



Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente N°. 10-054.267

Solicitud de Patente de Invención titulada: “VACUNA VIVA AVIRULENTA DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE CON ADYUVANTE”

Solicitante: ZOETIS W LLC

Nuestra Ref.: P2010/000061

RECURSO DE REPOSICION

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante, y dentro del término legal previsto por el artículo 51 del Código Contencioso Administrativo, me permito interponer RECURSO DE REPOSICIÓN en contra de la Resolución No. 40518, notificada por edicto desfijado el 16 de agosto de 2013.

1. ANTECEDENTES

La solicitud de patente ventilada en este expediente contiene un capítulo reivindicatorio con 2 reivindicaciones (capítulo reivindicatorio radicado el 14 de marzo de 2013, en respuesta al primer y único examen de fondo expedido el 30 de octubre de 2012). Según la Resolución No. 40518, el Despacho niega la totalidad de las reivindicaciones por supuesta falta de nivel inventivo.

2. OBJETO DEL RECURSO

Que se revoque la resolución recurrida, y en su lugar se conceda el privilegio de patente de invención para las reivindicaciones pendientes de la presente solicitud, o aquellas para las que el Despacho considere cumplen con los requisitos de patentabilidad.

3. FUNDAMENTO DEL RECURSO

Con referencia a los argumentos presentados por la SIC para desvirtuar el nivel inventivo de la presente solicitud en la resolución aquí recurrida, respetuosamente difiero del análisis expuesto, y procedo a refutar cada uno de dichos argumentos, exponiendo las motivaciones técnicas que desvirtúan la posición de ese Despacho.

En general, la SIC insiste en que las solicitudes de patente WO02/10343 (D1) y US2007/0253981 (D2) afectan el nivel inventivo de la presente solicitud.

3.1. a- i) La SIC presenta la siguiente tabla comparando las características de la invención contra D1 y D2.

Características Esenciales	D1	D2
Una composición inmunogénica que comprende:	Una composición que comprende:	Una vacuna para influenza canina que comprende:
Una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa avirulenta de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico de una cepa J de referencia de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> que tiene el número de acceso del GenBank 17243	Una bacteria viva sensible a la temperatura de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (Pág. 3, Líneas 16-20; Págs. 10-12, Ej. 3; Pág. 16, Reivindicaciones 3-5).	No se menciona
SP-Oil (1% a 3% v/ de copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno sorbitano y una solución tamponada)	Un adyuvante inmunológico	SP Oil (Pág. 10, Párr. 65)

ii) La SIC argumenta que D1 es el arte previo más cercano a la invención porque divulga una preparación de vacuna que contiene una bacterina viva sensible a la temperatura de *Mycoplasma hyopneumoniae* y un adyuvante inmunológico.

Adicionalmente, la SIC establece que el documento D2 da a conocer una vacuna contra la influenza canina junto con agentes capaces de generar una respuesta inmune mediada por células.

Toda vez que D1 enseña cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* que se pueden emplear en una composición inmunogénica, se entiende que la cepa J, reclamada por la presente invención, así como su código de acceso GenBank 17243, junto con el uso de adyuvantes en la generación de una respuesta inmune aumentada, son conocidos en el arte previo, y mientras que D2 divulga ciertas sustancias que se pueden utilizar para generar una respuesta inmune mediada por células como el Sp-Oil, se puede establecer que una combinación inmunogénica que contenga cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* junto con un agente que genere una respuesta inmune, se podría

alcanzar a partir de las enseñanzas de D1 en combinación con el adyuvante divulgado por D2 para generar una respuesta inmune mayor en el sujeto a quién se administre, dando como resultado la composición de la Reivindicación 1, la cual resulta ser obvia a la luz del arte previo.

b- i) Para empezar, me permito resaltar una vez más que la presente invención se refiere específicamente a composiciones inmunogénicas que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* y un adyuvante específico biológicamente aceptable SP-Oil (1% a 3% vol/vol de copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; de 2% a 6% vol/vol de escualano; de 0.1% a 0.5% vol/vol de monooleato de polioxietileno sorbitano; y una solución salina tamponada).

ii) D1 divulga vacunas que contienen una bacterina viva sensible a la temperatura de *Mycoplasma hyopneumoniae* y un adyuvante inmunológico, definido como **cualquier sustancia** cuya mezcla con un inmunógeno inyectado aumenta la respuesta.

Los adyuvantes especificados en D1 incluyen, pero no se limitan a,

- agentes tensioactivos, por ejemplo, hexadecilamina, octadecilamina, lisolecitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, N, N-dioctadecil-N'-N-bis(2-hidroxietil-propano diamina), metoxihexadecil-glicerol;
- polioles plurónicos;
- polianions, por ejemplo, pirano, sulfato de dextrano, poli IC, ácido poliacrílico, carbopol;
- péptidos, por ejemplo, dipéptido de muramilo, MPL, aimetilglicina, tuftsina, emulsiones de aceite, alumbre, y mezclas de los mismos.
- Otros adyuvantes potenciales incluyen la subunidad B péptídica de la toxina de E. coli lábil al calor o de la toxina del cólera.

Evidentemente, D1 no brinda enseñanza alguna acerca de composiciones que contengan **particularmente** el adyuvante SP-Oil concretamente aplicado en la presente invención, ni los efectos que éste proporcionaría. Es más, D1 no ilustra composición alguna que comprenda específicamente una cepa viva de *M. hyopneumoniae* avirulenta con un adyuvante **efectivo**.

El hecho que D1 enseñe cepas de *M. hyopneumoniae* resulta completamente irrelevante en la presente invención, pues lo que la SIC debe evaluar es la invención **como un todo**, es decir, si composiciones inmunogénicas de la presente invención que específicamente comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* y

un adyuvante específico biológicamente aceptable SP-Oil, resultan derivadas de manera obvia a partir del arte previo.

