títulos HI de la sangre de pavos de control y pavos inoculados con vacunas en emulsión agua en aceite que contienen antígeno de influenza aviar H5N3 inactivo y sin adyuvante Carbopol®, Carbopol® + DDA, CMC, HPMC, o
35

Al(OH)₃ (reHydrGel®). Los niveles de título HI marcados como “presangrado” es de 3 pavos sin vacuna.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5

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

10

EMULSIONES

Diferentes tipos de emulsiones utilizadas en las preparaciones de vacuna incluyen emulsiones agua en aceite, aceite en agua, y agua en aceite en agua. Un tipo preferido de emulsión para uso en el contexto de la presente invención es una emulsión agua en aceite. Una emulsión agua en aceite puede incluir adicionalmente uno o mas tensoactivos solubles, uno o mas tensoactivos solubles en agua, adyuvantes adicionales, componentes de fase acuosa adicional, estabilizantes de emulsión, o combinaciones de estos. Los métodos para elaborar agua en aceite se conocen en la técnica y se describen también aquí.

15

20

COMPOSICIONES PARA VACUNA

Como se utiliza aquí, una “composición de vacuna” es una composición que se puede utilizar para elicitar la inmunidad protectora en un receptor. Así, después que sea vacunado un sujeto con un antígeno, una vacuna evita, retrasa, o detiene la severidad del desarrollo de una enfermedad en el sujeto expuesto a la misma o un antígeno relacionado con un sujeto no vacunado. La inmunidad protectora proporcionada por una vacuna puede ser inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) o inmunidad celular, o ambas. La vacunación puede, por ejemplo, eliminar o reducir la carga de un patógeno o células infectadas, o producir cualquier otro alivio de la infección medible. La vacunación también puede reducir un límite del tumor en un sujeto inmunizado (vacunado).

25

30

35

El término “inmunidad protectora” como se utiliza aquí se refiere a inmunidad adquirida contra un antígeno en donde un sujeto a estado expuesto a un antígeno

que resulta en una respuesta inmune (activo/ adquirido o pasivo /innato, o ambos) en el sujeto que conduce a la inactivación y/o reducción en la carga de antígeno y la creación de memoria inmunológica (por ejemplo, memoria de células T o B).

- 5 La inmunidad protectora suministrada por la vacunación puede ser parcial o proporcionada en solo una fracción de sujetos vacunados. Así, una vacuna puede elicitar inmunidad protectora en una porción de la población inmunizada, ya que algunos individuos pueden fallar en montar una respuesta inmune protectora o robusta, o, en algunos casos, cualquier respuesta inmune. Esta inhabilidad puede
- 10 detener el fondo genético del individuo o debido a una condición de inmunodeficiencia (adquirida o congénita) o inmunosupresión (por ejemplo, debida al tratamiento con quimioterapia o uso de drogas inmunosupresoras, por ejemplo, para evitar el rechazo de órganos o suprimir una afección auto inmune). Las vacunas que proporcionan protección a una porción de la población inmunizada son no obstante
- 15 útiles y se consideran efectivas.

ADYUVANTES

- El término "adyuvante" como se utiliza aquí se refiere a un compuesto que mejora
- 20 una respuesta inmune del sujeto a un antígeno cuando se administra un conjunto con ese antígeno.

- La mejora mediada por el adyuvante de la respuesta inmune se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye sin limitación uno o
- 25 más de lo siguiente: (i) un incremento en el número de anticuerpos producidos en respuesta a la inmunización con la combinación de adyuvantes / antígenos versus aquellos producidos en respuesta a la inmunización con el antígeno solo; (ii) un incremento en el número de células T que reconocen el antígeno o el adyuvante; (iii) un incremento en el nivel de uno o mas de las citoquinas tipo I; y (iv) protección *in vivo* después de exposición en vivo.
- 30

- Una respuesta inmune se considera que mejora, si cualquier parámetro medible de inmunoreactividad específica de antígeno (por ejemplo, título de anticuerpo o producción de célula T) se incrementa por lo menos en 10% cuando un sujeto se
- 35 expone con un antígeno y un adyuvante comparado con un sujeto expuesto solo con el antígeno. En ciertas modalidades de la presente invención, una respuesta inmune

se mejora si cualquier parámetro medible de inmunoreactividad específica de antígeno se incrementa en por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 100%, por lo menos 125%, por lo menos 150%, por lo menos 175%, por lo menos 200%, por lo menos 225%, por lo menos 250%, por lo menos 275%, por lo menos 300%, por lo menos 350%, por lo menos 400%, por lo menos 450%, por lo menos 500%, o por lo menos 1000%.

10

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

15

Un polímero acrílico, como se utiliza aquí, es cualquier polímero o copolímero que contiene una porción acrílica. Polímeros acrílicos de ejemplo incluyen, por ejemplo, ácido poliacrílico, ácido metacrílico, metacrilato, acrilamida, acrilato, acrinitrilo, y ésteres alquilo de ácido poliacrílico. Ejemplos de copolímeros acrílicos incluyen, por ejemplo poli(acrilamida-cobutilo, metacrilato), ácido acrílico-metacrílico, acrilic-acrilamida y poli (metacrilato). Ejemplos de polímeros acrílicos disponibles comercialmente incluyen Carbopol (B. F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio), Carboset (B. F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio), Neocryl (Avecia, Inc., Wilmington, Del.), y Eudraglt (Rohm Tech, Inc., Malden, Mass). Un polímero acrílico particularmente útil para uso en las emulsiones de la presente invención es Carbopol, que se refiere también a y se conoce en la técnica, generalmente como un polímero soluble en agua de ácido acrílico reticulado con sacarosa polialilo.

25

Polímeros acrílicos específicos que se pueden incluir en la fase acuosa de las emulsiones agua en aceite de la presente invención incluyen polímeros de ácido alquilo-poliacrílico ("alquilo-PAA"), como se describe en la patente U.S. No. 6,340,464, y referencias citadas allí. Polímeros de ejemplo alquilo-PAA incluyen decilo-PAA (C10-PAA), octil-PAA (C8-PAA), butil-PAA (C4-PAA), y metilo-PAA (C1-PAA). (Ver, por ejemplo patente U.S. No. 6,340,464, Tabla I). Octil-PAA puede alternativamente ser referido como "octil-alquilo-PAA" o "OA-PAA".

30

35

En ciertas modalidades de la invención, el componente acuoso también comprende lecitina. En el contexto de la presente invención, la lecitina puede ser cualquier lecitina, por ejemplo, material lipoidal de lecitina, tal como fosfatidilcolina, que se puede utilizar para formar liposomas, fosfolípidos, lisofosfolípidos, glicolípidos y lípidos neutrales que comprenden la composición típica de lecitina. Las lecitinas son moléculas que, cuando se hidrolizan completamente, proporcionan dos moléculas de ácidos grasos, y una molécula de cada uno de glicerol, ácido fosfórico, y un compuesto nitrogenoso básico, que es usualmente colina. Los ácidos grasos obtenidos de lecitinas en hidrólisis son usualmente, pero no se limitan a, ácidos oleicos, palmíticos, y esteáricos. El ácido fosfórico se puede unir al glicerol en la posición α - o β , formando el ácido α -glicerofosfórico o β -glicerofosfórico, respectivamente, y que produce las series correspondientes de lecitinas que se conocen como lecitinas α - y β . Ejemplos de adyuvantes comprenden lecitina y un polímero acrílico como se describe en, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6,676,958.

En las composiciones para vacuna de la presente invención, el polímero acrílico y/o DDA se pueden utilizar en conjunto con uno o más adyuvantes adicionales. Adyuvantes adicionales de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, MF59, o SAF; geles minerales tal como hidróxido de aluminio (alúmina; por ejemplo, reHydragel® Al(OH)₃ disponible de Reheis Berkley HEights, HJ)), sales de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio) o sales de calcio (por ejemplo, fosfato de calcio); los adyuvantes derivados microbianamente tal como la toxina cólera (TC), toxina pertussis, toxina etiquetada por calor Escherichia coli (LT), toxinas mutantes (por ejemplo, LTK63 o LTR72), bacilos Calmette Guérin (BCG), lipopolisacáridos (LPS), micobacteria, toxina tétano, Corynebacterium parvum, motivos CpG de ADN, dipéptido muramilo, o lípido A monofosforilo; adyuvantes particulados tal como complejos inmunoestimuladores (ISCOM), liposomas, microesferas biodegradables, o saponinas (por ejemplo, QS-21); citocinas tal como IFN- γ , IL-2, IL-12, o GM-CSF; adyuvantes sintéticos tal como copolímeros de bloque no iónicos o tensoactivos, análogos de péptido muramilo (por ejemplo, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina [thr-MPD], N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-[1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi]-etilamina), polifosfazenos, polinucleótidos sintéticos, sustancias de superficie activa tal como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, emulsiones de hidrocarburo, o hemocianina de lapa ojo de cerradura

(KLH), los adyuvantes adicionales incluyen CMC (carboximetilcelulosa) y HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa).

