

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 377**

51 Int. Cl.:
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06740939 .1**
96 Fecha de presentación: **13.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1888107**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Nuevas formulaciones de vacunas**

30 Prioridad:
15.04.2005 US 107000

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2012

73 Titular/es:
MERIAL LIMITED (100.0%)
3239 SATELLITE BLVD
DULUTH, GA 30096-4640, US

72 Inventor/es:
PARISOT, ALEXIS, GUY, ANDRE;
DESGUILLES-BLECHET, STEPHANIE, MARIE-
CATHERINE;
CHARREYRE, CATHERINE y
ROULET, CLAUDE, JEAN, MARIE

74 Agente/Representante:
PONTI SALES, Adelaida

ES 2 389 377 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas formulaciones de vacunas

- 5 **[0001]** Esta solicitud reivindica prioridad respecto a la solicitud de EE.UU. nº de serie 11/107.000 presentada el 15 de abril, 2005, cuyo contenido se incorpora expresamente en el presente documento por referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** La presente invención se refiere a emulsiones de aceite en agua, a su uso como adyuvantes, y a composiciones farmacéuticas, inmunológicas o de vacunas que las comprenden.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 **[0003]** El uso de adyuvantes en vacunas es bien conocido. Un adyuvante es un compuesto que, cuando se combina con un inmunógeno de vacuna, aumenta la respuesta inmunitaria al inmunógeno de vacuna. Entre las estrategias que promueven la inmunogenicidad de una proteína, glicoproteína o péptido, están las que emulsionan los inmunógenos de vacuna (Nossal 1999, En: Fundamental Immunology. Paul (Ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.; Vogel and Powell, 1995, En: Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach. Powell and Newman (Eds.), Plenum Press, NY, N.Y. pág. 141). Debido a la función esencial que tienen los adyuvantes en la mejora de la inmunogenicidad de los inmunógenos de vacunas, el uso de adyuvantes en la formulación de vacunas ha sido prácticamente ubicuo (Nossal, 1999, véase antes; Vogel y Powell, 1995, véase antes; cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento por referencia). Los adyuvantes convencionales, bien conocidos en la materia, son de naturaleza diversa. Pueden consistir, por ejemplo, en sales inorgánicas insolubles en agua, liposomas, micelas o emulsiones, es decir, adyuvante de Freund. Se pueden encontrar otros adyuvantes en Vogel y Powell, 1995, mencionado antes. Aunque no hay un mecanismo de acción único de los adyuvantes, una característica esencial es su capacidad para aumentar significativamente la respuesta inmunitaria a un inmunógeno de vacuna, comparado con la respuesta inducida por el inmunógeno de vacuna solo (Nossal, 1999, véase antes; Vogel y Powell, 1995, véase antes). En relación con esto, algunos adyuvantes son más eficaces para aumentar las respuestas inmunitarias humorales; otros adyuvantes son más eficaces para aumentar las respuestas inmunitarias mediadas por célula responses (Vogel y Powell, 1995, véase antes); y todavía otro grupo de adyuvantes aumenta las respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células frente a los antígenos de vacuna (Vogel y Powell, 1995, véase antes).

- 35 **[0004]** En general, las emulsiones usadas en la formulación de vacunas comprenden una mezcla de aceite, disolución acuosa y tensioactivos. Algunas emulsiones incorporan un tensioactivo lipófilo tal como Span 80® y un tensioactivo hidrófilo tal como Tween 80®. Estas emulsiones pueden contener compuestos tales como lecitina o saponina, que se sabe que tienen propiedades tensioactivas.

- 40 **[0005]** El documento WO2005/009462 describe emulsiones de aceite en agua que comprenden una disolución acuosa que contiene un inmunógeno, un tensioactivo lipófilo no iónico (tal como Span 85), un aceite mineral (tal como parafina) y un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico (tal como Brij 96).

- 45 **[0006]** Sin embargo, se pueden observar problemas de estabilidad con las emulsiones usadas como adyuvantes de vacunas, en particular durante el almacenamiento o el transporte. Las actividades enzimáticas de la lipasa o esterasa presentes en la disolución o suspensión de inmunógeno pueden hidrolizar los tensioactivos de la emulsión y conducir a una falta de estabilidad del adyuvante. Las lipasas o esterases pueden venir, por ejemplo, del cultivo celular usado para el cultivo de virus o de bacterias. Esto es particularmente cierto cuando estas composiciones contienen inmunógenos concentrados, en especial inmunógenos concentrados no purificados. 50 Típicamente, este es el caso con adyuvantes usados en vacunas inactivadas (muertas). Este problema es incluso más importante con composiciones de vacunas multivalentes porque los inmunógenos están más concentrados en el mismo volumen de diluyente.

- 55 **[0007]** Otro problema con el uso de adyuvante está ligado al riesgo de efectos adversos tales como toxicidad o inflamación local en el sitio de inyección. Por ejemplo, después de la inyección se puede producir una respuesta inflamatoria local y/o granulomas. Con el fin de limitar dicha reacción adversa, se pueden reducir los tensioactivos y otros componentes en la emulsión; sin embargo, la reducción puede producir entonces una disminución de la estabilidad de la composición de la vacuna. Por lo tanto, son necesario nuevos adyuvantes y composiciones de vacunas que contengan dichos adyuvantes con mayor seguridad y estabilidad.

- 60 **[0008]** La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que dicho documento está disponible como técnica anterior de la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 65 **[0009]** En una primera realización, la presente invención proporciona una nueva emulsión de aceite en agua

(Ac/Ag), con mayor estabilidad en presencia de suspensiones de bacterias, parásitos o virus, en especial las concentradas y no purificadas o poco purificadas.

5 **[0010]** Otra realización de la presente invención proporciona una emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) estable, segura y fácilmente administrable, en particular inyectable, que actúa como un vehículo para el suministro de una composición farmacéutica, que comprende al menos un principio activo, que puede ser más en particular, un inmunógeno.

10 **[0011]** Otra realización más de la presente invención proporciona una emulsión Ac/Ag estable, segura e inyectable, que actúa como un adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria inducida por un inmunógeno. En particular, la presente invención proporciona un adyuvante nuevo que, cuando se usa en una composición de vacuna que contiene un inmunógeno, aumenta la respuesta inmunitaria celular, respuesta inmunitaria humoral o, ventajosamente ambas, de la vacuna frente al inmunógeno.

15 **[0012]** Otra realización más de la presente invención proporciona una composición estable, segura e inmunogénica o vacuna que comprende una emulsión de Ac/Ag.

20 **[0013]** Otra realización de la presente invención proporciona un procedimiento para hacer una composición de vacuna usando el adyuvante de la presente invención; la composición de vacuna así obtenida; y los procedimientos de uso de la misma.

25 **[0014]** Otra realización más de la presente invención proporciona un kit que comprende un inmunógeno u otro producto farmacéutico en un primer vial, y un adyuvante hecho de acuerdo con la presente invención en un segundo vial, con el adyuvante diseñado para ser mezclado con el inmunógeno u otro producto de vacuna antes de usar.

[0015] En una realización, la presente invención proporciona una emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) que puede comprender:

- 30 (1) una disolución acuosa que contiene un inmunógeno;
 (2) un aceite mineral;
 (3) un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico;
 (4) un tensioactivo hidrófilo no iónico, que es un alcohol graso etoxilado.

35 **[0016]** Las emulsiones hechas de acuerdo con la presente invención se basan en una combinación de al menos dos tensioactivos seleccionados de los miembros de dos grupos diferentes de tensioactivos (tensioactivos lipófilos e hidrófilos), y se puede usar uno o más tensioactivos pertenecientes a cada grupo.

40 **[0017]** En otra realización ventajosa más, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una nueva emulsión que puede contener al menos un inmunógeno adecuado para producir una respuesta inmunológica en un sujeto vacunado. La invención proporciona además dichas composiciones en las que la emulsión actúa como un adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria inducida por el inmunógeno, en particular, para aumentar la respuesta celular, la respuesta humoral o ventajosamente ambas.

45 **[0018]** En una realización ventajosa, el antígeno o inmunógeno es, o se obtiene de micoplasmas, ventajosamente *Mycoplasma hyopneumoniae*, *porcine circovirus*, ventajosamente *porcine circovirus 2* o *Helicobacter*, ventajosamente *Helicobacter cerdo* o *Helicobacter pylori*.

50 **[0019]** En otra realización ventajosa, la presente invención proporciona un procedimiento para hacer una composición de vacuna en la que un inmunógeno, en especial un inmunógeno en forma liofilizada o en una disolución acuosa, se mezcla con el adyuvante de acuerdo con la presente invención. El inmunógeno se puede seleccionar del grupo que consiste en: patógenos inactivados, patógenos atenuados, subunidades de antígenos, vectores de expresión recombinantes, incluyendo plásmidos y similares. El patógeno puede ser de origen bacteriano, vírico, protozooario, parasitario o fúngico, o el inmunógeno puede ser un taxoide.

55 **[0020]** En otra realización ventajosa, la presente invención proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto vacunado frente a un patógeno que comprende administrar la composición de vacuna de la presente invención al sujeto vacunado.

60 **[0021]** En otra realización ventajosa, la presente invención proporciona kits que comprenden al menos dos viales, en un primer vial un inmunógeno, en especial un inmunógeno en forma liofilizada o en disolución en un medio acuoso, y en un segundo vial un adyuvante o emulsión de acuerdo con la presente invención.

65 **[0022]** Hay que indicar que en esta descripción y en particular en las reivindicaciones, términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido a dichos términos en la ley de patentes de EE.UU.; p. ej., pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y las expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se

les adscribe en la ley de patentes de EE.UU., p. ej., permite elementos no citados explícitamente, pero excluye elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o nueva de la invención.

- 5 **[0023]** Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y están abarcadas por la misma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 10 **[0024]** Por conveniencia, aquí se recogen algunos términos usados en la memoria descriptiva, ejemplos y párrafos y reivindicaciones adjuntos.

[0025] Como se usa en el presente documento, el término “animal” abarca todos los animales vertebrados incluyendo seres humanos. Esto incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo las
15 etapas embrionaria y fetal. En particular, la expresión “animal vertebrado” incluye, pero sin limitar, seres humanos, caninos (p. ej. perros), felinos (p. ej. gatos); equinos (p. ej. caballos), bovinos (p. ej. ganado), porcinos (p. ej. cerdos), ovinos (p. ej. ovejas), caprinos (p. ej. cabras), conejos así como aviares. El término “aviar” como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier especie o subespecie de la clase taxonómica Aves, pero sin limitar a gallinas (reproductoras, de engorde y ponedoras), pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, loros, pinzones,
20 halcones, cuervos y ratites, incluyendo avestruz, emú y casuario.

[0026] Como se usa en el presente documento, el término “cerdo” o “lechón” se aplica a un animal de origen porcino, mientras que “cerda” se refiere a una hembra de edad y capacidad reproductora.

