

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 351**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04723123 .8**  
96 Fecha de presentación: **24.03.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1635867**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54 Título: **Composición que comprende partículas de iscom y microorganismos vivos**

30 Prioridad:  
**24.03.2003 SE 0300795**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.04.2012**

73 Titular/es:  
**ISCONOVA AB  
UPPSALA SCIENCE PARK, DAG  
HAMMARSKJÖLDS VAG 54 A  
751 83 UPPSALA, SE**

72 Inventor/es:  
**MOREIN, Bror y  
LÖVGREN BENGTTSSON, Karin**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 379 351 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

Composición que comprende partículas de iscom y microorganismos vivos

La presente invención se refiere al uso de partículas de iscom (complejos inmunoestimulantes) como adyuvante para la preparación de una composición antigénica, que comprende microorganismos vivos y a una composición que comprende al menos una partícula de iscom y uno o más microorganismos vivos.

**Antecedentes de la técnica**

En la actualidad, los adyuvantes se utilizan para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos que no tienen capacidad de replicación, es decir en las vacunas denominadas muertas o inactivadas. A pesar de que muchas vacunas contienen varios tipos de antígenos de vacuna con el fin de cubrir la protección inmunitaria contra varias enfermedades infecciosas, no se mezclan antígenos de vacuna vivos y muertos. Una de las razones de ello es que en las vacunas muertas es necesario utilizar adyuvantes para aumentar la eficacia de las vacunas muertas.

Las vacunas vivas contienen microorganismos que se replican en el huésped, es decir, los antígenos vivos atenuados de las vacunas, que son microorganismos que están estrechamente relacionados con el patógeno, es decir, los microorganismos que causan la enfermedad. Por consiguiente, cuando en las vacunas se utilizan antígenos replicantes, el huésped produce la mayoría de los antígenos de la vacuna, lo que da lugar a la producción in vivo de altas dosis de antígenos de la vacuna en el huésped.

Además, la producción de los antígenos de la vacuna en el huésped durante un período de tiempo contribuye también a hacer que las vacunas vivas sean eficaces, e incluso una sola administración de una vacuna viva eficaz a menudo es suficiente para provocar una protección inmunitaria de larga duración. Para ciertos agentes patógenos no se dispone de microorganismos vivos adecuadamente atenuados para que sean presentados en una vacuna, ya sea porque no se logra la atenuación, o porque después de la atenuación el microorganismo no induce una protección inmunitaria potente.

Existen razones tanto prácticas como económicas para administrar los antígenos de vacuna en una o en la menor cantidad de administraciones posibles, cuando hay un período definido para la vacunación. Tal período es en la primera infancia, respectivamente, en los animales recién nacidos, cuando se administra una vacuna para la protección contra hasta siete enfermedades infecciosas diferentes en una inyección. Otro período es cuando se reúne un gran número de animales, por ejemplo en unidades de engorde de diferentes haciendas y regiones. Otro ejemplo más de tales períodos es antes de realizar viajes a países exóticos, con el fin de inducir la protección inmunitaria contra enfermedades infecciosas exóticas, es decir, contra patógenos que no están presentes en el país de origen.

La mayoría de las vacunas para perros se utilizan en los cachorros y la primera vacunación se lleva a cabo justo antes o en el momento de la entrega al nuevo propietario. Existe una fuerte tendencia, por no decir un deseo, de evitar más de una administración principal de la vacuna y limitar el número de revacunaciones. La mayoría de las vacunas en los perros son vacunas vivas y se evitan los antígenos muertos de vacunas en las vacunas de varios componentes para los perros y gatos, sobre todo debido al hecho de la dificultad que presenta combinar vacunas vivas y muertas. Por consiguiente, en la actualidad, las vacunas para los perros son en su mayoría vacunas vivas de varios componentes (y) compuestas para proteger al animal contra un máximo de siete enfermedades infecciosas diferentes.

Una vacuna muerta de uso frecuente para perros y gatos es la vacuna contra el virus de la rabia. La Bordetella bronchiseptica (Bb) es también deseada como vacuna muerta, ya que la vacuna viva causa efectos secundarios. Una vacuna muerta de componentes de Bb (subunidad) necesitará un suplemento de adyuvante. Estas vacunas son las vacunas de un solo componente. La vacuna muerta del virus de la rabia requiere adyuvante, y hasta ahora se ha utilizado hidróxido de aluminio, que adsorbe los microorganismos e interfiere de ese modo con su replicación.

En el gato, para el virus de la leucemia felina se utiliza una vacuna muerta (subunidad) en base a gp70, que es una proteína de superficie del virus. También este antígeno de vacuna requiere adyuvante. La actual formulación adyuvante utilizada está compuesta por saponina libre (QS21) y  $Al(OH)_3$ , una mezcla que produce la lisis de las membranas virales y mata al virus. El componente  $Al(OH)_3$  causa en casos raros fibrosarcoma, que se cree que es causado por los efectos de depósito de algunos adyuvantes, por ejemplo, aceite o  $Al(OH)_3$  (informe del Veterinary Products Committee Working Group on Feline and Canine Vaccination Department for Environment, Food & Rural Affairs (DEFRA) Publications Admail 6000, Londres SW1A2XX).

Por consiguiente, existe un deseo de poder utilizar vacunas muertas y vivas mezcladas en una formulación común y estas deben ser compatibles entre sí en la formulación. Además, un adyuvante que esté presente en una formulación de vacuna no debe causar efectos secundarios adversos.

El documento WO 2004/030696 se refiere a una composición para la administración transdérmica de al menos un inmunógeno a un individuo, que comprende al menos un inmunógeno y un vehículo de oclusión y un sistema de administración de inmunógenos en la forma de una nanopartícula de Posintro o un ISCOM. Los antígenos pueden

derivar de microorganismos atenuados. Estos microorganismos son tratados para que no estén vivos en el momento de ser incorporados al producto final. Además, el producto final se esteriliza por medio de radiación con haz de electrones.

5 Josef C. y col. "Systemic and intestinal antibody secreting cell responses and protection in gnotobiotic pigs immunized orally with attenuated Wa human rotavirus and Wa 2/6.rotavirus-like-particles associated with immunostimulating complexes" Vaccine vol. 20, 2002, 1741-1753 describen cómo se combina el ISCOM con el rotavirus vivo en un estudio. Sin embargo, la combinación es únicamente como un régimen con cebado con el virus vivo seguido de estimulación (ones) con preparaciones de rotavirus muerto con ISCOM como adyuvante. En ninguno de los grupos se administró el ISCOM junto con el componente vivo ni en la misma ocasión para actuar como adyuvante de la respuesta de la vacuna viva.

10 Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que los ISCOM y las partículas de matrices de iscom se pueden utilizar como adyuvantes para los antígenos muertos de vacunas, por ejemplo, en una vacuna de varios componentes, sin causar efectos negativos en los componentes vivos replicantes de la vacuna. Esto es contrario a lo que ocurre con la mayoría de los (otros) adyuvantes comúnmente utilizados, que disminuyen la capacidad de replicación de los microorganismos vivos.

15 Inesperadamente, el adyuvante de iscom / matriz de iscom no sólo resultó inofensivo para los componentes vivos, sino que también mejoró la respuesta inmunitaria contra los componentes vivos de la vacuna.