5 Como se ilustra en los ejemplos proporcionados aquí, el uso de adyuvantes, tal como Carbopol, alquilo-PAA (por ejemplo, OA-PAA) y/o DDA en la fase acuosa de vacunas en emulsión agua en aceite mejoran sorprendentemente la antigenicidad de las vacunas como se compara con las vacunas en emulsión agua en aceite tradicionales sin adyuvantes.

10 ANTÍGENOS

15 El término "antígeno" como se utiliza aquí se refiere a un agente que cuando se introduce en un sujeto, se reconoce por el sistema inmune del anfitrión y que es capaz de elicitar una respuesta inmune y generar inmunidad protectora. Los antígenos incluyen sin limitación, "antígenos de superficie" que se expresan naturalmente en la superficie de un patógeno, o la superficie de una célula infectada, o la superficie de una célula de tumor.

20 En ciertas modalidades de la invención, el antígeno es un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser un agente infeccioso vivo o muerto o un agente infeccioso inactivado. Agentes infecciosos de ejemplo que pueden servir como antígenos en las composiciones para vacuna de la presente invención incluyen, por ejemplo, virus, bacterias, hongos, parásitos, u otros microorganismos. El antígeno puede también ser un componente o producto derivado de un virus, bacteria, hongo, 25 parásito u otro microorganismo. Alternativamente, el antígeno puede ser un producto obtenido mediante síntesis química, proteína, polipéptido, péptido, polisacárido, glicoproteína, glicolípido, ácido nucleico, o una combinación de estos. Un experto en la técnica entenderá que cuando los antígenos de ácido nucleico se introducen dentro de un animal, ellos conducirán finalmente a la producción de, por ejemplo, un péptido 30 o proteína, que elicitará una respuesta inmune.

Cuando se administra a un sujeto, los antígenos específicamente interactúan con un antígeno que reconoce la molécula del sistema inmune, tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor de antígeno de célula T (TCR) para elicitar 35 una respuesta inmune que conduce a la formación de las células de la memoria (por ejemplo células de la memoria B y T) e inmunidad protectora. Algunos antígenos

requieren la co-administración con un adyuvante o portador para elicitar una respuesta inmune.

5 Una vacuna puede contener un componente (por ejemplo, un vector) que produce un antígeno en adición a o en lugar de un antígeno. Los términos "vector", "vector de clonación", y "vector de expresión" significan el vehículo por el cual una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un gen externo) se puede introducir en una célula anfitriona, para transformar la expresión del promotor y anfitrión (por ejemplo, transcripción y/o translación) de la secuencia introducida de un antígeno. Los
10 vectores incluyen plásmidos, fagos, y virus (por ejemplo, un virus ARN tal como retrovirus y lentivirus).

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

Ejemplos no limitantes de enfermedades patógenas y/o afecciones en las cuales los
20 antígenos pueden elicitar inmunidad protectora son el virus de la influenza, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la bronquitis infecciosa, rinovirus, virus de la parainfluenza, parvovirus (por ejemplo, parvovirus de pato), adenovirus, Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Streptococcus pneumonia, Streptococcus puogenes, leucosis aviar, enfermedad bursal infecciosa, reovirus,
25 viruela, laringotraqueitis, enfermedad de Marek, tétano, hepatitis B, malaria, neumonía neumocócica, rotavirus, parvovirus, caronavirus, E. coli, Salmonella, Shigelia, Yersinia, Camfilobactoe, Clostridium, Vibrio y Giardia, Entamoeba, y Cryptosporidium. Los antígenos también pueden elicitar la inmunidad protectora contra una malignidad (por ejemplo, tumores sólidos o sanguíneos tal como
30 sarcomas, carcinomas, gliomas, blastomas, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfoma, leucemia, y melanoma).

En ciertas modalidades, el antígeno es un virus de la influenza, por ejemplo, un virus de la influenza inactivo. El virus de la influenza inactivo se puede obtener por
35 métodos tradicionales o por técnicas denominadas como "genéticas inversas". Los métodos de genéticas inversas de ejemplo se pueden utilizar para hacer antígenos

del virus de la influenza para uso en las composiciones para vacuna de la presente invención, se describen, por ejemplo, in las Patentes U.S. Nos. 6,951,754, 5,578,473, 5,820,871, 6,887,699, 6,544,785 y en la publicación de solicitud de patente Nos. 2003/0035814, 2006/0134138, 2006/0057116, 2005/0037487, 2005/0003349, 5 2006/0166321, y 2004/0142003. Los contenidos de las patentes anteriormente mencionadas y publicaciones de solicitudes de patente se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

10 Cualquier virus de la influenza inactivo se puede utilizar en el contexto de la presente invención incluyendo cualquier cepa de influenza A inactiva (por ejemplo, cepa de influenza aviar). Los virus de la influenza pueden ser virus de influenza recombinantes producidos por métodos tradicionales basados en huevos o por las técnicas de genética inversa mencionadas aquí antes. Los virus recombinantes pueden poseer cualquier combinación de subtipos de hemaglutinina (HA) y 15 neuraminidasa (NA). Virus de la influenza inactivo de ejemplo que se puede utilizar como un aptígeno en el contexto de la presente invención incluye virus con una hemaglutinina H1, H5, H7 o H9 combinada con cualquiera de N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, o N9. En general. El subtipo heamglutinina del antígeno se escoge en la base de los subtipos hemaglutinina exhibidos por la circulación de las cepas de 20 influenza infecciosa.

Cuando el antígeno es un virus de la influenza inactivo, por ejemplo, H5N3 o H5N9, la cantidad de antígeno en la composición de vacuna se expresa típicamente en términos de unidades de hemaglutinación (HAU) por dosis. Por ejemplo, en ciertas 25 modalidades de la invención, el antígeno es un virus de la influenza inactivo y está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 50 a 1000 HAU por dosis. En modalidades particulares, cada dosis de la composición de vacuna es de aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, 30 aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, aproximadamente 160, 35 aproximadamente 165, aproximadamente 170, aproximadamente 175, aproximadamente 180, aproximadamente 185, aproximadamente 190,

	aproximadamente	195,	aproximadamente	200,	aproximadamente	205,
	aproximadamente	210,	aproximadamente	215,	aproximadamente	220,
	aproximadamente	225,	aproximadamente	230,	aproximadamente	235,
	aproximadamente	240,	aproximadamente	245,	aproximadamente	250,
5	aproximadamente	255,	aproximadamente	260,	aproximadamente	265,
	aproximadamente	270,	aproximadamente	275,	aproximadamente	280,
	aproximadamente	285,	aproximadamente	290,	aproximadamente	295,
	aproximadamente	300,	aproximadamente	305,	aproximadamente	310,
	aproximadamente	315,	aproximadamente	320,	aproximadamente	325,
10	aproximadamente	330,	aproximadamente	335,	aproximadamente	340,
	aproximadamente	345,	aproximadamente	350,	aproximadamente	355,
	aproximadamente	360,	aproximadamente	365,	aproximadamente	370,
	aproximadamente	375,	aproximadamente	380,	aproximadamente	385,
	aproximadamente	390,	aproximadamente	400,	aproximadamente	405,
15	aproximadamente	410,	aproximadamente	415,	aproximadamente	420,
	aproximadamente	425,	aproximadamente	430,	aproximadamente	435,
	aproximadamente	440,	aproximadamente	445,	aproximadamente	450,
	aproximadamente	455,	aproximadamente	460,	aproximadamente	465,
	aproximadamente	470,	aproximadamente	475,	aproximadamente	480,
20	aproximadamente	485,	aproximadamente	490,	aproximadamente	495,
	aproximadamente	500,	aproximadamente	505,	aproximadamente	510,
	aproximadamente	515,	aproximadamente	520,	aproximadamente	525,
	aproximadamente	530,	aproximadamente	535,	aproximadamente	540,
	aproximadamente	545,	aproximadamente	550,	aproximadamente	555,
25	aproximadamente	560,	aproximadamente	565,	aproximadamente	570,
	aproximadamente	575,	aproximadamente	580,	aproximadamente	585,
	aproximadamente	590,	aproximadamente	595,	aproximadamente	600,
	aproximadamente	605,	aproximadamente	610,	aproximadamente	615,
	aproximadamente	620,	aproximadamente	625,	aproximadamente	630,
30	aproximadamente	635,	aproximadamente	640,	aproximadamente	645,
	aproximadamente	650,	aproximadamente	655,	aproximadamente	660,
	aproximadamente	665,	aproximadamente	670,	aproximadamente	675,
	aproximadamente	680,	aproximadamente	685,	aproximadamente	690,
	aproximadamente	700,	aproximadamente	705,	aproximadamente	710,
35	aproximadamente	715,	aproximadamente	720,	aproximadamente	725,
	aproximadamente	730,	aproximadamente	735,	aproximadamente	740,