A su vez, D2 ni siquiera se refiere al *M. hyopneumoniae* y mucho menos proporciona enseñanzas que sugieran el uso particular del adyuvante SP Oil incluido en la presente invención. Por el contrario, como bien lo reconoce la SIC, D2 se refiere a vacunas contra influenza canina, que no tienen relación alguna con la presente invención.

La única referencia al adyuvante específico de interés en la presente invención en D2 se encuentra en el párrafo [0065], en donde simplemente de manera general se listan ejemplos de agentes capaces de aumentar la respuesta inmune, que eventualmente podrían ser incluidos en composiciones de vacunas. No existe ningún ejemplo particular en D2 que ilustre el uso específico del adyuvante SP-Oil, y mucho menos indicación alguna sobre su utilidad en vacunas de *M. hyopneumoniae* y los efectos que proporcionaría.

iii) Así las cosas, no se entiende la afirmación de la SIC cuando asegura que existía “sugerencia o motivación para utilizar un adyuvante como el SP-oil, divulgado en el documento D2, en la composición revelada en D2 utilizando una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* conocida”.

Llamo respetuosamente la atención de ese Despacho sobre el estándar de nivel inventivo que debe ser aplicado en el examen de solicitudes de patente según la guía publicada por esa misma entidad, donde la misma SIC establece que “no basta con la existencia de los elementos de manera aislada o individualmente considerados para concluir la falta de nivel inventivo, sino que ellos en su totalidad e integridad enseñen de manera evidente la manera de llegar a la solución al problema técnico”¹ (mi subrayado). La misma guía de la SIC establece que el examinador debe presentar una exposición “de cómo las divulgaciones previas inducen a la persona del oficio normalmente versada en la materia a realizar la invención sin que se hubiese requerido de su parte investigación alguna”².

En el presente caso, siendo que D1 simplemente se refiere a cepas de *M. hyopneumoniae* y D2 sólo contiene una mención aislada sobre el adyuvante SP-oil sin referirse siquiera al microorganismo de interés en esta invención, y entre listas que comprenden más de **40** adyuvantes y ninguna enseñanza específica que ilustre el uso particular de SP-oil o siquiera un ejemplo que muestre el uso de cualquier adyuvante, solicito respetuosamente al Despacho indicar, como lo requiere la guía

¹ GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD. 2012. Sección 2.13. http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf

² Ibid., Sección 2.13.5

para examen de la SIC: ¿cómo a partir de D1 y D2 se integraría de manera evidente la presente invención y los resultados alcanzados, sin que se hubiese requerido investigación alguna?

La respuesta a esta pregunta incuestionablemente indica que la SIC simplemente encuentra aisladamente elementos específicos en el arte previo y los combina de manera arbitraria para encajar en la presente invención, sin considerar las motivaciones reales y enseñanzas el arte previo. No es aceptable a quien examina una patente simplemente desglosar sus elementos separadamente y luego buscar referencias aisladas en el estado del arte que los incluyan, como si de armar un rompecabezas con piezas aisladas, o una colcha de retazos, se tratara.

La única forma en que una persona medianamente versada en la materia en la podría llegar a la composición de la presente invención a partir de D1 y D2, es precisamente con el beneficio del conocimiento de la misma (es decir, de la invención), de lo contrario, según la información contenida en el arte previo, dicha persona medianamente versada, sin duda, hubiera elegido cualquiera de los más de 40 adyuvantes mencionados en D2, sin indicación alguna sobre cuál produciría un resultado ventajoso. En este punto, **solicito respetuosamente a la SIC indicar la enseñanza o sugerencia específica en D2 que conllevaría inequívocamente a la persona medianamente versada en la materia a usar específicamente el adyuvante SP-oil y no cualquiera de los otros más de 40 allí incluidos.**

3.3. a- En respuesta a mis argumentos en respuesta al primer examen de fondo, la SIC argumenta que el hecho que D1 haya demostrado vacunas efectivas de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Págs. 10 – 12, Ej. 13) no permite que la selección particular de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* posea nivel inventivo con en el caso de la presente invención.

b- Una vez más, me permito resaltar respetuosamente que la presente invención se refiere específicamente a composiciones inmunogénicas que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una cepa viva avirulenta de *Mycoplasma hyopneumoniae* y un adyuvante específico biológicamente aceptable SP-Oil (1% a 3% vol/vol de copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; de 2% a 6% vol/vol de escualano; de 0.1% a 0.5% vol/vol de monooleato de polioxietileno sorbitano; y una solución salina tamponada).

En este sentido, la SIC se equivoca al afirmar que la presente solicitud carecería de nivel inventivo frente a D1, porque tal documento se refería a la efectividad de una vacuna con una cepa seleccionada de *M. hyopneumoniae*, pues la invención reivindicada no se basa simplemente en la efectividad del uso de la cepa, sino a la composición con un adyuvante particular que proporciona resultados inesperados. Como lo demostré anteriormente, no hay enseñanza en el arte previo que motive a la persona mediana versada en la materia a particularmente el adyuvante SP-oil con la

cepa de *M. hyopneumoniae* utilizada, ni sugerencia alguna que permita predecir los resultados obtenidos.

Reitero respetuosamente que los Ejemplos 1 y 2 del Capítulo Descriptivo demuestran la eficacia *in vivo* de composiciones de vacuna de *M. hyopneumoniae* vivo avirulento con el adyuvante particular SP-Oil, evidenciando efectos impredecibles y demostrando que las composiciones aquí reclamadas aumentan ventajosamente la respuesta inmune, lo cual no podía ser previsto a partir de las enseñanzas de D1 ni D2.

