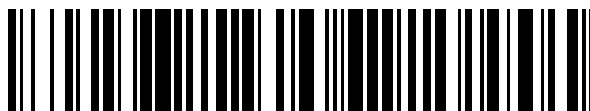


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 628**

51 Int. Cl.:
A61K 39/10 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05023118 .2**
96 Fecha de presentación: **23.12.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1616573**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

54 Título: **VACUNAS CONTRA LA BORDETELLA BRONCHISÉPTICA.**

30 Prioridad:
29.01.1999 US 117705 P
26.02.1999 US 121760 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.02.2012

73 Titular/es:
PFIZER PRODUCTS INC.
EASTERN POINT ROAD
GROTON, CT 06340, US

72 Inventor/es:
Dearwester, Don Alan;
Roberts, David Stewart y
Swearingin, Leroy Allen

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 628 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra la *Bordetella bronchiseptica*

Campo de la invención

5 La invención se refiere a una composición de antígeno que comprende un cultivo de *Bordetella bronchiseptica* que se ha inactivado añadiendo formalina seguido de la adición de glutaraldehído. La invención también se refiere a una composición de vacuna que comprende dicha composición de antígeno y un adyuvante.

Antecedentes de la invención

10 La generación de inmunidad a organismos infecciosos es una potente herramienta en el control de enfermedades. Los antígenos que inducen inmunidad a la infección se conocen como inmunógenos. Los anticuerpos protectores que inducen los antígenos pueden colaborar con otras defensas naturales para inhibir el proceso infeccioso, o éstos pueden neutralizar productos perjudiciales en el organismo infectado tales como toxinas.

15 Un medio eficaz para mejorar la respuesta de anticuerpos es el uso de un adyuvante. Así, se incluye un adyuvante en una vacuna como un aditivo o vehículo para mejorar la respuesta al antígeno. Un adyuvante puede actuar por diferentes mecanismos que incluyen, (1) atrapar al antígeno en el cuerpo causando una liberación lenta, (2) atraer las células del sistema inmune hacia el sitio de inyección, (3) estimular las células del sistema inmune para que proliferen y se activen y, (4) mejorar la dispersión del antígeno en el cuerpo del receptor.

20 Como adyuvantes se han usado una serie de agentes con diversas propiedades químicas, incluyendo emulsiones "agua en aceite" y "aceite en agua", sales minerales, polinucleótidos y sustancias naturales. Un adyuvante, conocido con el nombre comercial AMPHIGEN™, se describe en la patente de los Estados Unidos nº 5.084.269. El adyuvante AMPHIGEN™ está compuesto por una lecitina exenta de glicéridos disuelta en un aceite, normalmente parafina líquida clara. En preparaciones de vacuna, AMPHIGEN™ se dispersa en una solución o suspensión acuosa del antígeno inmunizante en forma de una emulsión "aceite en agua".

25 Cuando se usó el adyuvante AMPHIGEN™ según la patente de los Estados Unidos nº 5.084.269 anterior se observaron problemas. Por ejemplo, la lecitina en el AMPHIGEN™ no es suficiente para producir una emulsión estable del aceite, dando lugar así a un acúmulo o depósito de aceite en los tejidos en los que se ha inyectado. El aceite mineral no puede ser metabolizado o eliminado por el animal. Como resultado, el aceite se convierte en el origen de una grave inflamación crónica y de aparición de marcas. La emulsificación del AMPHIGEN™ directamente en la preparación de antígeno tiene el riesgo de dañar al antígeno. Además, si la emulsión deseada no se llega a formar, se deberá desechar el antígeno valioso.

30 El documento US 4.888.169 describe una composición de vacuna que comprende un cultivo de *Bordetella bronchiseptica* que se ha inactivado añadiendo sólo glutaraldehído.

El documento US 5.578.308 describe la inactivación (detoxificación) de toxina *Bordetella* purificada usando glutaraldehído seguido de formalina en presencia de aminoácidos.

Sumario de la invención

35 La invención se refiere a una composición de antígeno que comprende un cultivo de *Bordetella bronchiseptica* que se ha inactivado añadiendo formalina seguido de la adición de glutaraldehído. La invención también se refiere a una composición de vacuna que comprende dicha composición de antígeno y un adyuvante. De forma particular, la invención se refiere a dicha composición de vacuna, en la que dicho adyuvante comprende de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 12,5% en volumen/volumen (v/v) de una lecitina, de aproximadamente 1% a aproximadamente 23% v/v de un aceite, y de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 3,5% v/v de al menos un tensioactivo anfifílico.

40 En una primera realización la invención proporciona un procedimiento de inactivación de un cultivo de *Bordetella bronchiseptica* que comprende la adición de formalina a dicho cultivo seguido de la adición de glutaraldehído a dicho cultivo.

45 En una segunda realización la invención proporciona una composición de *Bordetella bronchiseptica* que comprende un cultivo de *Bordetella bronchiseptica*, formalina y glutaraldehído.

50 En una tercera realización la invención proporciona una vacuna para la protección de un mamífero frente a infección por *Bordetella bronchiseptica* que comprende aproximadamente 1 pg a aproximadamente 100 mg por kg de huésped de una cantidad de células de *Bordetella bronchiseptica* de un cultivo inactivado de acuerdo con el procedimiento anterior efectivo para proteger dicho mamífero contra una infección por *Bordetella bronchiseptica* y un vehículo fisiológicamente aceptable. Preferiblemente la vacuna comprende aproximadamente 10 pg a aproximadamente 1 mg por kg de huésped de células de *Bordetella bronchiseptica*, más preferiblemente aproximadamente 100 pg a aproximadamente 1 µg por kg de huésped de células de *Bordetella bronchiseptica*.

En una cuarta realización la invención proporciona una vacuna para la protección de un mamífero frente a infección por *Bordetella bronchiseptica* que comprende aproximadamente 1 pg a aproximadamente 100 mg por kg de huésped de una cantidad de células de *Bordetella bronchiseptica* de un cultivo inactivado de acuerdo con el procedimiento anterior efectivo para proteger dicho mamífero frente a infección por *Bordetella bronchiseptica* y un vehículo fisiológicamente aceptable, en el que dicha vacuna comprende además aproximadamente 1 pg a aproximadamente 100 mg por kg de huésped de una cantidad de antígenos de *Pasteutella multocida* efectivo para proteger el mamífero frente a una infección por *Pasteutella multocida* toxigénica. Preferiblemente la vacuna comprende aproximadamente 10 pg a aproximadamente 1 mg por kg de huésped de *Pasteutella multocida* toxigénica, más preferiblemente aproximadamente 100 pg a aproximadamente 1 µg por kg de huésped de antígenos de *Pasteutella multocida* toxigénica. Preferiblemente, la vacuna de la cuarta realización es para la protección de un cerdo frente a una infección por *Bordetella bronchiseptica* y/o una infección por *Pasteutella multocida* toxigénica. También se proporciona con la invención el uso de la vacuna de la cuarta realización en la preparación de una vacuna para la protección de un cerdo frente a infección por *Bordetella bronchiseptica* y/o una infección por *Pasteutella multocida* toxigénica.