	aproximadamente	745,	aproximadamente	750,	aproximadamente	755,
	aproximadamente	760,	aproximadamente	765,	aproximadamente	770,
	aproximadamente	775,	aproximadamente	780,	aproximadamente	785,
	aproximadamente	790,	aproximadamente	795,	aproximadamente	800,
5	aproximadamente	805,	aproximadamente	810,	aproximadamente	815,
	aproximadamente	820,	aproximadamente	825,	aproximadamente	830,
	aproximadamente	835,	aproximadamente	840,	aproximadamente	845,
	aproximadamente	850,	aproximadamente	855,	aproximadamente	860,
	aproximadamente	865,	aproximadamente	870,	aproximadamente	875,
10	aproximadamente	880,	aproximadamente	885,	aproximadamente	890,
	aproximadamente	900,	aproximadamente	905,	aproximadamente	910,
	aproximadamente	915,	aproximadamente	920,	aproximadamente	925,
	aproximadamente	930,	aproximadamente	935,	aproximadamente	940,
	aproximadamente	945,	aproximadamente	950,	aproximadamente	955,
15	aproximadamente	960,	aproximadamente	965,	aproximadamente	970,
	aproximadamente	975,	aproximadamente	980,	aproximadamente	985,
	aproximadamente 990, aproximadamente 995, aproximadamente 1000 HAU.					

En ciertas modalidades, cada dosis de la composición de vacuna contiene
aproximadamente 182 HAU, 256 HAU, o 512 HAU.

COMPONENTE DE ACEITE

Las composiciones para vacuna de la presente invención también incluyen un
componente de aceite. Ejemplos de aceites que se pueden incluir en el componente
de aceite incluyen sin limitación aceites de terpeno tal como escualano y escualeno:
aceites vegetales tal como aceite de soya, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de
jojoba, aceite de nuez, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de
alazor, aceite de sésamo, aceite de albaricoque, aceite de aguacate, aceite de
germen de trigo, aceite de canola, aceite de linaza, y aceite de almendra.; aceites de
pescado tal como aceite de tiburón, aceite de merluza, aceite de Menhaden, y aceite
de hígado de bacalao, aceites animales tal como aceite mink, manteca de cerdo, y
aceite de la grasa del pollo; y aceites sintéticos tales como oleato de etilo, miristato
de isopropilo, Migliol® (Sasol North America Inc., Houston, TX), y Captex® 300
(Abitec Corp., Columbus, Ohio) así como también aceite mineral (disponible de
Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), aceite de triglicéridos, derivados de propilenglicol, y

pristano. El aceite preferido de la fase de aceite es el aceite mineral. También se pueden utilizar combinaciones de estos aceites.

COMPONENTES ADICIONALES

- 5
- En ciertas modalidades de la presente invención, las composiciones para vacuna pueden incluir uno o más de componentes adicionales tal como, por ejemplo, tensoactivos, amortiguadores y compuesto estabilizantes.
- 10
- Los tensoactivos solubles en aceite incluyen Arlacel® 83 (sesquioleato de sorbitan, disponible de Uniquema, New Castle, DE), Arlacel® A (monoleato de manida disponible de Uniquema, New Castle, DE), Arlacel® 80 (disponible de Uniquema, New Castle, DE), Span® 80 (monoleato de sorbitan, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), L121 polaxamer 401 (Pluronic® L121, BASF Corp., Florham Park, NJ). Un
- 15
- tensoactivo soluble en aceite preferido es Arlacel® 83.
- Los tensoactivos solubles en agua incluyen Tween® 80 (monoleato de sorbitan polioxietileno, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Un tesoactivo soluble en agua preferido es Tween® 80.
- 20
- Las fases acuosas pueden incluir un componente amortiguador de pH tal como PBS (solución salina amortiguada con fosfato), conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido ascórbico), agentes saborizantes, colorantes y endulzantes.
- 25
- Las emulsiones se pueden estabilizar por la inclusión de o uno o más compuestos estabilizantes. Las clases de estabilizantes incluyen estabilizantes poliméricos y estabilizantes de bajo peso molecular. Los estabilizantes poliméricos forman geles en fases voluminosas u otras estructuras en interfases y reducen la viscosidad de una o más de las fases o las interfases. Los estabilizantes poliméricos incluyen sin
- 30
- limitación, proteínas, almidones, gomas, celulósicos, alcoholes polivinilo, ácido poliacrílico y polivinilpirrolidona. Estos materiales se unen a la interfase por enlaces covalentes o por interacciones hidrófobas o electrostáticas. Ellas forman un "complejo interfacial" que se define como una asociación de dos o más moléculas de superficie activa en la interfaz en una relación que no existe en las fases voluminosas. Ejemplos
- 35
- de estabilizantes de bajo peso molecular son, sin limitación, sales de ácidos grasos y de colesterol de cationes divalentes tal como estearato de aluminio.

MÉTODOS PARA ELABORAR LAS COMPOSICIONES PARA VACUNA DE LA INVENCION

- 5 La presente invención también incluye métodos para elaborar las composiciones para vacuna. En una modalidad, los métodos de la invención comprenden un componente de aceite emulsificante con un componente acuoso. Como se describe en más detalle anteriormente, el componente acuoso de la composición de vacuna comprende por lo menos un antígeno y por lo menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste
- 10 de un polímero acrílico y DDA. Cualquiera de los componentes de aceite, antígenos, adyuvantes y variaciones de estos se describen por otra parte aquí y se pueden utilizar en los métodos la presente invención.

- En una modalidad particular, un método para elaborar una composición de vacuna se proporciona, en donde el método comprende: (a) combinar una solución acuosa de
- 15 un antígeno con por lo menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de un polímero acrílico y DDA para formar una mezcla de antígeno/adyuvante; (b) combinar la mezcla de antígeno/adyuvante de (a) con un componente de aceite y un emulsificante para formar una mezcla de componente antígeno/adyuvante/aceite; y
- 20 (c) emulsificar la mezcla de componente antígeno/adyuvante/aceite de (b) para formar una emulsión aceite en agua, para formar una composición de vacuna.

- Los métodos de la invención comprenden emulsificar un componente de aceite con un componente acuoso para formar, por ejemplo, una emulsión de aceite en agua
- 25 (WO). Los métodos para preparar las emulsiones agua en aceite para las composiciones para vacuna son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Patentes U.S. nos. 5,109,026 y 5,744,137. En general, una fase acuosa (que incluye opcionalmente un tensoactivo) y una fase de aceite (que incluye opcionalmente un tensoactivo) se preparan y se mezclan para formar una emulsión agua en aceite.