- 25 **[0027]** Como se usa en el presente documento, el término “virulento” se aplica a un aislado que retiene su capacidad para ser infeccioso en un huésped animal.

[0028] Como se usa en el presente documento, la expresión “vacuna inactivada” abarca una composición de vacuna que contiene un organismo infeccioso o patógeno que ya no es capaz de replicarse o crecer. El patógeno
30 puede ser de origen bacteriano, vírico, protozoario, parasitario o fúngico. La inactivación se puede llevar a cabo por una variedad de procedimientos que incluyen la presión alta, tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con timerosal o formalina), ultrasonidos, radiación, calor o cualquier otro medio suficiente para prevenir la replicación o el crecimiento del organismo mientras que se mantiene su inmunogenicidad.

- 35 **[0029]** Como se usa en el presente documento, el término “inmunogenicidad” significa capaz de producir una respuesta inmunitaria en un animal huésped frente a un inmunógeno o inmunógenos. La respuesta inmunitaria forma la base de la inmunidad protectora provocada por una vacuna frente a un organismo infeccioso específico.

[0030] Como se usa en el presente documento, la expresión “respuesta inmunitaria” se refiere a una respuesta
40 provocada por un animal. Una respuesta inmunitaria se puede referir a inmunidad celular (CMI); inmunidad humoral o pueden implicar ambas. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmunitario. Por ejemplo, una composición de vacuna de la presente invención puede inducir específicamente una mayor respuesta de interferón gamma.

- 45 **[0031]** Como se usa en el presente documento, el término “antígeno” o “inmunógeno” significa una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un animal entero, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinantes que contiene un inserto con propiedades inmunógenas; un trozo o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras
50 presentación en un animal huésped; una proteína, una glicoproteína, una lipoproteína, un polipéptido, un péptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, un inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

[0032] Como se usa en el presente documento, el término “multivalente” significa una vacuna que contiene más de un antígeno sea de la misma especie (p. ej., diferentes aislados de *Mycoplasma hyopneumoniae*), de una especie
55 diferente (p. ej., aislados tanto de *Pasteurella hemolytica* como de *Pasteurella multocida*), o una vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* y *Clostridium*).

- [0033]** Como se usa en el presente documento, el término “adyuvante” significa una sustancia añadida a una
60 vacuna para aumentar una inmunogenicidad de vacuna. El mecanismo de cómo opera un adyuvante no se entiende bien. Se cree que algunos adyuvantes potencian la respuesta inmunitaria liberando lentamente el antígeno, mientras que otros adyuvantes pueden mediar sus efectos por cualquiera de los siguientes mecanismos: aumento de la infiltración celular, inflamación y tráfico al sitio de inyección, en particular para las células presentadoras de antígeno (APC); promoción del estado de activación de las APC por regulación por aumento de señales coestimuladoras o
65 expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC); potenciación de la presentación de antígeno; o inducción de liberación de citoquinas para efecto indirecto. El adyuvante más adecuado para un inmunógeno de

vacuna dado dependerá en gran medida del tipo de respuesta inmunitaria que se requiere para la inmunidad protectora. La selección de adyuvante puede ser algo empírica. Los adyuvantes de vacuna conocidos incluyen, pero sin limitar, emulsiones de aceite en agua (por ejemplo, adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund), en particular emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de agua en aceite en agua. También incluyen, por ejemplo, saponina, hidróxido de aluminio, sulfato de dextrano, carbómero, alginato sódico, "AVRIDINE" (N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina), aceite de parafina, dipéptido muramilo, lípidos catiónicos (p. ej., DMRIE, DOPE, y combinaciones de los mismos) y similares.

[0034] Como se usa en el presente documento, las expresiones "excipiente farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables y se refiere a un vehículo fluido para contener inmunógenos de vacuna que se pueden inyectar en un huésped sin efectos adversos significativos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitar, agua estéril, disolución salina, glucosa, o disoluciones tamponadas. Los vehículos pueden incluir agentes auxiliares incluyendo, pero sin limitar diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, aditivos potenciadores de la viscosidad, colorantes y similares. Los portadores o vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables o aceptables en veterinaria son bien conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable o aceptable en veterinaria puede ser una disolución de NaCl al 0,9 % (p. ej. disolución salina) o un tampón de fosfato. Las dosis y volúmenes de dosis se discuten en el presente documento en la descripción general y también las puede determinar el experto en la materia a partir de esta descripción junto con el conocimiento en la técnica, sin excesiva experimentación.

[0035] Como se usa en el presente documento la expresión "composición de vacuna "incluye al menos un antígeno o inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable, útil para inducir una respuesta inmunitaria en un huésped. Las composiciones de vacunas se pueden administrar en dosificaciones y mediante técnicas conocidas para el experto en la materia en el campo médico o veterinario, teniendo en cuenta factores tales como la edad, sexo, peso, especie y estado del animal receptor, y la vía de administración. La vía de administración puede ser administración percutánea, vía mucosa (p. ej., oral, nasal, ocular) o por una vía parenteral (p. ej., intradérmica, intramuscular, subcutánea). Para la administración parenteral del producto al huésped, se puede usar un inyector con aguja o sin aguja. Las composiciones de vacuna se pueden administrar solas o se pueden coadministrar o administrar secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Las formas de administración pueden incluir suspensiones y preparaciones para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica o intramuscular (p. ej., administración inyectable) tal como suspensiones o emulsiones estériles. Las composiciones de vacuna se pueden administrar como un pulverizador o mezcladas con alimento y/o agua o suministrar mezcladas con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, disolución salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, adyuvantes, aditivos potenciadores de la gelificación o viscosidad, conservantes, agentes de sabor, colorantes, y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Se pueden consultar los textos farmacéuticos estándar, tales como "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990, para preparar preparaciones adecuadas, sin excesiva experimentación.

[0036] La presente invención proporciona en una realización un nuevo adyuvante o emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) que puede comprender:

- (1) una disolución acuosa que contiene un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un huésped;
- (2) un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico;
- (3) un aceite mineral;
- (4) un tensioactivo hidrófilo no iónico que es un alcohol graso etoxilado.

[0037] Las emulsiones hechas de acuerdo con la presente invención se basan en una combinación de al menos dos tensioactivos seleccionados entre los miembros de dos grupos diferentes de tensioactivos (tensioactivos lipófilos e hidrófilos) y se puede usar uno o más tensioactivos pertenecientes a cada grupo.

[0038] Un alcohol graso etoxilado lipófilo puede ser un alcohol graso etoxilado que puede comprender aproximadamente 43 % (p/p) del peso molecular o menos de óxido de etileno (EO).

[0039] Un alcohol graso etoxilado hidrófilo puede ser un alcohol graso etoxilado que comprende más de aproximadamente 43 % (p/p) de óxido de etileno (EO).

[0040] Para los tensioactivos hidrófilos no iónicos, el alcohol graso puede ser un alcohol graso C9 a C22 y ventajosamente seleccionado del grupo que consiste en un alcohol oleico, cetílico, estearílico, isoestearílico, láurico, y combinaciones de los mismos, ventajosamente un alcohol oleico y más ventajosamente un alcohol oleico con 5 a 21 EO.

[0041] El grupo de tensioactivos hidrófilos no iónicos incluye, los alcoholes grasos etoxilados: Brij® 76 [Stearth-

10], Brij® 56 [Ceteth-10], Brij® 96/97 [Oleth-10], Brij® 98 [Oleth-20], Brij® 721 [Steareth-21], Brij® 58 [Ceteth-20], Brij® 35 [Laureth-23], Brij® 78 [Steareth-20], (Uniqema) Volpo® N5 [Oleth-5], Volpo® CS6 [Cetareth-6], Volpo® CS12 [Cetareth-12], Volpo® CS20 [Cetareth-20], Volpo® CS25 [Cetareth-25], Volpo® CS23 [Cetareth-23] (Croda), BL9-EX [Laureth-9], BC-7 [Ceteth-7], BT-5 [C12-14 Pareth-5], BT-7 [C12-14 Pareth-7], BT-9 [C12-14 Pareth-9], BT-12 [C12-14 Pareth-12], BD-10 [C12-15 Pareth-10], BO-7V [Oleth-7], BC5.5 [Ceteth-6], BL-21 [Laureth-21], BL-25 [Laureth-25], BC-15TX [Ceteth-15], BC-23 [Ceteth-23], BC-25TX [Ceteth-25], BO-15V [Oleth-15], BO-50V [Oleth-50], BB-20 [Beheneth-20], (Nikko Chemicals), y combinaciones de los mismos.

[0042] Para los tensioactivos lipófilos no iónicos, el alcohol graso es un alcohol graso C0 a C22 y ventajosamente se selecciona del grupo que consiste en alcohol oleico, cetílico, estearílico, isoestearílico, láurico, y combinaciones de los mismos, ventajosamente un alcohol oleico y más ventajosamente un alcohol oleico etoxilado con 1 a 4 EO.

[0043] El grupo de tensioactivos lipófilos no iónicos incluye los alcoholes grasos etoxilados: Brij® 30 [Laureth-4], Brij® 92/93 [Oleth-2], Brij® 72 [Steareth-2], Brij® 52 [Ceteth-2] (Uniqema), Volpo® L3 [C12-13 Pareth-3], Volpo® N3 [Oleth-3], Volpo® L4 [C12-13 Pareth-4] (Croda), BS-4 [Steareth-4], BD-2 [C12-15 Pareth-2], BD-4 [C12-15 Pareth-4], BT-3 [C12-14 Pareth-3] (Nikko Chemicals) y combinaciones de los mismos.

[0044] Los tensioactivos de la invención pueden tener alcohol graso de origen animal o vegetal. El cambio de un origen a otro se puede hacer simplemente con un pequeño ajuste en la formulación de la emulsión.

[0045] Una emulsión de acuerdo con la invención puede tener una concentración general de tensioactivos, en peso por volumen de emulsión de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 6,5 %, en particular de aproximadamente 1 % a aproximadamente 6 %, ventajosamente de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 5 %, más ventajosamente de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %.

[0046] Dichas emulsiones tienen una viscosidad baja y se pueden inyectar fácilmente.

[0047] En una realización ventajosa, la presente invención proporciona una emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) que puede comprender:

- (1) una disolución acuosa que contiene un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un huésped;
- (2) un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico;
- (3) un aceite mineral;
- (4) un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende más de aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de etileno;
- (5) un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende aproximadamente 71 % (p/p) o más de óxido de etileno.

[0048] El alcohol graso etoxilado que comprende más de aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de etileno ventajosamente es un alcohol oleico etoxilado con 5 a 14 EO. El alcohol graso que comprende aproximadamente 71 % (p/p) o más de óxido de etileno es ventajosamente un alcohol oleico etoxilado con 15 EO o más.