Se proporciona también el uso de la vacuna de la cuarta realización, en la preparación de una vacuna para la protección de un lechón frente a rinitis atrópica mediante:

- a) vacunar una cerda antes del parto y durante la gestación con una cantidad de una vacuna según la cuarta realización, eficaz para proporcionar anticuerpos anti-*Bordetella bronchiseptica* y anticuerpos anti-*Pasteurella multocida* toxígena en el calostro producido por dicha cerda; y
- b) suministrar el calostro producido por dicha cerda al lechón en un período de aproximadamente 24 horas después del nacimiento del lechón.

Se proporciona también la vacuna de la cuarta realización para la protección de un cerdo frente a rinitis atrópica mediante:

- a) vacunar una cerda antes del parto y durante la gestación con una cantidad de una vacuna según la cuarta realización, eficaz para proporcionar anticuerpos anti-*Bordetella bronchiseptica* y anticuerpos anti-*Pasteurella multocida* toxígena en el calostro producido por dicha cerda; y
- b) suministrar el calostro producido por dicha cerda al lechón en un período de aproximadamente 24 horas después del nacimiento del lechón.

El adyuvante usado en la invención comprende una lecitina, un aceite y un tensioactivo anfifílicos capaz de emulsionar el adyuvante, por ejemplo, un Tween o un tensioactivo Span. En otro aspecto preferido el tensioactivo es Tween 80, Tween 85, Span 80 o Span 85. En otro aspecto el adyuvante comprende una lecitina, un aceite y dos tensioactivos anfifílicos capaces de emulsionar el adyuvante o una composición de vacuna que contiene el adyuvante. En un aspecto preferido uno de los dos tensioactivos se encuentra principalmente en la fase acuosa, por ejemplo, Tween 80, y el otro tensioactivo se encuentra principalmente en la fase oleosa, por ejemplo, Span 80.

Una lecitina es un fosfátido. Las preparaciones no purificadas de lecitina pueden incluir triglicéridos. A efectos de la presente invención, "lecitina" incluye tanto las preparaciones purificadas como las no purificadas. En un aspecto preferido, la lecitina está exenta de glicéridos.

Aceites adecuados incluyen un aceite mineral, por ejemplo el aceite mineral ligero DRAKEOL™.

En un aspecto adicional, el adyuvante de la invención contiene una solución de vehículo acuosa, por ejemplo, un tampón fisiológicamente aceptable, agua o una solución salina.

En una realización preferida, el adyuvante de la invención contiene una lecitina, un aceite mineral, dos tensioactivos anfifílicos y una solución vehículo acuosa (por ejemplo, solución salina).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta un gráfico que representa la distribución del tamaño de las gotitas de una emulsión preparada como se describe a continuación. Las líneas (a) y (b) representan que aproximadamente el 94% de las gotitas tienen un diámetro de 1 µm o menor.

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a una composición de antígeno que comprende un cultivo de *Bordetella bronchiseptica* que se ha inactivado añadiendo formalina seguido de la adición de glutaraldehído. La invención también se refiere a una composición de vacuna que comprende dicha composición de antígeno y un adyuvante. De forma particular, la invención se refiere a dicha composición de vacuna, en la que dicho adyuvante comprende de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 12,5% en volumen/volumen (v/v) de una lecitina, de aproximadamente 1% a aproximadamente 23% en relación v/v de un aceite, y de aproximadamente 1,5% a 3,5% en relación v/v de al menos un tensioactivo anfifílico. El

adyuvante es útil para la mejora de la respuesta inmune a un antígeno.

En particular, se describe aquí un adyuvante de aceite que es capaz de emulsionar una formulación de vacuna. Además se describe en este documento un adyuvante que, cuando se usa en una formulación de vacuna es capaz de evitar sustancialmente la inflamación o la cicatrización en el sitio de inyección, típico de vacunas que contienen aceite mineral.

5 Los adyuvantes usados en la invención comprenden una lecitina, un aceite y un tensioactivo anfifílico capaz de emulsionar el adyuvante o una composición de vacuna que contiene el adyuvante.

Se ha descubierto que la adición de aproximadamente 1,5% v/v (es decir, 1,5% de concentración en volumen obtenida, por ejemplo, mezclando 98,5 volúmenes de la vacuna que comprende el adyuvante con 1,5 volúmenes del tensioactivo anfifílico) a 3,5% v/v de un tensioactivo anfifílico a una vacuna que contiene un adyuvante como el que se describe en la patente de los Estados Unidos nº 5.084.269 es eficaz para emulsionar suficientemente una composición de vacuna formulada con dicho adyuvante y minimizar la irritación en el sitio de inyección del animal vacunado.

10 En un aspecto el adyuvante descrito contiene una lecitina y un aceite y un tensioactivo anfifílico. En otro aspecto el adyuvante contiene una lecitina y un aceite y un tensioactivo anfifílico capaz de emulsionar una composición de vacuna formulada con un adyuvante de la invención. En otro aspecto preferido se usan dos tensioactivos anfifílicos en un adyuvante, por ejemplo, un tensioactivo Tween y un tensioactivo Span.

15 Un adyuvante preferido, denominado en la presente memoria "Adyuvante nº 1", comprende aproximadamente 2% v/v de lecitina, aproximadamente 18% v/v de aceite mineral y aproximadamente 8% v/v de tensioactivo (por ejemplo, aproximadamente 5,6% v/v de Tween 80 y aproximadamente 2,4% v/v de Span 80), siendo el volumen restante una solución salina. En un aspecto preferido, se formula una composición de vacuna que comprende un antígeno en una concentración de aproximadamente 75% v/v y un adyuvante, preferiblemente, Adyuvante nº 1, en una concentración de aproximadamente 25% v/v de la composición de vacuna. Todas las concentraciones expresadas en la presente memoria en porcentaje se indican en volumen por volumen, a no ser que el contexto indique otra cosa.