- 30 Por ejemplo, las emulsiones agua en aceite de Carbopol o Carbopol+DDA se pueden preparar como sigue: una fase acuosa se prepara al mezclar uno o más antígenos y, opcionalmente, Carbopol o Carbopol+DDA secuencialmente o simultáneamente en una solución acuosa para formar una mezcla homogénea. Un tensoactivo soluble en
- 35 agua se puede mezclar opcionalmente con la mezcla acuosa que contiene el antígeno. Los componentes acuosos adicionales incluyen adyuvantes adicionales

que se pueden agregar a la fase acuosa. Un diagrama de flujo ilustra un método de ejemplo para preparar una formulación de vacuna de la invención se establece en la figura 1.

- 5 El volumen total de cada dosis de la composición de vacuna puede ser, por ejemplo, de 0.05 mL a 2.0 mL. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el volumen de la dosis de la composición de vacuna es de aproximadamente 0.05 mL, aproximadamente 0.10 mL, aproximadamente 0.15 mL, aproximadamente 0.20 mL, aproximadamente 0.25, 10 mL, aproximadamente 0.30 mL, aproximadamente 0.35 mL, aproximadamente 0.40 mL, aproximadamente 0.45 mL, aproximadamente 0.50 mL, aproximadamente 0.55 mL, aproximadamente 0.60 mL, aproximadamente 0.65 mL, aproximadamente 0.70 mL, aproximadamente 0.75 mL, aproximadamente 0.80 mL, aproximadamente 0.85 mL, aproximadamente 0.90 mL, aproximadamente 0.95 mL o aproximadamente 1.0 mL.
- 15 Al preparar las composiciones para vacuna de la presente invención, varias porciones del componente acuoso (por ejemplo, el antígeno en la solución acuosa combinado con el adyuvante) al componente de aceite se puede utilizar, como se establece en la siguiente **tabla 1**:

20

Tabla 1

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

Una forma para preparar una emulsión agua en aceite es adicionar a la fase acuosa la fase de aceite. Esta mezcla luego se agita manualmente durante 15 a 20 segundos, se emulsifica durante 20 segundos utilizando una sonda de alto corte (Brinkman homogenizer, Brinkman Instruments, Westbury, N.Y.) Polytron 10/35, vortexed, o de manera similar una mezcla utilizando una técnica familiar para aquellos expertos en la técnica.

Para la preparación industrial de las vacunas en emulsión aceite en agua que contiene la composición del tensoactivo, el aceite y las fases acuosas que contienen el tensoactivo se pueden mezclar con un homogenizador Silverson.

Aquellos expertos en el arte pueden apreciar que las cantidades relativas de la fase acuosa que contiene el antígeno, la fase de aceite, y los tensoactivos se pueden ajustar para alcanzar emulsiones con propiedades específicas o viscosidades deseadas

5

MÉTODOS PARA VACUNAR UN ANIMAL

La presente invención también incluye métodos para vacunar un animal. Los métodos de la invención comprenden administrar a un animal cualquiera de las composiciones para vacuna descritas de esta forma aquí.

10

Las composiciones para vacuna de la invención se pueden administrar a cualquier animal, incluyendo por ejemplo, animal humano, ave, canino, felino, bovino, porcino o equino. Ejemplos de aves incluyen, por ejemplo, animales aviares tanto salvajes como domésticos, y particularmente aquellos que se utilizan comercialmente para la producción de huevos y alimentos. Sin limitación, ejemplos de aves incluyen pollos, pavos, gansos, patos, faisanes, y similares.

15

Las formulaciones de vacuna se pueden administrar por, sin limitación, liberación transdérmica, o por administración de transmucosa, incluyendo pero no limitado a rutas oral, bucal, intranasal, oftálmica, vaginal, rectal, intracerebral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, vía escarificación (escarificación a través de las capas superiores de la piel, por ejemplo utilizando una aguja bifurcada), por inhalación (pulmonar) o insuflación (a través de la boca o la nariz), o por administración a las células que presenten antígeno, tal como células dendríticas (DC), ex vivo seguidas por la administración de las células al sujeto, o por cualquier otra ruta estándar de inmunización.

25

Preferiblemente, las composiciones para vacuna de la invención se pueden suministrar parenteralmente, es decir, mediante administración intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), subdérmica (s.d.), o intradérmica (i.d.), mediante inyección directa, por vía, por ejemplo, inyección de bolo, infusión continua, o pistola de genes (por ejemplo para administrar un vector de vacuna a un sujeto, tal como ADN o ARN desnudo). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multidosis, con un conservante agregado.

35

Para la administración mediante inhalación, los terapéuticos de acuerdo con la presente invención se pueden suministrar convenientemente en la forma de una presentación en aerosol de empaques presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluoro-metano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar al proporcionar una válvula para medir la liberación de la cantidad. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se puede formular que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las composiciones de la presente invención también se pueden formular en composiciones tal como supositorios o enemas de retención.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, las composiciones para vacuna descritas aquí se administran a un sujeto en dosis terapéuticamente efectivas, preferiblemente, con toxicidad mínima.

El término "terapéuticamente efectivo" se aplica a los términos de dosis o cantidad se refiere a una cantidad de un compuesto o composición farmacéutica o vacuna que es suficiente para resultar en una actividad deseada luego de administración a un animal en necesidad del compuesto, composición farmacéutica o vacuna. Como se utiliza aquí con respecto a adyuvante – y composiciones o vacunas que contienen antígeno, el término "cantidad/dosis terapéuticamente efectiva" se utiliza de forma intercambiable con el término "cantidad/dosis inmunogénicamente efectiva" y se refiere a la cantidad/dosis de un compuesto (por ejemplo, un antígeno y/o un adyuvante) o composición farmacéutica o vacuna que es suficiente para producir una respuesta inmune efectiva después de la administración a un animal.

La frase "farmacéuticamente aceptable," se refiere a entidades y otros ingredientes de tales composiciones que son tolerables fisiológicamente y típicamente no producen reacciones inconvenientes cuando se administra a un humano. Preferiblemente, como se utiliza aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del estado gubernamental o federal o

listado en la Farmacopea U.S. o la farmacopea reconocida generalmente para uso en mamíferos, y más particularmente en humanos.

5 Una dosis terapéuticamente efectiva se puede determinar a partir de curvas de respuesta de dosis utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de una curva de respuesta de dosis se describe, sin limitación, en el Ejemplo 4 adelante.

10 La dosis de adyuvante, antígenos y otros componentes en composiciones para vacuna deben estar en cantidades tal que la dosis de antígeno administrada continuamente o intermitentemente no excederá una cierta cantidad en consideración de los resultados en los animales de prueba y las condiciones individuales de un sujeto.

15 Un régimen de dosificación específico variará dependiendo en el procedimiento de dosificación, las condiciones de un paciente o un sujeto animal tal como edad, peso corporal, sexo, sensibilidad, alimento, periodo de dosificación, drogas utilizadas en la combinación, seriedad de la enfermedad. Se puede determinar la dosis apropiada y tiempos de dosificación bajo ciertas condiciones por un médico de acuerdo a cada circunstancia del paciente y de acuerdo con las técnicas clínicas.

20 La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones inmunogénicas que contienen adyuvante se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en animales experimentales, por ejemplo, al determinar el LD_{50} (la dosis letal al 50% de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción LD_{50}/ED_{50} . Se prefieren las composiciones que exhiben índices terapéuticos mayores. Mientras los terapéuticos que exhiben efectos colaterales tóxicos se pueden utilizar (por ejemplo, cuando se trata formas severas de cáncer o infecciones que amenazan la vida), se debe tener cuidado para diseñar un sistema de suministro que objetiva tales composiciones inmunogénicas al sitio específico (por ejemplo, el tejido linfoide media una repuesta inmune, tumor o una réplica de soporte de órgano del agente de infección) con el fin de minimizar el daño potencial a otros tejidos y órganos y, reducir, por lo tanto efectos colaterales.

35

KITS QUE COMPRENDEN COMPONENTES PARA FABRICAR COMPOSICIONES PARA VACUNA

En ciertas modalidades, la invención proporciona un empaque o kit farmacéutico que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más ingredientes activos de una formulación inmunogénica. En una modalidad preferida, un kit para la preparación de una composición farmacéutica o de vacuna comprende por lo menos un antígeno, adyuvante (por ejemplo, Carbopol® o Carbopol ® + ADN), en la fase de aceite, y una fase acuosa, el kit comprende los componentes en diferentes contenedores, y opcionalmente instrucciones para mezclar los componentes y/o para administración de la composición. Cada contenedor del kit puede opcionalmente incluir uno o más portadores y/o excipientes y/o sustancias auxiliadoras fisiológicamente aceptables. Asociado con tales contenedores puede haber un aviso en la forma de prescribirse por una agencia gubernamental que resulta en la fabricación, uso o ventas de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia para fabricación, uso o venta para administración humana.