[0049] En esta realización ventajosa, la concentración del alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, en general es de aproximadamente 1,0 % a aproximadamente 5,0 %, en particular de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 4,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 2,0 % a aproximadamente 3,5 %, expresado como un porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v). Para el alcohol graso etoxilado hidrófilo, altamente no iónico, la concentración en general es de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3,0 %, en particular de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 2,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,0 % (p/v). La concentración del alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, en general es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,5 %, en particular de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 2,0 %, ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,2 % (p/v).

[0050] En una realización ventajosa, la presente invención proporciona una emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) que puede comprender:

- (1) una disolución acuosa que contiene un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un huésped;
- (2) un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico;
- (3) un aceite mineral;
- (4) un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico;
- (5) un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno hidrófilo no iónico.

[0051] El alcohol graso etoxilado hidrófilo es ventajosamente un alcohol graso que comprende más de

aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de etileno, y más ventajosamente un alcohol oleico etoxilado con 5 a 14 EO. El copolímero de bloques de POE-POP no iónico puede comprender ventajosamente 70 % (p/p) o más de óxido de etileno.

5 **[0052]** En esta realización ventajosa, la concentración de alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, en general es de aproximadamente 1,0 % a aproximadamente 5,0 %, en particular de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 4,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 2,0 % a aproximadamente 3,5 %, expresado como un porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v). Para el copolímero de bloques de POE-POP no iónico, la concentración en general es de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2,0 %, más en particular de aproximadamente 0,1 % a
10 aproximadamente 1,5 % (p/v). La concentración del alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, en general es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,5 %, en particular de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 2,0 %, ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,2 % (p/v).

15 **[0053]** En general, la emulsión de acuerdo con la invención puede tener una temperatura de inversión de fase (PIT), que es ≥ 25 °C, en particular está en el intervalo de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 65 °C, más en particular de aproximadamente 33 °C a aproximadamente 60 °C.

[0054] La PIT es la temperatura a la que una emulsión de agua en aceite cambia a una emulsión de aceite en
20 agua o separación de fases (rotura de la emulsión y separación de las 2 fases). El valor de PIT se puede medir por diferentes medios, por ejemplo, por aspecto visual o por conductividad. La emulsión se pone a una temperatura inferior a la PIT de la emulsión, por ejemplo de aproximadamente 25 °C en un baño de agua. La temperatura se aumenta progresivamente. Se observa el cambio del aspecto visual de la emulsión en comparación con una emulsión de control, en concreto la fluidez, la separación en dos fases, el cambio del aspecto de la superficie debido
25 a la migración de la fase de aceite a la superficie. La temperatura, para la cual se observa este cambio de aspecto visual es el valor de la PIT de la emulsión. Alternativamente, la PIT se determina por el paso rápido de un valor de conductividad de aproximadamente 5 – 15 miliSiemens/centímetro (mS/cm) (emulsión de aceite en agua) a un valor de aproximadamente 0 mS/cm (emulsión de agua en aceite), para disolución salina fisiológica como fase acuosa, medida con una sonda colocada en la emulsión, cerca de la superficie. La temperatura para la cual se observa la
30 transición es el valor de la PIT de la emulsión. Un experto en la materia podrá determinar las combinaciones de tensioactivos y aceite, incluyendo sus respectivas concentraciones, con el fin de producir emulsiones de acuerdo con la invención, y en particular emulsiones que tienen un valor de PIT que está en el intervalo definido antes, sin excesiva experimentación.

35 **[0055]** En general, las emulsiones de acuerdo con la presente invención pueden contener, en volumen por volumen de emulsión (v/v), de aproximadamente 2 % a aproximadamente 50 % de fase de aceite que incluye el o los aceites y los tensioactivos, en particular de aproximadamente 4 % a aproximadamente 40 %, ventajosamente de aproximadamente 8 % a aproximadamente 35 % y, más ventajosamente, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 % de fase de aceite. Por definición, los intervalos de valores en la presente memoria
40 descriptiva incluyen siempre el límite del intervalo, salvo que se indique otra cosa.

[0056] El aceite usado puede ser un aceite mineral incluyendo, pero sin limitar, aceite de parafina tal como aceite isoparafínico y/o aceite nafténico, escualano, escualeno, pristano, poliisobuteno, poliisobuteno hidrogenado, polideceno, poliisopreno, poliisopropeno y similares. Un aceite mineral ventajoso útil en la presente invención puede
45 incluir un aceite que comprende una cadena de carbonos lineal o ramificada que tiene un número de átomos mayor que 15, ventajosamente de 15 a 32, y exento de compuestos aromáticos. Dichos aceites pueden ser, por ejemplo, los comercializados con el nombre MARCOL[®] 52 o MARCOL[®] 82 (Esso) o "DRAKEOL[®] 6VR" (Penreco).

[0057] El aceite también puede ser una mezcla de aceites que comprende al menos 2 aceites seleccionados entre
50 los aceites descritos en el presente documento, y en cualquier proporción. La mezcla de aceites también puede comprender al menos un aceite seleccionado de los aceites descritos antes y al menos un aceite vegetal y este aceite vegetal representa de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 33 % de fase de aceite, ventajosamente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % en v/v. Estos aceites vegetales son aceites insaturados ricos en ácido oleico, que son biodegradables y ventajosamente líquidos a la temperatura de almacenamiento
55 (aproximadamente + 4 °C) o al menos permiten obtener emulsiones que son líquidas a esta temperatura. Por ejemplo, el aceite vegetal puede ser aceite de cacahuete, aceite de nuez, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de onagra y similares.

[0058] En general, la presente invención contempla el uso de una disolución acuosa que comprende un vehículo,
60 excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable o aceptable en veterinaria adecuado, incluyendo, pero sin limitar, agua estéril, disolución salina fisiológica, glucosa, tampón y similares. El vehículo, excipiente o diluyente también puede incluir polioles, glúcidos o agentes de tamponamiento del pH. El vehículo, excipiente o diluyente puede comprender también, por ejemplo, aminoácidos, péptidos, antioxidantes, bactericidas, compuestos bacteriostáticos. La disolución acuosa se añade al aceite y los tensioactivos en una cantidad para obtener 100 % del
65 volumen de la emulsión de acuerdo con la invención.

[0059] La presente invención contempla una emulsión que comprende un aceite de parafina; un alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO como tensioactivo lipófilo no iónico; un alcohol oleico etoxilado con 5-6 EO como tensioactivo hidrófilo no iónico; y un copolímeros de bloques de POE-POP con aproximadamente 70 a 80 % de EO y un PM de aproximadamente 9800 a 16000 como tensioactivo hidrófilo no iónico. En particular, el aceite de parafina está en una concentración de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % y ventajosamente de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 % (v/v); el alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO está en una concentración de aproximadamente 0,1 % a 1,5 %, ventajosamente de aproximadamente 0,1 % a 1,2 % (p/v); el alcohol oleico etoxilado con 5-6 EO está en una concentración de 1 % a 5 %, ventajosamente de 1 % a 4 % (p/v); y el copolímero de bloques de POE-POP con aproximadamente 70 a 80 % de EO y un PM de aproximadamente 9800 a 16000 está en una concentración de 0,01 % a 2 %, ventajosamente de 0,05 % a 1,5 % (p/v).

[0060] En una segunda realización de acuerdo con la presente invención, la emulsión comprende un aceite de parafina; un alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO como tensioactivo lipófilo no iónico; un alcohol oleico etoxilado con 10 EO como tensioactivo hidrófilo no iónico; y un copolímeros de bloques de POE-POP con aproximadamente 70 a 80 % de EO y un PM de aproximadamente 9800 a 16000 como tensioactivo hidrófilo no iónico. En particular el aceite de parafina está en una concentración de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %, ventajosamente de aproximadamente 15 % a 30 % (v/v); el alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO está en una concentración de 0,2 % a 3 %, ventajosamente de 0,5 % a 3 % (p/v); el alcohol oleico etoxilado con 10 EO está en una concentración de 0,2 % a 3 %, ventajosamente de 0,5 % a 3 % (p/v); y el copolímero de bloques de POE-POP con aproximadamente 70 a 80 % de EO y un PM de aproximadamente 9800 a 16000 está en una concentración de 0,01 % a 2 %, ventajosamente de 0,05 % a 1,5 % (p/v).

[0061] En una tercera realización de acuerdo con la presente invención, la emulsión comprende un aceite de parafina, un alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO como tensioactivo lipófilo no iónico y un alcohol oleico etoxilado con 5-6 EO como tensioactivo hidrófilo no iónico. En particular el aceite de parafina está en una concentración de 5 % a 50 %, ventajosamente de 15 % a 35 % (v/v); el alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO está en una concentración de 0,1 % a 3 %, ventajosamente de 0,5 % a 2 % (p/v); el alcohol oleico etoxilado con 5-6 EO está en una concentración de 1 % a 5 %, ventajosamente de 2,0 % a 4,5 % (p/v).

[0062] Opcionalmente se pueden añadir otros compuestos como coadyuvantes a la emulsión, incluyendo, pero sin limitar, aluminio; oligonucleótidos CpG (ODN), en particular ODN 2006, 2007, 2059, 2216 o 2135 (Pontarollo R.A. y col., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2002, 84: 43 – 59; Wernette C.M. y col., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2002, 84: 223 – 236; Mutwiri G. y col., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2003, 91: 89-103; Kerkmann M. y col., *J. Immunol.*, 2003, 170: 4465-4474); polyApolyU ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, *Pharmaceutical Biotechnology*, 6: 03); bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) ("Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell and Mark J. Newman, *Pharmaceutical Biotechnology*, volumen 6: 157), N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)propanodiamina (tal como Avridine[®]) (referencia anterior, pág. 148), carbómero, chitosán (véase la patente de EE.UU. nº de serie 5.980.912 por ejemplo).

[0063] La presente invención también proporciona un procedimiento para hacer una composición de vacuna o composición inmunológica que comprende al menos un antígeno o inmunógeno y un adyuvante o emulsión hecha de acuerdo con la presente invención. El inmunógeno se puede incorporar durante la formación de la emulsión o, en una realización alternativa, el inmunógeno se puede añadir a la emulsión más adelante, por ejemplo, justo antes de usar.

[0064] La cantidad total de la disolución acuosa usada puede estar presente en la primera emulsión producida. O puede usarse solo una parte de esta disolución acuosa para formar la emulsión y la cantidad restante de disolución acuosa se añade con la incorporación del inmunógeno. El inmunógeno o antígeno pueden estar en una forma liofilizada o presentarse en alguna otra forma sólida adecuada y después mezclar con la emulsión o, alternativamente, el antígeno puede estar en disolución, en particular en una disolución acuosa, y mezclar esta disolución con la emulsión.

[0065] Los tensioactivos se añaden ventajosamente al aceite o a la disolución acuosa de acuerdo con su solubilidad. Por ejemplo, los tensioactivos lipófilos no iónicos se añaden al aceite de acuerdo con la invención, mientras que los tensioactivos hidrófilos no iónicos se añaden a la disolución acuosa.