### **Resumen de la invención**

20 La presente invención se refiere al uso de partícula(s) de iscom como adyuvante en una formulación de antígenos de vacuna, que comprende al menos una partícula de iscom – matriz de iscom junto con un antígeno no replicante de vacuna y uno o más microorganismos vivos.

25 Se ha probado el efecto de varias saponinas formuladas en iscom y matriz de iscom sobre diversos virus que están implicados en las formulaciones de vacunas. Se mezclaron los antígenos de vacunas vivas con la formulación de adyuvante y la mezcla se incubó durante dos horas o más. Después de ello, se midió la capacidad del microorganismo para replicar en cultivos de células o en un huésped, en este caso en un embrión de pollo. Las partículas de iscom no dificultaron la replicación de los microorganismos vivos e incluso aumentaron la proliferación, al contrario de lo que ocurre con otros varios adyuvantes de uso común, que también se pusieron a prueba.

### **Descripción detallada de la invención**

30 La presente invención se refiere al uso de una partícula de iscom o de matriz de iscom como adyuvante junto con uno o más antígeno(s) no replicante(s), es decir muerto(s), de vacuna en una composición antigénica, que comprende al menos un tipo de microorganismo vivo. El antígeno muerto de la vacuna también puede incluir virus y bacterias (vectores) que contengan antígeno(s) extraño(s) de interés para la profilaxis y terapia expresadas por los genes insertados en el vector.

35 Por microorganismo vivo entendemos un microorganismo que puede replicarse en el huésped. El microorganismo vivo no debe estar en condiciones de causar reacciones adversas en el huésped. Por lo tanto, se utilizan de preferencia microorganismos atenuados. La atenuación se conoce en la técnica y puede realizarse como se describe en New Vaccine Technologies (2001) Ed. Ronald W. Ellis, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, EE. UU.

40 El microorganismo vivo, es decir replicante, puede ser cualquier microorganismo de interés para su uso como un antígeno para la activación o la modulación del sistema inmunitario. También incluye virus y bacterias (vectores) que contengan antígeno(s) extraño(s) de interés para la profilaxis y la terapia expresadas por los genes insertados en el vector. Los microorganismos se pueden elegir de virus, incluyendo el virus de la viruela, el virus de la encefalitis japonesa, vacunas contra la fiebre amarilla, vacunas contra la poliomielititis, vacunas contra el sarampión, vacunas contra la rubéola, vacunas contra las paperas y las vacunas trivalentes como las vacunas contra el sarampión, las paperas y la rubéola, o incluso una vacuna de virus vivo más, es decir, la vacuna contra la varicela; las vacunas vivas contra bacterias Gram + y Gram – incluyendo las elaboradas con bacterias como Mycobacterium bovis vivas atenuadas (BCG, vacuna contra la tuberculosis), Salmonella typhi viva atenuada, Shigella spp. viva atenuada, Vibrio cholerae vivo de virulencia atenuada, pediátricas. Ejemplo de un vector de adenovirus es una vacuna que expresa un antígeno tumoral p53 registrada para el tratamiento del carcinoma escamoso de cabeza y cuello. En ensayos clínicos se encuentra una vacuna contra el cáncer cervical, en la que el antígeno es expresado por un virus vacunal (vaccinia modificado Ankara /MVA/) (Nature Biotechnology Vol. 22 Nº 1 enero de 2004).

55 Ejemplos de vacunas vivas en animales, pero sin limitación a los ejemplos, son las vacunas contra el virus del moquillo canino, el parvovirus canino, el adenovirus canino, el virus Bordetella bronchseptica, los virus Parainfluenza 3 en perros y en ganado, el parvovirus felino tal como el virus de la panleucopenia felina, el calicivirus felino, el herpesvirus felino y el virus de la Chlamydia psittaci felina. Son ejemplos de vacuna de vector replicante: para el gato, la vacuna contra el virus de la leucemia felina, en la que la proteína de superficie gp70 del virus es expresada por un virus de la viruela del canario (ALVAC), las vacunas para aves de corral contra la enfermedad de Marek, en

las que el antígeno de la vacuna es expresado por el vector ALVAC y la vacuna contra el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa, para la que también se utiliza el vector ALVAC.

Un objetivo de la invención es aumentar el efecto de la vacuna de microorganismos vivos, de preferencia atenuados.

5 En la actualidad, las vacunas muertas y vivas (replicantes) a menudo no se presentan en la misma formulación de vacuna. En los casos en se utilizan antígenos de vacuna vivos y no replicantes (muertos), hoy en día no existe ningún componente adyuvante.

Por lo tanto, otro objetivo de la invención es proporcionar una composición en la que se mezclan microorganismos vivos, posiblemente atenuados, con microorganismos muertos y un adyuvante.

10 Por consiguiente, las partículas de iscom también se pueden utilizar en una composición que comprende además al menos un microorganismo muerto o inactivado junto con uno o más microorganismos vivos. La inactivación se conoce en la técnica y se puede realizar como se describe en New Vaccine Technologies (2001) Ed. Ronald W. Ellis, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, EE. UU. o como está descrito por Rueda. P. y col. 2001. Vaccine 19 (2001) páginas 726-734, "Effect of different baculo virus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of Porcine Parvo virus - like particles"

15 Se pueden utilizar diferentes especies de microorganismos en la misma composición que comprende las partículas de iscom o en diferentes composiciones para la administración conjunta en el mismo acontecimiento.

20 La invención también se refiere al uso de las partículas de iscom junto con microorganismos vivos en una composición de vacuna para inducir una protección inmunitaria en un paciente tratado con la vacuna. Las vacunas vivas atenuadas algunas veces se atenúan en exceso y, por consiguiente, son poco inmunogénicas, por lo que resulta de gran interés mejorar también la inmunogenicidad de los componentes vivos de las vacunas.

Las vacunas de bacterias inactivadas que incluyen vacunas conjugadas o de subunidades incluyen bacterias tales como el grupo de los estreptococos, estreptococos del grupo A, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Bordetella pertussis, Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae. Ejemplos de vacunas atenuadas para adultos son las vacunas contra el cólera, la E. coli enterotóxica, la shigelosis, etc.

25 Las vacunas muertas, pero sin limitación a los ejemplos, para su uso en animales (perros) son, la vacuna contra el parvovirus, las vacunas contra el virus de la rabia, las vacunas contra la leptospirosis tales como la Leptospira canicola, Leptospira icterohaemorrhagiae y la vacuna contra el virus respiratorio sincitial y el virus de la diarrea bovina, el herpesvirus bovino tipo 1 en el ganado bovino o los virus de la gripe en el caballo. Para los gatos, existe la vacuna contra el virus (parvo) de la panleucopenia felina, la vacuna contra el calicivirus felino, la vacuna contra el herpesvirus felino, la vacuna contra la Chlamydia psittaci felina, la vacuna contra el virus de la leucemia felina (FeLV) y la vacuna contra la rabia felina.

30

Ejemplos de vacunas muertas para su uso en seres humanos son las vacunas de virus inactivados, que incluyen el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus de la rabia, de la hepatitis A, de la polio y de la gripe.

35 La invención se puede utilizar con cualquier microorganismo muerto o vivo, de preferencia atenuado, para cualquier especie y los ejemplos anteriormente mencionados no limitan el alcance de la invención.

La invención también se refiere al uso de partículas de iscom por las que la composición antigénica comprende además una o más moléculas antigénicas.