Tensioactivos útiles en el adyuvante

25 Los tensioactivos útiles para el adyuvante usado en la invención son anfifílicos y aceptables para uso veterinario o médico. Los técnicos en la materia pueden determinar si a un tensioactivo particular es aceptable o no para uso médico o veterinario. Un tensioactivo es anfifílico si una parte de la molécula de tensioactivo es hidrófoba y otra parte es hidrófila. Véanse las patentes de los Estados Unidos números 5.690.942; 5.376.369; 4.933.179 y 4.606.918, que describen tensioactivos que se pueden usar en el adyuvante de la invención. Ejemplos de tensioactivos útiles en el adyuvante de la invención incluyen, aunque sin quedar limitados a ellos, un tensioactivo Tween y un tensioactivo Span. Los tensioactivos Tween y Span incluyen, aunque no quedan limitados a ellos, monolaureato (Tween 20, Tween 21, Span 20), monopalmitato (Tween 40, Span 40), monoestearato (Tween 60, Tween 61, Span 60), tristearato (Tween 65, Span 65), monooleato (Tween 80, Tween 81, Span 80) y trioleato (Tween 85, Span 85). En una realización preferida, se usa Tween 80, Tween 85, Span 80 o Span 85.

35 Se prefiere que un tensioactivo útil en el adyuvante de la invención sea anfifílico y tenga un valor del equilibrio hidrófilo-lipófilo ("HLB") que sea preferiblemente al menos la mitad de la suma de los valores HLB del resto de los componentes del adyuvante. Más preferiblemente, el tensioactivo tiene un valor HLB que varía de aproximadamente la mitad a aproximadamente dos veces la suma de los valores HLB del resto de componentes del adyuvante. Más preferiblemente, el tensioactivo tiene un valor HLB que es aproximadamente igual al valor HLB del resto de componentes del adyuvante. Se puede disponer fácilmente de los valores HLB para los tensioactivos, lecitinas, aceites y soluciones vehículo o, si fuera necesario, se pueden determinar por experimentación de rutina. Por ejemplo, véanse las patentes de los Estados Unidos números 4.504.275 y 4.261.925 y las referencias citadas en las mismas.

40 Los tensioactivos anfifílicos útiles en el adyuvante de la invención tienen valores HLB de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 17. Los procedimientos para determinar los valores HLB de tensioactivos particulares son conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos números 5.603.951; 4.933.179 y 4.606.918, que describen tensioactivos que tienen valores particulares de HLB.

45 La concentración de un tensioactivo en una composición de vacuna de la invención formulada con el adyuvante varía de aproximadamente 1,5% a 3,5% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 3% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 2,5% v/v y, lo más preferible, de aproximadamente 2% v/v. Cuando se usa más de un tensioactivo, la suma de las concentraciones de todos los tensioactivos usados en la composición de vacuna formulada con el adyuvante de la invención también variará de 1,5% a 3,5% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 3% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 2,5% v/v y, lo más preferible, de aproximadamente 2% v/v.

50 La concentración de un tensioactivo en el adyuvante de la invención depende también de la concentración en la que se usa el adyuvante en una composición de vacuna. Por ejemplo, se puede formular una composición de vacuna con el adyuvante de la invención de forma que aproximadamente el 25% del volumen de la composición de vacuna es el

adyuvante ("adyuvante al 25%") y el resto, aproximadamente el 75%, lo constituyen el resto de componentes, por ejemplo, la composición de antígeno. En un aspecto, la concentración del tensioactivo en un adyuvante al 25% varía de aproximadamente 6% a 14% v/v. Más preferiblemente, la concentración del tensioactivo en un adyuvante al 25% varía de aproximadamente 6% a 12% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 6% a aproximadamente 10% v/v y, lo más preferible, aproximadamente 8% v/v.

La concentración del tensioactivo en el adyuvante de la invención depende de diversos factores. Por ejemplo, cuanto mayor sea la concentración de aceite en el adyuvante, más tensioactivo se necesita para emulsionar una composición de vacuna formulada con el adyuvante. Otro factor que es útil para determinar la concentración de un tensioactivo es la concentración de una lecitina. Cuanto mayor concentración de una lecitina en el adyuvante, menor es la cantidad de adyuvante requerida para la emulsión.

Cuando se usa el adyuvante en una composición de vacuna a una concentración inferior al 25% v/v, la concentración de los componentes del adyuvante en el adyuvante deberá aumentar de forma proporcional. El vehículo acuoso es una excepción ya que el vehículo siempre comprende el volumen que queda sin ocupar por el resto de componentes; así, si aumenta la concentración de todos los componentes salvo el vehículo, la concentración del vehículo en el adyuvante disminuirá y *viceversa*. Por ejemplo, cuando se usa el adyuvante en una concentración de aproximadamente 12,5% v/v en una composición de vacuna, la concentración de los componentes en el adyuvante es aproximadamente el doble de la concentración de los componentes en un adyuvante al 25%. De igual forma, cuando el adyuvante de la invención se usa en una composición de vacuna en una concentración que es superior al 25% v/v, la concentración de los componentes en el adyuvante tendrá que disminuir en consecuencia, por ejemplo, cuando el adyuvante se usa en una concentración de aproximadamente 50% v/v en una composición de vacuna, la concentración de los componentes en el adyuvante es aproximadamente la mitad de la concentración de los componentes en un adyuvante al 25%.

En una realización, se pueden usar dos tensioactivos anfífilos en el adyuvante de la invención. Con preferencia, los dos tensioactivos incluirán un tensioactivo que estaría más concentrado en una fase acuosa que en una fase oleosa del adyuvante ("tensioactivo hidrófilo") y un tensioactivo que estaría más concentrado en una fase oleosa del adyuvante ("tensioactivo lipófilo"). Por ejemplo, Tween 80 se concentraría más en una fase acuosa y Span 80 se concentraría más en una fase oleosa. Un tensioactivo hidrófilo preferido tiene un valor HLB de aproximadamente 9 a aproximadamente 20 y un tensioactivo lipófilo preferido tiene un valor HLB de aproximadamente 2 a aproximadamente 9. Véanse las patentes de los Estados Unidos números 5.603.951; 4.933.179 y 4.606.918, que describen tensioactivos con valores HLB en ambos intervalos útiles para el adyuvante de la invención.