[0066] La emulsión se puede preparar de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, la emulsión se puede preparar a una temperatura inferior a la PIT de la emulsión, en particular a temperatura ambiente, p. ej., a aproximadamente 30 °C. La fase acuosa y la fase de aceite se mezclan entre sí mediante agitación mecánica, p. ej., con una turbina equipada con un estátor-rotor capaz de crear una fuerza de cizalladura alta. Ventajosamente, la agitación empieza con una velocidad de rotación baja y lentamente aumenta en relación con la adición progresiva en general de la disolución acuosa en el aceite. Ventajosamente la disolución acuosa se añade progresivamente al aceite. La relación de aceite/disolución acuosa se puede adaptar para obtener una emulsión de agua en aceite (Ag/Ac), por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 40 % a aproximadamente 55 % de aceite (v/v). Cuando se detiene la agitación, la emulsión cambia progresivamente a una emulsión de Ac/Ag mientras que se enfría a temperatura

ambiente (inversión de fase). Después de la inversión, y si es necesario, la emulsión se diluye por adición de una disolución acuosa para obtener la concentración deseada de aceite en la emulsión final. La emulsión se puede almacenar a aproximadamente 5 °C.

5 **[0067]** En otra realización, la emulsión se puede preparar a una temperatura mayor que la PIT de la emulsión. En una primera etapa, la fase acuosa y la fase de aceite se mezclan entre sí a una temperatura mayor que la PIT de la emulsión. Ventajosamente, la disolución acuosa se añade progresivamente al aceite. La relación de aceite/disolución acuosa se puede adaptar para obtener una emulsión de agua en aceite (Ag/Ac), por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 40 % a aproximadamente 55 % de aceite (v/v). La emulsión se puede hacer
10 por agitación con una fuerza de cizalladura baja o sin ella, p. ej., con un mezclador estático o una hélice marina (propulsor) o con una turbina a una velocidad de rotación muy baja. La emulsión obtenida es una emulsión de agua en aceite (Ag/Ac). En una segunda etapa, la emulsión se enfría progresivamente por debajo de la PIT. Durante esta etapa, la emulsión cambia a una emulsión de Ac/Ag (inversión de fase). Después de la inversión, y si es necesario, la emulsión se diluye por adición de una disolución acuosa para obtener la concentración deseada de aceite en la
15 emulsión final. La emulsión se puede almacenar a aproximadamente 5 °C.

[0068] El tamaño de las gotas de aceite puede ser de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 500 nm. La emulsión se puede usar, por ejemplo, como un adyuvante para formular una composición de vacuna o una composición farmacéutica. La emulsión también se puede usar como un disolvente para disolver un producto seco,
20 en especial un producto liofilizado que contiene, por ejemplo, microorganismos atenuados o vectores recombinantes vivos.

[0069] En una realización particular, se produce una preemulsión con solo una parte de la disolución acuosa. La preemulsión se puede diluir por adición de una suspensión de un principio activo tal como un fármaco o un
25 inmunógeno, ventajosamente un inmunógeno, para obtener la composición final. Alternativamente, la preemulsión se puede diluir con una disolución acuosa y usar para disolver un producto seco tal como un producto liofilizado.

[0070] El inmunógeno o antígeno adecuado para usar en la presente invención, se puede seleccionar del grupo que consiste en patógenos inactivados, patógenos atenuados, subunidades inmunogénicas (p. ej., proteínas, polipéptidos, péptidos, epítopos, haptenos), o vectores de expresión recombinantes, incluyendo plásmidos que
30 tienen insertos inmunogénicos. En una realización de la presente invención, el inmunógeno es un microorganismo inactivado o muerto. En otra realización de la invención, la composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado del grupo que patógenos aviares que incluyen, pero sin limitar, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus del síndrome de
35 caída de la puesta (EDS), o virus de enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV), virus influenza aviar, y similares, y combinaciones de los mismos.

[0071] Alternativamente, la composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno felino tal como, pero sin limitar, herpesvirus felino (FHV), calcivirus felino (FCV), virus de la leucemia felina (FeLV),
40 virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la rabia, y similares, y combinaciones de los mismos.

[0072] En otra realización más, una composición de vacuna de la presente invención comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno canino incluyendo, pero sin limitar, virus de la rabia, herpesvirus canino (CHV), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira*
45 *grippytyphosa*, *Borrelia burgdorjei*, *Bordetella bronchiseptica* y similares, y combinaciones de los mismos.

[0073] En otra realización más de la invención, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno equino, tal como el herpesvirus equino (tipo 1 o tipo 4), virus influenza equino, tétano, virus del Nilo
50 occidental, y similares y/o combinaciones de los mismos.

[0074] En otra realización más de la invención, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno bovino, tal como el virus de la rabia, rotavirus bovino, virus de parainfluenza bovina de tipo 3 (bPIV-3), coronavirus bovino, virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus sincitial
55 respiratorio bovino (BRSV), virus de la rinotraqueitis bovina (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* y similares y combinaciones de los mismos.

[0075] En otra realización más de la presente invención, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno porcino tal como, pero sin limitar, virus influenza porcino (SIV), circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2), virus del síndrome respiratorio reproductivo (PRRS), virus de la pseudorrabia (PRV), parvovirus porcino (PPV),
60 FMDV, peste porcina (HCV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Helicobacter cerdo*, *Helicobacter pylori* y similares, y combinaciones de los mismos.

[0076] Una realización ventajosa de la invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden al menos
65 un inmunógeno y una emulsión en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunógenos que comprenden virus, bacterias, hongos y similares, se pueden producir por procedimientos de cultivo in vitro, usando medio de

cultivo o líneas de células huésped adecuados y procedimientos convencionales bien conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, PRRS se puede cultivar en una línea celular adecuada, tal como la línea celular MA-104 (véanse las patentes de EE.UU. nº de serie 5.587.164; 5.866.401; 5.840.563; 6.251.404 entre otras). De una forma similar, se puede cultivar PCV-2 usando la línea celular PK-15 (véase la patente de EE.UU. nº de serie 6.391.314); se puede cultivar SIV en huevos (patente de EE.UU. nº de serie 6.048.537); y se puede cultivar *Mycoplasma hyopneumoniae* en un medio de cultivo adecuado (patentes de EE.UU. nº de serie 5.968.525; US 5.338.543; Ross R. F. y col., *Art. J. Vet. Res.*, 1984, 45: 1899 – 1905).

[0077] Para obtener una composición inmunológica o de vacuna inactivada, el patógeno se puede inactivar ventajosamente después de recoger, y opcionalmente, someter a clarificación mediante un tratamiento químico usando, por ejemplo, formaldehído, beta-propiolactona, etilenimina, etilenimina binaria (BEI), timerosal, y similares, y/o un tratamiento físico (p. ej., un tratamiento térmico o de ultrasonidos). Los procedimientos para la inactivación son bien conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, el virus PRRS se puede inactivar por tratamiento con beta-propiolactona (Plana-Duran y col., *Vet. Microbiol.*, 1997, 55: 361 – 370) o por tratamiento con BEI (patente de EE.UU. nº de serie 5.587.164); la inactivación del virus PCV-2 se puede llevar a cabo usando tratamiento con etilenimina o por tratamiento con beta-propiolactona (patente de EE.UU. nº de serie 6.391.314); el virus influenza de cerdo se puede inactivar usando un detergente como Triton, o por tratamiento con formaldehído (patente de EE.UU. nº de serie 6.048.537); la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* se puede inactivar por tratamiento con formaldehído (Ross R. F. véase antes), por tratamiento con etilenimina o BEI (véase el documento WO 91/18627), o por tratamiento con timerosal (patentes de EE.UU. nº de serie 5.968.525 y 5.338.543).

[0078] El patógeno inactivado se puede concentrar por técnicas de concentración convencionales, en particular, por ultrafiltración y/o purificar por medios de purificación convencionales, en particular usando técnicas de cromatografía incluyendo, pero sin limitar, filtración en gel, ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, o precipitaciones selectivas, en particular usando un polietilenglicol (PEG).

[0079] Los inmunógenos útiles en las composiciones de vacuna de acuerdo con la presente invención, también incluyen vectores de expresión. Un “vector” se refiere a un plásmido o virus de ADN o ARN recombinante, p. ej., poxvirus, adenovirus, herpesvirus, que comprenden un polinucleótido heterólogo para suministrar a una célula diana, in vitro o in vivo. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés para el propósito de terapia, y opcionalmente puede estar en forma de un casete de expresión. Como se usa en el presente documento, no es necesario que el vector sea capaz de replicación en la célula diana final o el sujeto. El término incluye vectores de clonación para la traducción de una secuencia que codifica un polinucleótido. También están incluidos vectores víricos.

[0080] El término “recombinante” significa un polinucleótido de ADNc genómico, de origen semisintético o sintético que no se encuentra en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición que no se encuentra en la naturaleza.

[0081] De acuerdo con otra realización de la invención, los vectores de expresión son vectores de expresión usados para la expresión in vitro de proteínas en un sistema celular adecuado. Las proteínas expresadas se pueden recoger en o del líquido sobrenadante del cultivo después, o no después de secreción (si no hay secreción, típicamente se produce o se realiza una lisis celular), opcionalmente concentrar por procedimientos de concentración tales como la ultrafiltración y/o purificar por medios de purificación, tales como procedimientos de cromatografía de afinidad, intercambio iónico o de tipo filtración en gel, y formular en una emulsión de acuerdo con la presente invención.

[0082] La presente invención también abarca la formulación de composiciones inmunológicas multivalentes o composiciones de vacuna de combinación. Por ejemplo, los antígenos útiles en una combinación bacteriana bovina hecha de acuerdo con la presente invención, incluyen, pero sin limitar, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella sp.*, en particular *P. multocida* y *P. haemolytica*, *Haemophilus sp.*, en particular *H. somnus*, *Clostridium sp.*, *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *E. coli* y similares.

[0083] La presente invención proporciona además procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria en un huésped, p. ej., un animal, que comprende administrar al huésped una composición inmunológica o una composición de vacuna de acuerdo con la invención. Las respuestas inmunitarias producidas de esta forma son en concreto respuestas de anticuerpos y/o inmunitarias celulares, y en particular, una respuesta de interferón gamma.

[0084] En particular, la presente invención proporciona procedimientos para inmunizar frente a, o prevenir o reducir, los síntomas causados por infección de un animal con un organismo patógeno (por ejemplo, infección por un virus, bacteria, hongo o parásito protozoario). El procedimiento de la presente invención es útil en animales vertebrados incluyendo, pero sin limitar, seres humanos, animales caninos (p. ej. perros), felinos (p. ej. gatos); equinos (p. ej. caballos), bovinos (p. ej. ganado), ovinos (p. ej. ovejas), caprinos (p. ej. cabras), porcinos (p. ej. cerdos), y conejos así como aviares, incluyendo, pero sin limitar, gallinas, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y ratites (avestruz, emú, casuario y similares).