Las composiciones para vacuna, pueden, si se desea, ser presentadas en empaques o dispositivos de suministro que pueden contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen un ingrediente activo (es decir, un antígeno y/o adyuvante). El empaque puede, por ejemplo, comprender una hoja plástica o de metal, tal como blíster. El empaque o dispositivo de suministro se puede acompañar por instrucciones para la administración. Las composiciones formuladas en un portador farmacéuticamente compatible también se pueden preparar, colocar en un contenedor apropiado, y etiquetar para vacunación contra un patógeno indicado y/o afección.

DEFINICIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

De acuerdo con la presente invención se puede emplear técnicas de biología molecular, microbiología, y ADN recombinante dentro del expertise de la técnica. Tales técnicas son bien conocidas y se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; DNACloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed.

- 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press. (1986)]; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); and F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons. Inc. (1994).

Una "molécula de ácido nucleico" (o alternativamente "ácido nucleico") se refiere a la forma polimérica éster fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina, o citidina: "moléculas ARN") o desoxiribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina: "moléculas ADN"), o cualesquier análogos de fosfoéster de estos tal como fosforotioatos y tioésteres, en cualquier forma monocatenaria o una hélice bicatenaria. Los oligonucleótidos (tienen poco menos de 100 unidades constituyentes de nucleótidos) o polinucleótidos se incluyen dentro del término definido así como también hélices bicatenarias, ADN-ARN, y ARN-ARN. Este término, por ejemplo, incluye ADN bicatenario, encontrado, *inter alia*, en moléculas de ADN lineales y (por ejemplo, fragmentos de restricción) o circulares, plásmidos y cromosomas. En la discusión la estructura de moléculas de ADN bicatenario particulares, secuencias se pueden describir aquí de acuerdo con la convención normal de dadas solo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita del ADN (es decir, la hebra tiene una secuencia homóloga al mRNA). Una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN que ha experimentado una manipulación biológica molecular.

Como se utiliza aquí el término "polipéptido" se refiere a un polímero basado en aminoácido, que puede ser codificado por un ácido nucleico o preparado sintéticamente. Los polipéptidos pueden ser proteínas, fragmentos de proteína, proteínas quiméricas, etc. Generalmente, el término "proteína" se refiere a un polipéptido expresado endógenamente en una célula. Generalmente, una secuencia de ADN que codifica una proteína o enzima particular se "transcribe" en una secuencia correspondiente de mRNA. La secuencia mRNA es, a su vez, "trasladado" en la secuencia de aminoácidos que forman una proteína. Una "secuencia de aminoácido" es cualquier cadena de dos o más aminoácidos. El término "péptido" es usualmente utilizado para polímeros basados en aminoácidos que tienen poco más de 100 unidades constituyentes de aminoácidos, puesto que el término "polipéptido"

se reserva para polímeros que tienen menos de 100 de tales unidades. Aquí, sin embargo, "polipéptido" será el término genérico.

5 Los siguientes ejemplos son ilustrativos pero no limitativos, del método y composiciones de la presente invención. Otras modificaciones adecuadas y adaptaciones de la variedad de condiciones y parámetros normalmente encontrados en química y biología molecular que son obvios para aquellos expertos en la técnica en vista de la presente descripción están dentro del espíritu y el alcance de la invención.

10

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

15 PREPARACIÓN DE FORMULACIONES DE CONTROL PARA VACUNA EN EMULSIÓN AGUA EN ACEITE

Genes inversos inactivos de la influenza aviar H5N3 (Liu et al., Virology 14:580-590 (2003)) se agregan a solución salina estéril. La mezcla se le permite 20 agitarse para formar una mezcla homogénea. Se agrega Tween® 80 (7.2 mL) a la mezcla seguido por mezclado para formar una mezcla acuosa homogénea.

La mezcla acuosa se agrega lentamente a una mezcla de aceite mineral/Arlacel® 83V (720 mL), de tal manera que la mezcla acuosa es 40% del 25 volumen total, para formar una emulsión agua en aceite.

EJEMPLO 2

30 PREPARACIÓN DE VACUNAS EN EMULSIÓN AGUA EN ACEITE QUE CONTIENEN UN ADYUVANTE EN LA FASE ACUOSA

Las emulsiones agua en aceite que contienen un adyuvante en la fase acuosa se preparan esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Influenza aviar H5N3 inactiva y 1 de 5 adyuvantes de la Tabla 2 se agregan a la salina estéril para un 35 volumen total de 197 mL. A la mezcla se le permite agitarse para formar una mezcla

homogénea. Se agrega Tween® 80 (3.0 mL) a la mezcla seguido por mezclado para formar una mezcla acuosa homogénea.

La mezcla acuosa se agrega lentamente a una mezcla de aceite mineral/Arlacel® 83V (300 mL), de tal manera que la mezcla acuosa es 40% del volumen total y la mezcla de aceite es 60% del volumen total, para formar una emulsión agua en aceite. Así, se preparan 5 vacunas en emulsión preparadas con 5 adyuvantes diferentes.

Tabla 2: Adyuvantes agregados a la Formulaciones para vacuna en emulsión Agua en aceite

Adyuvante	Cantidad
Al(OH) ₃ reHydragel®	58.5 mL
Carbopol®	50 mL de una solución al 2%
Carbopol® + DDA	33 mL de una solución al 2% de Carbopol + 16.5 g DDA
CMC (carboximetilcelulosa)	1 g
HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa)	1 g

EJEMPLO 3

DETERMINACIÓN DE LA DOSIFICACIÓN PARA INOCULACIÓN DE PAVOS

Se inoculan pavos con 1258, 256 o 512 HAU (unidad de hemaglutinación)/0.5 mL de vacuna sin adyuvantes, como se describió en el Ejemplo 1. El título HI (inhibición de hemoaglutinación) de la sangre de pavos inoculados se mide 3, 6, y 9 semanas después de inoculación. Las muestras se prueban con un ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI) (Manal de la Organización Mundial de la Salud sobre Diagnóstico de Influenza Animal y Vigilancia, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5). Los resultados se muestran en la Fig. 2. Aunque cada dosificación da

razonablemente inicialmente buena respuesta serológica, los títulos HI cayeron pronto dramáticamente.

EJEMPLO 4

5

INOCULACIÓN DE PAVOS CON LA VACUNA EN EMULSIÓN AGUA EN ACEITE QUE CONTIENE UN ADYUVANTE EN LA FASE ACUOSA

10 Se inoculan pavos con vacunas que contiene adyuvantes en la fase acuosa como se describió en el Ejemplo 2. Diez pavos de una semana de edad se vacunan con 0.5 mL de la vacuna (256 HAU/dosis). Como controles, se inoculan 10 pavos con la formulación descrita en el Ejemplo 1 y no se inoculan 10 pavos. Los pavos inoculados se les da un segundo refuerzo de vacunación de 0.5 mL de vacuna (256 HAU/dosis) 3 semanas después de la primera vacunación. Las muestras de suero en
15 sangre de los pavos se toman en 4, 7, y 10 semanas de edad y se prueban utilizando el mismo ensayo de inhibición de hemaglutinación utilizado en el Ejemplo 4. La Tabla 3 proporciona una descripción tabular del protocolo experimental como se describió anteriormente.

20 **Tabla 3: Protocolo para Probar la Eficacia de Formulaciones para vacuna en emulsión Agua en Aceite que Contiene un Adyuvante en la Fase Acuosa**

Edad de los Pavos	Actividad
1 semana	Sangrado de todos los pavos. Vacuna de pavos diseñados para vacunación
4 semanas	Sangrado de todos los pavos. Revacunación de pavos diseñados para vacunación
7 semanas	Sangrado de todos los pavos.
10 semanas	Sangrado de todos los pavos.

35 Los resultados de las vacunaciones experimentales y de control se dan en la Tabla 4 y la Figure 3. Los resultados demuestran la efectividad de las vacunas que comprenden el Carbopol® o Carbopol® + adyuvantes DDA.