Por ejemplo, los resultados ilustrados en los Ejemplos 1 y 2 muestran claramente la tendencia obtenida para SP-Oil al 5% y 10% en el punto de muestreo de 3 horas en comparación con el control, donde se alcanza una diferencia de **dos veces y de cuatro veces**, respectivamente, en el efecto bactericida. Es decir, con la presente invención se ha encontrado que un incremento en la cantidad de SP-Oil como adyuvante proporciona un efecto bactericida menor, lo que representa un mayor número de UFC/mL disponibles para elevar la respuesta inmune en la vacunación en comparación con el control (sin SP-Oil). De otra parte, en comparación con otros adyuvantes, la Tabla 1 demuestra que el adyuvante SL-CD no sería adecuado en una composición inmunogénica que comprenda un *M. hyopneumoniae* vivo avirulento, dado que presenta un efecto bactericida superior, lo que representaría una respuesta inmune deficiente.

Así entonces, **solicito respetuosamente a ese Despacho** indicar la información particular disponible en D1 y D2 que permita a la persona medianamente versada en la materia predecir que para la cepa de *M. hyopneumoniae*, de especial interés en la presente invención, en composiciones con el adyuvante SP-Oil, resultaría ventajoso, por ejemplo sobre el adyuvante SL-CD (de uso común en la técnica) o cualquier otro de los más de 40 adyuvantes referidos en D2. Es decir, **¿cómo la persona medianamente versada en la materia podría saber a partir de D1 y D2 que el adyuvante SP-Oil proporcionaría la ventaja de tener un efecto bactericida menor y apropiado para la composición reclamada?**

El efecto de las composiciones de la presente invención incluyendo una cepa *M. hyopneumoniae* en combinación con SP-Oil como adyuvante, no podría haber sido derivada de manera obvia por la persona medianamente versada en la materia siguiendo las enseñanzas del arte previo citado y mucho menos sin haber evaluado la respuesta inmune en los animales mediante la debida experimentación requerida. De nuevo, acogiendo los lineamientos de la Guía de Examen de la SIC, el Examinador debe explicar “cómo las divulgaciones previas inducen a la persona del oficio

normalmente versada en la materia a realizar la invención sin que se hubiese requerido de su parte investigación alguna”³.

3.4. a- El Examinador afirma que “la obtención de composiciones de vacuna con un adyuvante para aumentar la respuesta inmune hace parte del quehacer rutinario del campo técnico” y cita el libro de texto “Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology”, Segunda Ed. Wiley, 2003. Pags 453 y 454.

b- i) En primer lugar, me permito objetar la cita anterior al libro de texto mencionado, pues, si bien es cierto que, en virtud del artículo 1.2.2.5 de la Circular 21447 del 13 de abril de 2012, la Superintendencia determinó que en el trámite de una solicitud de patente se debe realizar en principio un solo examen de patentabilidad, y que sólo en casos excepcionales podría proceder un segundo examen de fondo en relación con modificaciones sustanciales de la solicitud, en el presente caso, si el Examinador consideraba que “la obtención de composiciones de vacuna con un adyuvante para aumentar la respuesta inmune hace parte del quehacer rutinario del campo técnico” (con base en el texto “Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology”), era necesaria la realización de un segundo examen de fondo, por cuanto en el primero no fue expuesto dicho argumento, por el cual ahora se terminó denegando la solicitud de patente, y el solicitante no tuvo la oportunidad de pronunciarse frente al mismo en los términos y bajo las condiciones establecidas para esos efectos en el artículo 45 de la Decisión 486, siendo esta además una clara violación al debido proceso al que tiene derecho el Solicitante, en los términos de los artículos 29 de la Constitución Política y 3 del nuevo Código Contencioso Administrativo.

En virtud de lo anterior, mi representada se vio en la imposibilidad de dar respuesta a este nuevo “impedimento”, incumpliendo los artículos citados al denegar la patente sin haber notificado al solicitante sobre las razones por las cuales no se concede la protección, ya que el Recurso de Reposición no es la vía para permitir al solicitante controvertir nuevos argumentos sobre la patentabilidad de su invención.

En conclusión, es claro que la Superintendencia vulneró el derecho al debido proceso de mi representada al tomar una decisión con argumentos que no habían sido expuestos previamente, negándole la posibilidad de ejercer su derecho a la defensa al no poder controvertir dentro del trámite administrativo los argumentos presentados con relación al requisito de nivel inventivo y al nuevo argumento presentado en la Resolución objeto de este recurso.

En este sentido, la Superintendencia debe proporcionar al solicitante la facultad de controvertir las razones por las cuales considera que no se debe dar la protección de una patente, tanto en el trámite dando cumplimiento al régimen andino, como después de él, agotando la vía gubernativa.

La Superintendencia actuó bajo su propio arbitrio, desconociendo las garantías del solicitante e imponiéndole cargas adicionales a las previstas por ley. Por ello, de insistir en su argumentación sobre la que se fundamenta la negación de la presente solicitud, **solicito respetuosamente que se revoque la Resolución aquí recurrida**, y en su lugar se emita un segundo examen de patentabilidad, para que mi representada pueda presentar observaciones complementarias frente a los nuevos cuestionamientos y referencias del arte previo que surgieron sobre la invención.

ii) Sin perjuicio de lo anterior, la mencionada cita que realiza el Examinador es a todas luces sesgada y subjetiva, pues si bien el texto “Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology” en las páginas 453 y 454 se refiere de manera amplia a la tecnología de adyuvantes y proporciona información general sobre el uso de adyuvantes que facilita la administración de cantidades reducidas de antígenos para alcanzar una adecuada respuesta inmune, no hay enseñanza alguna en dicho texto que motive a la persona medianamente versada en la materia a desarrollar composiciones de *M. hyopneumoniae* en combinación con el adyuvante SP-Oil y los resultados prácticos alcanzados. De hecho, la persona medianamente versada en la materia siguiendo las enseñanzas del texto “Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology” estaría predispuesta a NO utilizar adyuvantes basados en aceite (oil-based emulsions adjuvants), pues como se especifica en la página 456 (ANEXO 1), este tipo de adyuvantes ha sido históricamente reconocido como altamente tóxico y su uso (incluso en animales) ha sido discontinuado o por lo menos debe ser cuidadosamente evaluado.