[0085] En un aspecto particular de la invención, estos procedimientos consisten en la vacunación de hembras preñadas antes del parto, por administración de una composición de vacuna hecha de acuerdo con la invención. Estos procedimientos incluyen además la inducción de anticuerpos protectores producidos por el protocolo de vacunación y la transferencia de estos anticuerpos protectores de hembras preñadas vacunadas a sus crías. La
5 transferencia de dichos anticuerpos maternos, protege posteriormente a las crías frente a la enfermedad.

[0086] La dosificación de la composición de vacuna hecha de acuerdo con la presente invención dependerá de la especie, raza, edad, tamaño, historial de vacunación y estado de salud del animal que se va a vacunar. Otros factores como la concentración de antígenos, los componentes de vacuna adicionales y la vía de administración (es
10 decir, administración subcutánea, intradérmica, oral o intramuscular) también tendrán impacto en la dosificación eficaz. La dosificación de la vacuna que se va a administrar se puede determinar fácilmente basándose en la concentración de antígenos de la vacuna, la vía de administración, y la edad y estado del animal que se va a vacunar. Alternativamente, se pueden usar ensayos de inmunogenicidad sistemáticos de diferentes dosificaciones, así como estudios de la DL₅₀ y otros procedimientos de cribado, para determinar la dosificación eficaz para una
15 composición de vacuna de acuerdo con la presente invención sin excesiva experimentación. A partir de los ejemplos presentados a continuación, será fácilmente evidente qué dosificación aproximada y qué volumen aproximado sería adecuado para usar en la composición de vacuna descrita en el presente documento. El factor crítico es que la dosificación proporcione al menos un efecto protector parcial frente a la infección natural, que se pone de manifiesto por una reducción en la mortalidad y morbilidad asociadas con la infección natural. El volumen adecuado lo
20 determina también fácilmente un experto en la materia. Por ejemplo, en especies aviares el volumen de una dosis puede ser de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 0,5 ml, y ventajosamente, de aproximadamente 0,3 ml a aproximadamente 0,5 ml. Para las especies felina, canina y equina, el volumen de una dosis puede ser de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 3,0 ml, ventajosamente de aproximadamente 0,3 ml a aproximadamente 2,0 ml, y más ventajosamente, de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml. Para las
25 especies bovina y porcina, el volumen de dosis puede ser de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 5,0 ml, ventajosamente de aproximadamente 0,3 ml a aproximadamente 3,0 ml, y más ventajosamente de 0,5 ml a aproximadamente 2,0 ml.

[0087] Las vacunaciones repetidas pueden ser ventajosas en intervalos de tiempo periódicos para potenciar la
30 respuesta inmunitaria inicialmente o cuando ha transcurrido un periodo de tiempo largo desde la última dosis. En una realización de la presente invención, la composición de vacuna se administra como una inyección parenteral (es decir, vía subcutánea, intradérmica o intramuscular). La composición se puede administrar como una dosis o, en realizaciones alternativas, se puede administrar en dosis repetidas de aproximadamente 2 a 5 dosis, dadas en intervalos de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 semanas, ventajosamente de aproximadamente 2 a
35 aproximadamente 5 semanas. Sin embargo, un experto en la materia reconocerá que el número de dosis y el intervalo de tiempo entre vacunaciones dependerá de una serie de factores que incluyen, pero sin limitar, la edad del animal vacunado; el estado del animal, en particular la presencia de anticuerpos maternos; la vía de inmunización; la cantidad de antígeno disponible por dosis; y similares. Para la vacunación inicial, el periodo en general será mayor de una semana y ventajosamente será entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 semanas. Para los animales
40 previamente vacunados, se puede realizar una vacunación de refuerzo, antes o durante el embarazo, en un intervalo aproximadamente anual.

[0088] La presente invención también proporciona la administración de una composición de vacuna usando un inyector sin aguja, tal como, pero sin limitar, Pigjet®, Avijet®, Dermojet® o Biojector® (Bioject, Oregon, EE.UU.). Un
45 experto en la materia puede ajustar las especificaciones del inyector según sea necesario, en relación con factores tales como la especie de animal que se va a vacunar; la edad y peso del animal, y similares, sin excesiva experimentación.

[0089] En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende una sola administración de una
50 composición de vacuna formulada con una emulsión de acuerdo con la invención. Por ejemplo, en una realización, la composición de vacuna es una vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada, mientras que una realización alternativa proporciona una vacuna que comprende una composición de virus PCV2 inactivado. Otras composiciones inmunológicas o vacunas son adecuadas para usar en un régimen de una dosis individual incluyendo, pero sin limitar, PRRS y SIV inactivados. La vacuna se puede administrar también en presencia de
55 anticuerpos preexistentes.

[0090] La invención proporciona además procedimientos para tratar un huésped, p. ej., un animal, que comprende administrar al huésped una composición farmacéutica hecha de acuerdo con la invención y que comprende al
60 menos un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste en proteínas o péptidos, anticuerpos, alérgenos, CpG ODN, factores de crecimiento, citoquinas o antibióticos y en particular CpG ODN o citoquinas. Las composiciones farmacéuticas se pueden usar para mejorar las características de crecimiento en un animal tal como un pollo, un cerdo o una vaca.

[0091] La presente invención se refiere además a un kit que comprende un primer vial que contiene un ingrediente
65 tal como un inmunógeno o composición farmacéutica y, en un segundo vial, una emulsión hecha de acuerdo con la presente invención. El inmunógeno puede estar en una forma liofilizada, una forma seca o en disolución acuosa.

como se describe en el presente documento.

EJEMPLOS

5 Ejemplo 1: Procedimientos de fabricación de emulsión

[0092] La emulsión se produce en dos etapas como se describe a continuación:

Primera etapa: Se usó un emulsionador Silverson de estátor-rotor de alta cizalladura (tipo L4RT con una cabeza de disgregación con un diámetro de 10 mm) para producir las formulaciones. Para producir una emulsión, se emulsionó un volumen de fase de aceite a 35 °C con un volumen de fase acuosa nº 1. La fase acuosa se añadió a la fase de aceite con agitación, 5000 rpm (rotaciones por minuto) durante 1 min. La velocidad de rotación se aumentó progresivamente con un aumento del volumen a 8300 rpm durante 1 minuto. Durante esta etapa la emulsión era una emulsión de agua en aceite. La emulsión LR4 final es una emulsión de Ac/Ag que contiene 20 % de fase de aceite. Para la emulsión LR4, la composición de la fase era la siguiente:

Fase de aceite (72 ml):

- Oleth-2 (Brij® 92):	1,8 % p/v,
- Oleth-5 (Volpo® N5):	8,2 % p/v,
- Aceite de parafina (Marcol 82®):	87,5 % v/v,
- Conservante:	2,5 % v/v

Fase acuosa nº 1 (108 ml):

- Poloxámero 407 (Lutrol® F127): 0,58 % p/v,
- Tampón isotónico que contiene fosfato de disodio y monopotasio 0,02 M (pH 7,8): c.s. hasta 100,0 % v/v

[0093] Se usó una disolución al 5 % (p/v) de Lutrol® F127 en el mismo tampón que la vacuna, por ejemplo, en tampón isotónico que contiene fosfato de disodio y monopotasio 0,02 M (pH 7,8) para preparar la fase acuosa nº 1.

[0094] Cuando se detuvo la agitación, la emulsión cambió a una emulsión de aceite en agua. La emulsión se puso en una cámara fría a 5 °C durante al menos 4 horas. En esta etapa, la emulsión era una preemulsión que contenía 40 % de fase de aceite.

[0095] Segunda etapa: La fase acuosa nº 2 se preparó con 180 ml de tampón isotónico de fosfato de disodio y monopotasio 0,02 M, pH 7,8, con el o los inmunógenos (inmunógeno *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado, o el inmunógeno PCV-2, como se describe más adelante). La preemulsión preparada como en la primera etapa, se enfrió a aproximadamente 5 °C, se diluyó por adición del mismo volumen de la fase acuosa nº 2 a la misma temperatura, y se mezcló por rotación con una barra magnética durante 1 minuto. La concentración final de tensioactivo en la emulsión LR4 era 2,18 % (p/v).

[0096] Como se preparan en el presente documento, las vacunas LR4 son estables durante al menos 1 año a 5 °C.

[0097] Usando el mismo procedimiento de preparación, se pueden obtener otras emulsiones como se describe a continuación:

Emulsión LR3

Primera etapa:

[0098] La emulsión LR3 final era una emulsión de Ac/Ag que contenía 33 % de una fase de aceite.

Fase de aceite (120 ml):

- Oleth-2 (Brij® 92):	6,24 % p/v,
- Oleth-10 (Brij® 96):	2,76 % p/v,
- Aceite de parafina (Marcol 82®):	89,50 % v/v,
- Conservante:	1,50 % v/v

Fase acuosa nº 1 (120 ml):

- Poloxámero 407 (Lutrol® F127) : 1,20 % p/v,
- Tampón isotónico que contiene fosfato de disodio y monopotasio 0,02 M (pH 7,8): c.s. hasta 100,0 % v/v

[0099] Se usó una disolución al 5 % (p/v) de Lutrol® F127 en el mismo tampón que la vacuna, por ejemplo, en tampón isotónico de fosfato de disodio y monopotasio 0,02 M (pH 7,8) para preparar la fase acuosa nº 1.

[0100] Cuando se detuvo la agitación, la emulsión cambió a una emulsión de aceite en agua. La emulsión se puso en una cámara fría a 5 °C durante al menos 4 horas. En esta etapa, la emulsión era una preemulsión que contenía 50 % de fase de aceite.

[0101] Segunda etapa: La fase acuosa nº 2 (120 ml) está constituida por el tampón isotónico que contiene fosfato de sodio y monopotasio 0,02 M (pH 7,8), y el o los inmunógenos. La preemulsión preparada como en la primera etapa, se enfrió a aproximadamente 5 °C, se diluyó por adición de la mitad del volumen de la fase acuosa nº 2 a la misma temperatura, y se mezcló por rotación con una barra magnética durante 1 minuto. La concentración final de tensioactivo en la emulsión LR3 es 3,40 % (p/v).

[0102] Como se preparan en el presente documento, las vacunas LR3 son estables durante al menos 1 año a 5 °C.

[0103] Emulsión BE1 La emulsión final BE1 es una emulsión de Ac/Ag que contiene 33 % de una fase de aceite.