71

Tabla 4: Títulos HI para Pavos de 11 semanas inoculados con una Formulación para vacuna en emulsión Agua en Aceite con o sin un Adyuvante en la Fase Acuosa.

Grupo	256 HAU	Carbopol®	Carbopol® + DDA	Vacuna con/sin adyuvante	CMC	HPMC	AlOH ₃ reHydragel
HI GMT	120	222.5	232.5	133	97.14	140	82.5

(HI GMT = título medio geométrico de inhibición de hemaglutinación).

EJEMPLO 5

RESPUESTA INMUNE MEJORADA EN PAVOS OBTENIDA UTILIZANDO UNA COMPOSICIÓN DE VACUNA AGUA EN ACEITE QUE CONTIENE CARBOPOL Y DDA.

En este ejemplo, las composiciones para vacuna que tiene un antígeno de influenza aviar en una emulsión agua en aceite, con o sin Carbopol o Carbopol + DDA, se utilizan para vacunar pavos, y las respuestas inmunes al antígeno de la influenza se evalúan.

Las composiciones para vacuna utilizadas en este ejemplo se preparan esencialmente utilizando el método general destacado en la Figura 1. En resumen, una solución acuosa que comprende virus inactivo H5N9 de la influenza aviar se combinan con un emulsificador, con o sin 0.2 % de Carbopol o 0.5 g/mL DDA. La mezcla resultante se agrega lentamente a aceite mineral y luego se somete a emulsificación/homogenización para producir una “emulsión estándar” (que le falta Carbopol y DDA) o una “emulsión de Carbopol” o una “Carbopol + emulsión DDA”. La cantidad de H5N9 inactiva en las emulsiones finales es 512 HAU (según se mide al probar en la materia prima viral pre-inactiva) por dosis de 0.5 mL.

Cuatro grupos de pavos se utilizan en éste Ejemplo, cada grupo consiste de 20 pavos blancos comerciales de una semana de edad. El diseño experimental se resume en la siguiente tabla:

5

Grupo de Tratamiento	Composición de la Vacuna	# de pavos/ruta/vol.
1	Emulsión Estándar	20 / IM / 0.5 mL
2	Emulsión Carbopol	20 / IM / 0.5 mL
3	Carbopol + Emulsión DDA	20 / IM / 0.5 mL
4	Controles no vacunados	20 / n.a. / n.a.

10

IM = administración intramuscular (se vacunan pavos intramuscularmente en el pecho)

15

Las aves en los grupos 1, 2 y 3 se les administran las composiciones para vacuna correspondientes en una semana de edad seguidas por un refuerzo de vacunación en 4 semanas de edad. Se recolectan muestras de sangre en el momento de la vacunación inicial y en el momento del refuerzo de vacuna y en intervalos de tres semanas (es decir, en 7, 10, 13, 16, y 19 semanas de edad). Las muestras se prueban con un ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI) (Manual de la Organización Mundial de la Salud sobre Diagnóstico de Influenza Animal y Vigilancia, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5). El ensayo HI se desarrolla utilizando materia prima de antígeno H5N9 inactiva beta-propiolactona (BPL).

20

25

Los resultados de los ensayos HI (expresados en términos de títulos de media geométrica (GMT)) se muestran en la siguiente tabla 6:

TABLA 6

Grupo de Tratamiento	Inhibición de Hemaglutinación GMT** at					
	3 wpv1	3 wpv2	6 wpv2	9 wpv2	12 wpv2	15 wpv2
1 (emulsión estándar)	26	111	74	26	18	25
2 (Carbopol)	36	453	333	187	118	83
3 (Carbopol + DDA)	36	67	51	28	29	33

4 (control no vacunado)	5	5	5	5	5	5
-------------------------	---	---	---	---	---	---

- Wpv1 = semanas post vacunación 1; wpv2 = semanas post vacunación 2
- 5 **Para cálculo de GMT, un título de ave individual que es negativo en 1:10 (la dilución más baja probada) se le asigna un valor de 5.

10 Pavos vacunados con emulsión de antígeno H5N9 + Carbopol (Grupo 2) o con emulsión de antígeno H5N9 + Carbopol + DDA (Grupo 3) exhiben mayor HIGMT según se compara con aves vacunadas con emulsión estándar de sólo antígeno H5N9 (Grupo 1). Adicionalmente, el nivel mayor de la respuesta serológica en pavos se le administra el Carbopol incluso la emulsión subsiste a la duración del estudio a 15 semanas después de refuerzo de vacunación (pavos en 19 semanas de edad).

15 En este Ejemplo, una mejora general de la respuesta serológica se observa para influenza aviar en pavos que se les administra una emulsión de vacuna agua en aceite incluso de Carbopol o Carbopol + DDA en la fase acuosa. Esta mejora ocurre con un aislado H5N9 patogénico bajo convencional, similar a los resultados observados utilizando los aislados H5N3 de bajo patogénico de origen genético

20 inverso (Ejemplo 4). Por lo tanto, la respuesta inmune mejorada se puede atribuir al adyuvante y se aplica aparentemente a una variedad de antígenos.

EJEMPLO 6

25 RESPUESTA INMUNE MEJORADA EN PATOS OBTENIDA UTILIZANDO UNA COMPOSICIÓN DE VACUNA AGUA EN ACEITE QUE CONTIENE CARBOPOL

30 En éste ejemplo, las composiciones para vacuna que contienen un antígeno de influenza aviar en una emulsión agua en aceite, con o sin Carbopol en la fase acuosa, se utilizan para vacunar cuatro clases diferentes de patos, y se evalúa la respuesta inmune para el antígeno de influenza.

35 Las composiciones para vacuna utilizadas en éste Ejemplo se preparan esencialmente utilizando el método general destacado en la Figura 1. En resumen, una solución acuosa que comprende virus inactivo H5N3 g de influenza aviar de genética inversa ("rg-H5N3", ver Ejemplo 1) se combina con un emulsificador, con o

sin 0.2% Carbopol. La mezcla resultante se agrega lentamente al aceite mineral y luego se somete a emulsificación/homogenización para producir una “emulsión estándar” (que le falta Carbopol) o una “emulsión de Carbopol” (que contiene 0.2% de Carbopol en la fase acuosa). La cantidad de rg-H5N3 en la emulsión final es 256 HAU por dosis 0.5 mL.

En éste Ejemplo, cuatro razas diferentes de patos se utilizan: Pekín, Mallard, Khaki, Golden Hybrid 300. Cada raza de patos se subdivide en tres grupos diferentes de tratamiento como se muestra en la siguiente tabla 7:

TABLA 7

Raza	Grupo de Tratamiento	Composición de Vacuna	Números de Patos por Grupo de Tratamiento
Pekín	1	Emulsión Estándar	20
	2	Emulsión Carbopol	20
	3	Controles no vacunados	10
Mallard	1	Emulsión Estándar	20
	2	Emulsión Carbopol	20
	3	Controles no vacunados	10
Khaki Campbell	1	Emulsión Estándar	20
	2	Emulsión Carbopol	20
	3	Controles no vacunados	10
Goleen Hybrid 300	1	Emulsión Estándar	20
	2	Emulsión Carbopol	20
	3	Controles no vacunados	10

Los patos en los grupos de tratamiento 1 y 2 se vacunan subcutáneamente en la nuca con 0.2 mL de volumen total en la composición de vacuna en emulsión correspondiente en el día de edad (“vacunación primaria”). En las tres semanas de edad, los patos se refuerzan con 0.5 mL de la misma vacuna simultáneamente en la nuca.

Se recolectan muestras de sangre al momento de la vacunación primaria y en intervalos de tres semanas después, es decir, 3 semanas después de la vacunación

primaria ("3 WPV1") y en 3, 6, 9 y 12 semanas después de refuerzo de vacunación ("3 WPV2", "6 WPV2", "9 WPV2", y "12 WPV2"). Las muestra se prueban con un ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI) (Manual de la Organización Mundial de la Salud sobre Diagnóstico de Influenza y Vigilancia, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5).

- 5 El ensayo HI se desarrolla utilizando una materia prima de antígeno H5N3 inactiva beta-propiolactona (BPL).