Cuando se usan dos tensioactivos en el adyuvante de la invención, la concentración total de ambos tensioactivos combinados en una composición de vacuna formulada con el adyuvante de la invención varía de aproximadamente 1,5% a 3,5%, más preferiblemente, de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 3%, más preferiblemente, de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 2,5% y, lo más preferible, aproximadamente 2% v/v. La concentración de cada uno de los dos tensioactivos usados en el adyuvante de la invención puede diferir entre sí. Por ejemplo, cuando se usan un tensioactivo hidrófilo y un tensioactivo lipófilo, por ejemplo Tween 80 y Span 80, la concentración de Tween 80 puede variar de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 5 veces la concentración de Span, más preferiblemente, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4, más preferiblemente de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 3, más preferiblemente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5 y más preferiblemente, aproximadamente 2,3, con preferencia cuando se usa en un adyuvante con una lecitina y una concentración de aceite como en el Adyuvante nº 1.

La concentración del tensioactivo hidrófilo usado en el adyuvante de la invención depende, en parte, del tamaño de la fase acuosa, y la concentración del tensioactivo lipófilo depende, en parte, del tamaño de la fase oleosa. En una realización, el adyuvante de la invención que consta de una fase acuosa al 80% v/v y una fase oleosa al 20% v/v, puede contener un tensioactivo hidrófilo en una concentración de hasta aproximadamente cuatro veces (es decir, 80/20) la concentración de un tensioactivo lipófilo o, por ejemplo, hasta aproximadamente 2 veces.

45 Componentes no tensioactivos del adyuvante

Además del tensioactivo anfífilo, el adyuvante contiene una lecitina y un aceite. En otro aspecto, el adyuvante contiene una solución vehículo acuosa.

Cualquier lecitina conocida en la técnica es útil para el adyuvante. El término "lecitina" se refiere a una mezcla de fosfátidos. Cuando se proporciona en forma de extracto bruto, una lecitina puede contener además triglicéridos. Las lecitinas pueden ser de origen vegetal o animal. Además, las lecitinas pueden obtenerse por vía sintética. En las patentes de los Estados Unidos números 5.690.942; 5.597.602 y 5.084.269 se describen ejemplos de lecitinas. En una realización preferida, el contenido de triglicéridos en una lecitina usada en el adyuvante de la invención es reducido cuando se compara con su fuente natural, es decir, la lecitina está exenta de glicéridos. En la técnica se conocen una serie de formas para eliminar los glicéridos de una lecitina, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos nº 5.597.602.

La concentración de una lecitina en una composición de vacuna formulada con el adyuvante de la invención varía de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 12,5% v/v, más preferiblemente, de aproximadamente 0,5% a

aproximadamente 10% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 7,5%, más preferiblemente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, más preferiblemente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,5% y, lo más preferible, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1,25% v/v.

5 La concentración de una lecitina en un adyuvante al 25% es de al menos aproximadamente 1% v/v, preferiblemente, al menos aproximadamente 2% v/v. En otro aspecto, la concentración de lecitina en un adyuvante al 25% varía de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 40% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 30% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 20% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 10% v/v y, lo más preferible, de aproximadamente 2% a aproximadamente 5% v/v. La concentración de una lecitina en el adyuvante de la invención con una mayor o menor concentración se determina como se ha ejemplificado antes.

10 El adyuvante usado en la invención contiene un aceite, por ejemplo, un aceite descrito en las patentes de los Estados Unidos números 5.814.321 y 5.084.269. En un aspecto preferido, el adyuvante de la invención contiene un aceite mineral, por ejemplo, DRAKEOL™. En otro aspecto, se usa una mezcla de aceites. El aceite puede aportarse para la preparación del adyuvante de la invención en forma de aceite puro o como una mezcla que contiene el aceite y otro componente, por ejemplo, la lecitina.

15 La concentración de un aceite en una composición de vacuna formulada con el adyuvante varía de aproximadamente 1% a aproximadamente 23% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 20% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 15%, más preferiblemente de aproximadamente 3,5% a aproximadamente 10%, más preferiblemente de aproximadamente 3,5% a aproximadamente 7,5%, más preferiblemente, de aproximadamente 4% a aproximadamente 6% v/v y, lo más preferible, aproximadamente 4,5%.

20 La concentración de un aceite en un adyuvante al 25% es de al menos aproximadamente 5% v/v, preferiblemente de al menos aproximadamente 8% v/v y mas preferiblemente de al menos aproximadamente 12% v/v. En otro aspecto, la concentración de aceite en un adyuvante al 25% varía de aproximadamente 4% a aproximadamente 92% v/v, más preferiblemente, de aproximadamente 6% a aproximadamente 80% v/v, más preferiblemente, de aproximadamente 10% a aproximadamente 60% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 14% a aproximadamente 40% v/v, más preferiblemente, de aproximadamente 14% a aproximadamente 30% v/v, más preferiblemente, de aproximadamente 16% a aproximadamente 24% y, lo más preferible, de aproximadamente 18%. La concentración de un aceite en el adyuvante de la invención con una mayor o menor concentración se determina como se ha ejemplificado antes.

25 En otra realización, en el adyuvante de la invención se usa un vehículo acuoso, por ejemplo, solución salina (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), tris-HCl, tampón citrato-fosfato, tampones Hepes, otros tampones farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica o agua. El pH del vehículo es preferiblemente fisiológicamente aceptable, por ejemplo, de 6 a 8, más preferible, de aproximadamente 7. El vehículo acuoso usado en el adyuvante de la invención constituye el volumen que no es necesario para cualquiera de los restantes componentes.

30 El adyuvante de la invención se proporciona preferiblemente en una concentración que varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces la concentración después de la formulación del adyuvante en una composición de vacuna, más preferiblemente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8, más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 y, lo más preferible, de aproximadamente 4.

Usos de los adyuvantes

35 Los adyuvantes de la invención se pueden usar para mejorar la respuesta inmune a un antígeno de una formulación de vacuna. Los adyuvantes de la invención se pueden usar con antígenos derivados de cualquier bacteria o de cualquier virus, con la condición de que el antígeno no se destruya o quede desnaturalizado. Los antígenos usados en la invención son antígenos de *Bordetella bronchiseptica* y antígenos de cepas toxígenas de *Pasteurella multocida*.

