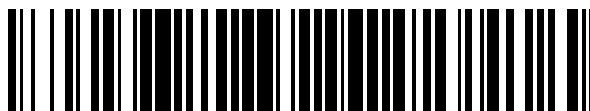


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 235**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2004 E 04722345 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1613346**

54 Título: **Emulsiones de aceite en agua microfluidizadas y composiciones de vacunas**

30 Prioridad:

04.04.2003 US 460301 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.03.2013

73 Titular/es:

**PAH USA 15 LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**DOMINOWSKI, PAUL J.;
KLOSE, PAMELA KAY;
KREBS, RICHARD LEE y
MANNAN, RAMASAMY M.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 398 235 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

Emulsiones de aceite en agua microfluidizadas y composiciones de vacunas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de forma general al campo de las vacunas y, en particular, a formulaciones de coadyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria en animales veterinarios. En particular, la invención se refiere al uso de una emulsión submicrométrica de aceite en agua como un coadyuvante de vacunas para potenciar la capacidad inmunógena de los antígenos. La presente invención proporciona formulaciones de emulsiones submicrométricas de aceite en agua, composiciones de vacunas que contienen un antígeno incorporado en dicha emulsión, así como procedimientos para preparar las emulsiones y vacunas.

15 **Antecedentes de la invención**

Las infecciones bacterianas, víricas, parasitarias y micoplásmicas están ampliamente difundidas en los animales veterinarios tales como ganado vacuno, porcino y animales de compañía. Las enfermedades provocadas por estos agentes infecciosos son a menudo resistentes a la terapia farmacéutica antimicrobiana, sin dejar medios efectivos de tratamiento. En consecuencia, cada vez se usa más una estrategia de vacunación para controlar la enfermedad infecciosa en los animales veterinarios. Un patógeno infeccioso entero puede hacerse adecuado para su uso en una formulación de vacuna después de la inactivación química o manipulación genética apropiada. De forma alternativa, puede expresarse una subunidad proteínica del patógeno en un sistema de expresión recombinante y purificarse para su uso en una formulación de vacuna.

25 Coadyuvante, en general, se refiere a cualquier material que aumenta la respuesta inmunitaria humoral y/o celular a un antígeno. Las vacunas tradicionales están compuestas por una preparación bruta de microorganismos patógenos inactivados y las impurezas asociadas a los cultivos de microorganismos patológicos podrían actuar como coadyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria. Sin embargo, cuando se usan preparaciones homogéneas de microorganismos patológicos o subunidades proteínicas purificadas como antígenos para la vacunación, la inmunidad provocada por dichos antígenos es deficiente y, por lo tanto, se hace necesaria la adición de ciertos materiales exógenos como coadyuvantes. Además, las vacunas sintéticas y de subunidades son caras de producir. Por lo tanto, con la ayuda de coadyuvantes, puede ser necesaria una dosis menor de antígeno para estimular la respuesta inmunitaria, reduciendo así en el coste de producción de las vacunas.

35 Se sabe que los coadyuvantes actúan de diferentes maneras para potenciar la respuesta inmunitaria. Muchos coadyuvantes modifican la red de citocinas asociadas a la respuesta inmunitaria. Estos coadyuvantes inmunomoduladores pueden ejercer su efecto incluso cuando no están combinados con antígenos. En general, los coadyuvantes inmunomoduladores provocan una regulación por aumento general de ciertas citocinas y una regulación por disminución concomitante de otras provocando una respuesta celular Th1 y/o humoral Th2.

40 Algunos coadyuvantes tienen la capacidad de preservar la integridad de la conformación de un antígeno de forma que los antígenos puedan presentarse de forma eficaz a las células efectoras inmunitarias apropiadas. Como resultado de esta preservación de la conformación del antígeno por la formulación del coadyuvante, la vacuna tendría una vida útil mayor que la mostrada por los complejos inmunoestimuladores (ISCOM). Ozel M. y col.; Quaternary Structure of the Immunestimulating Complex (Iscom), *J. of Ultrastruc. And Molec. Struc. Res.* 102, 240-248 (1989).

50 Algunos coadyuvantes tienen la propiedad de retener el antígeno en forma de formulación de liberación prolongada en el sitio de inyección. Como resultado de este efecto de liberación prolongada el antígeno no se pierde rápidamente por aclaramiento hepático. Las sales de aluminio y las emulsiones de agua en aceite actúan a través de este efecto de liberación prolongada con una duración menor. Por ejemplo, se puede obtener una formulación de liberación prolongada a largo plazo usando coadyuvante completo de Freund (FCA) que es una emulsión de agua en aceite. El FCA normalmente se mantiene en el sitio de inyección hasta que la biodegradación permite la separación del antígeno por las células que presentan antígeno.

55 Basándose en su naturaleza física, los coadyuvantes pueden agruparse en dos categorías muy amplias, en concreto coadyuvantes particulados y coadyuvantes no particulados. Los coadyuvantes particulados existen en forma de micropartículas. El inmunógeno es capaz de incorporar o asociarse a las micropartículas. Sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, complejos inmunoestimuladores, liposomas y nanopartículas y micropartículas son ejemplos de coadyuvantes particulados. Los coadyuvantes no particulados son generalmente inmunomoduladores y se usan generalmente junto con coadyuvantes particulados. Muramil dipéptido (un componente activo-adyuvante de un peptidoglicano extraído de *Mycobacteria*), copolímeros de bloque no iónicos, saponinas (una mezcla compleja de triterpenoides extraídos de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*), Lípido A (un disacárido de glucosamina con dos grupos fosfato y cinco o seis cadenas de ácidos grasos generalmente de C12 a C16 de longitud), citocinas, polímeros de carbohidratos, polisacáridos derivatizados y toxinas bacterianas tales como la toxina del cólera y la toxina lábil de *E. coli* (LT) son ejemplos de coadyuvantes no particulados.

70 Algunos de los coadyuvantes mejor conocidos son combinaciones de inmunomoduladores no particulados y materiales particulados que podrían conferir un efecto de liberación prolongada a la formulación de coadyuvante. Por ejemplo, FCA combina las propiedades inmunomoduladoras de componentes de *Mycobacterium tuberculosis* con el efecto depósito a corto plazo de las emulsiones en aceite.

75 Las emulsiones en aceite se han usado como coadyuvante de vacunas durante mucho tiempo. Le Moignic y Pinoy encontraron en 1916 que una suspensión de *Salmonella typhimurium* inactivados en aceite mineral aumentaba la respuesta inmunitaria. Subsiguientemente, en 1925, Ramon describió el aceite de almidón como una de las

5 sustancias que aumentan la respuesta antitóxica al toxoide de la difteria. Sin embargo, las emulsiones en aceite no se hicieron populares hasta 1937 cuando Freund logró su formulación de coadyuvante que hoy se conoce como coadyuvante Completo de Freund (FCA). El FCA es una emulsión de agua en aceite compuesta por aceite mineral (parafina) mezclado con Mycobacteria inactivadas y Arlachel A. Arlachel A es principalmente monooleato de manida y se usa como agente emulsionante. Aunque FCA es excelente para inducir una respuesta de anticuerpos, provoca un dolor fuerte, formación de abscesos, fiebre e inflamación granulomatosa. Para evitar estas reacciones secundarias indeseables, se desarrolló el coadyuvante Incompleto de Freund (IFA). El IFA es similar al FCA en su composición excepto por la ausencia de componentes de micobacteria. El IFA actúa mediante formulación de liberación prolongada en el sitio de inyección y liberación lenta del antígeno con estimulación de células productoras de anticuerpos.

10 Otra estrategia para mejorar FCA se basó en la noción de que la sustitución del aceite mineral por un aceite biocompatible ayudaría a eliminar las reacciones asociadas a FCA en el sitio de inyección. Se creía también que la emulsión debería ser una de aceite en agua en lugar de agua en aceite porque ésta produce efecto de liberación prolongada de larga duración en el sitio de inyección. Hilleman y col. describieron un coadyuvante basado en aceite "Adjuvant 65", que consiste en aceite de cacahuete al 86 %, Arlachel A al 10 % como emulsionante y monoestearato de aluminio al 4 % como estabilizante. Hilleman, 1966, Prog. Med. Virol. 8: 131-182; Hilleman y Beale, 1983, en New Approaches to Vaccine Development (Editores Bell, R. y Torrigiani, G.), Schwabe, Basilea, Suiza. En los seres humanos, el uso de Adjuvant 65 era seguro y potente, pero mostraba menos capacidad coadyuvante que IFA. Sin embargo, se suspendió el uso de Adjuvant 65 debido a la capacidad reactógena en el hombre con ciertos lotes de vacunas y la reducción de la capacidad de coadyuvante cuando se usaba emulsionante purificado o sintético en lugar de Arlachel A. Las patentes de Estados Unidos n° 5.718.904 y 5.690.942 enseñan que el aceite mineral en la emulsión de aceite en agua puede sustituirse por aceite metabolizable con el fin de mejorar el perfil de seguridad.

15 Además de la capacidad coadyuvante y la seguridad, el aspecto físico de una emulsión es también una consideración comercial importante. El aspecto físico depende de la estabilidad de la emulsión. La separación de fases, sedimentación y coalescencia son indicadores de la inestabilidad de la emulsión. La separación de fases ocurre cuando las fases oleaginosas y acuosa de la emulsión tienen una gravedad específica diferente. También se da la separación de fases cuando el tamaño inicial de la gota de la emulsión es grande y las gotas de emulsión no tienen movimiento Browniano. Cuando el tamaño de la gota es grande, hay una tendencia a la ruptura de la interfase y las gotas se fusionan en forma de partículas grandes. La estabilidad de la emulsión se determina mediante un número de factores tales como la naturaleza y cantidad de emulsionante usado, el tamaño de la gota en la emulsión y la diferencia de densidades entre la fase oleaginosas y acuosa.

20 Los emulsionantes promueven la estabilización de gotas dispersas reduciendo la energía libre de la interfase y creando barreras físicas o electroestáticas a la coalescencia de las gotas. Se han usado detergentes no iónicos así como iónicos como emulsionantes. Los emulsionantes no iónicos se orientan en la interfase y producen estructuras relativamente voluminosas, lo que conlleva al impedimento estérico de las gotas dispersas. Los emulsionantes aniónicos o catiónicos inducen la formación de una capa doble eléctrica atrayendo los contraiones; las fuerzas de repulsión de la capa doble provocan que las gotas se repelan las unas a las otras cuando se acercan.

25 Además de usar emulsionantes, puede lograrse también la estabilidad de la emulsión reduciendo el tamaño de la gota de la emulsión por medios mecánicos. Normalmente se han usado mezcladores de propulsores, rotores de turbina, molinos de coloides, homogeneizadores y aparatos de ultrasonidos para fabricar emulsiones. La microfluidización es otra forma de aumentar la homogeneidad del tamaño de la gota en la emulsión. La microfluidización puede producir una emulsión elegante, físicamente estable con un tamaño de partícula consistente en el intervalo submicrométrico. Además de aumentar la estabilidad de la emulsión, el proceso de la microfluidización permite la filtración final que es una forma preferente de asegurar la esterilidad del producto final. Además, las partículas oleaginosas submicrométricas pueden pasar desde los sitios de inyección a los vasos linfáticos y después a los nódulos linfáticos de la cadena de drenaje, sangre y bazo. Esto reduce la probabilidad de establecer una formulación de liberación prolongada oleaginosas en el sitio de la inyección que puede producir inflamación local y una reacción significativa en el sitio de inyección.

30 Los microfluidizadores están ahora disponibles en el mercado. La formación de emulsiones ocurre en un microfluidizador al interactuar dos corrientes fluidizadas a velocidades elevadas dentro de una cámara de interacción. El microfluidizador es aire o nitrógeno impulsado que puede operar con presiones internas por encima de 137900 kPa. La patente de Estados Unidos 4.908.154 enseña el uso de un microfluidizador para obtener emulsiones esencialmente libres de cualesquiera agentes emulsionantes.

35 En la literatura se han descrito un número de formulaciones de coadyuvantes de aceite en agua submicrométricas. La patente de Estados Unidos 5.376.369 describe un coadyuvante de emulsión submicrométrica de aceite en agua que se conoce como Syntax Adjuvant Formulation (SAF). SAF contiene escualeno o escualano como el componente oleaginoso, una cantidad de polímero de bloque Plurónico L121 que forma emulsiones (polioxi-propileno-polioxi-etileno) y una cantidad inmunopotenciadora de muramil dipéptido. El escualeno es un precursor de colesterol de tipo hidrocarburo lineal que se encuentra en muchos tejidos, de forma notable en el hígado de tiburones y otros peces. El escualano se prepara mediante hidrogenación de escualeno y está completamente saturado. Tanto escualeno como escualano pueden metabolizarse y tienen unos buenos antecedentes en estudios toxicológicos. Las emulsiones de escualeno o escualano se han usado en vacunas contra el cáncer en humanos con efectos secundarios leves y con una eficacia deseable. Véase, por ejemplo, Anthony C. Allison, 1999, Squalene and Squalane emulsions as adjuvants, *Methods* 19: 87-93.

40 La patente de Estados Unidos 6.299.884 y la publicación de patente internacional WO 90/14837 enseñan que los copolímeros de bloque de polioxi-propileno-polioxi-etileno no son esenciales para la formación de emulsiones submicrométricas de aceite en agua. Además, estas referencias enseñan el uso de aceite metabolizable no tóxico y expresamente excluyen el uso de aceite mineral y aceites de derivados del petróleo tóxicos en sus formulaciones de emulsiones.