El suero recolectado de patos representativos de cada raza en el día de edad (antes de vacunación) está libre de anticuerpo detectable HI para influenza aviar.

- 10 (Datos no mostrados). Los resultados del ensayo HI (expresado en términos de títulos de media geométrica (GMT) para los restantes puntos de tiempo se muestran en la siguiente tabla 8:

TABLA 8

Raza	Grupo de Tratamiento	Inhibición de Hemaglutinación GMT** at				
		3 wpv1	3 wpv2	6 wpv2	9 wpv2	12 wpv2
Pekín	1 (emulsión estándar)	9	14	12	7	6
	2 (Carbopol)	17	180	80	52	50
	3 (no vacunado)	5	5	5	5	5
Mallar	1 (emulsión estándar)	8	90	36	20	24
	2 (Carbopol)	34	170	120	97	67
	3 (no vacunado)	5	5	5	5	5
Khaki Campbe II	1 (emulsión estándar)	11	115	42	16	16
	2 (Carbopol)	29	238	138	76	57
	3 (no vacunado)	5	5	5	5	5
Golden Irbid 300†	1 (emulsión estándar)	17	126	83	72	75
	2 (Carbopol)	28	107	50	38	25
	3 (no vacunado)	5	5	5	5	5

WPV1 = semanas post vacunación 1; WPV2 = semanas post vacunación 2. †Se sospecha que los resultados de la “emulsión estándar” y los resultados “Carbopol” para 300 patos Golden Hybrid se cambian inadvertidamente en algún punto durante el experimento.

****Para el cálculo del GMT, un título de ave individual que es negativo en 1:10 (la dilución más baja probada) se le asigna un valor de 5.**

Los resultados presentados anteriormente muestran que las composiciones para vacuna agua en aceite formuladas con Carbopol en la fase acuosa producen significativamente mayor respuesta inmune en la mayoría de razas de patos probadas según se compara con las composiciones para vacuna agua en aceite formuladas sin Carbopol en la fase acuosa. Estos resultados confirman adicionalmente que las composiciones para vacuna agua en aceite comprenden un polímero acrílico (*por ejemplo*, Carbopol) en la fase acuosa dadas las respuestas inmunes superiores según se compara con las composiciones para vacuna agua en aceites convencionales.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún en algún detalle por vía de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, esta invención no se limita a las modalidades particulares descritas, pero se pretende que cubra todos los cambios y modificaciones que están dentro del espíritu y alcance de la invención como se define por la reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en ésta especificación son indicadoras del nivel de habilidad de los expertos en la técnica a los que pertenece la invención. Todas las publicaciones y patentes se incorporan aquí como referencia para el mismo alcance como si cada publicación inicial o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada como referencia.

REIVINDICACIONES:Lo que se reivindica es:

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende una emulsión agua en aceite,

en donde dicha emulsión comprende un componente de aceite y un
componente acuoso; y

10 en donde dicho componente acuoso comprende por lo menos un antígeno y
por lo menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de un
polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
- 15 2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicho por lo
menos un adyuvante es un polímero acrílico.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en donde dicho polímero
acrílico es un polímero de ácido acrílico reticulado con sacarosa polialilo.
- 20 4. La composición de vacuna de la reivindicación 2 en donde dicho polímero
acrílico es un adyuvante de ácido alquil-poliacrílico ("alquil-PAA").
5. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en donde dicho adyuvante
de alquil-PAA se selecciona del grupo que consiste de decil-PAA, octil-PAA,
25 butil-PAA, y metil-PAA.
6. La composición de vacuna de la reivindicación 5, en donde dicho adyuvante
alquil-PAA es octil-PAA
- 30 7. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicho por lo
menos un adyuvante es bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
8. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicho componente
acuoso comprende un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil
35 amonio (DDA).

9. La composición de vacuna de la reivindicación 7, en donde dicho polímero acrílico es un polímero de ácido acrílico reticulado con sacarosa polialilo.
- 5 10. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicho por lo menos un antígeno es un agente infeccioso.
11. La composición de vacuna de la reivindicación 10, en donde dicho agente infeccioso es un agente infeccioso vivo.
- 10 12. La composición de vacuna de la reivindicación 10, en donde dicho agente infeccioso es un agente infeccioso muerto o inactivo.
13. La composición de vacuna de la reivindicación 10, en donde dicho agente infeccioso es un virus, bacteria, hongo o parásito.
- 15 14. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicho por lo menos un antígeno es un péptido, polipéptido, o ácido nucleico.
15. La composición de vacuna de la reivindicación 10, en donde dicho agente infeccioso es un virus.
- 20 16. La composición de vacuna de la reivindicación 10, en donde dicho agente infeccioso es un agente que es capaz de infectar un ave, canino, felino, bovino, porcino, o equino.
- 25 17. La composición de vacuna de la reivindicación 16, en donde dicho agente infeccioso es un agente que es capaz de infectar un ave.
18. La composición de vacuna de la reivindicación 15, en donde dicho virus es un virus de la influenza.
- 30 19. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicho componente de aceite comprende aceite mineral.
- 35 20. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende adicionalmente uno o mas emulsificadores.

- 21. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicho componente acuoso comprende adicionalmente lecitina.
- 5 22. Un método para vacunar un animal, dicho método comprende administrar al animal la composición de vacuna de la reivindicación 1.
- 23. El método de la reivindicación 22, en donde el animal es un ave, canino, felino, bovino, porcino, o equino.
- 10 24. Un método para elaborar una composición de vacuna, dicho método comprende emulsificar un componente de aceite con un componente acuoso, En donde dicho componente acuoso comprende por lo menos un antígeno y por lo menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
- 15 25. El método de la reivindicación 24, en donde dicho por lo menos un adyuvante es un polímero acrílico.
- 20 26. El método de la reivindicación 25, en donde dicho polímero acrílico es un polímero de ácido acrílico reticulado con sacarosa polialilo.
- 25 27. El método de la reivindicación 24, en donde dicho por lo menos un adyuvante es bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
- 30 28. El método de la reivindicación 24, donde dicho componente acuoso comprende un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
- 29. El método de la reivindicación 28, en donde dicho polímero acrílico es un polímero de ácido acrílico reticulado con sacarosa polialilo.
- 35 30. Un método para elaborar una composición de vacuna, dicho método comprende:

- 5
- (a) combinar una solución acuosa de un antígeno con por lo menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste de un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA) para formar una mezcla de antígeno /adyuvante;
- (b) combinar dicha mezcla de antígeno / adyuvante de (a) con un componente de aceite y un emulsificador para formar un mezcla de antígeno/ adyuvante/ componente de aceite; y
- 10 (c) emulsificar dicha mezcla de antígeno/ adyuvante/ componente de aceite de (b) para formar una emulsión agua en aceite, formando de esta manera una composición de vacuna.
- 15 31. El método de la reivindicación 30, en donde dicho por lo menos un adyuvante es un polímero acrílico.
32. El método de la reivindicación 31, en donde dicho polímero acrílico es un polímero de ácido acrílico reticulado con sacarosa polialilo.
- 20 33. El método de la reivindicación 30, en donde dicho por lo menos un adyuvante es bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
- 25 34. El método de la reivindicación 30, en donde en (a), dicha solución acuosa de dicho antígeno se combina con un polímero acrílico y bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
35. El método de la reivindicación 34, en donde dicho polímero acrílico es un polímero de ácido acrílico reticulado con sacarosa de polialilo.
- 30 36. El método de la reivindicación 30, en donde dicho componente de aceite comprende aceite mineral.

RESUMEN**COMPOSICIONES PARA VACUNA EN EMULSIÓN QUE COMPRENDEN
ANTÍGENO Y UN ADYUVANTE EN LA FASE ACUOSA**

5

Se utilizan formulaciones de vacuna en emulsión que contienen un antígeno y un adyuvante en la fase acuosa para la vacunación de animales en donde el adyuvante es un polímero acrílico y/o bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA). Estas
10 formulaciones se pueden preparar al mezclar una fase acuosa que contiene el antígeno y adyuvante con una fase aceitosa en la presencia de un emulsificador.