40 En una realización preferida, el adyuvante se usa en una composición de vacuna que contiene antígenos de un cultivo de *B. bronchiseptica* que se ha inactivado mediante la adición de formalina en la fase log, preferiblemente en la fase log tardía, seguida de la adición de glutaraldehído. Además de matar las células bacterianas, el objeto de esta novedosa y única inactivación es hacer no tóxicas la endotoxina y exotoxina *B. bronchiseptica*, mientras que los antígenos de las células de *B. bronchiseptica* siguen siendo eficaces para provocar la respuesta inmune deseada. Se añade formalina en el cultivo de *B. bronchiseptica* en una concentración de aproximadamente 0,2% v/v a aproximadamente 1% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 0,4% v/v a aproximadamente 0,8% v/v y, lo más preferible, de aproximadamente 0,6% v/v. Se añade glutaraldehído de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 40 minutos después de la adición de la formalina al cultivo, más preferiblemente, de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 30 minutos y, lo más preferible, aproximadamente 20 minutos. Se añade glutaraldehído en el cultivo de *B. bronchiseptica* en una concentración de aproximadamente 0,2% v/v a aproximadamente 1% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 0,4% v/v a aproximadamente 0,8% v/v y, lo más preferible, de aproximadamente 0,6% v/v. Antes de añadir el glutaraldehído al cultivo, éste tiene una concentración de aproximadamente 10% v/v a aproximadamente 50% v/v, más preferiblemente de aproximadamente 15% v/v a aproximadamente 35% v/v y, lo más preferible, de aproximadamente 25% v/v. Después de añadir formalina y glutaraldehído al cultivo de *B. bronchiseptica*, la mezcla resultante se incubaba

agitando de aproximadamente 32°C a aproximadamente 42°C, más preferiblemente, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C y, lo más preferible a aproximadamente 37°C. La mezcla se incuba de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 60 horas, más preferiblemente de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas. El resto de etapas de procesado en la preparación de la composición de antígeno de la invención a partir de un cultivo de *B. bronchiseptica* se describen en el Ejemplo 7, más adelante, y en las patentes de los Estados Unidos números 5.019.388 y 4.888.169.

Composiciones de vacuna que comprenden adyuvantes de la invención y su administración

El adyuvante de la invención se puede usar en una formulación de vacuna para inmunizar un animal. En una realización, la formulación de vacuna contiene el adyuvante y un antígeno. Las relaciones óptimas de cada componente en la formulación de vacuna se pueden determinar por técnicas bien conocidas por los técnicos en la materia.

Se puede administrar una formulación de vacuna a un sujeto *per se* o en forma de una composición farmacéutica o terapéutica. Las composiciones farmacéuticas que comprenden el adyuvante de la invención y un antígeno se pueden fabricar por medio de procedimientos convencionales para mezclar, disolver, granular, arrastrar, desleir, emulsionar, encapsular, atrapar o liofilizar. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de forma convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o materiales auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesado de los antígenos de la invención en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación correcta depende de la vía de administración elegida. A efectos de esta solicitud, "vehículo fisiológicamente aceptable" abarca los vehículos que son aceptables para el uso por seres humanos o animales sin efectos secundarios relativamente perjudiciales (respecto al trastorno que se esté tratando), así como los diluyentes, excipientes o materiales auxiliares que son igualmente aceptables.

Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para su administración por inyección, por ejemplo, para inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal.

Para inyección, las preparaciones de vacuna se pueden formular en soluciones acuosas, con preferencia en tampones fisiológicamente compatibles como: solución de Hank, solución de Ringer, solución salina tamponada con fosfato, o cualquier otro tampón a base de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, las proteínas pueden estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado antes de usarlas, por ejemplo, con agua estéril exenta de pirógenos.

Está dentro de los conocimientos de los técnicos en la materia determinar la cantidad eficaz de la formulación de vacuna que se administrará, en especial a la luz de la descripción detallada expuesta en la presente memoria.

Se puede estimar una dosis eficaz inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir la inducción de una respuesta inmune usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Un técnico en la materia podría optimizar fácilmente la administración a todas las especies animales en base a los resultados descritos en la presente memoria. La cantidad dosificada y el intervalo se pueden ajustar caso por caso. Por ejemplo, cuando se usan como una vacuna, las formulaciones de vacuna de la invención se pueden administrar en aproximadamente 1 a 3 dosis durante períodos de 1 a 36 semanas. Con preferencia, se administran 1 ó 2 dosis, en intervalos de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 4 meses, y se pueden administrar vacunaciones de refuerzo de forma periódica posteriormente. Para animales individuales pueden ser apropiados otros protocolos. Una dosis adecuada es una cantidad de la formulación de vacuna que, cuando se administra en la forma antes descrita, puede provocar una respuesta inmune en un animal inmunizado, suficiente para proteger al animal de una infección durante al menos 4 a 12 meses. En general, la cantidad de antígeno presente en una dosis varía de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 100 mg por kg de receptor, con preferencia, de aproximadamente 10 pg a aproximadamente 1 mg y, preferiblemente de aproximadamente 100 pg a aproximadamente 1 µg. El intervalo de dosis adecuado variará según la vía de inyección y el peso del paciente, aunque de forma típica variará desde aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml.

Habiendo descrito la invención, se presentan los siguientes ejemplos únicamente en sentido ilustrativo y no limitante.

Ejemplo 1. Uso de un adyuvante que contiene aceite y lecitina

El siguiente ejemplo describe el uso de un adyuvante que contiene lecitina exenta de glicéridos disuelta en un aceite ("adyuvante a base de aceite-lecitina"), normalmente aceite mineral (parafina líquida clara) en vacunas para uso veterinario. Véase la patente de los Estados Unidos nº 5.084.269, que describe un adyuvante a base de aceite-lecitina. Una preparación de vacuna que usa un adyuvante a base de aceite-lecitina es una emulsión "aceite en agua".

A no ser que se indique de otro modo, en la presente memoria, todas las concentraciones porcentuales se expresan en volumen por volumen. Los valores porcentuales, a no ser que se exprese de otro modo, de un adyuvante a base de aceite-lecitina, se refieren a la concentración de una mezcla de lecitina (10% de la mezcla) y un aceite vehículo (DRAKEOL™) (90% de la mezcla) en un vehículo acuoso (fase continua). Por ejemplo, un adyuvante a base de aceite-lecitina al 20% contiene lecitina al 2% v/v (Central Soya, Fort Wayne, Indiana), DRAKEOL™ 5 al 18% v/v (Penreco,

Karns City, Pennsylvania) y solución salina al 80% v/v (reduciéndose el contenido de la solución salina si se añaden otros componentes, por ejemplo, tensioactivos). A no ser que se indique de otro modo, los valores porcentuales de un adyuvante a base de aceite-lectina en una composición de vacuna, es decir, después de diluir la solución de adyuvante con la solución de antígeno, se refieren a la concentración de una mezcla de lecitina (10% de la mezcla) y un aceite vehículo (DRAKEOL™) (90% de la mezcla) en la preparación de vacuna que comprende el adyuvante y una solución que contiene un antígeno. Salvo que se indique de otro modo, en todos los casos en los que se añade un tensioactivo a una composición de adyuvante, los valores porcentuales para la concentración de tensioactivo se refieren a la concentración total de todos los tensioactivos añadidos en el adyuvante o la preparación de vacuna.