De cualquier manera, contrario a lo afirmado por la SIC, no es posible predecir el efecto de utilizar diferentes adyuvantes en combinación con composiciones inmunogénicas, pues éstos inesperadamente pueden conducir a diferencias que produzcan efectos significativos en la actividad biológica e incluso efectos tóxicos nocivos.

iii) En este punto me permito enfatizar que el uso de diferentes adyuvantes con diferentes antígenos es un arte impredecible en el campo biomédico, en el sentido que no existe tecnología que permita predecir el aumento de la respuesta inmune dada. No siquiera una herramienta teórica que pueda dar a conocer, de manera anticipada si una combinación particular entre cualquier antígeno/adyuvante presentaría resultados favorables, sin la necesidad expresa de realizar ensayos experimentales para saberlo.

De aceptar el argumento equivocado y subjetivo de la SIC que las combinaciones de un adyuvante y una cepa que genera una respuesta inmunológica/adyuvante corresponden a una práctica rutinaria en el campo técnico, se llegaría a la conclusión errónea y completamente alejada de la realidad técnica, que no hay necesidad de realizar ensayos experimentales, sino simplemente combinar de manera aleatoria cualquier cepa antigénica y cualquier adyuvante para obtener vacunas que presenten respuestas inmunes aumentadas.

Por el contrario, para formular la composición de la presente invención, se requirió realizar arduas investigaciones como se demuestra en los ejemplos del Capítulo Descriptivo, pues no había garantía alguna a partir de la información disponible en el estado de la técnica que permitirá sustraerse a la imprevisibilidad de los efectos del uso de adyuvantes en composiciones inmunogénicas. En este punto, una vez más solicito respetuosamente al Despacho indicar cómo a partir del arte previo citado, la persona medianamente versada en la materia esperaría con razonable expectativa los resultados alcanzados por la presente invención, si necesidad de acudir a experimentación alguna.

3.5. Considerando las imprecisiones señaladas a lo largo de este escrito, es claro que las conclusiones a las que llega la SIC son erradas y carecen de sustento técnico a la luz de la divulgación contenida en D1 y/o D2, pues ellas están soportadas en premisas equivocadas y a especulaciones que no han sido probadas, pues ninguna enseñanza de D1 o D2 promueve el uso particular de SP-oil como adyuvante en composiciones con *M. hyopneumoniae* y menos aún, permiten predecir los efectos sorprendentes e inesperados logrados.

Al evaluar el nivel inventivo de una invención, y con el fin de alcanzar una conclusión de no obviedad adecuada, debe retrocederse en el tiempo al momento en que la invención era desconocida, y específicamente evaluar las motivaciones del arte previo que hubieran conducido inequívocamente a la invención reclamada.

La única forma en que el Despacho pudo haber llegado a las conclusiones citadas anteriormente durante el análisis de patentabilidad fue aplicando un análisis en retrospectiva, luego de analizar la presente invención. Este tipo de análisis es conocido en la doctrina y jurisprudencia internacional como análisis en retrospectiva o “hindsight”, el cual se proscribe en el Manual Andino de Patentes (MAP), conforme al cual “...la búsqueda de anterioridades se efectúa *a posteriori*, tomando como punto de partida la misma invención,...el examinador debe realizar el esfuerzo intelectual de colocarse en la situación que ha tenido que afrontar el técnico con conocimientos medios en la

materia en un momento en que la invención no era conocida, es decir antes de la invención".⁴(mi subrayado).

Como bien se reconoce en la doctrina y jurisprudencia internacional, no es apropiado anticiparse a los resultados presentados por la invención, ya que así, siempre resultará "obvio" todo objeto de una solicitud de patente, pues inevitablemente está parecerá derivada de la teoría en que se basa su desarrollo, sin dar mayor importancia al trabajo, incertidumbre, intelecto y creatividad involucrados en la invención para llegar a la solución del problema planteado en la solicitud.

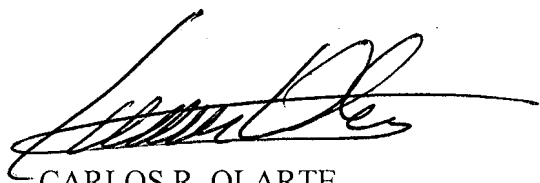
Si la SIC hubiera realizado un análisis acertado de las enseñanzas del arte previo, y de los datos e información demostrando los efectos sorprendentes y mejorados señalados anteriormente, habría concluido que una persona medianamente versada en la materia no habría encontrado en dichos documentos la información relevante para desarrollar las composiciones aquí reivindicadas.

4. Para terminar, de conformidad con lo establecido en el artículo 59 del Código Contencioso Administrativo, solicito respetuosamente que todos y cada uno de los puntos planteados en el presente recurso sean resueltos de manera individual, completa y motivada, respecto de las razones de hecho, derecho y/o conveniencia que lleven a esa Superintendencia a adoptar la decisión que estime frente a la solicitud aquí formulada.