La partícula de iscom puede ser una partícula de iscom o una partícula de matriz de iscom o cualquiera de sus subfragmentos.

40 El iscom contiene al menos un glicósido, al menos un lípido y al menos un tipo de sustancia o epítipo antigénico. Estas sustancias pueden ser de diferentes tipos, tales como proteínas y péptidos, glicoproteínas y glicopéptidos, hidratos de carbono, etc. Estos complejos aumentan la inmunogenicidad de los antígenos incluidos y también pueden contener una o más sustancias inmunomoduladoras (con actividad adyuvante). Los iscom se pueden preparar como se describe en los documentos EP 0 109 942 B 1, EP 0 242 380 B1 y EP 0 180 546 B1.

45 La matriz contiene al menos un glicósido, que es una sustancia con actividad adyuvante y al menos un lípido. La matriz tiene un efecto inmunopotenciador sobre las sustancias antigénicas administradas conjuntamente, véase el documento EP 0 436 620 B1. La matriz puede contener otros componentes inmunoestimulantes y potenciadores además de las saponinas, por ejemplo, lipopolisacáridos (LPS), el lípido A o derivados del lípido A, la toxina del cólera (CT) o la toxina termolábil de E. coli (LT) y sus sub-fragmentos o derivados de los mismos, por ejemplo, LTB, LTA, CTB, CTA o CTA1-DD.

50

Las partículas de iscom que contienen tales moléculas antigénicas integradas en la partícula, acopladas a la partícula o simplemente mezcladas en la composición se pueden utilizar junto con los microorganismos vivos y/o inactivados.

- Los lípidos usados son particularmente los que se describen en la patente EP 0 109 942 B 1 del solicitante, en particular en la página 3, y en la patente EP 0 436 620 B 1 en la página 7, líneas 7-24. En especial, se utilizan esteroides tales como el colesterol y fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Se pueden utilizar receptores que contienen lípidos que se unen a los componentes de unión de las células, tales como los glicolípidos que incluyen el receptor de la toxina del cólera, que es el gangliósido GM1, y el antígeno fucosado de grupo sanguíneo. Los componentes de unión de las células pueden funcionar a continuación como moléculas dirigidas al mucus y unirse a las sustancias que contienen lípidos a través de la simple mezcla de los mismos con los complejos que los contienen. Los complejos de iscom que comprenden tales receptores y los receptores se describen en el documento WO 97/30728.
- 5 El glicósido de las partículas de iscom puede ser cualquier glicósido. Los glicósidos de preferencia se describen en el documento EP 0 109 924 B1. Especialmente preferidos son el extracto crudo de Quillaja saponaria Molina (Dalsgaard, K. (1974), Arch. Gesamte Virusforsch, 44, 243.), o cualquier subfracción del mismo como se describe en el documento PCT/US/88101842 concedido a Kensil y col., Kensil, CA y col. (1991), J. Immunol., 146, 431, Kersten, GFA y col. (1990). "Aspects of Iscoms. Analytical, Pharmaceutical and Adjuvant Properties; Thesis, University of Utrecht", documentos EP 0 362 279 B2 y EP 0 555 276 B1.
- 10 Las fracciones de saponina según la invención pueden ser las fracciones A, B y C que se describen en el documento WO 96/11711, las fracciones B3, B4 y B4b que se describen en el documento EP 0 436 620 y las fracciones QA1-22 que se describen en el documento EP 0 3632 279 B2, Q-VAC (Nor-Feed, AS Dinamarca), Quillaja Saponaria Molina Spikoside (Isconova AB, Uppsala Science Park, 751 83, Uppsala, Suecia).
- 15 Se pueden utilizar las fracciones QA-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21 y 22 del documento EP 0 3632 279 B2, en especial QA-7, 17-18 y 21. Se obtienen como se describe en el documento EP 0 3632 279 B2, especialmente en la página 6 y en el Ejemplo 1 en las páginas 8 y 9.
- Se utilizan de preferencia las sub-fracciones A y C. Sorprendentemente ha resultado que la matriz-A y la matriz-C potencian la replicación del virus (véase Ejemplo 2).
- 20 La expresión "una fracción de saponina de Quillaja Saponaria Molina" se utiliza a lo largo de la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones como una descripción genérica de una fracción de saponina semi-purificada o definida de Quillaja Saponaria o una sustancialmente pura. Es importante que la fracción no contenga una cantidad de cualquier otra fracción que afecte negativamente a los buenos resultados que se obtienen cuando se utilizan las mezclas de iscom o matriz de iscom que comprenden esencialmente una fracción. La preparación de saponina puede incluir, si se desea, cantidades menores, por ejemplo hasta el 40% en peso, tales como hasta el 30% en peso, hasta el 25% en peso, hasta el 20% en peso, hasta el 15% en peso, hasta el 10% en peso, hasta el 7% en peso, hasta el 5% en peso, hasta el 2% en peso, hasta el 1% en peso, hasta el 0,5% en peso, hasta el 0,1% en peso, de otros compuestos tales como otras saponinas u otros materiales adyuvantes.
- 25 Las moléculas antigénicas pueden acoplarse a la partícula de matriz de iscom o simplemente mezclarse en la composición y utilizarse junto con los microorganismos vivos y/o inactivados.
- Las moléculas antigénicas que pueden incorporarse en o asociarse con la matriz de iscom según la presente invención pueden ser cualquier entidad química que tenga la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, tal como (pero no limitado a) un ser humano u otro animal, que incluye pero no se limita a una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células contra bacterias, virus, micoplasmas u otros microorganismos. El inmunógeno específico puede ser una proteína o un péptido, un hidrato de carbono, un polisacárido, un lipopolisacárido o un lipopéptido; o puede ser una combinación de cualquiera de éstos.
- 30 En particular, la molécula antigénica específica puede incluir una proteína nativa o un fragmento de la proteína, o una proteína sintética o un fragmento o péptido de la proteína; puede incluir una glicoproteína, un glicopéptido, una lipoproteína, un lipopéptido, una nucleoproteína, un nucleopéptido; puede incluir un conjugado de péptido-péptido; puede incluir un producto de expresión de un ácido nucleico recombinante.
- 35 Ejemplos de tales inmunógenos se citan en el documento EP 0 109 942 B1 e incluyen, pero sin limitación, a los que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra la hepatitis vírica o bacteriana, la gripe, la difteria, el tétanos, la tos ferina, el sarampión, las paperas, la rubéola, la poliomiелitis, el neumococo, el herpes, el virus respiratorio sincitial, el Haemophilus influenzae, la clamidia, el virus varicela-zoster, el virus de la rabia o el virus de la inmunodeficiencia humana.
- 40 Cualquier tipo de partícula de iscom, partícula de matriz de iscom, microorganismo vivo e inactivado y la sustancia antigénica se pueden utilizar juntos en una composición para su uso como un agente antigénico o inmunomodulador según la invención.
- Además, una o más partículas de iscom, partículas de matriz de iscom, microorganismos vivos e inactivados y las sustancias antigénicas se pueden utilizar juntos en una composición para uso como un agente antigénico o inmunomodulador según la invención. La invención también se refiere a una composición que comprende al menos una partícula de iscom y uno o más microorganismos vivos. La composición puede ser una vacuna, en la que el
- 45
- 50
- 55

microorganismo vivo es un virus. Tal composición puede comprender además uno o más microorganismos muertos o inactivados. También puede comprender una o más moléculas antigénicas.