Fase de aceite (120 ml):

- Oleth-2 (Brij® 92): 3,0 % p/v,
 - Oleth-5 (Volpo® N5): 9,1 % p/v,
 - Aceite de parafina (Marcol 82®): 86,4 % v/v,
 - Conservante: 1,5 % v/v

Fase acuosa nº 1 (240 ml):

- Tampón isotónico que contiene fosfato de sodio y monopotasio 0,02 M (pH 7,8): c.s. hasta 100,0 % v/v

[0104] La fase acuosa nº 1 contiene tampón isotónico que contiene fosfato de sodio y monopotasio 0,02 M (pH 7,8) al 98,5 % v/v y el o los inmunógenos. La emulsión BE1 no se diluye antes de usar. La concentración final de tensioactivo en la emulsión de BE1 es 4 % en p/v.

25 **Ejemplo 2: Estabilidad de las emulsiones**

[0105] Las composiciones LR4 y LR3 eran estables incluso en presencia del o de los inmunógenos concentrados a 21 °C durante al menos 9 meses. La distribución del tamaño de partículas de las emulsiones no cambió a lo largo de este periodo de tiempo.

30 **Ejemplo 3: Composición de vacuna combinada de *Mycoplasma hyopneumoniae* y PCV-2 y seguridad en lechones**

[0106] Materiales y procedimientos: dos vacunas preparadas como se describe en el ejemplo 1, que contienen la emulsión LR3 o LR4, 12 unidades de antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado y $2,4 \log_{10}$ (unidades de antígeno) de circovirus porcino de tipo 2 inactivado/dosis. Veinticuatro (24) lechones de 3 semanas de edad, se alojaron aleatoriamente en dos grupos. El grupo 2 de 12 lechones se vacunó el día 0 con 4 ml de la composición de vacuna LR3 por vía intramuscular, mientras que el grupo 3 de 12 lechones se vacunó el día 0 con 4 ml de la composición de vacuna LR4 por vía intramuscular. El grupo 1 corresponde al grupo de control no vacunado. Los lechones se controlan diariamente. Dos semanas después de inyección, se observan el sitio de inyección y las lesiones locales.

Tratamiento	Choque y reacciones generales	Hipertermia °C	Ganancia de peso diaria media relativa	Tamaño de la reacción local (cm ³)
Grupo 1 (control)	No hay reacción	-0,1 ± 0,3*	6,5 ± 1,9	0,0 ± 0,0
Grupo 2 (LR3)	No hay reacción	0,6 ± 0,5	6,3 ± 1,3	1,8 ± 2,8
Grupo 3 (LR4)	No hay reacción	0,1 ± 0,2	6,4 ± 1,7	8,4 ± 11,4
*Media ± desviación típica				

[0107] Resultados: Los adyuvantes LR3 y LR4 han mostrado un buen perfil de seguridad.

45 **Ejemplo 4: Resultados serológicos después de administración de una dosis de una vacuna PCV-2 con adyuvante de la emulsión LR4**

[0108] Materiales y procedimientos: Una vacuna preparada como se describe en el ejemplo 1, que contiene emulsión LR4, CpG ODN nº 2216 50 µg/dosis, 1,5 unidades de antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado y $1,5 \log_{10}$ (unidades de antígeno) de circovirus porcino de tipo 2 inactivado/dosis. Cuarenta (40) lechones de 3 semanas de edad y que tenían anticuerpos maternos altos previamente existentes, se alojaron aleatoriamente en dos grupos. El grupo 2 de 20 lechones se vacunó el día 0 con 0,5 ml de la composición de vacuna LR4 por vía intradérmica con un inyector sin aguja. El grupo 1 corresponde al grupo de control no vacunado. Se tomaron muestras de sangre en D0, D21, D41, D63, D84, D126, D153 y D180 después de vacunación para la valoración de los anticuerpos de PCV-2 ORF2 por ELISA.

Tratamiento	D0	D21	D41	D63	D84	D126	D153	D180
Grupo 1	3,09 ± 0,58*	2,57 ± 0,50	2,15 ± 0,58	< 1,51 ± 0,48	< 1,51 ± 0,34	< 1,51 ± 0,17	< 1,51 ± 0,05	< 1,51 ± 0,02
Grupo 2	2,91 ± 0,52	2,35 ± 0,52	2,44 ± 0,35	267 ± 0,50	2,60 ± 0,49	2,40 ± 0,49	2,48 ± 0,54	2,43 ± 0,54

*Media ± desviación típica (unidades log₁₀)

[0109] **Resultados:** Como se demuestra en la siguiente tabla, todos los sujetos vacunados mostraron una respuesta significativa de anticuerpos dirigidos contra PCV-2 ORF2, de 7 a 180 días después de vacunación, incluso en presencia de anticuerpos maternos en el momento de la vacunación.

5

Ejemplo 5: Procedimiento de preparación de *Helicobacter*

[0110] **Cultivo:** Se desarrollaron cultivos bacterianos a partir de cultivos madre en glicerol, usando un inóculo al 5-10 % en caldo Brucella complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS). Los cultivos se desarrollaron en 10 matraces con tapón con ventilación en un incubador de gas triple (N₂ 85 %, CO₂ 10 %, O₂ 5 %) con agitación a aproximadamente 70 rpm a 37 °C. En el momento de la inoculación, también se prepararon placas de TSA + sangre de oveja al 5 % (SB) como ensayo de diagnóstico para determinar la pureza de la muestra. La morfología de la colonia era puntiforme y límpida. Se observó algo de hemólisis en las placas de la izquierda del incubador durante 3-4 días. Los cultivos tardaron 24-36 horas en crecer hasta una DO₆₀₀ > 1. Los cultivos desarrollados también se 15 prepararon en placas de TSA + SB al 5 %, y se ensayó la producción de catalasa y ureasa (*Helicobacter cerdo* era positiva para ambas).

[0111] **Centrifugación:** Los cultivos desarrollados hasta DO₆₀₀ > 1 se dividieron en partes alícuotas en botellas de 20 centrifuga estériles a 7500 rpm durante 20 min con un rotor J10 Beckman a aproximadamente 8600 g. El líquido sobrenadante se descartó y los sedimentos celulares se lavaron con 1 x disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Los sedimentos se volvieron a suspender en PBS y se dividieron en partes alícuotas en viales de vacuna de 10 ml.

[0112] **Liofilización:** Las preparaciones de antígeno se liofilizaron durante 36 horas sin estabilizantes ni 25 conservantes. Se observaron tortas bien formadas.

[0113] **Digestión con pepsina:** Se preparó una disolución de pepsina (0,1 %) en HCl 10 mM y se esterilizó por 30 filtración dos veces con un filtro de 0,2 micrómetros. La preparación de antígeno liofilizada se digirió con pepsina (se añadió 1 µg de pepsina por cada mg de masa celular seca) durante 25 h a 37 °C y se basculó suavemente. Las muestras de 100 µl se extendieron sobre placas de TSA + SB al 5 % (incubadas a 37 °C en un incubador microaerófilo de gas triple) a las 18 y 25 horas; no se observó crecimiento después de 96 horas, indicando que la digestión con pepsina tiene un efecto de inactivación.

[0114] **Neutralización en PBS:** Las preparaciones de antígeno tenían un pH de aproximadamente 2,0 después de 35 la digestión con pepsina, de modo que se neutralizaron con un volumen 2: 1 de PBS. Después de neutralización del pH, el pH era aproximadamente 7,0.

Ejemplo 6: Formulaciones de preparaciones de antígeno preparada a partir de *Helicobacter cerdo* tratadas con pepsina o formalina

40

[0115] Las vacunas se formularán, como se muestra en la tabla 1, de forma extemporánea disolviendo las 40 bacterias liofilizadas en 10 ml de adyuvante LR2 por vial. Los valores reflejan la concentración de cada ingrediente después de formulación. La emulsión de LR2 es equivalente a la emulsión de LR4 descrita en el ejemplo 1. En la emulsión de LR2, la concentración final de Lutrol F127 es 0,20 % (p/v) en lugar de 0,175 % (p/v).

45

Tabla 1: Formulaciones de vacunas

Ingrediente	Componentes	Cantidad de ingrediente mg por ml	Cantidad de ingrediente mg por dosis (2 ml)
PBS	NaCl	2	4
	KCl	0,05	0,1
	Na ₂ HPO ₄	0,2875	0,575
	KH ₂ PO ₄	0,05	0,1
	H ₂ O desionizada		
pepsina (disolución)		3,5 µg	7,0 µg
	HCl	0,042	0,084
células de <i>Helicobacter</i>		3,5	7,0

Ejemplo 7: Animales y procedimientos para la vacunación con vacunas basadas en *H. cerdo*

[0116] Los animales usados en este estudio son cerdos convencionales seleccionados que no tienen PRRSV ni tienen *M. hyopneumoniae*. Los lechones convencionales se seleccionan mientras todavía están con sus madres. Se registran todos los pesos de cerdos. Los cerdos se asignan a dos grupos de al menos 5 cerdos cada uno, con estratificación por peso, sexo y camada de origen. Se examinan todos los cerdos para asegurar el estado de salud. Solo se incluyen en el ensayo animales clínicamente sanos. Se identifican todos los cerdos. Los cerdos se vacunan con 1 y 2 semanas de edad mientras están con sus madres. Un grupo de cerdos se vacuna y un grupo se deja como control sin vacunar. Los animales vacunados reciben 1 dosis (2 ml por dosis) por vía intramuscular, 0,5 ml en cada hombro y cadera. Los controles sin vacunar no reciben ninguna inyección.

[0117] A las 3 semanas de edad, todos los cerdos se destetan y se estimulan. Cada grupo se alberga en pocilgas separadas en una instalación de aislamiento. Se hace la necropsia de los cerdos aproximadamente 28 días después de la estimulación. La necropsia de los cerdos de control negativos se hace en la fecha final de necropsia. El diseño experimental se resume en la tabla 2.

Tabla 2: Diseño experimental

Descripción del tratamiento	Estimulación con <i>Helicobacter</i>	Sin estimulación
Grupo vacunado	5 cerdos	
Controles negativos		5 cerdos

[0118] *Procedimiento de estimulación y evaluación:* en el caso de enfermedad clínica grave, se pueden administrar los tratamientos que se consideren necesarios para el bienestar del animal. Se registrarán el número marcado en la oreja de cada animal, la o las fechas de enfermedad, el diagnóstico supuesto, el régimen de tratamiento, y la disposición del animal. No se proporciona tratamiento después de la estimulación. Se realiza la eutanasia de los animales moribundos o lesionados. Un animal que no está sano (enfermedad o lesión clínica) se puede retirar del estudio.

[0119] *Serología y ensayos de la piel:* Se recoge sangre de la vena cava anterior antes de la vacunación, antes de la estimulación y en la necropsia. Se determinan los niveles de anticuerpos contra *Helicobacter*. Se llevan a cabo ensayos de la piel.

[0120] *Parámetros de producción:* Los cerdos se pesan cuando llegan, antes de la vacunación, antes de la estimulación y en cada necropsia para evaluar la potencial ganancia o pérdida de peso.

[0121] *Necropsia:* Se realiza la necropsia de los cerdos 28 días después de inyección adaptada para la estimulación con *Helicobacter*.