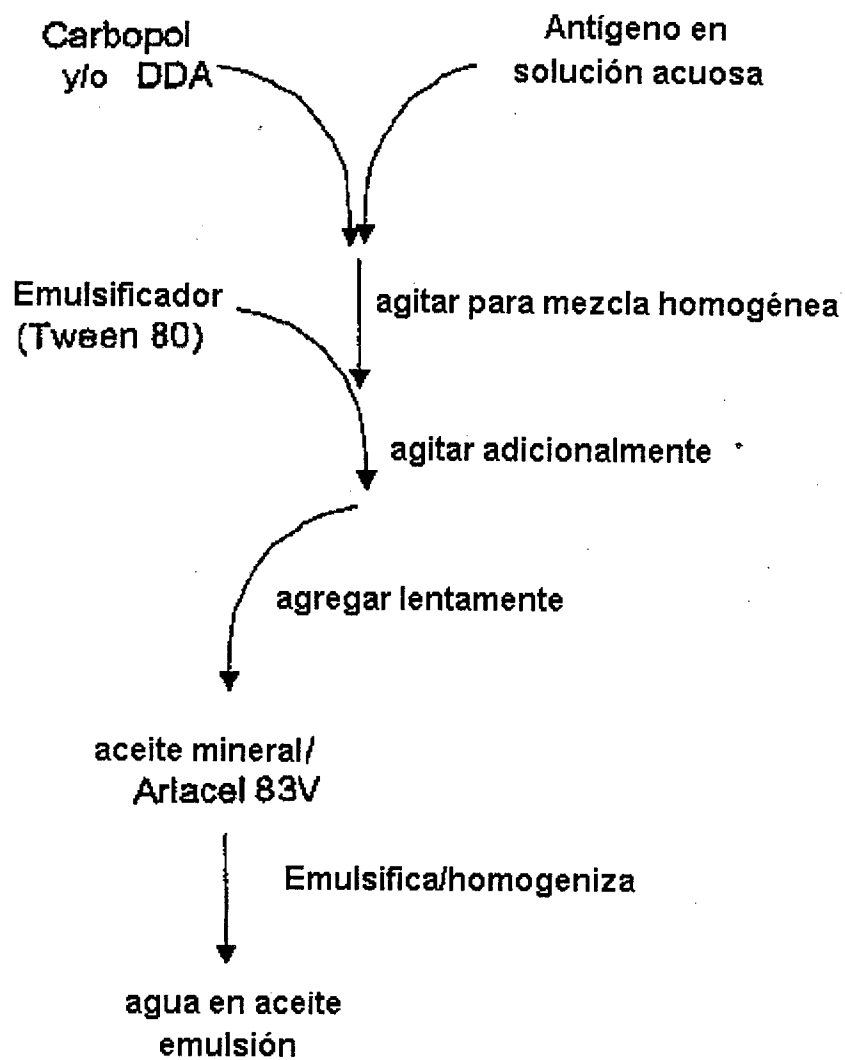


FIG. 1

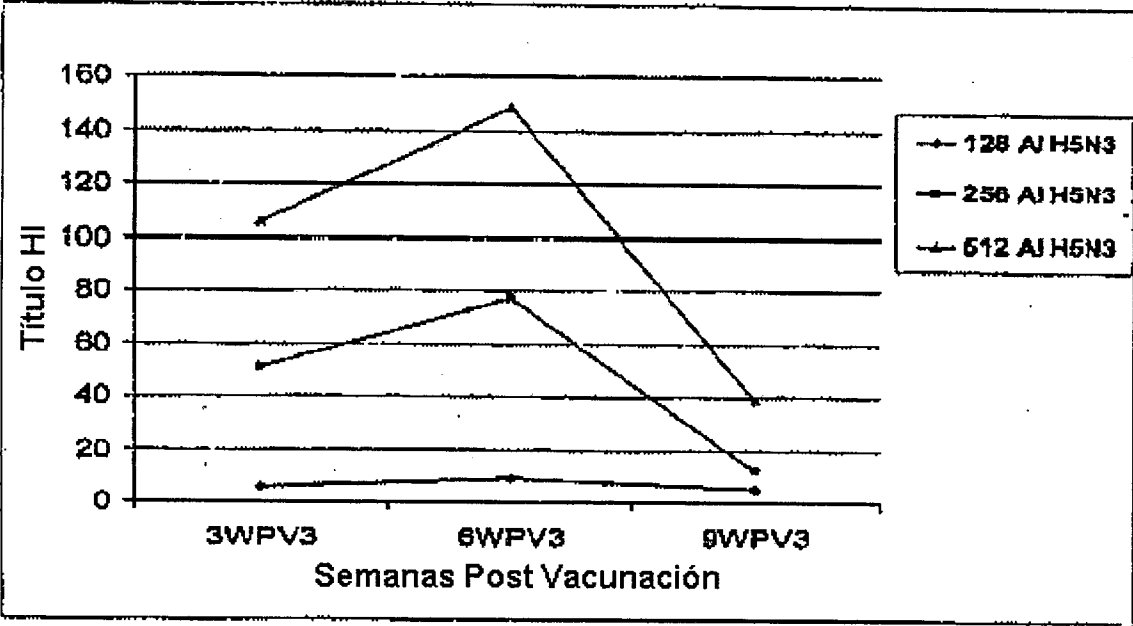


FIG. 2

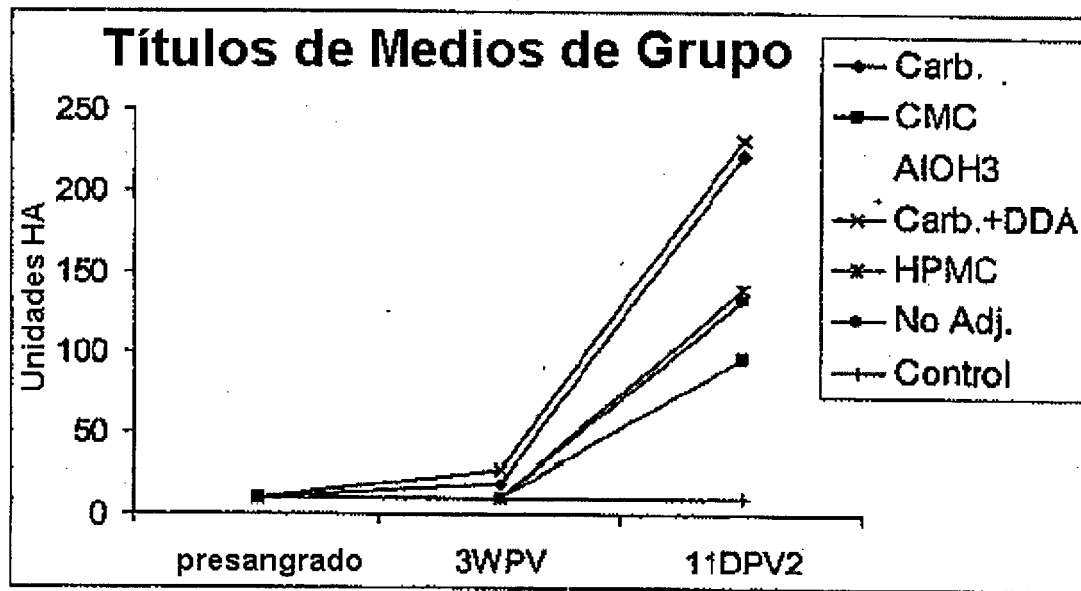
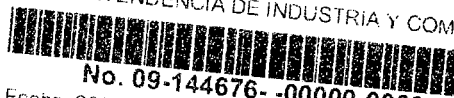


FIGURA 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144676-00000-0000

Fecha: 2009-12-17 15:38:15 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 85


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	9 144676
	Solicitud internacional	PCT/US2008/067433
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	01836

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Continúa en la página siguiente...

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia



Radicación No.: 9 144676

e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 12 FEB. 2010
adpall



Bogotá,
2020

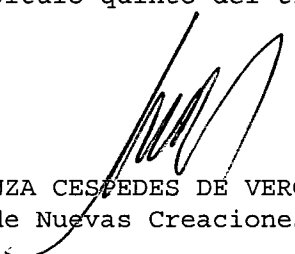
Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH LLC

REFERENCIA	Radicación No.	9 144676
	Solicitud internacional	PCT/US2008/067433
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>01837</u>

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
adpall **11 2 FEB. 2010**