La composición puede ser utilizada para animales en el campo de la medicina veterinaria y para los seres humanos.

5 Las composiciones farmacéuticas y de medicina veterinaria según la presente invención, y para su uso según la presente invención, pueden incluir, además del ingrediente activo, un excipiente, un diluyente, un vehículo, un tampón, un estabilizador, un aditivo u otros materiales farmacéuticamente aceptables muy conocidos para los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo o de otro material dependerá de la vía de administración.

10 Un antígeno de vacuna viva por lo general se liofiliza y antes de la administración se disuelven los antígenos de la vacuna (microorganismos vivos) en un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los antígenos de la vacuna solubilizados o suspendidos se administran inmediatamente al individuo. Antes de la administración, un antígeno liofilizado se disuelve o se suspende en un disolvente que puede contener el adyuvante, es decir la formulación de matriz de iscom o el iscom con o sin la vacuna muerta y/o la(s) sustancia(s) antigénica(s). Como alternativa, antes de suspender o solubilizar el componente liofilizado en la vacuna, el disolvente se mezcla con la matriz de iscom y/o las partículas de iscom y/o los microorganismos muertos y/o las moléculas antigénicas.

15 El disolvente farmacéuticamente aceptable puede ser un tampón, por ejemplo PBS.

Los microorganismos vivos se suministran de preferencia liofilizados y por separado de las partículas de adyuvante.

20 Por consiguiente, la invención también se refiere a un kit de partes que comprenden al menos un compartimiento que contiene al menos un organismo vivo y al menos un compartimiento que contiene al menos una partícula de iscom.

Un kit de partes puede comprender diferentes compartimientos, por ejemplo, uno o más compartimientos que comprenden al menos un microorganismo vivo liofilizado y al menos un compartimiento que comprende al menos una partícula de iscom. La partícula de iscom de preferencia se disuelve o se suspende en un disolvente farmacéuticamente aceptable.

25 Otra forma de realización según la invención se refiere a un kit de partes, que además comprende también al menos un microorganismo inactivado, que puede estar presente en otro compartimiento adicional o en el mismo compartimiento como un compartimiento que contiene al menos una partícula de iscom.

Cuando están presentes moléculas antigénicas, pueden estar integradas o acopladas en una partícula de iscom o mezcladas con una o más partículas de matriz de iscom y mantenidas en el mismo compartimiento.

30 La cantidad de sustancia antigénica, microorganismo inactivado y microorganismo vivo depende de la sustancia y de los microorganismos utilizados y del individuo a tratar. El contenido de microorganismo vivo depende además de la constitución del microorganismo. Para un microorganismo no vivo inactivado la dosis baja en pequeños animales es de 0,1 µg hasta 100 µg, para animales de gran tamaño la dosis baja varía desde 10 µg hasta 300 µg, sin que estos sean valores extremos limitantes. En los seres humanos los intervalos de dosis son de 1 µg hasta 200 µg, sin que estos sean valores extremos limitantes.

35 La invención se describirá más a continuación por medio de ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

#### Preparación de matrices de iscom e ISCOM

40 En los siguientes experimentos se utilizan ISCOM y matrices de iscom como sistemas adyuvantes y de administración de antígeno y adyuvante de vacunas. En los siguientes experimentos se analiza la capacidad para aumentar la inmunogenicidad de antígenos de vacuna seleccionados en formulaciones que contienen antígenos muertos de vacunas (que no replican) y antígenos vivos de vacunas, es decir, que replican. Las formulaciones útiles deben aumentar la inmunogenicidad del antígeno muerto de vacuna y ser a la vez compatibles con el antígeno vivo de vacuna, es decir, no debe reducir la replicación ni la inmunogenicidad de los antígenos vivos de vacuna. Sería ventajoso que los ISCOM y las matrices de iscom también mejorasen la inmunogenicidad de los antígenos vivos de vacunas. En los siguientes experimentos se exploran estas propiedades en sistemas de cultivos celulares, en embriones y en modelos animales (mamíferos). La clave para tener éxito con las formulaciones es que las probables propiedades negativas de cada constituyente no tengan efectos negativos sobre la formulación de la vacuna. Por ejemplo, la saponina libre de quillaja es muy lítica y producirá la lisis del virus con cubierta utilizado en la presente invención y también lisará las células infectadas por estos virus. Otros adyuvantes pueden tener otros efectos negativos, por ejemplo, el atrapamiento del antígeno vivo de la vacuna. Este ejemplo describe la formulación de los ISCOM y las matrices de iscom, que neutralizan y bloquean los efectos negativos de los componentes libres de la quillaja.

Las matrices de iscom y los ISCOM se prepararon como se describe en los documentos EP 0 109 942 B1, EP 0 242 380 B1, EP 0 180 546 B1 y EP 0 436 620 B1. A continuación se da una descripción más detallada de los ejemplos específicos en la presente solicitud.

#### **Materiales**

- 5 Colesterol, por ejemplo, Sigma C8503 (EE. UU.)  
Fosfatidilcolina (derivado de huevo), por ejemplo, Lipoid E-PC (Alemania)  
MEGA-10 (Bachem AG, Suiza)  
Octilglucósido (Bachem, Suiza)  
Fracción A y C de saponina de quillaja (Patente WO 9611711)
- 10 Preparados de saponina semipurificada, Spikoside (Inconova AB, Suecia) y Q-VAC (Norfeed AS, Dinamarca)  
Filtros estériles de 0,22 µm (Acrodisc)  
PBS (solución salina 150 mM tamponada con fosfato 10 mM, pH 6,8-7,4)  
Casete de diálisis Slide-A-Lyzer PM de corte 12 - 14.000, Pierce (EE. UU.) 0,5 - 3 ml y 3 - 15 ml.

#### **Virus**

- 15 Virus de la gripe purificado A/PR/8/34 (H1N1), 6,0 mg/ml  
Virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) purificado, 3,7 mg/ml

#### **MEGA-10** (disolución madre)

- 20 Se preparó una disolución madre al 20% (p/p) mediante la disolución de 2,0 g de MEGA-10 sólido seco en 8 ml de agua destilada, con calentamiento suave (30 - 50 °C). La disolución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm, se separó en alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **Octilglucósido** (disolución madre)

Se preparó una disolución madre al 20% (p/p) mediante la disolución de 2,0 g de octilglucósido seco en 8 ml de agua destilada, con calentamiento suave (30 - 50 °C). La disolución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm, se separó en alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

- 25 **Mezcla de lípidos** (15 mg/ml en MEGA-10)

Se disolvieron 150 mg de colesterol y de fosfatidilcolina en 10 ml de MEGA-10 al 20%, con calentamiento suave (30 - 60 °C) y con agitación lenta. La disolución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm, se separó en alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Antes de utilizar, las mezclas de lípidos congeladas se calentaron hasta 40 - 50 °C hasta obtener una disolución transparente.

- 30 **Mezcla de lípidos** (10 mg/ml en octilglucósido)

Se disolvieron 100 mg de colesterol y de fosfatidilcolina en 10 ml de octilglucósido al 20% con suave calentamiento (30 - 60 °C) y con agitación lenta. La disolución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm, se separó en alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Antes de utilizar, las mezclas de lípidos congeladas se calentaron hasta 40 - 50 °C hasta obtener una disolución transparente.