5. NOTIFICACIÓN

Recibiré notificaciones en mis oficinas ubicadas en la Carrera 5 No. 34-03, de Bogotá.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

ANEXO 1. "Biopharmaceuticals. Biochemistry and Biotechnology", Segunda Ed. Wiley, 2003. Pags 453 a 460.

⁴ Manual Andino de Patentes ⁴ Manual Andino de Patentes. (2004). Sección 10.2. (disponible en <http://www.comunidadandina.org/public/patentes.pdf>).

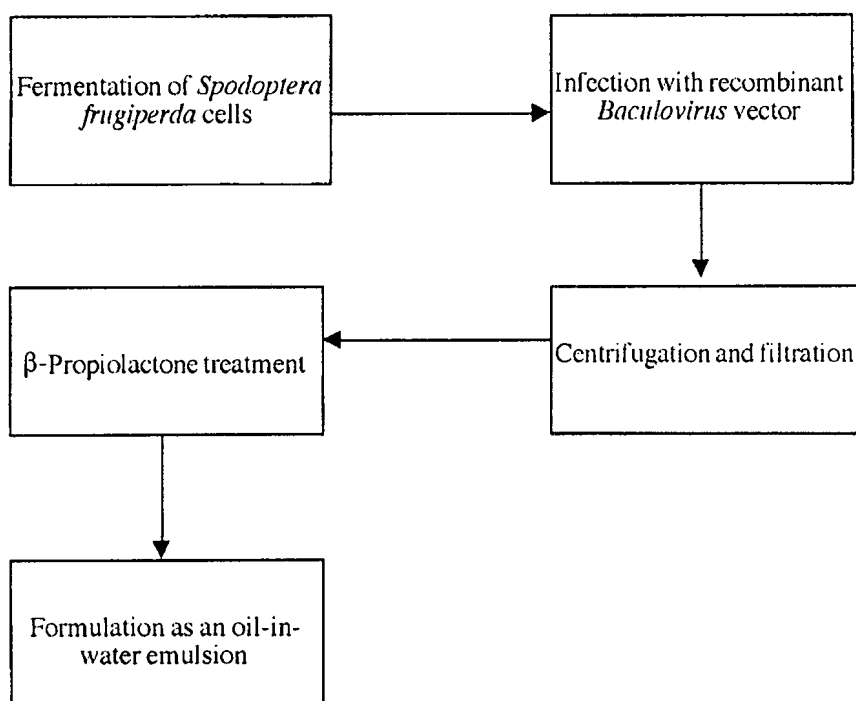


Figure 10.17. Overview of the manufacture of the veterinary vaccine Porcilis pesti. Refer to text for specific details

including Porcilis pesti and Bayovac CSF E2. *Porcilis pesti*, for example, contains a recombinant form of the classical swine fever virus E2 antigen, the immunodominant surface antigen associated with this viral pathogen. It is used to immunize young pigs. An overview of its manufacture is presented in Figure 10.17. The process is initiated by growth of *Spodoptera frugiperda* cells, typically in a 500l fermenter. The cells are then infected with the recombinant baculovirus vector, resulting in high-level expression of the recombinant E2 antigen. The antigen is harvested from the production medium by low-speed centrifugation and membrane filtration steps, which serve to remove intact cells/cellular debris. The antigen-containing supernatant is then treated with β -propiolactone in order to inactivate any viral particles present. The antigen is not subjected to subsequent high-resolution chromatographic purification steps, and hence is not purified to homogeneity. The product is then formulated as an oil-in-water emulsion.

Adjuvant technology

Administration of many vaccines on their own stimulates a poor host immunological response. This is particularly true of the more recently developed subunit vaccines. An adjuvant is defined as any material that enhances the cellular and/or humoral immune response to an antigen. Adjuvants thus generally elicit an earlier, more potent and longer-lasting, immunological reaction against co-administered antigen. In addition, the use of adjuvants can often facilitate administration of reduced quantities of antigen to achieve an adequate immunological response.

Table 10.20. Overview of the adjuvant preparations that have been developed to date, or are under investigation. Of these, aluminium-based substances are the only adjuvants used to any significant degree in humans. Calcium phosphate and oil emulsions find very limited application in human medicine

Mineral compounds	Aluminium phosphate, AlPO ₄ Aluminium hydroxide, Al(OH) ₃ Alum, AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O Calcium phosphate, CaPO ₄
Bacterial products	Mycobacterial species Mycobacterial components (e.g. trehalose dimycolate, muramyl dipeptide) <i>Corynebacterium</i> species <i>Bordetella pertussis</i> Lipopolysaccharide
Oil-based emulsions	Freund's complete/incomplete adjuvants (FCA/FIA) Starch oil Quil A
Saponins	
Liposomes	
Immunostimulatory complexes (ISCOMs)	
Some cytokines	Interleukins-1 and -2

This implies consequent economic savings, as vaccines (particularly subunit and vector vaccines) are far more expensive to produce than the adjuvant.

A number of different adjuvant preparations have been developed (Table 10.20). Most preparations also display some associated toxicity and, as a general rule, the greater the product's adjuvanticity, the more toxic it is likely to be. A few different adjuvants may be used in veterinary medicine; however, for safety reasons, aluminium-based products are the only adjuvants routinely used in human medicine. Application of many of the aggressive adjuvant materials is reserved for selected experimentation purposes in animals.

The concept of enhancing the immune response against an antigen by co-administration of an immunostimulatory substance dates back to the beginning of the 20th century. Oil-based emulsions were used from 1916 on, while in the mid-1920s, scientists discovered that the immunological response to administration of tetanus and diphtheria toxin was increased by co-administration of a range of (somewhat unlikely) substances, including agar, starch oil, saponin, tapioca and breadcrumbs.