La patente de Estados Unidos 5.961.970 enseña otra emulsión submicrométrica de aceite en agua más para su uso como coadyuvante en vacunas. En la emulsión que se describe en esta patente, el componente hidrófobo se selecciona del grupo que consiste en un aceite triglicérido de cadena media, un aceite vegetal y una mezcla de los mismos. El tensioactivo que se incluye en esta emulsión puede ser un tensioactivo biológicamente compatible natural tal como un fosfolípido (por ejemplo lecitina) o un tensioactivo no natural farmacéuticamente aceptable tal como TWEEN-80. Esta patente enseña también la incorporación del antígeno a la emulsión en el momento en que se forma la emulsión, contrastando con la mezcla del antígeno con la emulsión después de que se ha formado la emulsión de forma independiente y extrínseca.

La patente de Estados Unidos 5.084.269 enseña que una formulación de coadyuvante que contiene lecitina combinada con aceite mineral provoca un descenso de la irritación en el animal hospedador y simultáneamente induce una inmunidad sistémica aumentada. La formulación del coadyuvante que resulta de la patente de Estados Unidos 5.084.269 se usa comercialmente en vacunas veterinarias con el nombre comercial AMPHIGEN®. La formulación de AMPHIGEN® está formada por micelas – gotas de aceite rodeadas de lecitina. Estas micelas permiten que se unan más antígenos celulares completos que los coadyuvantes con base oleaginosas tradicionales. Además, las formulaciones de vacunas a base de AMPHIGEN® contienen un bajo contenido en aceite del 2,5 al 5 % de aceite mineral, comparado con otras formulaciones de vacunas que contienen coadyuvantes oleaginosos, que normalmente contienen del 10 % al 20 % de aceite. Su bajo contenido en aceite hace que esta vacuna con base de coadyuvante sea menos irritante para los tejidos en el sitio de inyección, dando como resultado menos lesiones y que haya menos desechos al sacrificar. Además, el recubrimiento de lecitina que rodea las gotas de aceite reduce adicionalmente las reacciones en el sitio de inyección dando como resultado una vacuna que es tanto segura como eficaz.

La formulación de AMPHIGEN® se usa como coadyuvante en un número de vacunas veterinarias y existe una necesidad de mantener el aspecto físico de la vacuna durante periodos de almacenamiento cortos y largos así como en el momento de la reconstitución. Además, un antígeno liofilizado se mezcla con la formulación de coadyuvante preparada previamente justo antes de la inyección. Esta práctica no asegura siempre que exista una distribución uniforme del antígeno en la emulsión de aceite en agua y el aspecto de la emulsión puede no ser deseable. Además, al reposar, la emulsión homogeneizada puede mostrar separación de fases. Por lo tanto, existe una necesidad de una formulación de coadyuvante estable que no muestre separación de fases durante una vida útil larga. Una forma de prevenir la separación de fases es reducir el tamaño de la gota y aumentar la homogeneidad de las partículas de la emulsión. Aunque se ha documentado el proceso de microfluidización de formulaciones en emulsión a base de aceite metabolizable, la microfluidización de las emulsiones de aceite en agua tales como la formulación de AMPHIGEN® no se ha realizado todavía.

En la presente invención, se ha usado la microfluidización para llevar el tamaño de las gotas de aceite mineral rodeadas de lecitina a tamaño submicrométrico. De forma inesperada, los presentes inventores han descubierto que la microfluidización de formulaciones de vacunas que tienen como coadyuvante una emulsión de aceite en agua formada por una mezcla de lecitina y aceite no solo mejora el aspecto físico de las formulaciones, sino que potencia también los efectos inmunizadores de las formulaciones. Las formulaciones microfluidizadas se caracterizan también por un perfil de seguridad mejorado.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto de forma inesperada que la actividad de coadyuvante y el perfil de seguridad de emulsiones con base oleaginosas de aceite en agua no metabolizables pueden mejorarse mediante la microfluidización. Los antígenos que se incorporan en emulsiones microfluidizadas son estables incluso cuando los antígenos se incorporan de forma intrínseca a las emulsiones antes de la microfluidización.

En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona formulaciones de emulsión submicrométrica de aceite en agua útiles como un coadyuvante de vacuna. Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua de la presente invención están compuestas por un aceite no metabolizable, al menos un tensioactivo y un componente acuoso, en el que el aceite está disperso en el componente acuoso con un tamaño medio de gota de aceite en el intervalo submicrométrico. Un aceite no metabolizable preferente es aceite mineral ligero. Tensioactivos preferentes incluyen lecitina, Tween-80 y SPAN-80.

Una emulsión de aceite en agua preferente proporcionada por la presente invención está compuesta por una formulación de AMPHIGEN®.

Las emulsiones de aceite en agua de la presente invención pueden incluir componentes adicionales que son apropiados y deseables, incluyendo conservantes, agentes osmóticos, moléculas bioadhesivas y moléculas inmunoestimuladoras. Las moléculas inmunoestimuladoras preferentes incluyen, por ejemplo Quil A, colesterol, GPI-0100, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA).

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para preparar una emulsión submicrométrica de aceite en agua. De acuerdo con la presente invención, se mezclan los diversos componentes de la emulsión, incluyendo el aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente apropiado para su uso en la emulsión. La mezcla se somete a un proceso de emulsionamiento primario para formar una emulsión de aceite en agua, que después se pasa por un microfluidizador para obtener una emulsión de aceite en agua de gotas con un diámetro inferior a 1 micra, preferentemente con un tamaño de gota medio inferior a 0,5 micras.

En otra realización más, la presente invención proporciona composiciones de vacuna que contienen un antígeno y una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente. El antígeno se incorpora en la emulsión de forma extrínseca o intrínseca, preferentemente de forma intrínseca.

El antígeno que puede incluirse en las composiciones de la vacuna de la presente invención puede ser un antígeno bacteriano, fúngico o vírico o una combinación de los mismos. El antígeno puede tener forma de una preparación inactivada de células o virus completos o parciales, o tomar la forma de moléculas antigénicas obtenidas mediante purificación convencional de proteínas, técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

5 En una realización adicional, la presente invención proporciona procedimientos para preparar composiciones de vacunas que contienen un antígeno o antígenos combinado(s) con una emulsión submicrométrica de aceite en agua.

10 Para preparar las composiciones de vacunas de la presente invención, el (los) antígeno(s) puede(n) combinarse de forma intrínseca (por ejemplo antes de la microfluidización) o de forma extrínseca (por ejemplo después de la microfluidización) con los componentes de la emulsión de aceite en agua. Preferentemente, el antígeno se combina con los componentes de la emulsión de aceite en agua de forma intrínseca.

15 En otra realización más, la presente invención proporciona composiciones de vacunas que contienen un antígeno microencapsulado y una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente, en las que el antígeno microencapsulado se combina con la emulsión de forma extrínseca.

Breve descripción de los dibujos

20 La **Figura 1** representa el procedimiento para la preparación en lotes de composiciones de vacunas no microfluidizadas. En este procedimiento los diversos componentes de la vacuna se añaden al recipiente de adición de la izquierda y finalmente se bombean al vaso de mezclado donde los componentes se mezclan por medios mecánicos simples.

25 La **Figura 2** representa el procedimiento para la preparación de composiciones de vacunas microfluidizadas que contienen antígeno incorporado de forma intrínseca. Los diversos componentes de la vacuna se añaden al recipiente de adición y se transfieren a la unidad de mezclado de la preemulsión para mezclar por medios mecánicos simples. Subsiguientemente, se pasa la emulsión por un microfluidizador y se recoge en la cámara de post-microfluidización.

30 La **Figura 3** representa la distribución del tamaño de las gotas de la vacuna basada en de la formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada, la vacuna basada en de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada y la preparación de vacuna de mezclado en banco.

35 La **Figura 4** muestra la ausencia de separación de fases en la preparación de vacuna microfluidizada.

40 La **Figura 5** representa una comparación de la estabilidad de los antígenos que se incorporan de forma intrínseca a la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada (A907505) y tres preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizadas de control (A904369, A904370 y A904371). Las cuatro preparaciones de vacunas se almacenaron a 4 °C durante dos años. En momentos diferentes durante el almacenamiento (0, 6, 12 ó 24 meses), se usaron las cuatro formulaciones para vacunar vacas de tres meses de edad. La vacunación se realizó el Día 0 y 21 con 2 ml de una dosis de vacuna y se recogieron los sueros dos semanas después de la segunda vacunación. Se determinó la valoración de anticuerpos neutralizadores para el virus de BVD Tipo II en cada una de las muestras de suero. Los datos se presentan como la media geométrica de 5 animales.

45 La **Figura 6** muestra la media por mínimos cuadrados de la temperatura rectal del ganado vacuno antes y después de la administración de vacunas microfluidizadas y no microfluidizadas. T01: Grupo placebo – Dosis única; T02: Grupo placebo – Dosis doble; T03: Formulación no microfluidizada – Dosis única; T04: Formulación no microfluidizada – Dosis doble; T05: Formulación microfluidizada – Dosis única; T06: Formulación microfluidizada – Dosis doble.

50 La **Figura 7** muestra la media por mínimos cuadrados de los volúmenes de reacción en el sitio de inyección observados en el ganado vacuno después de la administración de vacunas microfluidizadas y no microfluidizadas. T03: Formulación no microfluidizada – Dosis única; T04: Formulación no microfluidizada – Dosis doble; T05: Formulación microfluidizada – Dosis única; T06: Formulación microfluidizada – Dosis doble.

55 La **Figura 8** representa la media geométrica de las valoraciones de IgG para antígeno PauA recombinante de *Streptococcus uberis* después de la vacunación con las diversas formulaciones de vacuna que contenían tanto antígeno PauA recombinante como antígeno de célula entera de *E. coli*.

60 La **Figura 9** representa la media geométrica de las valoraciones de IgG para antígeno de células enteras de *E. coli* de *Streptococcus uberis* después de la vacunación con las diversas formulaciones de vacuna que contenían tanto antígeno PauA recombinante como antígeno de célula entera de *E. coli*.

65 Las **Figuras 10A y 10B** representan la distribución de tamaño de partícula de una formulación de Amphigen microfluidizada en la producción inicial (Figura 10A) y a los 22 meses después de la producción (Figura 10B).

Descripción detallada de la invención

70 Los presentes inventores han descubierto de forma inesperada que la microfluidización de formulaciones de vacunas que tienen como coadyuvantes una emulsión de aceite en agua compuestas por una mezcla de lecitina y aceite mineral no sólo mejora el aspecto físico de las formulaciones de vacunas, sino que también potencia los efectos inmunizadores de las formulaciones de vacunas. Las formulaciones de vacunas microfluidizadas se caracterizan también por un perfil de seguridad mejorado.

75

Basándose en estos descubrimientos, la presente invención proporciona emulsiones submicrométricas de aceite en agua útiles como un coadyuvante en composiciones de vacunas. Se proporcionan también procedimientos para preparar estas emulsiones submicrométricas de aceite en agua usando un microfluidizador. Además, la presente invención proporciona composiciones de vacunas submicrométricas en las que un antígeno se combina con una emulsión submicrométrica de aceite en agua. También se proporcionan los procedimientos para preparar dichas composiciones de vacunas. La presente invención proporciona además composiciones de vacunas que contienen antígenos microencapsulados combinados con una emulsión submicrométrica de aceite en agua y procedimientos para preparar dichas vacunas.

Para hacer más clara la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la invención.

Emulsiones submicrométricas de aceite en agua

En una realización, la presente invención proporciona emulsiones submicrométricas de aceite en agua útiles como un coadyuvante de vacunas. Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua de la presente invención potencian la capacidad inmunógena de los antígenos de las composiciones de vacunas, son seguras para administrarse a animales y estables durante el almacenamiento.

Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua de la presente invención están compuestas por un aceite no metabolizable, al menos un tensioactivo y un componente acuoso, en los que el aceite está disperso en el componente acuoso con un tamaño medio de gota de aceite en el intervalo submicrométrico.

Por “submicrométrico” se quiere decir que las gotas son de un tamaño inferior a 1 μm (micrómetro) y el tamaño medio de gota de aceite es inferior a 1 μm . Preferentemente, el tamaño medio de gota de la emulsión es inferior a 0,8 μm ; más preferentemente inferior a 0,5 μm ; e incluso más preferentemente inferior a 0,4 μm o aproximadamente 0,1-0,3 μm .

El “tamaño medio de la gota” se define como el tamaño de partícula del Diámetro Medio del Volumen (DMV) en una distribución de volumen de tamaños de partícula. EL DMV se calcula multiplicando cada diámetro de partícula por el volumen de todas las partículas de ese tamaño y sumando. Esto se divide después entre el volumen total de todas las partículas.

El término “aceite no metabolizable” como se usa en la presente memoria se refiere a aceites que no pueden ser metabolizados por el cuerpo del sujeto animal al que se administra la emulsión.

Los términos “animal” y “sujeto animal” como se usan en la presente memoria se refieren a todos los animales no humanos, incluyendo ganado vacuno, ovejas y cerdos por ejemplo.

Los aceites no metabolizables adecuados para su uso en las emulsiones de la presente invención incluyen alcanos, alquenos, alquinos y sus ácidos y alcoholes correspondientes, sus éteres y ésteres, y sus mezclas. Preferentemente, los compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarburo ligeros, es decir, los componentes de ese tipo tienen 6 a 30 átomos de carbono. El aceite puede prepararse o purificarse sintéticamente a partir de productos de petróleo. Los aceites preferentes no metabolizables para su uso en las emulsiones de la presente invención incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas por ejemplo.