- 35 **Disoluciones madre de saponina** (100 mg/ml)

Se disolvió 1,0 gramo de la fracción A o C de *Quillaja saponaria* Molina respectivamente o una mezcla de 0,7 g de A y 0,3 g de C, Spikoside o Q-VAC en 10,0 ml de agua destilada. Las disoluciones se filtraron a través de un filtro estéril de 0,22 µm y las alícuotas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

- 40 Los preparados de matrices de iscom se generaron como se indica en la Tabla 1. Las mezclas se prepararon de la siguiente manera usando los lípidos MEGA-10 disueltos;

1. Se añadieron 2 ml de PBS a un tubo Falcon de 50 ml.
2. Se añadió la mezcla de lípidos.
3. Se añadió saponina y se mezcló la mezcla.
4. Se añadió PBS hasta un volumen final de 12 ml.

5. Se mezcló la disolución de manera exhaustiva y se incubó a temperatura ambiente.
6. Se colocó la disolución en la casete Slide-A-Lyzer.
7. Se sometió la disolución a diálisis frente a PBS, 4 cambios (a temperatura ambiente durante 48 - 60 horas).
8. Se aspiró la disolución de la Slide-A-Lyzer y se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

5

Tabla 1

Preparación (MATRIZ)	Mezcla de lípidos (15 mg/ml)		Saponina de quillaja (Fracción A y/o C)		PBS
	Cantidad (mg)	Volumen (µl)	Cantidad (mg)	Volumen (µl)	Volumen (µl)
Matriz A	12	800	48*	480	2,0 + 8,72
Matriz C	12	800	30**	300	2,0 + 8,90
MB-703	12	800	42***	420	2,0 + 8,78
Matriz de Spikoside	12	800	60 <sup>S</sup>	600	2,0 + 8,60
Matriz de Q-VAC	12	800	120 <sup>Q</sup>	1200	2,0 + 8,00

\* - Fracción A sola  
 \*\* - Fracción C sola  
 \*\*\* - Mezcla de fracción A + C, que consiste en 7 partes (mg) de A + 3 partes (mg) de C  
<sup>S</sup> - Spikoside  
<sup>Q</sup> - Q-VAC

La formación de la matriz de iscom se verificó por medio de tinción negativa con microscopía electrónica y las concentraciones resultantes de saponina se determinaron por medio de HPLC. (San Martin and Briones, Quality control of commercial quillaja (Quillaja saponaria Molina) extracts by reverse phase HPLC. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 2063-2068, 2000.

10

La matriz MM-703 se preparó mezclando 5,5 ml de matriz A con 3,0 ml de matriz C.

#### Preparación de ISCOM de PR8 (virus de la gripe) y VRSB (virus respiratorio sincitial bovino)

Los virus purificados (PR8 y VRSB respectivamente) se diluyeron en PBS hasta una concentración de 2,0 mg/ml.

El virus PR8 se solubilizó mediante la adición de MEGA-10 hasta una concentración final del 2% (p/p), la mezcla se incubó durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente.

15

El virus VRSB se solubilizó mediante la adición de octilglucósido hasta una concentración final del 1% (p/p), la mezcla se incubó durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente.

Se eliminó el núcleo viral de las suspensiones del virus solubilizadas por medio de untracentrifugación y los sobrenadantes que contenían las glicoproteínas de la cubierta viral solubilizadas se sometieron a análisis de aminoácidos antes de su posterior incorporación en el ISCOM.

20

Por cada mg de glicoproteínas virales se añadió 1 mg de cada uno de colesterol y fosfatidilcolina de las disoluciones madre (PR8/MEGA-10 y VRSB/octilglucósido) y 3,5 mg de la mezcla de Fracción A + C (como se describe anteriormente en la Tabla 1) o 5 mg de Spikoside. Las mezclas se incubaron y se colocaron en las casetes Slide-A-Lyzer (0,5 - 3 ml). Las casetes se sometieron a diálisis contra PBS, se realizaron 4 cambios de PBS durante 24 - 48 horas a temperatura ambiente. La formación de los iscom y la incorporación de las glicoproteínas virales se verificó mediante microscopía electrónica y centrifugaciones analíticas en gradientes de densidad de sacarosa como se describió anteriormente en el documento EP 0 109 942 B1.

25

#### Ejemplo 2

#### Las formulaciones de ISCOM y matrices de iscom no reducen la proliferación viral en embriones de pollo a diferencia de los adyuvantes de aceite e hidróxido de aluminio que se utilizan convencionalmente

30

Este ejemplo se llevó a cabo para explorar el efecto de diversos adyuvantes en la replicación de virus en embriones de pollo. El efecto negativo puede depender del efecto de los respectivos adyuvantes en el virus o en las células que son el objetivo de la infección por el virus.

35

Se probaron los efectos de las siguientes formulaciones adyuvantes en los virus vivos para explorar si podían interferir con la replicación del antígeno viral vivo en el embrión de pollo: matriz A, matriz C, matriz 703, matriz bruta de Spikoside (MB703), adyuvante oleoso (adyuvante incompleto de Freund), hidróxido de aluminio (Allhydrogel, Superfos AS), iscom de virus de la gripe e iscom de virus respiratorio sincitial bovino. Las preparaciones de iscom y matrices de iscom se prepararon como se describe en el EJEMPLO 1.



A partir de una disolución madre de virus de la gripe (virus sembrado en líquido alantoico), que contenía  $9 \log_{10}$  se preparó una dilución  $6 \log_{10}$  en PBS como dilución de trabajo. A un ml de esta dilución de trabajo del virus se añadieron 50, 100 y 200  $\mu\text{g}$  de cada una de las formulaciones de adyuvantes. Las mezclas de adyuvantes y virus se incubaron durante al menos 2 horas a temperatura ambiente antes de inyectar 100  $\mu\text{l}$  en el líquido alantoico de huevos de gallina embrionados de 11 días. El líquido alantoico se recogió a los 18 días de incubación. El nivel de replicación del virus se midió como la dosis infectiva 50 para los embriones (EID50), es decir, el punto final en el que se infecta el 50% de los embriones. La detección de la infección, es decir, la presencia de virus en el líquido alantoico del huevo embrionado, se basa en el fenómeno de que el virus de la gripe produce la agregación de los glóbulos rojos de pollo, fenómeno denominado hemaglutinación (HA).

## 10 Resultados

Se infectaron cuatro grupos de control, que incluyeron de 7 a 10 embriones cada uno, con el virus de la gripe que no se incubó previamente con ninguna de las formulaciones de adyuvante. Los valores de EID50 variaron entre  $9,2 \log_{10}$  hasta  $9,5 \log_{10}$ .

Ninguna de las formulaciones de matriz ni de iscom mencionadas anteriormente redujeron los valores de EID50 en comparación con los valores de EID50 medidos en los grupos de control. Por el contrario, el aceite y el hidróxido de aluminio redujeron los valores de EID50 más de una unidad  $\log_{10}$ , lo que es inaceptable si se desea mezclar con antígenos vivos de vacunas, es decir, no se pueden utilizar en una vacuna que contiene antígenos vivos de vacuna (*United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF)*). Por lo tanto, se concluye que las formulaciones de matriz son "compatibles" para su uso en vacunas, que contienen microorganismos vivos.