Few of these substances remain in medical use, due to unacceptable side effects. An ideal adjuvant should display several specific characteristics. These include:

- safety (no unacceptable local/systemic responses);
- elicit protective immunity, even against weak immunogens;
- be non-pyrogenic;
- be chemically defined (facilitates consistent manufacture and quality control testing);
- be effective in infants/young children;
- yield stable formulation with antigen;
- be biodegradable;
- be non-immunogenic itself.

Adjuvant mode of action

Adjuvants are a heterogeneous family of substances in terms of both their chemical structure and their mode of action. The observed adjuvanticity of any such substance may be due to one or more of the following factors:

- depot formation of antigen; this results in the subsequent slow release of the antigen from the site of injection which, in turn, ensures its prolonged exposure to the immune system;
- enhanced antigen presentation to the cells of the immune system;
- the direct induction of immunostimulatory substances, most notably interleukins and other cytokines.

In addition to the use of adjuvants *per se*, modification of the antigen may result in increasing its inherent immunogenicity. Such modifications can include:

- polymerization of protein antigens (e.g. by reaction with glutaraldehyde or other cross-linking agents); this approach has been successfully adopted with tetanus and diphtheria toxoids;
- conjugation of proteins to polysaccharides;
- cationization of protein antigens.

Mineral-based adjuvants

A number of mineral-based substances display an adjuvant effect. Although calcium phosphate, calcium chloride and salts of various metals (e.g. zinc sulphate and cerium nitrate) display some effect, aluminium-based substances are by far the most potent. Most commonly employed are aluminium hydroxide and aluminium phosphate (Table 10.20). Their adjuvanticity, coupled to their proven safety, renders them particularly valuable in the preparation of vaccines for young children. They have been incorporated into millions of doses of such vaccine products so far.

The principal method by which aluminium-adjuvanted vaccines are prepared entails mixing the antigen in solution with a pre-formed aluminium phosphate (or hydroxide) precipitate under chemically-defined conditions (e.g. of pH). Adsorption of the antigen to the aluminium-based gel ensues, with such preparations being generally termed 'aluminium-adsorbed vaccines'. 1 mg of aluminium hydroxide will usually adsorb ca. 50–200 μg of protein.

The major mode of action of such products appears to be depot formation at the site of injection. The antigen is only slowly released from the gel, ensuring its sustained exposure to immune surveillance. The aluminium compounds are also capable of activating complement. This can lead to a local inflammatory response, with consequent attraction of immunocompetent cells to the site of action.

Despite their popularity, aluminium-based adjuvants suffer from several drawbacks. They tend to effectively stimulate only the humoral arm of the immune response. They cannot be frozen or lyophilized, as either process promotes destruction of their gel-based structure. In addition, aluminium-based products display poor or no adjuvanticity when combined with some antigens (e.g. typhoid or *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharides).

Oil-based emulsion adjuvants

The adjuvanticity of oil emulsions was first recognized in the early 1900s. However, the first such product to gain widespread attention was Freund's complete adjuvant (FCA), developed in 1937. This product essentially contained a mixture of paraffin (i.e. mineral) oil with dead

Table 10.21. Some toxic effects sometimes noted when Freund's complete adjuvant (FCA) is administered to experimental animals

Inflammation/abscess formation at the site of injection
Pyrogenic effect (fever)
Severe pain
Possible organ damage
Possible induction of autoimmune disease
Hypersensitization
Induction of cancer in some animals under some conditions

mycobacteria, formulated to form a water-in-oil emulsion. Arlacel A (mannide mono-oleate) is usually added as an emulsifier.

Freund's incomplete adjuvant (FIA) is a similar product. It differs from FCA in that it lacks the mycobacterial component and, consequently, displays somewhat lesser adjuvanticity. The mode of action of FIA is largely attributed to depot formation. The mycobacterial components in FCA have additional direct immunostimulatory activities.

Although it is one of the most potent adjuvant substances known, FCA is too toxic for human use. Some of its reported side effects are listed in Table 10.21. Its toxicity has also precluded its routine veterinary application, although it is sometimes used for experimental purposes. FIA is less toxic than its mycobacterial-containing counterpart. It has found used in the preparation of selected animal vaccines, and was even incorporated into some earlier human vaccines (Table 10.22). However, its use in humans (and to a large extent, animals) has been discontinued due to its reported toxic effects.

The presence in mineral oil of potential carcinogens also raised safety concerns relating to FCA/FIA. Mineral oil is composed of a complex mixture of both cyclic and non-cyclic hydrocarbons of varying chain length, some of which display carcinogenic potential. Arlacel A was also found to be capable of inducing cancer in mice.

Various additional oil-based adjuvants have subsequently been developed. Adjuvant 65, for example, consists of 86% peanut oil, 10% Arlacel A and 4% aluminium monostearate (as a stabilizer). Unlike mineral oil, peanut oil is composed largely of triglycerides, which are readily metabolized by the body. Although adjuvant 65 was initially proved safe and effective in humans, it displayed less adjuvanticity than FIA. Its use was largely discontinued, mainly due to the presence in its formulation of Arlacel A.

Latterly, some oil-in-water adjuvants have been developed. Many are squalene-in-water emulsions. Emulsifiers most commonly used include polyalcohols, such as Tween and Span. In some cases, immunostimulatory molecules (including muramyl dipeptide and trehalose

Table 10.22. Some vaccine preparations in which Freund's incomplete adjuvant (FIA) was used as an adjuvant

Human vaccines	Influenza vaccines
	Dead poliomyelitis vaccines
Veterinary vaccines	Foot and mouth disease
	Newcastle disease
	Rabies
	Distemper
	Infectious canine hepatitis

dimycolate; see next section) have also been incorporated in order to enhance adjuvanticity. These continue to be carefully assessed and may well form a future family of useful adjuvant preparations.