Cuando se usó un adyuvante a base de aceite-lectina como adyuvante en las formulaciones de vacuna, se encontró que no se emulsionaba en preparaciones acuosas sin la adición de tensioactivos adicionales ya que la lecitina en el adyuvante a base de aceite-lectina no es suficiente para la emulsión. Por tanto, las vacunas preparadas usando adyuvante a base de aceite-lectina dispersado de forma inadecuada formaron un acúmulo o depósito de la mayor parte del aceite mineral en los tejidos en el sitio de inyección. Este aceite no lo puede metabolizar o eliminar el animal al que se ha inyectado y permanece como fuente de inflamación grave crónica y aparición de marcas.

Se determinó además que el añadir tensioactivos a la formulación de vacuna, que comprende un adyuvante a base de aceite-lectina y un antígeno, con el fin de emulsionar la formulación no era una solución adecuada. Los problemas encontrados cuando se añadía aceite y tensioactivos a la formulación de vacuna antes de emulsionar fueron que el antígeno podía quedar dañado y, si no se conseguía una emulsión adecuada, la formulación debía descartarse, incluyendo el antígeno valioso.

Se ensayaron diferentes composiciones de adyuvante que comprendían un adyuvante a base de aceite-lectina en combinación con tensioactivos para emulsionar las formulaciones de vacuna.

Ejemplo 2. Uso de un adyuvante que contiene un tensioactivo en una baja concentración

El siguiente ejemplo describe el uso de una emulsión que contiene aceite-lectina al 40% y 2% de tensioactivos sintéticos, es decir, Tween 80 y Span 80 (Van Water & Rogers, Omaha, Nebraska) en solución salina tamponada con fosfato. Este adyuvante se preparó de forma aséptica y separada del antígeno. La emulsión se añadió a la preparación de antígeno sin emulsión adicional. Los tensioactivos sintéticos ayudaron al adyuvante a base de aceite-lectina a dispersarse en forma de una emulsión relativamente estable y gotitas relativamente grandes. La emulsión de adyuvante se añadió a la preparación acuosa del antígeno en una relación de uno a ocho, disminuyendo el contenido de adyuvante a base de aceite-lectina desde 40% a 5% y los tensioactivos de un 2% combinado a 0,25%.

El adyuvante se usó en varias vacunas. Se encontró que debido a que la emulsión tiene gotas gruesas y no es muy estable, las gotitas de aceite tienden a coalescer y a separarse en forma de un depósito permanente irritante de aceite en los tejidos inyectados. Otro problema observado con este adyuvante fue que se agregaba con un gel de Al. Una serie de vacunas contienen gel de Al para una serie de propósitos, por ejemplo, como adyuvante o para estabilizar un antígeno o unirse a una endotoxina. El adyuvante a base de aceite-lectina tiene una carga negativa que hace que éste se una con el gel de Al cargado positivamente, formando agregados de gran tamaño. Estos agregados son antiestéticos, presentan dificultades para pasar a través de una aguja hipodérmica y son muy irritantes para los tejidos inyectados.

Ejemplo 3. Uso de un adyuvante que contiene un tensioactivo en una elevada concentración

Se emulsionó un adyuvante a base de aceite-lectina (5% v/v) en la preparación de antígeno con ayuda de los tensioactivos Tween 80 y Span 80, como antes, aunque en una concentración de tensioactivo total de 8% en la composición de vacuna. La emulsión fue muy fina y estable. La emulsión tenía casi la claridad de una solución y no sufrió cremado en reposo. Al microscopio, con un aumento máximo (resolución de 0,2 micrómetros), la mayoría de la gotitas eran demasiado pequeñas para ser visibles. Por tanto, era una microemulsión. Se encontró que este adyuvante, cuando se usó en una formulación de vacuna estaba prácticamente exento de reactividad en el sitio de inyección y, cuando se añadió gel de Al, no se detectó agregación del aceite y el gel. Como resultado de su elevado contenido en tensioactivo, este adyuvante es fácil de emulsionar, tiene una apariencia atractiva, es estable, no reacciona con gel de Al y prácticamente está exento de efectos irritantes en el sitio de inyección. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, esta emulsión tenía una potencia como adyuvante ligeramente menor cuando se compara con la versión de gotitas gruesas realizada con tensioactivos en una menor concentración.

Ejemplo 4. Uso de un adyuvante que contiene un tensioactivo en una concentración media

Se realizó un intento por encontrar una emulsión de adyuvante que fuera aceptablemente suave y con potencia completa como un adyuvante. Se usó un adyuvante a base de aceite-lectina al 20% en estos experimentos y se encontró que una emulsión de adyuvante a base de aceite-lectina al 20% es más fácil de preparar que una emulsión de adyuvante a base de aceite-lectina al 40%. Su adición a vacunas en una relación de uno a cuatro, para preparar una concentración final de aceite del 5%, dejaba el 75% del volumen de la dosis para los antígenos. Los experimentos previos demostraron que se podía preparar una emulsión suave submicrométrica (la mayoría de las gotitas tenían un diámetro menor de un micrómetro, véase la Figura 1) con aceite al 20% y con un 16% de los tensioactivos Tween 80 y Span 80.

Se prepararon para los ensayos dos emulsiones. Una contenía adyuvante a base de aceite-lecitina al 20% y tensioactivos Tween 80 y Span 80 al 16%. La dilución uno a cuatro proporcionó una emulsión que comprendía adyuvante a base de aceite-lecitina al 5% y tensioactivos al 4% en la preparación de vacuna. La otra emulsión se preparó con un adyuvante a base de aceite-lecitina al 40% y 2% de los tensioactivos Tween 80 y Span 80. La dilución uno a ocho proporcionó una emulsión con adyuvante a base de aceite-lecitina al 5% y tensioactivos al 0,25%.