## 20 Ejemplo 3

**Las formulaciones de ISCOM y matrices de iscom no reducen la replicación viral en cultivos celulares a diferencia de la matriz de Spicoside, saponina C libre, 703 libre y Spicoside libre, el adyuvante oleoso y el hidróxido de aluminio, que redujeron la proliferación viral**

Los cultivos celulares son sensibles a los sistemas para medir la replicación viral in vitro. En este ejemplo, se probaron las siguientes formulaciones de adyuvante para explorar si interferían con la replicación de diversos virus. Se seleccionaron los siguientes virus para la prueba porque son dianas importantes para las vacunas en diversas especies de animales: El virus indicador fue el virus del moquillo canino (CDV) en cultivos de células VERO probados contra la matriz A, la matriz C, la matriz 703 (MB703), la matriz de Spikoside, la matriz Q-VAC, el adyuvante oleoso, hidróxido de aluminio, saponina A libre, saponina C libre, 703 libre y spikoside libre, iscom del virus de la gripe e iscom del virus respiratorio sincitial bovino. Las preparaciones de iscom y de matrices de iscom se prepararon como se describe en el EJEMPLO 1.

## Procedimientos

A partir de una disolución madre de CDV, que contenía  $5 \log_{10}$  se preparó una dilución al décimo en medio del virus sin suero, como dilución de trabajo. A un ml de esta dilución del virus se añadieron 50, 100 y 200  $\mu\text{g}$  de cualquiera de las formulaciones de adyuvante. Las mezclas de adyuvantes y virus se incubaron durante al menos 2 horas antes de permitir la adsorción de 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla de adyuvante y virus en diluciones  $-1 \log_{10}$  (calculado a partir de la disolución madre del virus) hasta una dilución  $-5 \log_{10}$  durante 1 a 2 horas a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a cultivos de células vero adherentes a la superficie de plástico de  $25 \text{ cm}^2$  en matraces Costar (N° 3055, Coming Inc., Coming, NY 14831, EE. UU.). Posteriormente, se eliminaron las suspensiones de virus respectivamente y las suspensiones de virus-adyuvante en la medida de lo posible y se añadió medio de cultivo celular que contenía suero de ternera al 2% a cada matraz.

El nivel de replicación del virus se midió como la dosis infectiva 50 del cultivo tisular (TCID50), es decir, el punto final en el que se infecta el 50% de los cultivos tisulares. La detección de la infección, es decir, la presencia del virus en los cultivos tisulares se basa en la destrucción celular que está causando el virus, es decir, el efecto citopático (CPE). La especificidad de la reacción se confirmó mediante inmunofluorescencia o por medio de neutralización de los virus recuperados de los cultivos celulares. Los cultivos se continuaron y se examinaron durante 8 días cuando los controles de virus presentaron del 50 al 100% de CPE (destrucción celular), mientras que los cultivos no infectados todavía presentaban capas de células confluentes.

Los controles de virus incluyeron el virus en las mismas diluciones, tratadas de la misma manera que las mezclas de adyuvantes y virus, excepto que las suspensiones de virus no se mezclaron con las formulaciones de adyuvante.

Los controles de células eran células no infectadas.

Cada ensayo con mezcla y con control se llevó a cabo por cuadruplicado.

**Resultados**

La valoración de los cuatro controles de virus, es decir, CDV que no se incubó previamente con ninguna formulación de adyuvante, dio un valor de 4,7 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>.

5 Las valoraciones del virus tratado con la matriz A y con la matriz C fueron ambas de 5,7, es decir, un valor diez veces superior al del control de virus, es decir un aumento inesperado de proliferación del virus.

Matriz 703 (4,7), matriz A + C (4,7), matriz Q-VAC (4,5), saponina A libre, iscom de virus de la gripe (4,9) e iscom de virus respiratorio sincitial bovino (4,4). Los valores entre paréntesis muestran que ninguna de estas formulaciones difiere significativamente de los valores del control de virus.

10 Matriz de Spikoside, saponina C libre, 703 libre y spikoside libre, el adyuvante oleoso y el hidróxido de aluminio disminuyeron más de diez veces los valores de virus en comparación con el control de virus.

**Conclusión**

15 La matriz de Spikoside, saponina C libre, 703 libre y spikoside libre, el adyuvante oleoso y el hidróxido de aluminio no se pueden utilizar junto con los antígenos vivos de vacunas, debido a que disminuyen la capacidad de replicación, cuando se mezclan con los antígenos vivos de vacunas United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF).

La matriz 703, la matriz A + C, la matriz Q-VAC, saponina A libre, los iscom de virus de la gripe y los iscom de virus respiratorio sincitial bovino se pueden usar todos como adyuvante en una vacuna que contiene componentes de vacuna.

20 El tratamiento con matriz A y matriz C mejoró la proliferación del virus en cultivos celulares, un resultado inesperado, que puede dar lugar a una mayor eficacia.

**Ejemplo 4**

**La matriz de iscom mejora en gran medida la inmunogenicidad en hurones de una vacuna de virus de la rabia muerto y no obstaculiza, sino que aumenta la inmunogenicidad de los componentes vivos de la vacuna incluidos en la vacuna**

25 En los ejemplos anteriores se probó el efecto de diversos adyuvantes sobre la replicación de antígenos vivos de vacuna en cultivos celulares in vitro y en embriones de pollo in vivo. En este ejemplo, se analizó la inmunogenicidad en un modelo animal (hurón) utilizando una vacuna comercial viva de varios componentes. La intención era demostrar que una formulación de matriz de iscom seleccionada para mejorar un antígeno de la vacuna del virus de la rabia muerto no tiene efectos negativos sobre la inmunogenicidad de los antígenos vivos de la vacuna incluidos en la formulación. Los componentes vivos de la vacuna fueron seleccionados porque están incluidos comúnmente en las vacunas comerciales para perros.

**Diseño experimental**

35 Se separaron 18 hurones en tres grupos de 6 hurones. El grupo 1 fue vacunado en la semana 0 con una vacuna viva comercial (vacuna viva atenuada contra el virus del moquillo canino, adenovirus, parvovirus y virus Parainfluenza) mezclada con los componentes purificados del virus de la rabia muerto. En la semana 4, se administró a los hurones una dosis de refuerzo del componente del virus de la rabia muerto.

40 Los grupos 2 y 3 fueron vacunados en la semana 0 con la misma vacuna comercial viva (vacuna viva atenuada contra el virus del moquillo canino, adenovirus, parvovirus y virus Parainfluenza) mezclada con el componente purificado del virus de la rabia muerto con adyuvante, que era cualquiera de las dos diferentes preparaciones matriz de iscom, es decir, MM703 y MB703 respectivamente (preparadas como se describe en el Ejemplo 1). En la semana 4, se administró a los hurones una dosis de refuerzo del componente del virus de la rabia muerto solo (Grupo 1) o el componente de la rabia mezclado con cualquiera de las dos preparaciones de matriz adyuvantes. El esquema de la inmunización se presenta en la Tabla 2.

45 Ambas vacunas (los antígenos vivos de la vacuna liofilizados y el antígeno del virus de la rabia muerto liofilizado) se reconstituyeron en PBS estéril o en PBS estéril suplementada con 75 µg/ml de MM703 o MB703. Las vacunas se administraron por vía subcutánea según las indicaciones del fabricante de la vacuna viva. Se administró un ml de vacuna por dosis.