El término “aceite mineral” se refiere a una mezcla de hidrocarburos líquidos que se obtienen a partir de vaselina mediante una técnica de destilación. El término es sinónimo de “parafina líquida”, “vaselina líquida” y “aceite mineral blanco”. El término se pretende que incluya también “aceite mineral ligero”, es decir, aceite que se obtiene de forma similar mediante destilación de vaselina pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que la vaselina. Véase, por ejemplo Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pa.; Mack Publishing Company, 1999, en las páginas 788 y 1323). El aceite mineral puede obtenerse a partir de diversas fuentes comerciales, por ejemplo J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). El aceite mineral preferente es el aceite mineral blanco ligero disponible comercialmente con el nombre de DRAKEOL®.

Normalmente, el componente oleaginoso de las emulsiones submicrométricas de la presente invención está presente en una cantidad del 1 % al 50 % en volumen; preferentemente, en una cantidad del 10 % al 45; más preferentemente en una cantidad del 20 % al 40 %.

Las emulsiones de aceite en agua de la presente invención normalmente incluyen al menos un (es decir, uno o más) tensioactivo. Los tensioactivos y emulsionantes, términos que se usan de forma indistintamente en la presente memoria, son agentes que estabilizan la superficie de las gotas de aceite y mantienen las gotas de aceite dentro del tamaño deseado.

Tensioactivos adecuados para su uso en las presentes emulsiones incluyen tensioactivos biológicamente compatibles naturales y tensioactivos sintéticos no naturales. Los tensioactivos biológicamente compatibles incluyen compuestos de fosfolípidos o una mezcla de fosfolípidos. Los fosfolípidos preferentes son fosfatidilcolinas (lecitina), tales como lecitina de soja o de huevo. La lecitina puede obtenerse como mezcla de fosfátidos y triglicéridos lavando aceites vegetales crudos con agua, y separando y secando las gomas hidratadas resultantes. Un producto refinado puede obtenerse fraccionando la mezcla para obtener los fosfolípidos y glucolípidos insolubles en acetona que permanecen después de separar los triglicéridos y aceite vegetal lavando con acetona. De forma alternativa, puede obtenerse lecitina de diversas fuentes comerciales. Otros fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse convencionalmente.

Tensioactivos sintéticos no naturales adecuados para su uso en las emulsiones submicrométricas de la presente invención incluyen tensioactivos no iónicos con base de sorbitan, por ejemplo tensioactivos de sorbitan sustituidos con ácidos grasos (disponibles comercialmente con el nombre SPAN® o ARLACEL®), ésteres de ácidos grasos de sorbitol polietoxilado (TWEEN®), ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos de fuentes tales como aceite de ricino (EMULFOR); ácido graso polietoxilado (por ejemplo ácido esteárico disponible con el nombre de SIMULSOL M-53), polímero de isooctilfenol polietoxilado/formaldehído (TYLOXAPOL), éteres de alcoholes grasos de polioxietileno (BRIJ®); éteres de polioxietileno nonfenilo (TRITON®N), éteres de polioxietileno isooctilfenilo (TRITON®X). Tensioactivos sintéticos preferentes son los tensioactivos disponibles con el nombre de SPAN® y TWEEN®.

10 Tensioactivos preferentes para su uso en las emulsiones de aceite en agua de la presente invención incluyen lecitina, Tween-80 y SPAN-80.

15 En general el tensioactivo, o la combinación de tensioactivos si se usan dos o más, está presente en la emulsión en una cantidad del 0,01 % al 10 % en volumen, preferentemente del 0,1 % al 6,0 %, más preferentemente del 0,2 % al 5,0 %.

El componente acuoso constituye la fase continua de la emulsión y puede ser agua, solución salina tamponada o cualquier otra solución acuosa adecuada.

20 Las emulsiones de aceite en agua de la presente invención pueden incluir componentes adicionales que son apropiados y deseables, incluyendo conservantes, agentes osmóticos, moléculas bioadhesivas y moléculas inmunoestimuladoras.

25 Se cree que las moléculas bioadhesivas pueden potenciar la administración y unión de antígenos sobre o a través de la superficie mucosa diana confiriendo inmunidad mucosa. Ejemplos de moléculas bioadhesivas adecuadas incluyen polímeros ácidos no naturales tales como ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico (por ejemplo CARBOPOL®, CARBOMER); polímeros naturales modificados sintéticamente ácidos tales como carboximetilcelulosa; polímeros naturales modificados sintéticamente neutros tales como (hidroxipropil)metilcelulosa; polímeros que portan aminas básicas tales como quitosán; polímeros ácidos que pueden obtenerse de fuentes naturales tales como ácido algínico, ácido hialurónico, pectina, goma de tragacanto y goma de karaya; y polímeros neutros no naturales, tales como poli(alcohol vinílico); o sus combinaciones.

30 La expresión "moléculas inmunoestimuladoras", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a las moléculas que potencian la respuesta inmunitaria protectora inducida por un componente antígeno en las composiciones de las vacunas. Los materiales inmunoestimuladores adecuados incluyen componentes de la pared celular bacteriana, por ejemplo derivados de N-acetil-muramilo-L-alanilo-D-isoglutamina tales como murabutida, treonilo-MDP y muramilo tripéptido; glucósidos de saponina y sus derivados, por ejemplo Quil A, QS 21 y GPI-0100; colesterol y compuestos de amonio cuaternario por ejemplo bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) y N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxi-etil)propanodiamina ("avridina").

40 Las saponinas son compuestos glucosídicos que se producen como metabolitos secundarios en una gran variedad de especies vegetales. La estructura química de las saponinas confiere una amplia gama de actividades farmacológicas y biológicas, que incluyen alguna actividad inmunológica potente y eficaz.

45 Estructuralmente, las saponinas están constituidas por cualquier aglucona unida a una o más cadenas de azúcares. Las saponinas pueden clasificarse de acuerdo con su composición de agluconas: glucósidos triterpénicos, glucósidos esteroideos y glucósidos alcaloides esteroideos.

50 La saponina puede aislarse de la corteza de *Quillaja saponaria*. La saponina ha sido conocida desde hace mucho como un inmunoestimulador. Dalsgaard, K., "Evaluation of its adjuvant activity with special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease", *Acta. Vet. Scand.* 69: 1-40 1978. Los extractos brutos de plantas que contenían saponinas mejoraron la potencia de las vacunas contra la glosopeda. Sin embargo, los extractos brutos se asociaron a efectos secundarios adversos cuando se usaron en vacunas. Subsiguientemente, Dalsgaard purificó parcialmente el componente activo del coadyuvante de saponina mediante diálisis, intercambio de iones y cromatografía por filtración en gel. Dalsgaard, K. y col. "Saponin Adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Morina with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines", *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 44: 243-254 1974. Un componente activo de coadyuvante purificado de esta forma se conoce como "Quil A". En base al peso Quil A demostró una potencia aumentada y mostró reacciones locales reducidas cuando se comparó con saponina. Quil A se usa extensamente en vacunas veterinarias.

60 El análisis adicional de Quil A mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) reveló una mezcla heterogénea de saponinas muy similares y llevó al descubrimiento de QS21 que era un coadyuvante potente con una toxicidad mínima o reducida. Kensil C.R. y col., "Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex", *J. Immunol.* 146: 431-437, 1991. Al contrario que la mayoría de otros inmunoestimuladores, QS21 es soluble en agua y puede usarse en vacunas con o sin formulaciones tipo emulsión. Se ha demostrado que QS21 provoca una respuesta de tipo Th1 en ratones estimulando la producción de anticuerpos IgG2a e IgG2b e indujo CD8 + CTL (MHC clase I) específico de antígeno en respuesta a antígenos subunitarios. Los estudios clínicos en humanos han demostrado su capacidad como coadyuvante con un perfil toxicológico aceptable. Kensil, C.R. y col., "Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. In Vaccine Design: the subunit and Adjuvant Approach," Editores Powell, M.F. y Newman, M.J. Plenum Publishing Corporation, New York 1995, páginas 525-541.

75 La patente de Estados Unidos 6.080.725 enseña los procedimientos de preparación y uso conjugado de saponina-lipófilo. En este conjugado de saponina-lipófilo, un resto lipófilo tal como un lípido, ácido graso, polietilenglicol o terpeno se une covalentemente a una saponina triterpénica no acilada o desacilada mediante un grupo carboxi presente en el ácido 3-O-glucurónico de la saponina triterpénica. La unión de un resto lipófilo al ácido 3-O-

glucurónico de una saponina tal como desacilsaponina de Quillaja, luciosida P o saponina de *Gypsophila*, *saponaria* y *Acanthophyllum* potencia sus efectos coadyuvantes sobre la inmunidad mediada humoral y celular. Además, la unión de un resto lipófilo al resto de ácido 3-O-glucurónico de desacilsaponina o saponina no acilada proporciona un análogo de saponina que es más fácil de purificar, menos tóxico, químicamente más estable y posee propiedades como coadyuvante iguales o mejores que la saponina original.

GPI-0100 es un conjugado de saponina-lipófilo que se describe en la patente de Estados Unidos 6.080.725. GPI-0100 se produce mediante la adición de una amina alifática a desacilsaponina mediante el grupo carboxilo del ácido glucurónico.

Compuestos de amonio cuaternario – Se ha propuesto una serie de bases nitrogenadas alifáticas para su uso como coadyuvantes inmunológicos, incluyendo aminas, compuestos de amonio cuaternario, guanidinas, benzamidinas y tiouronios. Compuestos de ese tipo específicos incluyen bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietyl)propanodiamina (“avridina”).

La patente de Estados Unidos 5.951.988 enseña una formulación de coadyuvante que contiene sales de amonio cuaternario tales como DDA en conjunción con un componente oleaginoso. Esta formulación es útil en conjunción con sustancias inmunológicas conocidas, por ejemplo antígenos víricos o bacterianos en una composición de vacuna, para potenciar la respuesta inmunógena. La composición es también útil sin un antígeno incorporado como formulación inmunoestimuladora no específica.

La patente de Estados Unidos 4.310.550 describe el uso de N,N-alquilo superior-N,N'-bis(2-hidroxietyl)propanodiamina y N,N-alquilo superior-xililendiaminas formuladas con emulsión grasa o lipídica como coadyuvante de vacunas. En la patente de Estados Unidos 4.310.550 se describe un procedimiento para inducir o potenciar la respuesta inmunógena de un antígeno en el hombre o en un animal a través de la administración parenteral de la formulación de coadyuvante.

En una realización preferente, la presente invención proporciona una emulsión submicrométrica de aceite en agua útil como coadyuvante de vacunas, que se compone de una formulación de AMPHIGEN®, con gotas de un tamaño inferior a 1 µm y un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,25 µm.

La expresión “formulación de AMPHIGEN®”, tal como se usa en la presente memoria se refiere a una solución formada mezclando una solución de aceite de lecitina DRAKEOL® (Hydronics, Lincoln, NE) con solución salina en presencia de TWEEN® 80 y SPAN® 80. Una formulación típica de AMPHIGEN® contiene aceite mineral ligero al 40 % en volumen (v/v), aproximadamente 25 % p/v de lecitina, aproximadamente 0,18 % de TWEEN 80 en volumen (v/v) y aproximadamente 0,08 % de Span 80 en volumen (v/v).

Procedimientos para preparar emulsiones submicrométricas de aceite en agua

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para preparar las emulsiones submicrométricas de aceite en agua que se han descrito anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, los diversos componentes de la emulsión, incluyendo el aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente adecuado para su uso en la emulsión se combinan y mezclan los unos con los otros.

La mezcla formada se somete a un procedimiento de emulsionamiento, normalmente pasando una o más veces a través de uno o más homogeneizadores o emulsionadores para formar una emulsión de aceite en agua que tiene un aspecto uniforme y un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,5 µm. Para este fin puede usarse cualquier homogeneizador o emulsionador comercial, por ejemplo emulsionador Ross (Hauppauge, NY), homogeneizador Gaulin (Everett, MA).

La emulsión así formada se somete después a microfluidización para llevar el tamaño de gota al intervalo submicrométrico. La microfluidización puede lograrse usando un microfluidizador comercial tal como el modelo de número 110Y disponible en Microfluidics, Newton, Mass; el modelo 30CD de Gaulin (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); y Rainnie Minilab tipo 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy Inc., Hudson, Wis.). Estos microfluidizadores operan forzando los fluidos a través de pequeñas aperturas a presión elevada, de tal forma que las dos corrientes de fluido interactúan a velocidades elevadas en una cámara de interacción para formar emulsiones con gotas de un tamaño submicrométrico.

El tamaño de la gota puede determinarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, difracción por láser, usando instrumentos de medición disponibles en el mercado. El tamaño puede variar dependiendo del tipo de tensioactivo usado, la relación entre tensioactivo y aceite, la presión de trabajo, temperatura y similares. Los expertos en la técnica pueden determinar la combinación deseada de estos parámetros para obtener emulsiones con el tamaño de gota deseado sin experimentación excesiva. Las gotas de las emulsiones de la presente invención son inferiores a 1 µm de diámetro, preferentemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,8 µm, y más preferentemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,5 µm, e incluso más preferentemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,3 µm.

En una realización preferente de la presente invención, la solución oleaginoso de lecitina DRAKEOL, que está disponible en el mercado de Hydronics (Lincoln, NE) y contiene lecitina al 25 % en aceite mineral ligero, se combina y mezcla con solución salina así como con los tensioactivos TWEEN® 80 y SPAN® 80 para formar una “solución de AMPHIGEN®” o “formulación de AMPHIGEN®”. La solución de AMPHIGEN® se emulsiona después con un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm para formar una emulsión de aceite en agua. Subsiguientemente la emulsión se hace pasar una vez a través de un Microfluidizador que trabaja a aproximadamente 3.102,5±3.447,5 kPa. La emulsión de aceite en agua microfluidizada tiene gotas de un tamaño

inferior a 1 µm, con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,25 µm.