Ejemplo 8: Aislados de *Helicobacter*

[0122] Se recuperaron dos aislados bacterianos (2662 y 1268) de la mucosa gástrica porcina por cultivo microaerófilo y paso por placas con medio de Skirrow.

[0123] Basándose en la localización gástrica (cardias y antro), morfología (Gram negativas, varillas cortas, curvadas de “tipo ala de gaviota”), actividad de la ureasa, reactividad con un anticuerpo de conejo dirigido contra Hp, ambos aislados se asignaron al género *Helicobacter* basándose en el análisis de SDS-PAGE y los perfiles de transferencia Western, se encontró que el aislado 2662 era similar a *Helicobacter pylori* y se le dio el nombre de “*Helicobacter cerdo*”. El aislado 1268 tenía un perfil distinto del de 2662.

Ejemplo 9: Carga bacteriana medida por la actividad de la ureasa

[0124]

Tabla 3: Carga bacteriana medida por actividad de la ureasa

Grupos	Actividad de ureasa en mucosa gástrica			
	Ninguna	Débil	Moderada	Fuerte
Grupo vacunado	4*	0	2	-
Controles de infección	-	1	3	3

*Lesión macroscópica de pars-esofágico

Ejemplo 10: Respuesta inflamatoria gástrica

[0125] La respuesta inflamatoria gástrica (tabla 4) se “puntuó” según los folículos e infiltrados linfocíticos en la lámina propia gástrica en una escala de 0, nada; 1, leve; 2, moderada; y 3, grave. La puntuación inflamatoria total para cada cerdo se calculó como la suma de las puntuaciones histológicas en cardias y antro gástricos. Las puntuaciones medias por grupo se calcularon a partir de esta.

Tabla 4: Respuesta inflamatoria gástrica

Número de grupo	Puntuación total media
Grupo Vacunado	3,6
Grupo de control	4,4

Ejemplo 11: Respuestas serológicas

5

[0126]

Tabla 5: Respuestas serológicas

Grupos	Día 6	Primera vacunación	Día 14	Segunda vacunación	Día 24	Día 40
Grupo vacunado	1,0		1,3		81,0	86,5
Controles de infección	1,0		0,8		1,3	4,5
Suivaxyn Myco hyo + H. cerdo	6,9		11,8		99,9	97,3
Controles	9,4		6,6		9,1	9,0

10 **[0127]** La vacuna de *H. cerdo* proporcionó buenos índices de inmunidad protectora basándose en la intensidad de la actividad de la ureasa, evaluación histológica ciega de secciones de tejidos y las fuertes respuestas serológicas. Una vacuna combinada que comprendía Suvaxyn, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *H. cerdo*, dio respuestas de anticuerpos similares.

15 **[0128]** La invención se describe además mediante los siguientes párrafos numerados:

1. Una emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) que comprende:

- 20 (1) una disolución acuosa que contiene un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un huésped;
- (2) un tensioactivo lipófilo no iónico que es un alcohol graso etoxilado;
- (3) un aceite mineral;
- (4) un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico.

25 2. La emulsión del párrafo 1, en la que el alcohol graso etoxilado lipófilo comprende aproximadamente 43 % o menos del peso molecular (p/p) de óxido de etileno (EO).

3. La emulsión del párrafo 1, en la que el alcohol graso etoxilado hidrófilo comprende más de aproximadamente 43 % (p/p) de óxido de etileno (EO).

30 4. La emulsión del párrafo 2, en la que el alcohol graso etoxilado es un alcohol graso C9 a C22 y ventajosamente seleccionado del grupo que consiste en un alcohol oleico, cetílico, estearílico, isoestearílico, láurico, y combinaciones de los mismos, ventajosamente un alcohol oleico y más ventajosamente un alcohol oleico etoxilado con 1 a 4 EO.

35 5. La emulsión del párrafo 3, en la que el alcohol graso etoxilado es un alcohol graso C9 a C22 y ventajosamente seleccionado del grupo que consiste en alcohol oleico, cetílico, estearílico, isoestearílico, láurico, y combinaciones de los mismos, ventajosamente un alcohol oleico y más ventajosamente un alcohol oleico etoxilado con 5 a 21 EO.

40 6. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 1 a 5, en el que el tensioactivo hidrófilo no iónico es un alcohol graso etoxilado.

7. La emulsión del párrafo 6, en la que el alcohol graso etoxilado es Brij® 76, Brij® 56, Brij® 96/97, Brij® 98, Brij® 721, Brij® 58, Brij® 35, Brij® 78 (Uniqema), Volpo® N5, Volpo® CS6, Volpo® CS12, Volpo® CS20, Volpo® CS25, Volpo® CS23 (Croda), BL9-EX, BC-7, BT-5, BT-7, BT-9, BT-12, BD-10, BO-7V, BC5.5, BT-5, BL-21, BL-25, BC.15TX BC-23, BC-25TX, BO-15V, BO-50V, BB-20, (Nikko Chemicals) o cualquier combinación de los mismos.

8. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 1 a 7, en la que el tensioactivo lipófilo no iónico es un alcohol graso etoxilado.

50 9. La emulsión del párrafo 8, en la que el alcohol graso etoxilado es Brij® 30, Brij® 92/93, Brij® 72, Brij® 52 (Uniqema), Volpo® L3, Volpo® N3, Volpo® L4 (Croda), BS-4, BD-2, BD-4, BT-3 (Nikko Chemicals) o cualquier composición de los mismos.

55 10. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 1 a 9, en la que la concentración total de tensioactivos, en peso por volumen de emulsión es de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 6,5 %, en particular de aproximadamente 1 % a aproximadamente 6 %, ventajosamente de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 5

%, más ventajosamente de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %.

11. Una emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) que comprende:

- 5 (1) una disolución acuosa que contiene un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un huésped;
(2) un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico;
(3) un aceite mineral;
(4) un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende más de aproximadamente 43 % y menos
10 de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de etileno;
(5) un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende aproximadamente 71 % (p/p) o más de óxido de etileno.

12. La emulsión del párrafo 11, en la que el alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende más de
15 aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de etileno (EO) es un alcohol oleico etoxilado con 5 a 14 EO.

13. La emulsión del párrafo 11 ó 12, en la que el alcohol graso alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que
20 comprende aproximadamente 71 % (p/p) o más de óxido de etileno (EO) es un alcohol oleico etoxilado con 15 EO o más.

14. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 11 a 13, en la que la concentración del alcohol graso etoxilado
hidrófilo no iónico, que comprende más de aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de
óxido de etileno, es de aproximadamente 1,0 % a aproximadamente 5,0 %, en particular de aproximadamente 1,5 %
25 a aproximadamente 4,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 2,0 % a aproximadamente 3,5 %, expresado
como un porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v).

15. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 11 a 14, en la que la concentración de alcohol graso etoxilado
hidrófilo no iónico, que comprende aproximadamente 71 % o más (p/p) de óxido de etileno, es de aproximadamente
30 0,01 % a aproximadamente 3,0 %, en particular de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 2,5 %, más
ventajosamente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,0 % (p/v).

16. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 11 a 15, en la que la concentración del alcohol graso etoxilado
lipófilo no iónico, es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,5 %, en particular de aproximadamente 0,2 %
35 a aproximadamente 2,0 %, ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,5 %, más
ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,2 % (p/v).

17. Una emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) que comprende:

- 40 (1) una disolución acuosa que contiene un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una
respuesta inmunitaria en un huésped;
(2) un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico;
(3) un aceite mineral;
(4) un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico;
45 (5) un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno hidrófilo no iónico.

18. La emulsión del párrafo 17, en la que el alcohol graso etoxilado hidrófilo es ventajosamente un alcohol graso
etoxilado que comprende más de aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de
50 etileno.

19. La emulsión del párrafo 17, en la que el alcohol graso es un alcohol oleico etoxilado con 5 a 14 EO.

20. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 17 a 19, en la que la concentración del alcohol graso etoxilado
hidrófilo no iónico, es de aproximadamente 1,0 % a aproximadamente 5,0 %, en particular de aproximadamente 1,5
55 % a aproximadamente 4,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 2,0 % a aproximadamente 3,5 %, expresada
como porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v).

21. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 17 a 20, en la que la concentración del copolímero de bloques de
polioxietileno-polioxipropileno hidrófilo no iónico, es de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2,0 %, más en
60 particular de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1,5 % (p/v).

22. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 17 a 21, en la que la concentración del alcohol graso etoxilado
lipófilo no iónico, es de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,5 %, en particular de aproximadamente 0,2 %
a aproximadamente 2,0 %, ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,5 %, más
65 ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,2 % (p/v).

ES 2 389 377 T3

23. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 1 a 22, en la que la emulsión tiene una temperatura de inversión de fase (PIT) mayor o igual que 25 °C.
24. La emulsión del párrafo 23, en la que la PIT es de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 65 °C, más en particular de aproximadamente 33 °C a aproximadamente 60 °C.
25. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 1 a 24, en la que la emulsión comprende en volumen por volumen de emulsión (v/v) de aproximadamente 2 % a aproximadamente 50 % de fase de aceite que incluye el o los aceites y los tensioactivos, en particular de aproximadamente 4 % a aproximadamente 40 %, ventajosamente de aproximadamente 8 % a aproximadamente 35 %, más ventajosamente, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 % de fase de aceite.
26. La emulsión del párrafo 25, en la que el aceite es un aceite mineral.
27. La emulsión del párrafo 26, en la que el aceite mineral es un aceite de parafina, tal como aceite isoparafínico y/o aceite nafténico, escualano, escualeno, pristano, poliisobuteno, poliisobuteno hidrogenado, polideceno, poliisopreno, poliisopropeno y similares.
28. La emulsión del párrafo 25 ó 26, en la que el aceite mineral comprende una cadena de carbonos lineal o ramificada que tiene un número de átomos de carbono mayor que 15, ventajosamente de 15 a 32, y está exento de compuestos aromáticos.
29. La emulsión del párrafo 28, en la que el aceite se comercializa con el nombre MARCOL® 52 o MARCOL® 82 (Esso) o "DRAKEOL® 6VR" (Penreco).
30. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 25 a 29, en la que el aceite es una mezcla de aceites que comprende al menos dos aceites en cualquier proporción.
31. La emulsión del párrafo 30, en la que la mezcla de aceites comprende al menos un aceite vegetal.
32. La emulsión del párrafo 31, en la que el aceite vegetal representa de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 33 % de la fase de aceite, ventajosamente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % en v/v.
33. La emulsión del párrafo 31 ó 32, en la que el aceite vegetal es aceite de cacahuete, aceite de nuez, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de onagra y similares.
34. Una emulsión que comprende un aceite de parafina; un alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO como tensioactivo lipófilo no iónico; alcohol oleico etoxilado con 5-6 EO como tensioactivo hidrófilo no iónico; y un copolímero de bloques de POE-POP con aproximadamente 70 a 80 % de EO y un PM de aproximadamente 9800 a 16000 como tensioactivo hidrófilo no iónico.
35. La emulsión del párrafo 34, en la que el aceite de parafina está en una concentración de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % y ventajosamente de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 % (v/v); el alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO está en una concentración de 0,1 % a 1,5 %, ventajosamente de 0,1 % a 1,2 % (p/v); el alcohol oleico etoxilado con 5-6 EO está en una concentración de 1 % a 5 %, ventajosamente de 1 % a 4 % (p/v); y el copolímero de bloques de POE-POP con aproximadamente 70 a 80 % de EO y un PM de aproximadamente 9800 a 16000 está en una concentración de 0,01 % a 2 %, ventajosamente de 0,05 % a 1,5 % (p/v).
36. Una emulsión que comprende un aceite de parafina, un alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO como tensioactivo lipófilo no iónico; un alcohol oleico etoxilado con 10 OE como tensioactivo hidrófilo no iónico; y un copolímero de bloques de POE-POP con aproximadamente 70 a 80 % de EO y un PM de aproximadamente 9800 a 16000 como tensioactivo hidrófilo no iónico.
37. La emulsión del párrafo 36, en la que el aceite de parafina está en una concentración de 5 % a 50 %, ventajosamente de 15 % a 30 % (v/v); el alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO está en una concentración de 0,2 % a 3 %, ventajosamente de 0,5 % a 3 % (p/v); el alcohol oleico etoxilado con 10 EO está en una concentración de 0,2 % a 3 %, ventajosamente de 0,5 % a 3 % (p/v); y el copolímero de bloques de POE-POP con aproximadamente 70 a 80 % de EO y un PM de aproximadamente 9800 a 16000 está en una concentración de 0,01 % a 2 %, ventajosamente de 0,05 % a 1,5 % (p/v).
38. Una emulsión que comprende un aceite de parafina, un alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO como tensioactivo lipófilo no iónico y un alcohol oleico etoxilado con 5-6 OE como tensioactivo hidrófilo no iónico.
39. La emulsión del párrafo 38, en la que el aceite de parafina está en una concentración de 5 % a 50 %, ventajosamente de 15 % a 30 % (v/v); el alcohol oleico etoxilado con 2-3 EO está en una concentración de 0,1 % a 3