Tabla 2

Grupo	1ª vacunación (semana 0)	2ª vacunación (semana 4)
1	Vacuna viva + rabia muerta	Rabia muerta
2	Vacuna viva + rabia muerta + MM703	Rabia muerta + MM703
3	Vacuna viva + rabia muerta + MB703	Rabia muerta + MB703

Se extrajo sangre de los hurones en las semanas 0, 2, 4, 5, 6 y 8, y se realizaron pruebas en los sueros para detectar anticuerpos contra los componentes de la vacuna. Las pruebas utilizadas fueron un ELISA indirecto convencional, que se usó para realizar el diagnóstico serológico de rutina y un ELISA de bloqueo desarrollado especialmente para confirmar la especificidad de los resultados.

5 **Resultados**

Los resultados se muestran en la Tabla 3 (ELISA indirecto) y en la Tabla 4 (ELISA de bloqueo).

Los análisis en el ELISA convencional revelaron que las respuestas de anticuerpos séricos fueron mayores contra ambos antígenos vivos y contra el antígeno de la vacuna del virus de la rabia muerto en los animales inmunizados con la vacuna suplementada con las formulaciones MM703 y MB703 que en el grupo de control, es decir, los animales del grupo que se había inmunizado con la vacuna sin adyuvante.

Los análisis realizados en medio de la prueba de ELISA de bloqueo mostraron que el antígeno vivo de CDV indujo niveles similares de respuestas de anticuerpos séricos en todos los grupos. La respuesta inmune a los otros antígenos vivos de la vacuna aumentó por medio de ambas formulaciones, MM703 y MB703. Estas formulaciones adyuvantes mejoraron de manera considerable los niveles de anticuerpos séricos contra el antígeno de la vacuna del virus de la rabia muerto.

Los valores de la respuesta en los hurones de los grupos a los que se administró una mezcla de virus vivo y cualquiera de las dos preparaciones de matriz no fueron más bajos que las de los hurones del grupo 1 para ninguno de los virus probados. Los hurones del grupo 1 fueron vacunados con el virus vivo atenuado, sin adyuvante de matriz. Por el contrario, una cantidad sorprendentemente alta de hurones que recibieron la vacuna viva mezclada con cualquiera de los dos adyuvantes de matriz, respondieron con valores más altos que los que recibieron la vacuna viva sin adyuvante.

**Tabla 3**

Análisis ELISA indirecto de muestras de suero de hurones vacunados con una vacuna de combinación de virus vivo y la vacuna muerta contra la rabia, con o sin adyuvante adicional de matriz de iscom.

Grupos	CAV sem 0	CAV sem 2	CAV sem 4	CAV sem 5	CAV sem 6	CAV sem 8	CDV sem 0	CDV sem 2	CDV sem 4	CDV sem 5	CDV sem 6	CDV sem 8
<b>Grupo de control</b>												
Hurón Nº 1	40	450	40	150	40	40	40	150	50	50	150	40
Hurón Nº 2	40	100	50	150	40	40	40	150	50	40	150	40
Hurón Nº 3	40	450	150	150	50	50	40	150	40	40	50	150
Hurón Nº 4	40	150	100	150	50	50	40	150	50	40	50	40
Hurón Nº 5	40	150	40	450	40	40	40	450	50	50	50	40
Hurón Nº 6	40	150	50	50	50	40	40	450	150	40	50	100
<b>MB703</b>												
Hurón Nº 7	40	450	450	2700	1350	1350	40	150	450	450	450	450
Hurón Nº 8	40	450	150	1350	450	450	40	150	50	50	50	40
Hurón Nº 9	40	450	1350	4050	2700	1350	40	450	450	450	450	150
Hurón Nº 10	40	50	40	50	1350	50	40	150	50	40	50	50
Hurón Nº 11	40	150	40	40	50	40	50	150	50	40	50	50
Hurón Nº 12	40	450	1350	4050	4050	2700	40	450	450	450	450	450
<b>MM703</b>												
Hurón Nº 13	40	50	450	1350	1350	150	40	150	150	50	150	50
Hurón Nº 14	40	150	1350	2700	12150	2700	40	150	150	450	450	450
Hurón Nº 15	40	450	50	40	40	40	40	50	50	40	40	40
Hurón Nº 16	450	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-
Hurón Nº 17	40	50	1350	4050	2700	1350	40	450	450	450	150	150
Hurón Nº 18	40	150	40	40	50	50	40	1350	40	40	40	40

Grupos	CPV sem 0	CPV sem 2	CPV sem 4	CPV sem 5	CPV sem 6	CPV sem 8	CPI 5 sem 0	CPI 5 sem 2	CPI 5 sem 4	CPI 5 sem 5	CPI 5 sem 6	CPI 5 sem 8
<b>Grupo de control</b>												
Hurón Nº 1	40	40	450	450	40	50	40	150	40	50	40	40
Hurón Nº 2	40	40	450	450	40	150	40	150	40	50	40	40
Hurón Nº 3	40	150	300	450	50	40	40	150	40	50	40	40
Hurón Nº 4	450	150	450	1350	300	300	40	150	40	40	40	150
Hurón Nº 5	40	40	40	450	40	50	40	450	40	100	40	40
Hurón Nº 6	40	100	40	450	40	40	40	450	40	50	40	40

# ES 2 379 351 T3

(continuación)

Grupos	CPV sem 0	CPV sem 2	CPV sem 4	CPV sem 5	CPV sem 6	CPV sem 8	CPI 5 sem 0	CPI 5 sem 2	CPI 5 sem 4	CPI 5 sem 5	CPI 5 sem 6	CPI 5 sem 8
<b>MB703</b>												
Hurón Nº 7	40	1350	1350	4050	1350	4050	40	150	40	450	40	50
Hurón Nº 8	150	1350	1350	4050	1350	1350	40	150	40	40	40	40
Hurón Nº 9	100	4050	4050	12150	4050	4050	40	40	40	1350	150	50
Hurón Nº 10	150	450	1350	4050	450	1350	40	150	40	40	40	40
Hurón Nº 11	100	450	150	300	150	900	50	150	50	40	50	40
Hurón Nº 12	40	100	450	1350	450	1350	40	150	40	2700	1350	1350
<b>MM703</b>												
Hurón Nº 13	150	1350	4050	12150	12150	12150	40	100	40	40	40	40
Hurón Nº 14	150	1350	12150	12150	4050	12150	150	150	50	1350	1350	450
Hurón Nº 15	40	100	1350	4050	900	4050	40	100	50	40	40	40
Hurón Nº 16	40	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-
Hurón Nº 17	100	100	450	4050	450	4050	40	50	50	1350	150	450
Hurón Nº 18	40	450	1350	4050	450	1350	40	450	40	450	40	40

1. Todos los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA)
2. CAV = adenovirus canino, CDV = virus del moquillo canino, CPV = parvovirus canino, CPI5 = parainfluenzavirus 5 canino, Rab = rabia
3. - = sin datos

**Tabla 3 (continuación)**

5 Análisis ELISA indirecto de muestras de suero de hurones vacunados con una vacuna de combinación de virus vivo y la vacuna muerta contra la rabia, con o sin adyuvante adicional de matriz de iscom.