Composiciones de vacuna que contienen antígenos incorporados en emulsiones submicrométricas de aceite en agua

5 En otra realización, la presente invención proporciona composiciones de vacunas que contienen un antígeno(s) y una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente. Estas composiciones de vacunas se caracterizan porque tienen un efecto inmunógeno potenciado y un aspecto físico mejorado (por ejemplo no se observa separación de fases después de un periodo de almacenamiento largo). Además, las composiciones de
10 vacunas de la presente invención son seguras para la administración a animales.

De acuerdo con la presente invención, el antígeno puede combinarse con la emulsión de forma extrínseca o, preferentemente, de forma intrínseca. El término “intrínsecamente” se refiere al procedimiento en el que el antígeno se combina con los componentes de la emulsión antes de la etapa de microfluidización. El término “extrínsecamente”
15 se refiere al procedimiento en el que el antígeno se añade a la emulsión después de que la emulsión ha sido microfluidizada. El antígeno añadido de forma extrínseca puede ser antígeno libre o puede estar encapsulado en micropartículas como se describe con más detalle a continuación.

El término “antígeno”, tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier molécula, compuesto o
20 composición que es inmunógeno en un animal y se incluye en la composición de vacuna para provocar una respuesta inmunitaria protectora en el animal al que se administra la composición de vacuna.

El término “inmunógeno”, tal como se usa en relación con un antígeno se refiere a la capacidad del antígeno de provocar una respuesta inmunitaria en un animal contra el antígeno. La respuesta inmunitaria puede ser una
25 respuesta inmunitaria celular mediada primordialmente por linfocitos T citotóxicos, o una respuesta inmunitaria humoral mediada primordialmente por linfocitos T cooperadores, que a su vez activa linfocitos B que provocan la producción de anticuerpos.

Una “respuesta inmunitaria protectora” se define como cualquier respuesta inmunitaria, ya sea respuesta inmunitaria
30 mediada por anticuerpos o células, o ambos, que ocurre en el animal que previene o reduce de forma detectable la aparición o elimina o reduce de forma detectable la gravedad, o ralentiza de forma detectable la velocidad de progresión, del trastorno o enfermedad provocada por el antígeno o un patógeno que contiene el antígeno.

Los antígenos que pueden incluirse en la composición de vacuna de la presente invención incluyen antígenos
35 preparados a partir de bacterias patógenas tales como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Manheimia hemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma galanacium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridial spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovars, *Leptospira spp.*;
40 hongos patógenos tales como *Candida*; protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria spp.*; helmintos tales como *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Fasciola*, ya sea en forma de una preparación de células enteras o parciales inactivadas o en forma de moléculas antígenas obtenidas por purificación convencional de proteínas, técnicas de ingeniería genética o síntesis química. Antígenos adicionales
45 incluyen virus patógenos tales como virus del herpes bovino 1, 3, 6, virus de diarrea vírica bovina (BVDV) tipos 1 y 2, virus de la pseudogripe bovina, virus sinticial respiratorio bovino, virus de leucosis bovina, virus de rinderpest, virus de la glosopeda, rabia, virus de la fiebre porcina, virus de la fiebre porcina africana, parvovirus porcino, virus PRRS, circovirus porcino, virus de la gripe, virus de enfermedad vesicular porcina, virus de fiebre de Techen, virus de pseudorrabia, ya sea en forma de una preparación de virus completos o parciales inactivados, o en forma de moléculas antígenas obtenidas por purificación convencional de proteínas, técnicas de ingeniería genética o síntesis
50 química.

La cantidad del antígeno debe ser tal que el antígeno combinado con la emulsión de aceite en agua, sea eficaz para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un animal. La cantidad precisa para que un antígeno sea efectivo
55 depende de la naturaleza, actividad y pureza del antígeno y puede ser determinada por los expertos en la técnica.

La cantidad de emulsión de aceite en agua presente en las composiciones de vacunas debe ser suficiente para potenciar la capacidad inmunógena del (de los) antígeno(s) en las composiciones de vacunas. Cuando sea deseable y apropiado, pueden añadirse cantidades adicionales de tensioactivo(s) o tensioactivo(s) adicional(es) a la
60 composición de vacuna además del (de los) tensioactivo(s) proporcionado(s) por la emulsión de aceite en agua. De forma general, el componente oleaginoso está presente en el volumen final de una composición de vacuna en una cantidad del 1,0 % al 20 % en volumen; preferentemente en una cantidad del 1,0 % al 10 %; más preferentemente en una cantidad del 2,0 % al 5,0 %. El tensioactivo, o la combinación de tensioactivos si se usan dos o más tensioactivos, está presente en el volumen final de una composición de vacuna en una cantidad del 0,1 % al 20 % en volumen, preferentemente del 0,15 % al 10 %, más preferentemente del 0,2 % al 6,0 %.

Además del (de los) antígeno(s) y la emulsión de aceite en agua, la composición de vacuna puede incluir otros componentes que son apropiados y deseables, tales como conservantes, agentes osmóticos, moléculas bioadhesivas y moléculas inmunostimuladoras (por ejemplo Quil A, colesterol, GPI-0100, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA)), como se ha descrito anteriormente en relación con la emulsión de aceite en agua.
70

Las composiciones de vacunas de la presente invención pueden incluir también un vehículo veterinariamente aceptable. La expresión “un vehículo veterinariamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, coadyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción y similares. Los diluyentes
75 pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa entre otros. Estabilizadores incluyen albúmina, entre otros.

En una realización preferente, la presente invención proporciona una composición de vacuna que incluye al menos un antígeno de BVDV tipo I o BVDV tipo II, que se incorpora de forma intrínseca a un emulsión de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño inferior a 1 µm, preferentemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,8 µm, más preferentemente inferior a 0,5 µm, e incluso más preferentemente con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,5 µm. El antígeno de BVDV tipo I y/o II está preferentemente en forma de una preparación vírica inactivada. La emulsión submicrométrica de aceite en agua preferentemente está compuesta por una formulación de AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferentemente incluye también Quil A, colesterol y timerosol.

En otra realización preferente, la presente invención proporciona una composición de vacuna que incluye un antígeno de Leptospira y al menos un antígeno de BVDV tipo I o BVDV tipo II en una emulsión de aceite en agua. Los antígenos, preferentemente en forma de preparación celular o vírica inactivada, se incorporan de forma intrínseca a la emulsión submicrométrica de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño inferior a 1 µm; preferentemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,8 µm, más preferentemente inferior a 0,5 µm, e incluso más preferentemente con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,5 µm. La emulsión submicrométrica de aceite en agua preferentemente está compuesta por una formulación de AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferentemente incluye también una o más moléculas inmunoestimuladoras que se seleccionan de Quil-A, colesterol, DDA, GPI-100 e hidróxido de aluminio (Al(OH)).

En otra realización preferente más, la presente invención proporciona una composición de vacuna que incluye al menos un agente bacteriano, por ejemplo la proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante o una preparación celular de *E. coli* o una combinación de ambas en una emulsión de aceite en agua. El (los) antígeno(s) se combina(n) de forma intrínseca con la emulsión submicrométrica de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño inferior a 1 µm, con un tamaño medio de gota inferior a 0,5 µm y preferentemente con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,25 µm. La emulsión submicrométrica de aceite en agua preferentemente está compuesta por una formulación de AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferentemente incluye también una o más moléculas inmunoestimuladoras que se seleccionan de Quil-A, DDA, GPI-100.

Las composiciones de vacunas de la presente invención pueden administrarse a un animal por vías conocidas, incluyendo la oral, intranasal, mucosa, tópica, transdérmica y parenteral (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). La administración puede lograrse usando una combinación de vías, por ejemplo la primera administración usando una vía parenteral y una administración posterior usando una vía mucosa.

Procedimientos de preparación de composiciones de vacunas

En una realización adicional, la presente invención proporciona procedimientos para preparar composiciones de vacunas que contienen un antígeno o antígenos y una emulsión submicrométrica de aceite en agua.

Para preparar las composiciones de vacunas de la presente invención, el (los) antígeno(s) puede(n) combinarse de forma intrínseca o de forma extrínseca con los componentes de la emulsión de aceite en agua. Preferentemente, el antígeno se combina con los componentes de la emulsión de aceite en agua de forma intrínseca.

El antígeno puede combinarse con los diversos componentes de la emulsión, incluyendo el aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente apropiado para formar una mezcla. La mezcla se somete a un procedimiento de mezclado primario normalmente pasando una o más veces a través de uno o más homogeneizadores o emulsionadores para formar una emulsión de aceite en agua que contiene el antígeno. Puede usarse cualquier homogeneizador o emulsionador comercial, por ejemplo emulsionador Ross (Hauppauge, NY), homogeneizador Gaulin (Everett, MA) o Microfluidics (Newton, MA). De forma alternativa, los diversos componentes del coadyuvante de la emulsión, incluyendo aceite, uno o más tensioactivos y un componente acuoso pueden combinarse primero para formar una emulsión submicrométrica de aceite en agua usando un homogeneizador o emulsionador; y el antígeno se añade después a esta emulsión. El tamaño medio de gota de la emulsión de aceite en agua después del mezclado primario es de aproximadamente 1,0-1,2 micrómetros.

La emulsión que contiene el antígeno se somete después a microfluidización para llevar el tamaño de gota al intervalo submicrométrico. La microfluidización puede lograrse usando un microfluidizador comercial tal como el modelo de número 110Y disponible en Microfluidics, Newton, Mass; el modelo 30CD de Gaulin (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); y Rainnie Minilab tipo 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy Inc., Hudson, Wis.).

El tamaño de la gota puede determinarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, difracción por láser, usando instrumentos de medición disponibles en el mercado. El tamaño puede variar dependiendo del tipo de tensioactivo usado, la relación entre tensioactivo y aceite, la presión de trabajo, temperatura y similares. Se puede determinar una combinación deseada de estos parámetros para obtener emulsiones con un tamaño de gota deseado. Las gotas de aceite de las emulsiones de la presente invención son inferiores a 1 µm en diámetro y el tamaño medio de gota es inferior a 0,5 µm. Preferentemente, el tamaño medio de gota está aproximadamente entre 0,1 µm y 0,3 µm.

En una realización preferente de la presente invención, la solución oleaginosa de lecitina DRAKEOL®, que contiene lecitina al 25 % en aceite mineral ligero, se combina y mezcla con solución salina así como los tensioactivos TWEEN® 80 y SPAN® 80 para formar una mezcla que contiene aceite mineral ligero al 40 %, TWEEN® 80 al 0,18 % y SPAN® 80 al 0,08 %. La mezcla se emulsiona después con un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm para formar un producto de emulsión que se denomina también "formulación de AMPHIGEN®" o "solución de AMPHIGEN®". Subsiguientemente, el (los) antígeno(s) deseado(s) se combina con la solución de AMPHIGEN® y cualesquiera otros componentes adecuados (por ejemplo moléculas

inmunoestimuladoras) con ayuda de un emulsionador, por ejemplo, homogeneizador Ross, para formar una emulsión de aceite en agua que contiene el (los) antígeno(s). Esta emulsión se hace pasar una vez a través de un Microfluidizador que trabaja aproximadamente 68.950+3.447,5 kPa. La emulsión de aceite en agua microfluidizada tiene gotas de un tamaño inferior a 1 µm, con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,25 µm.

5 **Composiciones de vacunas que contienen antígenos microencapsulados en una emulsión submicrométrica de aceite en agua y procedimientos de preparación**

10 En otra realización más, la presente invención proporciona composiciones de vacunas que contienen un antígeno encapsulado en micropartículas (o "antígeno microencapsulado"), en las que el antígeno microencapsulado se incorpora de forma extrínseca a una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente.

15 Los procedimientos para absorber o atrapar antígenos en vehículos particulados son notorios en la técnica. Véase por ejemplo Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications (Justin Hanes, Masatoshi Chiba y Robert Langer. Polymer microspheres for vaccine delivery. En: Vaccine design. The subunit and adjuvant approach. Editores Michael F. Powell y Mark J. Newman, 1995 Plenum Press, Nueva York y Londres). Los vehículos particulados pueden presentar copias múltiples de un antígeno seleccionado al sistema inmunitario en un sujeto animal y promover la captura y retención de antígenos en nódulos linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígeno a través de la liberación de citocinas. 20 También se han descrito en la técnica vehículos particulados e incluyen por ejemplo los que se derivan de polímeros de polimetilmetacrilato, así como los que se derivan de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glucolidas), que se conocen como PLG. Los polímeros de polimetilmetacrilato no son biodegradables mientras que las partículas de PLG pueden ser biodegradables por hidrólisis aleatoria no enzimática de enlaces éster a ácidos láctico y glicólico que se excretan por rutas metabólicas normales.

25 También se han usado microesferas biodegradables para lograr la liberación controlada de vacunas. Por ejemplo puede lograrse una liberación continuada de antígeno durante un periodo prolongado. Dependiendo del peso molecular del polímero y la relación entre ácido láctico y glicólico en el polímero, un polímero de PLGA puede tener una velocidad de hidrólisis desde unos pocos días o semanas a varios meses o un año. Una liberación lenta controlada puede dar como resultado la formación de niveles elevados de anticuerpos similares a los que se observan tras inyecciones múltiples. De forma alternativa, puede lograrse una liberación pulsátil de antígenos de vacunas seleccionando polímeros con velocidades diferentes de hidrólisis. La velocidad de hidrólisis de un polímero normalmente depende del peso molecular del polímero y la relación entre ácido láctico y ácido glicólico en el polímero. Las micropartículas que están formadas por dos o más polímeros diferentes con velocidades variables de liberación de antígenos proporcionan liberaciones pulsátiles de antígenos e imitan los regímenes de vacunación de dosis múltiples.