Se añadió gel de Al (REHYDRAGEL™, obtenido de Reheis, Berkeley Heights, New Jersey) en una concentración del 10% a muestras de cada emulsión. En la emulsión con tensioactivos al 0,25%, el aceite y el gel de Al se agregaron y se separaron formando una capa densa en la parte superior de la columna de líquido (cremado). Por el contrario, en la emulsión con 4% de tensioactivos, no se produjo agregación o cremado. Con un 4% de tensioactivos, el gel de Al sedimentó en el fondo del tubo, dejando las gotitas de aceite dispersadas en el líquido sobrenadante.

Ejemplo 5. Inflamación de los lugares de inyección usando un adyuvante que contiene un tensioactivo en una concentración media

Se ensayaron preparaciones de vacuna en cerdos para determinar si se producía inflamación del sitio de inyección cuando se usaba un adyuvante con una concentración media de tensioactivo. Las preparaciones de vacuna que contenían un adyuvante a base de aceite-lecitina al 5% y 0,25% ó 4% de tensioactivos no provocaron inflamación en cerdos en el sitio de inyección. Cuando se añadió gel de Al a la preparación de vacuna en una concentración de 10%, la preparación con un 0,25% de tensioactivos provocó una inflamación intensa en el sitio de inyección, mientras que la preparación con un 4% de tensioactivos casi no produjo inflamación.

Los experimentos se llevaron a cabo para determinar el intervalo de concentraciones de tensioactivos que era eficaz para prevenir la agregación con el gel de Al y la inflamación del sitio de inyección. Cuando se usó una concentración de tensioactivo del 1,5% en la vacuna, se observó una ligera agregación del aceite y el gel de Al. La agregación fue mucho más intensa a concentraciones menores de tensioactivo. A concentraciones de tensioactivo del 2% y 4%, no se observó agregación. La inflamación inducida en cerdos por las preparaciones de vacuna que contenían 0,5% o menos de tensioactivos fue mayor a las 2 y 4 semanas después de la vacunación que la inducida por las preparaciones que contenían 1% o más de tensioactivos. A las 6 semanas de la vacunación, fue evidente que el mínimo necesario para evitar inflamación crónica era un 1,5% de tensioactivos.

Ejemplo 6. Adyuvantes con propiedades útiles *in vivo* e *in vitro*

Se llevaron a cabo ensayos para encontrar un adyuvante que no reaccionara con gel de Al y que no originara reactividad en el animal después de la vacunación. Se determinó que un adyuvante a base de aceite-lecitina al 20% que contenía 8% de tensioactivos, y que originaba una preparación de vacuna con un 5% de adyuvante a base de aceite-lecitina y 2% de tensioactivos, era suficiente para evitar tanto la reactividad *in vitro* con el gel de Al como la irritación de los tejidos en el sitio de inyección. La evidencia de una relación entre la concentración de tensioactivo y la potencia del adyuvante fue mucho menos clara. Existían indicaciones ocasionales de que un 4% de tensioactivos en la vacuna era un porcentaje excesivo, por ejemplo, en la inducción de aglutinina a *E. coli* K99 y neutralización de antitoxina a la toxina de *P. multocida* Tipo D.

Así, se determinó que la concentración óptima de tensioactivos era del 8% en un adyuvante a base de aceite-lecitina al 20%, obteniéndose un 2% de tensioactivos en la composición de vacuna. Esto proporcionó una emulsificación razonablemente fácil y una buena estabilidad cuando se almacenó en frío. En vacunas con adyuvante a base de aceite-lecitina al 5%, un 2% de tensioactivos era ideal para la potencia del adyuvante y para la ausencia de irritación en los tejidos inyectados.

Se determinó el tamaño de las gotitas en la emulsión submicrométrica de un adyuvante a base de aceite-lecitina al 20% con un 8% de tensioactivos. El tensioactivo al 8% estaba formado por Tween 80 al 5,6% en la fase acuosa y Span 80 al 2,4% en la fase oleosa. Aproximadamente el 94% de todas las gotitas tenía un diámetro inferior a 1 micrómetro, véase la Figura 1.

Se preparó una solución patrón de 1000 ml de adyuvante a base de aceite-lecitina al 20% con un 8% de tensioactivos a partir de 200 ml de solución de lecitina-aceite esterilizada por filtrado (lecitina al 10% en aceite mineral DRAKEOL™), Tween 80 (56 ml) y Span 80 (24 ml) esterilizados en autoclave, y solución salina tamponada con fosfato (720 ml) (PBS de Dulbecco). La solución de lecitina-aceite y Span 80 se combinaron y mezclaron en un depósito estéril durante al menos 1 hora a temperatura ambiente hasta que se completó la emulsión. La solución salina y el Tween 80 se combinaron y mezclaron en un depósito estéril durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de aceite se emulsionó en la mezcla acuosa usando un agente emulsionante. La emulsión se continuó por recirculación hasta que se añadió todo el adyuvante a la solución salina. La emulsión se hizo pasar entonces dos veces por un homogeneizador a temperatura ambiente. El adyuvante se almacenó a una temperatura de 2°C a 8°C.

Ejemplo 7. Vacuna para la rinitis atrófica usando un adyuvante que contiene un tensioactivo en una concentración media

Se usó el adyuvante descrito en el Ejemplo 4 con una concentración media de tensioactivos en una vacuna para la rinitis atrófica que contenía antígenos de *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* toxígena. Se preparó una vacuna de *Bordetella bronchiseptica*-Bacterina-toxoide de *Pasteurella multocida* a partir de células de *B. bronchiseptica* y el toxoide de *P. multocida*.

Las células de *B. bronchiseptica*, cepa 2-9 NADL, se prepararon como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5.019.388 y 4.888.169, salvo porque al finalizar el ciclo de crecimiento, los cultivos se mezclaron continuamente y se añadió solución de formalina hasta una concentración final de 0,6%. En un período de 20 minutos después de la adición de formalina, se añadió una solución de glutaraldehído al 25% hasta una concentración final de 0,6%. El cultivo se agitó durante 24 a 48 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para completar la inactivación y destoxificación. (Véase la Tabla 1). A continuación, se enfriaron los líquidos del cultivo hasta 15°C o menos para su procesado. Los cultivos inactivados no procesados inmediatamente se almacenaron a $2-8^\circ\text{C}$ durante un período de hasta 14 días. Después de la inactivación, se separaron las bacterias del líquido de cultivo por centrifugación. El sobrenadante se descartó y las células se volvieron a suspender en solución salina tamponada con fosfato a aproximadamente una décima parte del volumen original. La suspensión concentrada se almacenó a $2-8^\circ\text{C}$. El tratamiento de *B. bronchiseptica* con dos aldehídos inactiva tanto la endotoxina como la exotoxina, evitando otros tratamientos de seguridad.