Bacteria/bacterial products as adjuvants

Selected microorganisms have been identified which can trigger particularly potent immunological responses. The immunostimulatory properties of these cells has generated interest in their potential application as adjuvants. Examples include various Mycobacteria, *Corynebacterium parvum*, *C. granulorum* and *Bordetella pertussis*. Although some such microorganisms are used as antigens in vaccines, they are considered too toxic to be used solely in the role of adjuvant. Thus, researchers have sought to identify the specific microbial biomolecules responsible for the observed immunostimulatory activity. It was hoped that these substances, when purified, might display lesser/no toxic side effects, while retaining their immunostimulatory capacity.

Fractionation of mycobacteria resulted in the identification of two cellular immunostimulatory components, trehalose dimycolate (TDM) and muramyl dipeptides (MDP). Both are normally found in association with the mycobacterial cell wall. TDM is composed of a molecule of trehalose (a disaccharide consisting of two molecules of α -D-glucose linked via an α 1-1 glycosidic bond), linked to two molecules of mycolic acid (a long-chain aliphatic hydrocarbon-based acid) found almost exclusively in association with mycobacteria. TDM, while retaining its adjuvanticity, is relatively non-toxic.

The structure of the native immunostimulatory MDPs was found to be n-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (N-acetyl muramic acid is a base component of bacterial peptidoglycan). Native TDM is a potent pyrogen and is too toxic for general use as an adjuvant. The molecular basis underlying MDP's adjuvanticity remains to be fully elucidated. Administration of MDP is, however, known to activate a number of cell types which play direct/indirect roles in immune function, and induces the secretion of various immunomodulatory cytokines (Table 10.23).

A number of derivatives were synthesized in the hope of identifying a modified form which retained its adjuvanticity but displayed lesser toxicity. Some such derivatives, most notably threonyl-MDP, muramyl tripeptide and murabutide, display some clinical promise in this regard.

Table 10.23. Some cell types activated upon administration of MDP. Activation induces synthesis of a range of immunomodulatory cytokines by these (and other) cells

Cell types activated	Macrophages
	Mast cells
	Polymorphonuclear leukocytes
	Endothelial cells
	Fibroblasts
	Platelets
	Interleukin-1
	Colony stimulating factors
	Fibroblast activating factor
	B cell growth factor
Cytokines and other molecules induced	Prostaglandins

Table 10.24. Some characteristic biological effects induced by lipopolysaccharide

Pyrogenicity
Generalized and severe toxicity
Adjuvanticity
Activation of macrophages and granulocytes
B lymphocyte mitogen
Activation of complement
Induction of synthesis of TNF, CSF, IL-1, IFN
Some anti-tumour activity

Threonyl-MDP, for example, has been included in the formulation known as Syntex adjuvant formulation-1 (SAF-1). Animal studies suggest that this adjuvant is non-toxic and elicits a good B and T cell response.

An additional bacterial component displaying appreciable adjuvanticity is the *Corynebacterium granulosum*-derived p40 particulate fraction. p40 is composed of fragments of cell wall peptidoglycan and associated glycoproteins. Its administration to animals results in activation of various elements of immune function while displaying little or no toxic effects. In addition to activation of macrophages, p40 induces synthesis of a variety of cytokines, most notably IL-2, TNF, IFN- α and IFN- γ . Not surprisingly, p40 was found to enhance both specific and non-specific resistance to a wide range of pathogens and was also shown to display anti-tumour activity. Clinical trials in humans appear to confirm many of these observations. p40, or derivatives thereof, may therefore yet play a role in human or veterinary immunization programmes.

The observed adjuvanticity of *Bordetella pertussis* is largely attributable to the presence of pertussis toxin and lipopolysaccharide (LPS). LPS, a constituent of the cell envelope of Gram-negative bacteria (Chapter 3), essentially consists of polysaccharide moieties to which lipid (lipid A) is covalently attached.

While purified LPS displays potent immunostimulatory properties, it also induces various toxic side effects (Table 10.24), the most prominent of which is pyrogenicity. These effects render application of LPS as an adjuvant unacceptable. Both its immunostimulatory and toxic properties are mainly associated with the lipid A portion of the molecule. Attempts have been made to chemically or otherwise alter the lipid A portion in order to ameliorate the observed toxicity.

Succinylated or phthalylinated LPS displays significant reduction in toxicity (up to 100 000-fold) while retaining its adjuvanticity. Acid treatment (0.1 M HCl) of LPS obtained from various *Salmonella* species resulted in the production of an LPS-derivative termed monophosphoryl lipid A (MPL). This also displays adjuvanticity, with little associated pyrogenicity or toxicity. This alteration of biological activity can also be achieved by removal of some of the fatty acids found in the LPS lipid A region. As LPS is effective in activating both cellular and humoral immune responses, research in this area continues to be pursued.

Additional adjuvants

In addition to the immunostimulatory substances discussed above, the adjuvanticity of a variety of other substances is also being appraised. These include saponins, liposomes and immunostimulatory complexes (ISCOMS).