30 De acuerdo con la presente invención, un antígeno, incluyendo cualquiera de los que se describen anteriormente, puede absorberse sobre un vehículo polimérico particulado, preferentemente un polímero de PLG, usando cualquier procedimiento conocido en la técnica (tal como el que se ejemplifica en el Ejemplo 17) para formar una preparación de antígeno microencapsulado. La preparación de antígeno microencapsulado se mezcla después y se dispersa en una emulsión submicrométrica de aceite en agua, emulsión que ha sido descrita anteriormente, para formar la composición de vacuna.

45 En una realización preferente, la presente invención proporciona una composición de vacuna que contiene un antígeno encapsulado en un polímero de PLG, en el que el antígeno microencapsulado está disperso de forma extrínseca en una emulsión de aceite en agua microfluidizada que está compuesta por aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN80, SPAN80 y solución salina y tiene un tamaño medio de gota inferior a 1,0 µm.

50 A continuación están los ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención en modo alguno.

55 **Ejemplo 1**

Preparación de una formulación de AMPHIGEN®

60 Se preparó una formulación de AMPHIGEN® en un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa se mezclaron 80 litros de solución de aceite de lecitina Drakeol, 116 litros de solución salina de Toxoide de ténanos, 1,2 litros de SPAN 80, y 2,8 litros de Tween 80 y se emulsionaron usando un emulsionador Ross. La solución de aceite de lecitina Drakeol contenía lecitina de soja al 25 % y aceite mineral al 75 %. El producto emulsionado se hizo recircular por el emulsionador Ross durante un mínimo de 5 volúmenes o un mínimo de 10 minutos. El producto emulsionado se almacenó a 2-7 °C durante un máximo de 24 horas para procesamiento adicional. La emulsión del tanque del emulsionador Ross se transfirió a un homogeneizador Gaulin y se homogeneizó durante 20 minutos a una presión de 31027,5 kPa. La solución de aceite de lecitina Drakeol al 40 % (en lo sucesivo "formulación de AMPHIGEN®" o "solución de AMPHIGEN®") se dispensó después en envases de carboxi polipropileno estériles. El dispensado se realizó dentro de un embudo de dispensado de clase 100 localizado en un ambiente controlado de clase 10.000. Los envases se almacenaron a 2-7 °C. Esta formulación de AMPHIGEN® se usó en los experimentos que se describen a continuación a no ser que se indique lo contrario.

70 **Ejemplo 2**

Mezclado primario mediante homogenización por mezclado ultrarrápido de la vacuna contra BVD.

75 El aparato usado para este procedimiento de homogenización se muestra en la **Figura 1**. Usando técnica aséptica o válvulas de cruce de vapor, se unió un frasco que contenía un antígeno de BVD Tipo I (una preparación vírica de

BVD Tipo I inactivada) al puerto de la parte inferior del vaso de mezclado. Después de completar la transferencia del volumen requerido del antígeno de BVD Tipo I, se sustituyó el frasco de BVD Tipo I por el envase que contenía una preparación vírica de BVD Tipo II inactivada (una preparación vírica de BVD Tipo II inactivado). Después de completar la transferencia de la cantidad requerida de un antígeno de BVD Tipo II, se unió el homogeneizador Ross al recipiente portátil y se inició la recirculación a RPM máximas (3300 rpm). La agitación del recipiente se mantuvo a velocidad media.

Usando técnica aséptica o válvulas de cruce de vapor, se unió un frasco que contenía Quil-A con una concentración de 50 mg/ml al homogeneizador al puerto en línea del vaso de mezclado. Se pasó una cantidad requerida de la solución de Quil-A al recipiente a través de succión en línea. Después de completar la transferencia de solución de Quil-A, se retiró el frasco. Del mismo modo, se transfirió una cantidad requerida de colesterol en solución de etanol (18 mg/ml) al vaso de mezclado. Subsiguientemente, se añadieron al vaso de mezclado una cantidad requerida de la formulación de AMPHIGEN®, solución de timerosol al 10 % y soluciones de dilución de medio de Eagle Modificado Básico ("BME").

Una vez se completaron las adiciones, se continuó mezclando durante otros 15 minutos. La formulación resultante se dividió en dosis alícuotas de 2 ml y representaba una vacuna de BVD con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada. Cada dosis de la vacuna contenía 500 µg de Quil-A, 500 µg de colesterol, formulación de AMPHIGEN® al 2,5 % y timerosol al 0,009 %. La concentración de antígeno para las dos cepas diferentes de BVD se determinó en términos de la valoración de ELISA para gp53.

Ejemplo 3

Mezclado secundario por microfluidización

La **Figura 2** ilustra el procedimiento usado para la mezcla secundaria mediante microfluidización. El microfluidizador se esterilizó al vapor. Primero se instaló la cámara del módulo de procesamiento auxiliar en la unidad y se instaló la cámara del blanco en la segunda posición de la cámara. Se conectó el vaso que contenía la vacuna de BVD con todos los coadyuvantes preparada como se describe en el Ejemplo 2 al microfluidizador uniendo una línea de transferencia desde la válvula de drenaje del vaso suministrador a la entrada del microfluidizador. Se conectó gas nitrógeno a la entrada del filtro de aire del vaso suministrador y se ajustó la presión de vaso a 138 +/- 34 kPa. La válvula de drenaje del vaso de recogida se conectó a la línea de transferencia de la salida del microfluidizador. Después de realizar todas las conexiones necesarias, se abrieron las válvulas y se inició la microfluidización con una presión de trabajo de 68.950 +/- 3.447,5 kPa. El contenido completo de la vacuna se pasó a través del microfluidizador una vez y se recogió en la cámara post-microfluidización. Esta preparación se dividió en dosis alícuotas de 2 ml y representa la vacuna de BVD con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada.

Ejemplo 4

Preparación de una composición de vacuna mediante mezclado en banco

La formulación de AMPHIGEN® preparada como se describe en el ejemplo 1 se diluyó al 2,5 % añadiendo antígenos de BVD y el diluyente. La solución resultante se mezcló en el banco usando una barra de agitación en lugar de un homogeneizador. La preparación final contenía la siguiente composición: antígenos de BVD Tipo 1 y Tipo 2, formulación de AMPHIGEN® al 2,5 % (que contiene aceite, lecitina, SPAN® y TWEEN®, como se describe en el Ejemplo 1) y solución salina. TWEEN 80 y SPAN 80 están presentes en la preparación de vacuna final a 0,18 % y 0,08 % en volumen respectivamente.

Ejemplo 5

Comparación de una distribución de tamaño de gotas entre las preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada y no microfluidizada

Se usaron la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada preparada como se describe en el Ejemplo 2, la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada preparada como se describe en el Ejemplo 3 y la preparación preparada por mezcla en banco como se describe en el Ejemplo 4 para comparar el tamaño de gota de las preparaciones de vacunas. Se añadieron 2 ml de la muestra de cada una de las preparaciones a un difractor malvern 2000 Laser y se determinó la distribución del tamaño de gota. Como se muestra en la **Figura 3**, los resultados indican que la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada tenía el volumen de partícula máximo alrededor de 0,1 micras mientras que la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada tenía el volumen máximo de distribución de partículas alrededor de 1 micra.

Ejemplo 6

Reducción en la separación de fases de la vacuna.

Se compararon tres preparaciones de vacuna diferentes: la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada preparada como se describe en el Ejemplo 2, la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada preparada como se describe en el Ejemplo 3 y la vacuna preparada por mezcla en banco como se describe en el Ejemplo 4, para determinar sus propiedades de separación de fases después de almacenamiento prolongado. Todas estas preparaciones se dejaron reposar a 4 °C durante aproximadamente un mes y la separación de fases se controló en términos de aparición de una capa cremosa en la parte superior de las preparaciones de vacunas. Como se muestra en la **Figura 4**, no se produjo separación de fases en la preparación con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada cuando se comparó con las otras dos preparaciones.

Ejemplo 7**Preparación de vacuna para ganado vacuno microfluidizada y no microfluidizada contra el virus de la diarrea vírica bovino**

Se incorporó de forma intrínseca el antígeno vírico del virus de la diarrea bovino a la formulación de AMPHIGEN® mediante microfluidización. El término "incorporado de forma intrínseca" se refiere al procedimiento por el cual se añadió el antígeno a la formulación de AMPHIGEN® antes de la microfluidización. El antígeno se sometió a las fuerzas físicas del procedimiento de microfluidización junto con los componentes de la formulación de coadyuvante. En el grupo control no microfluidizado, la preparación de antígeno se dispersó en la formulación de AMPHIGEN® mediante mezclado.

La composición final de las preparaciones control y microfluidizada era la siguiente: BVD tipo I con una valoración ELISA tras la inactivación de 2535 UR/dosis para gp53, BVD Tipo II con una valoración ELISA tras la inactivación de 3290 UR/dosis para gp53, Quil-A con la concentración de 1,25 mg/dosis, colesterol con una concentración de 1,25 mg/dosis, la formulación de AMPHIGEN® con una concentración final de 2,5 % y timerosol con una concentración final de 0,009 %. La dosis de la vacuna era de 5 ml.

Ejemplo 8**Estabilidad a largo plazo de antígenos víricos de BVD incorporados de forma intrínseca en la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada**

Este experimento se realizó para determinar la estabilidad del antígeno incorporado de forma intrínseca durante el almacenamiento a largo plazo. Se incorporó de forma intrínseca el antígeno vírico de BVD Tipo II inactivado en la formación AMPHIGEN® durante el procedimiento de microfluidización para obtener una preparación de vacuna microfluidizada (A907505). Otras tres preparaciones de vacunas que contenían el mismo antígeno en una formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada (A904369, A904370 y A904371) sirvió como control. En las preparaciones no microfluidizadas, el antígeno se mezcló con formulación de AMPHIGEN® y se mezcló usando un homogeneizador Ross. Las cuatro preparaciones de vacunas se almacenaron a 4 °C durante dos años. En momentos diferentes durante el almacenamiento (0, 6, 12 o 24 meses) se usaron las cuatro formulaciones para vacunar vacas de tres meses de edad.

Los días 0 y 21 se vacunaron vacas de tres meses de edad por vía subcutánea con una formulación de vacuna de 2 ml. El suero de los animales vacunados se extrajo el día 35 y se midió la respuesta serológica a la vacuna en términos de la valoración de anticuerpo mediante un ensayo ELISA de BVDV-E2. Como se muestra en la **Figura 5**, la preparación de vacuna microfluidizada mostró una valoración de anticuerpos más elevada en todos los tiempos analizados (0, 6, 12 y 24 meses), sugiriendo que no se pierde la estabilidad de la preparación de antígeno durante la incorporación intrínseca del antígeno durante el procedimiento de microfluidización. Además, se encontró también de forma sorprendente que la preparación de vacuna microfluidizada indujo una respuesta inmunitaria potenciada en todos los tiempos.

Ejemplo 9**Reducción del aumento de temperatura rectal inducida por la vacuna después de la microfluidización**

Se usaron las preparaciones de vacunas microfluidizada y no microfluidizada tal como se han descrito en el Ejemplo 7 para vacunar el ganado vacuno el día cero y se controló la temperatura rectal durante el periodo desde un día antes de la vacunación hasta cuatro días después de la vacunación. La dosis de la vacuna era de 2 ml. Los grupos se vacunaron con una dosis única o doble de la vacuna. Se midieron las temperaturas rectales y se registraron diariamente desde el Día 1 hasta el Día 4 inclusive. Se midieron las temperaturas rectales el día 0 antes de la administración del artículo de experimentación.

Como se muestra en la **Figura 6**, los resultados indican que se dio un aumento brusco en la temperatura rectal aproximadamente en las 24 horas después de la vacunación en los animales vacunados con una dosis única o doble de la formulación de vacuna no microfluidizada. Sin embargo, en los animales vacunados con formas microfluidizadas de la vacuna, el aumento de la temperatura rectal tras la vacunación fue mínima y significativamente menor que en los animales vacunados con la formulación no microfluidizada (**Figura 6**).

Ejemplo 10**El volumen de reacción en el sitio de la inyección se resolvió más rápido cuando se vacunó con formulaciones de vacunas microfluidizadas**

Se usaron las preparaciones de vacunas microfluidizadas y no microfluidizadas preparadas como se describe en el Ejemplo 7 para vacunar el ganado vacuno el día cero. Los animales incluidos en este estudio eran ganado vacuno de carne híbridos. Había tres animales en cada uno de los grupos de tratamiento con placebo (T01 y T02). Había seis animales en cada uno de los grupos T03 a T06. La dosis de vacuna era de 2 ml y los grupos se vacunaron con una o dos dosis de la vacuna el día cero. En día 0, se administró el artículo de experimentación en el lado derecho del cuello. Los animales que recibieron la dosis doble (4 ml) del artículo de experimentación (T02, T04 y T06) recibieron la dosis doble completa en forma de inyección única en un lado. La observación de los sitios de inyección, incluyendo la estimación del tamaño de reacción en el sitio de inyección se realizó en el lado derecho del cuello del Día 0 al Día 4 inclusive, y los Días 6, 9 y 14. El Día 0 se observaron los sitios de inyección antes de la administración de los artículos de experimentación. Los grupos vacunados con una o dos dosis del placebo no mostraron aumento significativo del volumen de reacción en el sitio de inyección y por lo tanto esos datos no se muestran en la Figura 7. En el caso de la formulación de vacuna no microfluidizada, se dio un aumento proporcional del volumen de reacción

en el sitio de inyección entre la vacunación con una dosis y la de dos dosis. Por otra parte, en el caso de la formulación de vacuna microfluidizada, aunque la dosis única indujo un volumen de reacción en el sitio de inyección mayor, la inyección con la segunda dosis no provocó un aumento mayor. Sin embargo, en el caso de los animales a los que se inyectó formulación de vacuna microfluidizada, el volumen de reacción en el sitio de inyección se resolvió con una velocidad mayor cuando se comparó con el de los animales inyectados con una formulación de vacuna no microfluidizada. Estos resultados se muestran en la **Figura 7**.