%, ventajosamente de 0,5 % a 2 % (p/v); el alcohol oleico etoxilado con 5-6 EO está en una concentración de 1 % a 5 %, ventajosamente de 2,0 % a 4,5 % (p/v).

40. Un procedimiento para hacer una composición de vacuna que comprende mezclar un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un huésped con una emulsión de uno cualquiera de los párrafos 1 a 39.

41. La emulsión de uno cualquiera de los párrafos 1 a 39 o la composición de vacuna del párrafo 40 para usar para inducir una respuesta inmunitaria en un huésped.

10

42. Un kit para llevar a cabo el procedimiento del párrafo 40 o el uso del párrafo 41, que comprende la emulsión de uno cualquiera de los párrafos 1 a 39 o la composición de vacuna del párrafo 40 e instrucciones para llevar a cabo el procedimiento o el uso.

REIVINDICACIONES

1. Una emulsión de aceite en agua (Ac/Ag) que comprende:

- 5 (1) una disolución acuosa que contiene un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un huésped;
 (2) un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico;
 (3) un aceite mineral;
 (4) un tensioactivo hidrófilo no iónico, que es un alcohol graso etoxilado.

10

2. La emulsión de la reivindicación 1, en la que el alcohol graso etoxilado lipófilo comprende aproximadamente 43 % (p/p) o menos del peso molecular de óxido de etileno (EO); o

15 en la que el alcohol graso etoxilado lipófilo comprende aproximadamente 43 % (p/p) o menos del peso molecular de óxido de etileno (EO) y en la que el alcohol graso etoxilado es un alcohol graso C9 a C22 y ventajosamente seleccionado del grupo que consiste en un alcohol oleico, cetílico, estearílico, isoestearílico, láurico, y combinaciones de los mismos, ventajosamente un alcohol oleico y más ventajosamente un alcohol oleico etoxilado con 1 a 4 EO; o

20 en la que el alcohol graso etoxilado hidrófilo comprende más de aproximadamente 43 % (p/p) de óxido de etileno; o

en la que el alcohol graso etoxilado hidrófilo comprende más de aproximadamente 43 % (p/p) de óxido de etileno y

25 en la que el alcohol graso etoxilado es un alcohol graso C9 a C22 y ventajosamente seleccionado del grupo que consiste en alcohol oleico, cetílico, estearílico, isoestearílico, láurico, y combinaciones de los mismos, ventajosamente un alcohol oleico y más ventajosamente un alcohol oleico etoxilado con 5 a 21 EO; o

30 en la que el alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, es Steareth-10, Ceteth-10, Oleth-10, Oleth-20, Steareth- 21, Ceteth-20, Laureth-23, Steareth-20, Oleth-5, Cetareth-6, Cetareth-12, Cetareth-20, Cetareth-25, Cetareth- 23, Laureth-9, Ceteth-7, C12-14 Pareth-5, C12-14 Pareth-7, C12-14 Pareth-9, C12-14 Pareth-12, C12-15 Pareth-10, Oleth-7, Ceteth-6, Laureth-21, Laureth-25, Ceteth-15, Ceteth-23, Ceteth-25, Oleth-15, Oleth-50, Beheneth-20 o cualquier combinación de los mismos; o

35 en la que el alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, es Laureth-4, Oleth-2, Steareth-2, Ceteth-2, C12-13 Pareth- 3, Oleth-3, C12-13 Pareth-4, Steareth-4, C12-15 Pareth-2, C12-15 Pareth-4, C12-14, Pareth-3 o cualquier combinación de los mismos; o

40 en la que la concentración total de tensioactivos, en peso por volumen de emulsión es de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 6,5 %, en particular de aproximadamente 1 % a aproximadamente 6 %, ventajosamente de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 5 %, más ventajosamente de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %.

45 3. La emulsión de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo hidrófilo no iónico comprende un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende más de aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de etileno (EO) y un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende aproximadamente 71 % (p/p) o más de óxido de etileno (EO).

50 4. La emulsión de la reivindicación 3, en la que el alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende más de aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de etileno (EO), es un alcohol oleico etoxilado con 5 a 14 EO; o

en la que el alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende aproximadamente 71 % (p/p) o más de óxido de etileno (EO) es un alcohol oleico etoxilado con 15 EO o más; o

55 en la que la concentración del alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende más de aproximadamente 43 % y menos de aproximadamente 71 % (p/p) de óxido de etileno, es de aproximadamente 1,0 % a aproximadamente 5,0 %, en particular de aproximadamente 1,5 % a aproximadamente 4,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 2,0 % a aproximadamente 3,5 %, expresado como un porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v); o

60

en la que la concentración del alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, que comprende aproximadamente 71 % (p/p) o más de óxido de etileno, es de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 3,0 %, en particular de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 2,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,0 % (p/v); o

65

en la que la concentración de alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, es de aproximadamente 0,1 % a

aproximadamente 2,5 %, en particular de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 2,0 %, más ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,5 %, más ventajosamente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 1,2 % (p/v).

5 5. La emulsión de la reivindicación 1, en la que la emulsión tiene una temperatura de inversión de fase (PIT) mayor o igual que 25 °C; o

10 en la que la emulsión tiene una temperatura de inversión de fase (PIT) mayor o igual que 25 °C y en la que la PIT es de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 65 °C, más en particular de aproximadamente 33 °C a aproximadamente 60 °C.

6. La emulsión de la reivindicación 1, en la que la emulsión comprende en volumen por volumen de emulsión (v/v) de aproximadamente 2 % a aproximadamente 50 % de fase de aceite que incluye el o los aceites y los tensioactivos, en particular de aproximadamente 4 % a aproximadamente 40 %, ventajosamente de aproximadamente 8 % a aproximadamente 35 % y, más ventajosamente, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 % de fase de aceite; o

20 en la que la emulsión comprende en volumen por volumen de emulsión (v/v) de aproximadamente 2 % a aproximadamente 50 % de fase de aceite que incluye el o los aceites y los tensioactivos, en particular de aproximadamente 4 % a aproximadamente 40 %, ventajosamente de aproximadamente 8 % a aproximadamente 35 % y, más ventajosamente, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 % de fase de aceite, y en la que el aceite es un aceite mineral; o

25 en la que la emulsión comprende en volumen por volumen de emulsión (v/v) de aproximadamente 2 % a aproximadamente 50 % de fase de aceite que incluye el o los aceites y los tensioactivos, en particular de aproximadamente 4 % a aproximadamente 40 %, ventajosamente de aproximadamente 8 % a aproximadamente 35 % y, más ventajosamente, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 % de fase de aceite, y en la que el aceite es un aceite mineral, y en la que el aceite mineral es un aceite de parafina tal como aceite isoparafínico y/o aceite nafténico, escualano, escualeno, pristano, poliiisobuteno, poliiisobuteno hidrogenado, polideceno, poliiisopreno, poliiisopropeno y similares; o

35 en la que la emulsión comprende en volumen por volumen de emulsión (v/v) de aproximadamente 2 % a aproximadamente 50 % de fase de aceite que incluye el o los aceites y los tensioactivos, en particular de aproximadamente 4 % a aproximadamente 40 %, ventajosamente de aproximadamente 8 % a aproximadamente 35 % y, más ventajosamente, de aproximadamente 15 % a aproximadamente 30 % de fase de aceite, y en la que el aceite es un aceite mineral y en la que el aceite mineral comprende una cadena de carbonos lineal o ramificada que tiene un número de átomos de carbono mayor que 15, ventajosamente de 15 a 32, y está exento de compuestos aromáticos; o

40 en la que el aceite es una mezcla de aceites que comprende al menos dos aceites en cualquier proporción; o

en la que el aceite es una mezcla de aceites que comprende al menos dos aceites en cualquier proporción y en la que la mezcla de aceites comprende al menos un aceite vegetal; o

45 en la que el aceite es una mezcla de aceites que comprende al menos dos aceites en cualquier proporción y en la que la mezcla de aceites comprende al menos un aceite vegetal, y en la que el aceite vegetal representa de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 33 % de la fase de aceite, ventajosamente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % en v/v; o

50 en la que el aceite es una mezcla de aceites que comprende al menos dos aceites en cualquier proporción y en la que la mezcla de aceites comprende al menos un aceite vegetal, y en la que el aceite vegetal es aceite de cacahuete, aceite de nuez, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de onagra y similares.

7. La emulsión de la reivindicación 1, en la que el antígeno o inmunógeno de vacuna es Mycoplasma hypopneumoniae, porcine circovirus 2 o Helicobacter pylori.

8. La emulsión de la reivindicación 1, que además comprende un copolímero de bloques de polioxietileno-polioxiopropileno hidrófilo no iónico.