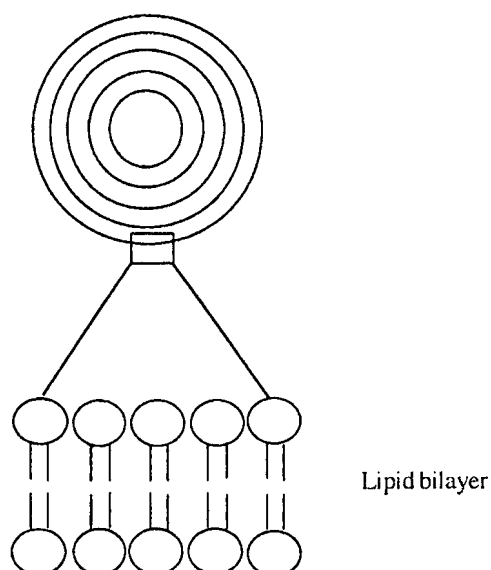


Figure 10.18. Generalized liposome structure. Refer to text for details

Saponins are a family of glycosides (sugar derivatives) widely distributed in plants. Each saponin consists of a sugar moiety bound to a 'sapogenin'—either a steroid or a triterpene. The immunostimulatory properties of the saponin fraction isolated from the bark of *Quillaja* (a tree) has been long recognized; Quil A (which consists of a mixture of related saponins) is used as an adjuvant in selected veterinary vaccines. However, its haemolytic potential precludes its use in human vaccines. Research efforts continue in an attempt to identify individual saponins (or derivatives thereof) that would make safe and effective adjuvants for use in human medicine.

Liposomes are membrane-based supramolecular particles which consist of a number of concentric lipid membrane bilayers separated by aqueous compartments (Figure 10.18). They were developed initially as carriers for therapeutic drugs. Initially, the bilayers were almost exclusively phospholipid-based. More recently, non-phospholipid-based liposomes have been developed.

The adjuvanticity of liposomes depends upon their composition, number of layers and charge characteristics. They act as effective adjuvants for both protein and carbohydrate-based antigen and help stimulate both B and T cell responses. Their likely mode of action includes depot formation, but they also possibly increase/enhance antigen presentation to macrophages. The exact molecular mechanism(s) by which they stimulate a T cell response remains to be elucidated, but it appears to be associated with their hydrophobicity. Liposomes are likely to gain more widespread use as adjuvants when technical difficulties associated with their stability and consistent/reproducible production are resolved.

ISCOMs are stable (non-covalent) complexes composed of a mixture of Quil A, cholesterol and (an amphipathic) antigen. ISCOMs stimulate both humoral and cellular immune responses and have been used in the production of some veterinary vaccines. Their use in humans, however, has not been licensed so far, mainly due to safety concerns relating to the Quil A component.

In summary, therefore, a whole range of adjuvants have thus far been identified/developed. Problems of toxicity have precluded use of many of these adjuvants (particularly in humans). However, research efforts continue in an attempt to develop the next generation of safe and, hopefully, even more effective vaccine adjuvants.

FURTHER READING

Books

- Amyes, S. (2002). *Tumour immunology*. Taylor & Francis, London.
 Grossbard, M. (1998). *Monoclonal Antibody-based Therapy of Cancer*. Marcel Dekker, New York.
 Harris, W. (1997). *Antibody Therapeutics*. CRC Press, Boca Raton, FL.
 Kontermann, R. (2001). *Antibody Engineering*. Springer-Verlag, Berlin.
 Liddell, J. (1995). *Antibody Technology*. BIOS Scientific, Oxford.
 Plotkin, S. (1999). *Vaccines*. W.B. Saunders, London.
 Powell, M. (1995). *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*. Plenum, New York.
 Stern, P. (2000). *Cancer Vaccines and Immunotherapy*. Cambridge University Press, Cambridge.
 Talwar, G. (1994). *Synthetic Vaccines*. Springer-Verlag, Berlin.
 Woodrow, G. (1997). *New Generation Vaccines*. Marcel Dekker, New York.

Articles

Antibody technology

- Benhar, I. (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Adv.* **19**, 1–33.
 Berger, M. *et al.* (2002). Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Am. J. Med. Sci.* **324**(1), 14–30.
 Breedveld, F. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* **355**, 735–740.
 Chapman, P. (2002). PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**(4), 531–545.
 Chester, K. & Hawkins, R. (1995). Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol.* **13**, 294–300.
 Funaro, A. *et al.* (2000). Monoclonal antibodies and the therapy of human cancers. *Biotechnol. Adv.* **18**(5), 385–401.
 Goldenberg, D. *et al.* (2002). Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J. Nuclear Med.* **43**(5), 693–713.
 Hoogenboom, H. *et al.* (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* **4**, 1–20.
 Huennekens, F. (1994). Tumor targeting: activation of prodrugs by enzyme-monoclonal antibody conjugates. *Trends Biotechnol.* **12**, 234–239.
 Keating, G. & Perry, C. (2002). Infliximab—an updated review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *Biodrugs* **16**(2), 111–148.
 Kohler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature* **256**, 495–497.
 Murry, J. (2000). Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age. *Semin. Oncol.* **27**(6), 64–70.
 Senter, P. & Springer, C. (2001). Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal antibody–enzyme conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**(3), 247–264.
 Trail, P. & Bianchi, A. (1999). Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **11**(5), 584–588.
 Umemura, S. *et al.* (2002). Pathological evaluation of HER2 overexpression for the treatment of metastatic breast cancers by humanized anti-HER2 monoclonal antibody (Trastuzumab). *Acta Biochim. Cytochim.* **35**(2), 77–81.
 Wang, R. (1999). Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development. *J. Mol. Med.* **77**(9), 640–655.
 Wang, R. & Rosenberg, S. (1999). Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol. Rev.* **170**, 85–100.
 Winter, G. & Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature* **349**, 293–299.

Vaccine technology

- Andino, R. *et al.* (1994). Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science* **265**, 1448–1451.
 Chauhan, V. (1996). Progress towards malaria vaccine. *Curr. Sci.* **71**(12), 967–975.
 Cox, J. & Coutter, A. (1997). Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* **15**(3), 248–256.
 Doolan, D. & Hoffman, S. (1997). Multigene vaccination against malaria—a multistage, multi-immune response approach. *Parasitol. Today* **13**(5), 171–178.