Ejemplo 11

10 Preparación de preparaciones de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada con antígenos víricos BVD y Leptospira incorporados de forma intrínseca y moléculas inmunoestimuladoras tales como Quil A y DDA

Se formuló Leptospira de la cepa hardjo-bovi CSL inactivado en formalina en el coadyuvante apropiado con recuentos directos de aproximadamente $1,4 \times 10^9$ organismos/dosis de 5 ml. La cepa de Leptospira Pomna T262 inactivada en formalina se formuló a aproximadamente 2400 Unidades nefalómeras/dosis de 5 ml. Las unidades nefalómeras se calcularon basándose en la medición nefalométrica de fluido de fermentación procesado previamente. El virus BVD Tipo 1 se formuló con una valoración de Elisa E2 de aproximadamente 3000 Unidades relativas/dosis de 5 ml. El virus BVD Tipo 2 se formuló con una valoración por ELISA E2 de aproximadamente 3500 Unidades relativas/dosis de 5 ml. La unidad relativa se calculó basándose en la valoración por ELISA E2 de fluido volumétrico tras la inactivación antes del ensamblado. Se usaron tanto Quil-A como colesterol con una concentración de 0,5 mg por dosis. Se usaron timerosol y la formulación de AMPHIGEN® con la concentración final del 0,009 % y el 2,5 % respectivamente. Se usó hidróxido de aluminio (Rehydragel Lv) con una concentración final del 2,0 %. Cuando se usó DDA como inmunomodulador, DDA se incluyó en la formulación de AMPHIGEN®. La formulación de AMPHIGEN® (es decir, la solución madre de Drakeol-lecitina al 40 %) contenía 1,6 mg/ml de DDA y, cuando se diluía de forma apropiada, la preparación de vacuna final contenía el 2,5 % de formulación de AMPHIGEN® y 0,1 mg/ml de DDA.

En la preparación de diferentes formulaciones de vacunas se añadieron fracciones de BVD, Leptos, Quil-A, colesterol, timerosol, la formulación de AMPHIGEN® y solución salina como un agente diluyente a un homogeneizador Silverson y se mezcló durante 15 minutos a 10.000 ± 500 rpm. Después se microfluidizaron los componentes con un tamiz de 200 micrómetros a 68.950 kPa.

Cuando la formulación de la vacuna contenía hidróxido de aluminio, la microfluidización se llevó a cabo sin hidróxido de aluminio. Cuando se completó la microfluidización, se añadió hidróxido de aluminio y se mezcló con una barra de agitación hasta la mañana siguiente a 4 °C.

Ejemplo 12

40 Preparación de vacuna de virus BVD para estudios de exposición

La preparación de vacuna que se usó en este experimento contenía antígenos del virus BVD Tipo 1 y el virus BVD Tipo 2. Se usó antígeno BVD1-5960 con una valoración después de inactivación por ELISA de 2535 UR/dosis para gp53. Se usó el antígeno BVD2-890 con una valoración después de inactivación por ELISA de 3290 UR/dosis para gp53. Se usaron Quil-A y colesterol a la concentración de 0,5 mg/ml. Se usaron timersol y la formulación de AMPHIGEN® con una concentración final de 0,009 % y 2,5 % respectivamente. Cuando se usó DDA como inmunomodulador, DDA se incluyó en la formulación de AMPHIGEN®. La solución madre de AMPHIGEN® (solución de Drakeol-lecitina al 40 %) contenía cantidades variables de DDA y, cuando se diluía de forma adecuada, la preparación final de vacuna contenía el 2,5 % de formulación de AMPHIGEN® y concentraciones de DDA que variaban en el intervalo de 0,5 mg/dosis a 2,0 mg/dosis. Se usó gel de aluminio (Rehydragel-LV) con una concentración final de 2 %. Se usó GPI-0100 en el intervalo de 2, 3 y 5 mg/dosis.

Todos los componentes se añadieron a un homogeneizador Silverson y se mezclaron durante 15 minutos a 10.500 rpm y después se microfluidizaron pasando por una cámara de 200 micras con 68.950 kPa. Cuando la preparación de la vacuna contenía hidróxido de aluminio, la microfluidización se llevó a cabo sin hidróxido de aluminio. Cuando se completó la microfluidización, se añadió hidróxido de aluminio y se mezcló con una barra de agitación hasta la mañana siguiente a 4 °C.

Ejemplo 13

Protección contra exposición a Leptospira después de vacunación con una formulación microfluidizada de vacuna con Amphigen con antígenos de Leptospira	
Tabla 1 – Grupos de tratamiento	
Grupo de tratamiento	Composición del coadyuvante
T01	Solución salina
T02	Quil-A, colesterol y la formulación de AMPHIGEN® (QAC)
T03	Quil-A, colesterol, la formulación de AMPHIGEN® y AIOH (QAC-AIOH)
T04	DDA, colesterol y la formulación de AMPHIGEN® (DDA)
T05	DDA, colesterol, la formulación de AMPHIGEN® y AIOH (DDA-AIOH)

La Tabla 1 muestra la composición de las formulaciones de coadyuvante en las preparaciones de vacunas analizadas en este estudio. Las preparaciones de vacunas se prepararon como se describe en el Ejemplo 11. Había seis animales en cada grupo. En este estudio se usaron novillos de carne híbridos de aproximadamente siete meses

de edad. La vacunación se realizó el Día 0 y el Día 21 por vía subcutánea con un volumen de vacuna de 5 ml. La exposición se realizó con L. Hardjo-bovis cepa 203 de NADC (Nacional Agricultural Disease Center). La exposición se realizó durante los días 57-59 con un inóculo de 1 ml. La exposición se administró de forma conjunta ocular y por vía vaginal. El material de exposición contenía $5,0 \times 10^8$ unidades de leptospira/ml. La orina se recogió 5 semanalmente para realizar un cultivo de leptospira, FA y PCR. La recogida de los riñones se realizó durante los días 112 y 113.

Tabla 2 – Resultados del estudio de exposición a Leptospira

Tratamiento	Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez de Leptospira en orina y riñón por cultivo	Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez de Leptospira en orina y riñón por FA	Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez de Leptospira en orina y riñón por PCR	Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez de Leptospira en orina y riñón en todos los ensayos
Solución salina	100	83,3	83,3	100
QAC	0	0	0	0
QAC/AIOH	0	50,0	0	50,0
DDA	0	0	0	0
DDA/AIOH	0	33,3	16,7	50,0

10 La Tabla 2 muestra los datos del estudio de exposición a Leptospira. Para determinar el porcentaje de infección por Leptospira en el animal expuesto, se usaron los siguientes criterios. Si el cultivo de riñón era positivo sólo en una muestra, se considera que el animal es Leptospira positivo. Si un animal es positivo sólo en una muestra para FA o PCR, se considera que el animal es negativo. Si la muestra es positiva para FA y PCR sólo en una muestra, se 15 considera que es Leptospira positivo.

Los resultados que se muestran en la Tabla 2 indican que la duración de la eliminación urinaria en todos los grupos vacunados fue significativamente más corta basándose en los tres ensayos. En lo que se refiere a la colonización 20 urinaria y renal, las eficacias de las formulaciones que contenían QAC y DDA sin AIOH fueron comparables. AIOH no mejoró e incluso redujo las eficacias de las vacunas que contenían QAC o DDA en este estudio de exposición.

Tabla 3 – Intervalo de valoración de aglutinación microscópica el día de valoración media geométrica máxima antes de la exposición (Día 35)

Tratamiento	L. Hardjo	L. pomona
Solución salina	<20	<20
QAC	160 – 640	1280 – 10240
QAC/AIOH	160 – 2560	8 – 10240
DDA	40 – 1280	320 – 2560
DDA/AIOH	320 – 640	1280 – 5120

Se detectaron respuestas serológicas contra ambos antígenos de Leptospira de la formulación de vacuna en los animales vacunados y la respuesta máxima se notó el Día 35. No existió correlación entre la respuesta serológica y la protección contra la exposición. La presencia de gel de aluminio en la formulación de vacuna redujo el nivel de 30 protección aunque potenció la respuesta serológica por la presencia de gel de aluminio en la vacuna.

Ejemplo 14

35 **Provocación de respuesta inmunitaria al antígeno vírico de BVD y protección contra la exposición al virus BVD Tipo 2 tras la inmunización con una preparación de vacuna microfluidizada que contiene formulación de AMPHIGEN® y DDA.**

En este experimento se usaron terneras seronegativas de cuatro a siete meses de edad. Había seis grupos 40 diferentes y cada grupo tenía diez animales (Tabla 4). El Día 0 y el Día 21 cada animal recibió una dosis subcutánea de 2 ml de la vacuna o placebo en el lado del cuello aproximadamente a medio camino entre la escápula y la cabeza.

Tabla 4 – Grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	Composición del coadyuvante
T01	Solución salina
T02	Quil-A, formulación de AMPHIGEN® y colesterol
T03	Formulación de AMPHIGEN®, colesterol, DDA (0,5 mg/dosis) y AIOH
T04	Formulación de AMPHIGEN®, colesterol y DDA (0,5 mg/dosis)
T05	Formulación de AMPHIGEN®, colesterol y DDA (1,0 mg/dosis)
T06	Formulación de AMPHIGEN®, colesterol y DDA (2,0 mg/dosis)

Se administró una dosis de 5 ml de preparación de exposición del virus (aproximadamente 2,5 ml por fosa) por vía intranasal el día 44 del estudio. En este estudio se usó virus BVD Tipo 2, cepa aislada nº 24515 (Cepa Ellis), lote nº 46325-70 no citopático como cepa de exposición. Se valoraron muestras retenidas de material de exposición (dos copias por valoración) en el momento del inicio de la exposición e inmediatamente después de completarlo. La valoración de virus vivos media por dosis de 5 ml era de 5,3 log₁₀ DIAF₅₀/5 ml antes de la exposición y 5,4 log₁₀ DIAF₅₀/5 ml después de la exposición (DIAF es equivalente a DICT₅₀).

Se realizó un seguimiento de los animales todos los días desde el Día 3 al día 58. Se asignaron puntuaciones de enfermedad clínica de 0, 1, 2, o 3 basándose en los signos clínicos atribuibles a la infección por BVD 2 para cada animal los Días 42 a 58. Las puntuaciones del Día 44 se registraron antes de la exposición. Se extrajeron muestras de sangre (dos tubos de separación de suero de 13 ml, SST) de cada animal los Días 0, 21, 35, 44 y 58 para determinar las valoraciones en suero de anticuerpos de neutralización de los virus BVD Tipo 1 y BVD tipo 2.

Se extrajeron muestras de sangre de cada animal del Día 42 al Día 58, inclusive, y se determinó la presencia de virus BVD en la capa leucocitaria. El Día 44 se obtuvieron muestras antes de la exposición.

Se extrajeron de cada animal muestras de sangre (un tubo de EDTA de 4 ml) para determinar la leucocitometría el Día 42 al Día 58, inclusive. El Día 44 se obtuvieron muestras antes de la exposición.

Leucopenia se definió como un descenso del 40 % o mayor de la leucocitometría desde el nivel inicial (leucocitometría anterior a la exposición media de dos días anteriores y del día de la exposición).

Se usaron las puntuaciones de enfermedad clínica para definir el estado de enfermedad de la forma siguiente; si la puntuación es ≤ 1, entonces enfermedad = no; si la puntuación es > 2, entonces enfermedad = si.

Como se muestra en las Tablas 5 y 6, los grupos que se vacunaban con vacunas que contenían antígenos víricos de BVD junto con la formulación de AMPHIGEN®, Quil A o DDA y microfluidizadas, se seroconvirtieron con valoraciones de neutralización de virus en suero significativas para los virus BVD Tipo 1 y BVD Tipo 2. En esos grupos hubo también una reducción significativa del porcentaje de animales que mostraban viremia después de la exposición, mientras que en el grupo de control 100 % de los animales mostraban viremia (Tabla 7). Además, en los grupos vacunados la frecuencia de la enfermedad se redujo también de forma significativa (Tabla 8). De forma similar, el porcentaje de animales que mostraban leucopenia se redujo también en los grupos vacunados y la reducción de la leucopenia fue más significativa en el grupo que contenía DDA que en el grupo que contenía Quil A (Tabla 9). En el grupo de control se dio un descenso significativo de la subida de peso comparado con los grupos vacunados. (Tabla 10).

Serología

Antes de la vacunación el Día 0, todos los animales del estudio eran seronegativos (SVN < 1:2) para anticuerpos contra virus de BVD Tipos 1 y 2 (no se muestran los datos). Catorce días después de la segunda vacunación (Día 35) todos los animales a los que se administró placebo (T01) seguían siendo seronegativos para anticuerpos contra el virus BVD Tipos 1 y 2; y los animales vacunados con los ITA (Antígeno en experimentación de investigación) (T02, T03, T04, T05 y T06) eran seropositivos (SVN ≥ 1:8) para anticuerpos contra el virus BVD, Tipos 1 y 2. Un animal al que se administró la vacuna con coadyuvante de formulación de AMPHIGEN® a 2 mg/dosis de DDA tenía una valoración de SVN de 3 para anticuerpos contra el virus BVD Tipo 2 el Día 35 (no se muestran los datos).