Grupos	Rab sem 0	Rab sem 2	Rab sem 4	Rab sem 5	Rab sem 6	Rab sem 8
<b>Grupo de control</b>						
Hurón Nº 1	40	150	450	150	150	50
Hurón Nº 2	40	150	450	40	50	40
Hurón Nº 3	40	50	900	40	40	40
Hurón Nº 4	40	50	900	40	40	40
Hurón Nº 5	40	450	450	50	40	40
Hurón Nº 6	40	150	450	50	50	40
<b>MB703</b>						
Hurón Nº 7	40	1350	900	4050	4050	12150
Hurón Nº 8	40	900	450	900	12150	4050
Hurón Nº 9	40	1350	4050	4050	4050	1350
Hurón Nº 10	40	900	4050	4050	4050	1350
Hurón Nº 11	40	900	450	450	4050	4050
Hurón Nº 12	40	900	4050	12150	12150	12150
<b>MM703</b>						
Hurón Nº 13	40	1350	450	4050	12150	4050
Hurón Nº 14	40	1350	1350	12150	12150	4050
Hurón Nº 15	40	1350	150	900	4050	1350
Hurón Nº 16	40	-	-	-	-	-
Hurón Nº 17	40	1350	1350	12150	12150	4050
Hurón Nº 18	40	900	900	12150	12150	12150

1. Todos los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA)
2. CAV = adenovirus canino, CDV = virus del moquillo canino, CPV = parvovirus canino, CPI5 = parainfluenzavirus 5 canino, Rab = rabia
3. - = sin datos

**Tabla 4**

Análisis ELISA de bloqueo de muestras de suero de hurones vacunados con una vacuna de combinación de virus vivo y la vacuna muerta contra la rabia, con o sin adyuvante adicional de matriz de iscom.

Grupos	Rab sem 0	Rab sem 2	Rab sem 4	Rab sem 5	Rab sem 6	Rab sem 8	CAV sem 0	CAV sem 2	CAV sem 4	CAV sem 5	CAV sem 6	CAV sem 8
<b>Grupo de control</b>												
Hurón Nº 1	<3	27	<3	<3	<3	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 2	<3	9	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 3	<3	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 4	<3	3	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 5	<3	9	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 6	<3	3	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
<b>MB703</b>												
Hurón Nº 7	<3	<3	9		>81	9	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 8	<3	<3	3	9	>81	9	<3	<3	9	9	9	3
Hurón Nº 9	<3	<3	9	54	>81	27	<3	<3	27	81	27	9
Hurón Nº 10	<3	<3	3	9	27	27	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 11	<3	<3	<3	9	9	27	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 12	<3	<3	<3	81	81	>=81	<3	<3	<3	<3	<3	<3
<b>MM703</b>												
Hurón Nº 13	<3	<3	<3	3	9	27	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 14	<3	3	3	81	>81	27	<3	<3	9	27	27	3
Hurón Nº 15	<3	9	<3	3	9	27	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 16	3	-	-	-	-	-	<3	-	-	-	-	-
Hurón Nº 17	3	<3	3	18	>81	>=81	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 18	9	<3	<3	18	>81	>=81	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Grupos	CDV sem 0	CDV sem 2	CDV sem 4	CDV sem 5	CDV sem 6	CDV sem 8	CPV sem 0	CPV sem 2	CPV sem 4	CPV sem 5	CPV sem 6	CPV sem 8
<b>Grupo de control</b>												
Hurón Nº 1	<3	<3	3	<3	<3	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 2	<3	<3	<3	<3	<3	3	<3	<3	<3	<3	3	<3
Hurón Nº 3	<3	<3	<3	<3	3	3	<3	9	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 4	<3	<3	6	<3	3	9	<3	<3	3	<3	<3	<3
Hurón Nº 5	<3	3	3	<3	<3	9	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hurón Nº 6	<3	<3	<3	3	<3	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
<b>MB703</b>												
Hurón Nº 7	<3	3	6	<3	3	<3	<3	<3	9	3	27	27
Hurón Nº 8	<3	<3	3	<3	3	<3	<3	<3	3	9	3	9
Hurón Nº 9	<3	3	6	6	6	<3	<3	9	54	3	>81	>81
Hurón Nº 10	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3	3	54
Hurón Nº 11	<3	<3	<3	<3	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3
Hurón Nº 12	<3	9	3	<3	9	3	<3	<3	<3	<3	<3	9
<b>MM703</b>												
Hurón Nº 13	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3	3	<3	27	>81	>81
Hurón Nº 14	<3	3	<3	3	9	9	<3	3	9	<3	9	>81
Hurón Nº 15	<3	<3	<3	3	<3	9	<3	27	<3	<3	3	27
Hurón Nº 16	<3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Hurón Nº 17	<3	3	9	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	9
Hurón Nº 18	<3	9	<3	6	<3	27	<3	<3	<3	<3	<3	3

1. Todos los resultados se expresan en valores
2. CAV = adenovirus canino, Rab = rabia, CDV = virus del moquillo canino, CPV = parvovirus canino
3. - = no probado

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una partícula de iscom como adyuvante para preparar una composición antigénica, cuya composición comprende al menos un microorganismo vivo.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que la composición antigénica es una vacuna que comprende al menos un virus vivo.
3. El uso según la reivindicación 1 y/o 2, en el que la composición antigénica comprende además al menos un microorganismo muerto o inactivado.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición antigénica comprende además una o más moléculas antigénicas.
- 10 5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la partícula de iscom es un iscom que comprende al menos un glicósido, al menos un lípido y al menos un antígeno que contiene una proteína hidrófoba o un péptido hidrófobo.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la partícula de iscom es una matriz de iscom, que comprende al menos un glicósido y al menos un lípido.
- 15 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la partícula de iscom comprende al menos un fragmento de glicósido de Quil A.
8. El uso según la reivindicación 7, en el que la partícula de iscom comprende el subfragmento A y /o el subfragmento B y / o el subfragmento C de Quil A.
- 20 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se usan 7 partes en peso de la fracción A y 3 partes en peso de la fracción C de Quil A en diferentes partículas de iscom.
10. Composición que comprende al menos una partícula de iscom y uno o más microorganismos vivos.
11. La composición según la reivindicación 10, en la que el microorganismo vivo es un virus.
12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, que además comprende uno o más microorganismos muertos o inactivados.
- 25 13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que además comprende una o más moléculas antigénicas.
14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que la partícula de iscom es un iscom que comprende al menos un glicósido, al menos un lípido y al menos un antígeno que contiene una proteína hidrófoba o un péptido hidrófobo.
- 30 15. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que la partícula de iscom es una matriz de iscom, que comprende al menos un glicósido y al menos un lípido.
16. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en la que la partícula de iscom comprende al menos un fragmento de glicósido de Quil A.
- 35 17. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en la que la partícula de iscom comprende el subfragmento A y / o el subfragmento B y / o el subfragmento C de Quil A.
18. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que se usan 7 partes en peso de la fracción A y 3 partes en peso de la fracción C de Quil A en diferentes partículas de iscom.
19. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, que además comprende un vehículo, un diluyente, un excipiente o un aditivo farmacéuticamente aceptable.
- 40 20. Kit de partes que comprende al menos un compartimiento que contiene al menos un microorganismo vivo y al menos un compartimiento que contiene al menos una partícula de iscom.
21. El kit de partes según la reivindicación 20, que además comprende al menos un microorganismo inactivado, que puede estar presente en otro compartimiento o en el mismo compartimiento que el al menos un compartimiento que contiene la al menos una partícula de iscom.