El toxoide de *P. multocida* se preparó de dos formas diferentes como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5.536.496 y 5.695.769. En una de ellas, la toxina se convierte en toxoide en las células bacterianas mediante la adición de formaldehído al cultivo; el toxoide permanece en el interior de las células. En la forma alternativa, las células vivas se lisan mecánicamente y se extrae la toxina. La toxina se convierte en toxoide por exposición a un pH elevado, como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.536.496. Ambas formas de toxoide se tratan con gel de Al para controlar la endotoxina libre por un procedimiento patentado, como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.616.328 (véase la Tabla 1). La sinergia entre las dos formas de toxoide de *Pasteurella* da como resultado respuestas de antitoxina que superan con creces la suma de las respuestas de cada una cuando se usan por separado como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.695.769.

Tabla 1. Tratamiento de células durante la preparación de vacuna de *Bordetella bronchiseptica*-Bacterina-toxoide de *Pasteurella multocida*

Antígeno	Inactivador	Concentración	Intervalo de T diana	Tiempo (mín/máx)
<i>B. bronchiseptica</i>	Formalina Glutaraldehído	0,6%	$0,6\% 37 \pm 2^\circ\text{C}$	24 a 48 horas
Toxoide ligado a las células de <i>P. multocida</i>	Formalina	0,4%	$37 \pm 2^\circ\text{C}$	5 días
Toxoide sin células de <i>P. multocida</i>	NaOH 5N	pH $10 \pm 0,2$	$15 \pm 2^\circ\text{C}$	1 a 6 horas

El adyuvante descrito en el Ejemplo 4 se añadió dando concentraciones de 5% de adyuvante a base de aceite-lecitina y 2% de tensioactivos en la formulación de vacuna.

Un ensayo clínico para determinar la dosis inmunizadora mínima de la vacuna para la rinitis atrófica demostró las propiedades como adyuvante del adyuvante a base de aceite-lecitina con una concentración media de tensioactivos. Se vacunaron cerdas preñadas con dos dosis de 2 ml en un intervalo de 4 semanas. Estas parieron aproximadamente 2 semanas después de la segunda dosis. Al mes de edad, sus lechones se sometieron a una severa infección provocada, consistente en cultivos virulentos de *B. Bronchiseptica* y *P. Multocida* administrados intranasalmente de forma secuencial. Los cerdos nacidos de 7 cerdas vacunadas solo con un placebo desarrollaron rinitis atróficas graves. Los lechones de las 7 cerdas a las que se les administró vacuna que contenía una dosis completa de los antígenos estuvieron fuertemente protegidos por el anticuerpo materno todavía circulante. Las cerdas a las que se administraron vacunas que contenían 1/2 ó 1/8 de dosis de antígenos no proporcionaron a sus lechones una protección satisfactoria.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de antígeno que comprende un cultivo de *Bordetella bronchiseptica* que se ha inactivado mediante adición de formalina seguido de adición de glutaraldehído.
2. Una composición de vacuna que comprende la composición de antígeno de la reivindicación 1 y un adyuvante.
- 5 3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que dicho adyuvante comprende de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 12,5% en volumen/volumen (v/v) de una lecitina, de aproximadamente 1% a aproximadamente 23% v/v de un aceite y de aproximadamente 1,5% a 3,5% v/v de al menos un tensioactivo anfifílico.
4. Un procedimiento para inactivar un cultivo de *Bordetella bronchiseptica* que comprende añadir formalina a dicho cultivo, seguido de la adición de glutaraldehído a dicho cultivo.
- 10 5. Una composición de *Bordetella bronchiseptica* que comprende un cultivo de *Bordetella bronchiseptica*, formalina y glutaraldehído.
6. Una vacuna para la protección de un mamífero frente a infección *Bordetella bronchiseptica* que comprende aproximadamente 1 pg a aproximadamente 100 mg por kg de huésped de células de *Bordetella bronchiseptica* de un cultivo inactivado de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 4 efectivo para proteger dicho mamífero frente a una infección por *Bordetella bronchiseptica* y un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 15 7. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende aproximadamente 10 pg a aproximadamente 1 mg por kg de huésped de *Bordetella bronchiseptica*.
8. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende aproximadamente 100 pg a aproximadamente 1 µg por kg de huésped de células de *Bordetella bronchiseptica*.
- 20 9. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además aproximadamente 1 pg a aproximadamente 100 mg por kg de huésped de antígenos de *Pasteurella multocida* toxigénica efectivos para proteger al mamífero frente a una infección de *Pasteurella multocida* toxigénica.
10. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende aproximadamente 10 pg a aproximadamente 1 mg por kg de huésped de antígenos de *Pasteurella multocida* toxigénica.
- 25 11. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende aproximadamente 100 pg a aproximadamente 1 µg por kg de huésped de antígenos de *Pasteurella multocida* toxigénica.
12. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 para la protección de un cerdo frente a una infección por *Bordetella bronchiseptica* y/o una infección por *Pasteurella multocida* toxigénica.
- 30 13. Uso de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 en la preparación de una vacuna para la protección de un cerdo frente a una infección por *Bordetella bronchiseptica* y/o una infección por *Pasteurella bronchiseptica*.
14. Uso de una vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 en la preparación de una vacuna para la protección de un lechón frente a rinitis atrófica mediante:
 - a) vacunar una cerda antes del parto y durante la gestación con una cantidad de una vacuna según la
 - 35 reivindicación 9, eficaz para proporcionar anticuerpos anti-*Bordetella bronchiseptica* y anticuerpos anti-*Pasteurella multocida* toxigénica en el calostro producido por dicha cerda; y
 - b) suministrar el calostro producido por dicha cerda al lechón en un período de aproximadamente 24 horas después del nacimiento del lechón.
15. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 en la protección de un lechón frente a rinitis atrófica mediante:
 - 40 a) vacunar una cerda antes del parto y durante la gestación con una cantidad de una vacuna según la reivindicación 9, eficaz para proporcionar anticuerpos anti-*Bordetella bronchiseptica* y anticuerpos anti-*Pasteurella multocida* toxigénica en el calostro producido por dicha cerda; y
 - b) suministrar el calostro producido por dicha cerda al lechón en un período de aproximadamente 24 horas después del nacimiento del lechón.

45

Figura 1