Antes de la exposición el Día 44, todos los controles (T01) excepto uno, eran seronegativos (SVN <1:2) para anticuerpos contra el virus BVD Tipos 1 y 2 (no se muestran datos). Uno de los controles (nº 2497) era seropositivo (SVN = 10) para anticuerpos contra el virus BVD Tipo 1 y seronegativo para anticuerpos contra el virus BVD Tipo 2. Catorce días después de la exposición, todos los animales del estudio eran seropositivos para anticuerpos contra el virus BVD Tipos 1 y 2.

Tabla 5. Media geométrica de las valoraciones de neutralización en suero de virus BVD Tipo 1

Tratamiento		Media geométrica de valoraciones de SVN contra el virus BVD Tipo 1 en el Día del estudio				
		0	21	35	44	58
T01	Solución salina	<2	<2	<2	<2	23,9
T02	Amphigen, Quil A	<2	39,1	19824,5	14018,2	27554,5
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, AI	<2	51,8	32204,8	22381,1	23170,4
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	<2	27,0	14512,4	8932,0	21996,2
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	<2	26,7	11585,2	8194,6	20882,0
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	<2	23,5	8778,7	6769,3	16961,1

Tabla 6. Media geométrica de las valoraciones de neutralización en suero de virus BVD Tipo 2

Tratamiento		Media geométrica de valoraciones de SVN contra el virus BVD Tipo 1 en el Día del estudio				
		0	21	35	44	58
T01	Solución salina	<2	<2	<2	<2	522,0
T02	Amphigen, Quil A	<2	8,9	2272,4	2048,2	24833,6
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	<2	9,5	3565,7	2702,2	20881,8
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	<2	4,1	1260,7	989,1	18496,2
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	<2	6,4	1398,8	1453,9	30047,8
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	<2	7,7	1673,2	1428,9	16384,0

5 Tabla 7. Aislamiento de virus BVD después de la exposición

Tratamiento		Aislamiento de virus BVD		
		Días del estudio	Frecuencia (%) de animales con viremia	Media por MC de Días de viremia
T01	Solución salina	47 a 58	10/10 (100,0)	10,4
T02	Amphigen, Quil A	50 a 53	1/10 (10,0)	0,4
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	---	0/10 (0,0)	0,0
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	48, 50 a 52, 57	3/10 (30,0)	0,5
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	49 a 51	2/10 (20,0)	0,4
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	48 a 52	2/10 (20,0)	0,5

Tabla 8. Signos clínicos de enfermedad por BVD después de la exposición

Tratamiento		Frecuencia (%) con enfermedad	Frecuencia (%) observaciones con signos clínicos de enfermedad por BVD				Total Obs.
			0	1	2	3	
T01	Solución salina	9/10 (90,0)	75 (46)	63 (37,5)	29 (17,3)	1 (0,6)	168
T02	Amphigen, Quil A	1/10 (10,0)	105 (61,8)	63 (37,1)	2 (1,2)	0 (0)	170
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	2/10 (20,0)	99 (58,2)	67 (39,4)	4 (2,4)	0 (0)	170
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	0/10 (0,0)	118 (69,4)	52 (30,6)	0 (0)	0 (0)	170
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	0/10 (0,0)	101 (59,4)	69 (40,6)	0 (0)	0 (0)	170
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	0/10 (0,0)	104 (61,2)	66 (38,8)	0 (0)	0 (0)	170

10

Tabla 9. Leucopenia tras la exposición

Tratamiento		Leucopenia	
		Frecuencia (%) de animales leucopénicos	Media por MC de Días de leucopenia
T01	Solución salina	10/10 (100,0)	7,8
T02	Amphigen, Quil A	6/10 (60,0)	1,2
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	2/10 (20,0)	0,2
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	4/10 (40,0)	0,8
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	3/10 (30,0)	0,9
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	2/10 (30,0)	0,5

Tabla 10. Peso corporal y subida de peso corporal durante el estudio

Tratamiento		Peso corporal medio (kg.) en el Día del estudio				Subida de peso (kg)
		-1	43	50	58	
T01	Solución salina	171,46	219,95	222,72	216,32	44,86
T02	Amphigen, Quil A	194,14	238,82	247,98	262,63	68,49
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	186,20	233,33	242,31	262,63	76,43
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	169,51	214,24	223,44	244,08	74,57
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	162,80	204,76	217,23	230,02	67,22
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	185,07	232,83	242,18	254,15	68,77

Aislamiento de virus

5 Durante el periodo de exposición (Días 44 a 58), los diez animales del grupo control (T01) sufrían viremia (se aísla virus BVD uno o más días). En los grupos a los que se había administrado ITA, la frecuencia de los animales con viremia era uno, cero, tres, dos y dos en cada grupo de diez (T02, T03, T04, T05 y T06, respectivamente). La diferencia entre el control y los grupos a los que se había administrado los ITA era estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$). La media por mínimos del número de días de viremia era también significativamente mayor (10,4 días) para el control comparado con los grupos a los que se había administrado los ITA (0,0 a 0,5 días).

Enfermedad Clínica

15 Se consideró que los animales con puntuaciones de señales clínicas de 2 o 3 demostraban signos de enfermedad por BVD. La frecuencia de los animales con signos clínicos de enfermedad por virus BVD era nueve de diez en el control (T01) y uno, dos, cero, cero y cero de diez en cada uno de los grupos a los que se administraron los ITA (T02, T03, T04, T05 y T06 respectivamente). La diferencia entre el control y los grupos a los que se administraron los ITA era estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Leucopenia

20 Durante el periodo de exposición (Días 44 a 58), los diez animales del control (T01) sufrían leucemia (una reducción del 40 % en la leucocitometría comparada con la inicial antes de la exposición, Días 42-44). La frecuencia de animales con leucemia era seis, dos, cuatro, tres y dos de los diez animales de cada uno de los grupos a los que se administraron los ITA (T02, T03, T04, T05 y T06 respectivamente). La diferencia entre el control y los grupos a los que se administró la vacuna que tenía la formulación de AMPHIGEN® como coadyuvante a 0,5 mg/dosis e hidróxido de aluminio (T03) era estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$). La media por mínimos cuadrados del número de días de leucemia era significativamente mayor (7,8 días) para el control comparado con los grupos a los que se administraron los ITA (0,2 a 1,2 días).

Ejemplo 15**Provocación de respuesta inmunitaria al antígeno vírico de BVD y protección contra la exposición al virus BVD Tipo 2 tras la inmunización con una formulación de vacuna microfluidizada que contiene GPI-0100.**

35 Se siguió un grupo de condiciones experimentales como se describe en el Ejemplo 14 y se realizó una comparación directa entre Quil A y GPI-0100. Como se muestra en las Tablas 11 y 12, los animales vacunados con antígenos de BVD en la preparación de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada que contenía Quil-A o GPI-0100 tenía una valoración de anticuerpos significativa para los virus BVD Tipo 1 y BVD Tipo 2. La valoración de anticuerpos para el virus BVD Tipo 1 era muy superior a la de virus BVD Tipo 2. Sin embargo, la exposición subsiguiente a virus BVD Tipo 2 demostró una fuerte protección y se redujo significativamente la incidencia de la enfermedad en las terneras vacunadas con la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada que contenía GPI-0100 (Tablas 13-15).

Tabla 13. Aislamiento de virus BVD después de la exposición

Tratamiento		Aislamiento de virus BVD	
		Frecuencia (%) de animales con viremia	Media por MC de Días de viremia
T01	Solución salina	10/10 (100,0)	8,4
T02	Amphigen, Quil A	3/10 (30,0)	0,3
T03	Amphigen, 2 mg de GPI-0100 AIOH	0/10 (0,0)	0,0
T04	Amphigen, 2 mg de GPI-0100	1/10 (10,0)	0,1
T05	Amphigen, 3 mg de GPI-0100	3/10 (30,0)	0,3
T06	Amphigen, 5 mg de GPI-0100	2/10 (20,0)	0,2

Tabla 14. Signos clínicos de enfermedad por BVD después de la exposición

5

Tratamiento		Frecuencia (%) con enfermedad	Frecuencia (%) observaciones con una puntuación de enfermedad clínica de			Total Obs.
			0	1	2	
T01	Solución salina	5/10 (50,0)	103 (60,6)	55 (32,4)	12 (7,1)	170
T02	Amphigen, Quil A	5/10 (50,0)	115 (67,6)	48 (28,2)	7 (4,1)	170
T03	Amphigen, 2 mg de GPI-0100 AIOH	0/10 (0,0)	128 (75,3)	42 (24,7)	0 (0)	170
T04	Amphigen, 2 mg de GPI-0100	0/10 (0,0)	124 (72,9)	46 (27,1)	0 (0)	170
T05	Amphigen, 3 mg de GPI-0100	0/10 (0,0)	104 (61,2)	66 (38,8)	0 (0)	170
T06	Amphigen, 5 mg de GPI-0100	0/10 (0,0)	128 (75,3)	42 (24,7)	0 (0)	170

Tabla 15. Leucopenia tras la exposición

10

Tratamiento		Leucopenia	
		Frecuencia (%) de animales leucopénicos	Media por MC de Días de leucopenia
T01	Solución salina	9/10 (90,0)	8,7
T02	Quil A	6/10 (60,0)	1,6
T03	2 mg de GPI-0100, AIOH	7/10 (70,0)	2,6
T04	2 mg de GPI-0100	4/10 (40,0)	1,5
T05	3 mg de GPI-0100	7/10 (70,0)	2,6
T06	5 mg de GPI-0100	8/10 (80,0)	2,9

En conclusión, se demostró la seguridad de cada vacuna por la ausencia de reacciones adversas de mortandad en los animales vacunados. La potencia de cada vacuna se demostró por seroconversión (valoraciones de anticuerpos de SVN contra BVD-1 y BVD-2 >1:8) en 100 % de los animales vacunados. Se demostró la resistencia satisfactoria a la exposición por la vacuna con 2 mg de GPI-0100 sólo como coadyuvante.

15

Ejemplo 16

Preparación de vacuna que contiene antígeno microencapsulado en emulsión microfluidizada de aceite en agua

20

Se añadieron tres gramos de Trehalosa (Fluka) a agua para obtener una solución madre de 333 mg/ml de solución de Trehalosa. Se añadió antígeno PauA recombinante solubilizado en solución de SDS al 0,8 % (SDS/rPauA) a la solución de Trehalosa para obtener una concentración final de 494 µg de rPauA/ml. En la siguiente etapa se disolvieron 10 gramos de ácido polilactidaglicólico (PLG-Resomer RE 503H, Boehringer Ingelheim) en 200 ml de cloruro de metileno (MeCl₂). La solución resultante de PLG/MeCl₂ se combinó con la solución de SDS-rPauA/trehalosa preparada en la primera etapa. La solución combinada se sometió a microfluidización usando Microfluidizador (de Microfluidics Modelo M110EH) y la preparación microfluidizada se desecó por pulverización usando un secador por pulverización Temco Modelo SD-5). El material desecado por pulverización se recogió usando un tamiz de 500 micrómetros.

25

30

La concentración de rPauA en este material desecado por pulverización se cuantificó usando un análisis por transferencia Western. Se disolvieron 1,04 mg de material desecado por pulverización en 50 µl de acetona y se centrifugó a 13.200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante. Las fracciones de sobrenadante y de sedimento se secaron en una campana de seguridad biológica durante 2,5 horas. Se resuspendió el sedimento en 47,43 µl de solución de muestra (25 µl de tampón de muestra + 10 µl de agente reductor + 65 µl de agua). La fracción de sobrenadante desecado se resuspendió con 20 µl de solución de muestra. En el análisis Western se usó PauA purificado como patrón para cuantificar el contenido de rPauA del material desecado por pulverización.

Se preparó una solución madre de manitol al 20 % disolviendo 100 gramos de manitol (Sigma) en 500 ml de agua para inyectables (WFI). La solución se calentó a 40 °C con placa calefactora/agitador y se enfrió a 30 °C. La solución se esterilizó por filtración con un filtro estéril de 0,22 micras (Millipore). Se preparó una solución de carboximetilcelulosa al 2,5 % disolviendo 12,5 gramos de carboximetilcelulosa (Sigma) en 500 ml de WFI y se mezcló hasta la mañana siguiente a 4 °C. La solución se sometió a autoclave a 121 °C.

El polvo resultante de la desecación por pulverización se reconstituyó en una solución que contenía manitol al 5 %, carboximetilcelulosa al 0,3 % y timerosol 1:5000. La solución final se dividió en alícuotas en viales de 3 ml y se liofilizó usando un Lyophilizer (USIFROID). El polvo liofilizado representa el rPauA microencapsulado. El antígeno de subunidad proteica microencapsulado se resuspendió en 2 ml de emulsión de aceite en agua microfluidizada que contenía una formulación de AMPHIGEN® (tal como la emulsión microfluidizada que se describe en el Ejemplo 20) y que se usa como vacuna.

Ejemplo 17

Preparación de una formulación de vacuna microfluidizada que contiene antígeno bacteriano de células enteras y antígeno de proteína recombinante en emulsión de aceite en agua

Se prepararon dos preparaciones de vacunas que contenían proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante y células bacterianas de *Escherichia coli*, se añadieron de forma intrínseca a emulsiones de aceite en agua como se describe en los Ejemplos 2 y 3. El antígeno PauA recombinante estaba en una concentración de 100 µg por dosis y las células de *E. coli* daban un recuento final de 4×10^9 por dosis. Las composiciones de coadyuvantes en emulsión de las dos formulaciones de vacuna se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Formulaciones de vacunas que contienen tanto proteína recombinante como células enteras de *E. coli*

Tratamiento	Antígeno	Adyuvante
T01	Placebo	Solución salina
T02	Pau A/ <i>E. coli</i>	SEAM-14
T03	Pau A/ <i>E. coli</i>	Amphigen al 2,5 %, 0,5 mg de GPI-0100, 0,5 mg de colesterol
T04	Pau A/ <i>E. coli</i>	Amphigen al 2,5 %, 0,5 mg de bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDA), 0,5 mg de colesterol

Ejemplo 18

Respuesta inmunitaria a vacuna microfluidizada que contiene rPauA y agentes bacterianos de células enteras en emulsión de aceite en agua

En este experimento se usaron vacas lecheras maduras. Los animales estaban al final de su primera o segunda lactancia en el momento de la admisión. Se administraron por vía subcutánea 2 ml de cada formulación de vacuna tres veces, una en el momento de secado (D - 0), 28 días después (D = 28) y de nuevo 4 a 10 días después del parto (C + 4 - C+10). La primera y tercera dosis se administraron en el lado izquierdo del cuello y la segunda se administró en el lado derecho del cuello. Se extrajo sangre antes de cada vacunación y aproximadamente 14 días y 32 días después de la tercera vacunación. La valoración de anticuerpos para *E. coli* y el antígeno rPauA se determinaron mediante ELISA. Como se muestra en la **Figura 8**, los resultados indican que la valoración de anticuerpos para rPauA era superior en el grupo vacunado con la formulación de vacuna que contiene GPI-0100 como inmunoestimulante y era máxima el día 70 después de la vacunación inicial. La valoración de anticuerpos para antígeno contra *E. coli* se muestra en la **Figura 9**. La valoración de anticuerpos contra antígeno de *E. coli* era comparable en ambas formulaciones de vacunas, aunque la presencia de GPI-0100 como inmunoestimulante indujo una valoración de anticuerpos relativamente mayor comparada con la formulación con DDA como inmunoestimulante.

Ejemplo 19

Análisis de actividad viricida de las preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada

Para determinar si la microfluidización inactiva el virus, se determinó la actividad viricida de tres preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada. Las tres preparaciones contenían tres virus infecciosos bovinos diferentes, específicamente virus del herpes bovino (BHV), virus de paragripe 3 (PI3), y virus sintial respiratorio bovino (BRSV).

La detección de la actividad viricida de las tres preparaciones de vacunas se realizó de acuerdo con los requisitos de la USDA 9CFR-113.35.

Los resultados que se muestran en la Tabla 17 indican que la microfluidización de las preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® no provoca inactivación significativa de la preparación de vacuna.

Tabla 17. Análisis de actividades viricidas de vacunas microfluidizadas

Serie	BRSV	BHV	PI3
A	0	0,2	0
AM200	-0,2	0	-0,2
AM75	0	-0,3	-0,3
AM75 a 37C	0,1	-0,3	-0,2
B	0	-0,1	-0,2
BM200	0	0	-0,2
BM75	-0,2	-0,5	0
BM75 a 37C	0,5	-0,5	0
C	0,1	-0,1	-0,2
CM200	-0,2	-0,1	-0,2
CM75	0,1	0,5	-0,2
CM75 a 37C	0,5	0,5	-0,2

A = colesterol añadido a 650 ml/minuto
 B = colesterol añadido a 28 ml/minuto
 C = colesterol añadido a 5 ml/minuto
 M200 = microfluidizada con tamiz de 200 micras
 M75 = microfluidizada con tamiz de 75 micras
 M75 a 37C = fluidos calentados a 37 °C antes de microfluidización
 Un valor por encima de 0,7 es indicador de efecto viricida.

5

Ejemplo 20

Preparación de una formulación de AMPHIGEN® microfluidizada

- 10 Se preparó una formulación de AMPHIGEN® combinando solución de aceite de lecitina DRAKEOL (aceite mineral ligero con lecitina al 25 %) y TWEEN 80 (con la concentración final de 0,18 %) y Span 80 (con la concentración final de 0,08 %) mezclando durante 8-22 horas a 36 ± 1 °C. La mezcla de aceite se añadió después a solución salina con ayuda de un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm. Subsiguientemente la mezcla se pasó una vez por un microfluidizador con una cámara de interacción de 200 µm a 31.027,5+3.447,5 kPa .
- 15 Las Figuras 10 A y 10 B muestran la estabilidad de la formulación de AMPHIGEN® microfluidizada. La distribución del tamaño de partículas, medida por difracción de láser, en el momento inicial de partida (**Figura 10A**) era casi idéntico a la distribución de tamaño de partícula después de 22 meses de almacenamiento a 4 °C (**Figura 10B**).

REIVINDICACIONES

1. Una emulsión submicrométrica microfluidizada de aceite en agua que comprende un aceite no metabolizable de hidrocarburo ligero, un tensioactivo y un componente acuoso, estando disperso dicho aceite en dicho componente acuoso con un tamaño medio de gota de aceite inferior a 0,5 μm .
2. La emulsión de la reivindicación 1, en la que dicho aceite es aceite mineral ligero y está en una cantidad del 1 % al 50 % v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está en una cantidad del 0,01 % al 10 % v/v, y en la que dicho aceite está disperso en dicho componente acuoso y el tamaño medio de gota de aceite se encuentra entre 0,1 μm y 0,5 μm .
3. La emulsión de la reivindicación 1, en la que el aceite no metabolizable es aproximadamente el 40 % v/v de aceite mineral, el tensioactivo comprende aproximadamente el 10 % p/v de lecitina, aproximadamente el 0,18 % v/v de ésteres de ácidos grasos de sorbitol polietoxilado y aproximadamente el 0,08 % v/v de tensioactivos de sorbitan sustituidos con ácidos grasos, en la que dicho aceite está disperso en dicho componente acuoso y el tamaño medio de gota de aceite se encuentra entre 0,1 μm y 0,5 μm .
4. Un procedimiento para preparar una emulsión submicrométrica de aceite en agua de la reivindicación 1, que comprende:
- (a) preparar una mezcla combinando un aceite no metabolizable de hidrocarburo ligero, un tensioactivo y un componente acuoso;
- (b) someter dicha mezcla a un procedimiento de emulsionamiento primario para producir una emulsión de aceite en agua que tiene un tamaño medio de gota de aceite de 1,0 μm a 1,1 μm ; y
- (c) someter la emulsión de aceite en agua preparada en (b) a microfluidización para producir dicha emulsión submicrométrica de aceite en agua, en el que la emulsión submicrométrica tiene un tamaño medio de gota de aceite inferior a 0,5 μm .
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho aceite es aceite mineral ligero y está en una cantidad del 1 % al 50 % v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está en una cantidad del 0,01 % al 10 % v/v y en el que dicho tamaño medio de gota de aceite de dicha emulsión submicrométrica está entre 0,1 μm y 0,5 μm .
6. Una composición de vacuna que comprende una emulsión de aceite en agua de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un antígeno, estando dicho antígeno disperso en dicha emulsión.
7. Una composición de vacuna que comprende una emulsión de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho antígeno está disperso en dicha emulsión y, además, en la que dicho aceite es aceite mineral ligero y está presente en dicha composición de vacuna en una cantidad del 1 % al 20 % v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está presente en dicha composición de vacuna en una cantidad del 0,01 % al 10 % v/v, y en la que dicho tamaño medio de gota de aceite está entre 0,1 μm y 0,5 μm .
8. La composición de vacuna de la reivindicación 6 o 7, en la que dicho antígeno es un antígeno vírico o un antígeno bacteriano.
9. La composición de vacuna de la reivindicación 8, en la que dicho antígeno vírico comprende Virus de Diarrea Bovino Tipo 1 o Tipo 2 inactivado y en la que dicho antígeno bacteriano comprende al menos uno de entre una bacterina de *Leptospira* inactivada, la proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante o una preparación de células de *E. coli*.
10. Un procedimiento para preparar una composición de vacuna de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, que comprende:
- (a) preparar una mezcla combinando un aceite no metabolizable de hidrocarburo ligero, un tensioactivo y un componente acuoso;
- (b) añadir un antígeno a la mezcla formada en (a);
- (c) someter la mezcla que contiene dicho antígeno, que se forma en (b), a un procedimiento de emulsionamiento primario para producir una emulsión de aceite en agua que tiene un tamaño medio de gota de aceite de 1,0 μm a 1,1 μm ; y
- (d) someter la emulsión formada en (c) a microfluidización para producir dicha composición de vacuna, en el que la composición tiene un tamaño medio de gota de aceite inferior a 0,5 μm .
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho antígeno es un antígeno vírico o un antígeno bacteriano.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho antígeno vírico comprende Virus de Diarrea Bovino Tipo 1 o Tipo 2 inactivado y en el que dicho antígeno bacteriano comprende al menos uno de entre una bacterina de *Leptospira* inactivada, la proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante o una preparación de células de *E. coli*.
13. Una composición de vacuna que comprende un antígeno microencapsulado y una emulsión de aceite en agua de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicho antígeno microencapsulado está disperso en dicha

emulsión.

- 5 14. Una composición de vacuna que comprende un antígeno microencapsulado y una emulsión de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho antígeno está disperso en dicha emulsión y, además, dicho aceite es aceite mineral ligero y está presente en dicha composición de vacuna en una cantidad del 1,0 % al 20 % v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está presente en dicha composición de vacuna en una cantidad de 0,01 % a 10 % v/v, dicho antígeno es un antígeno vírico o un antígeno bacteriano y está encapsulado en un vehículo particulado, y en la que dicho vehículo comprende ácido polilactidaglicólico.

10

Figura 1

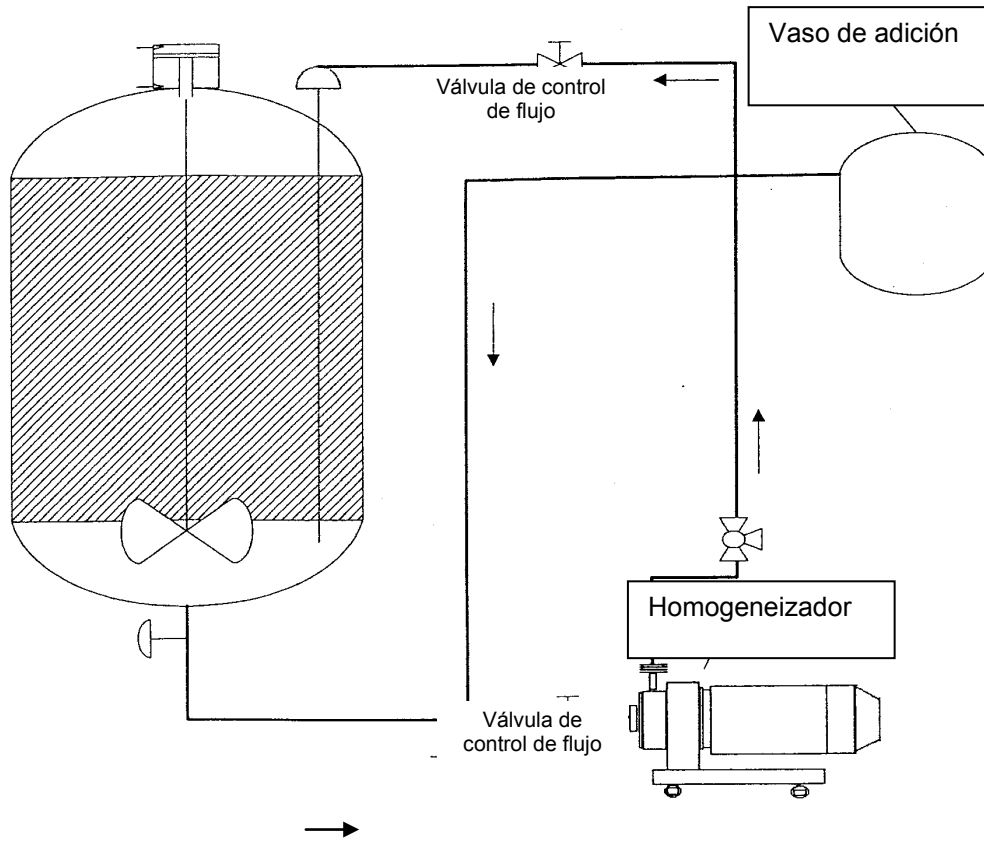


Figura 2

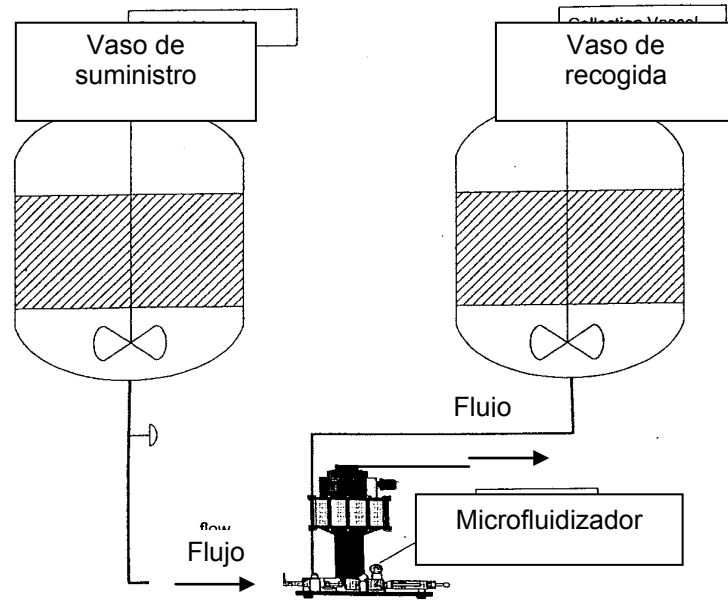


Figura 3

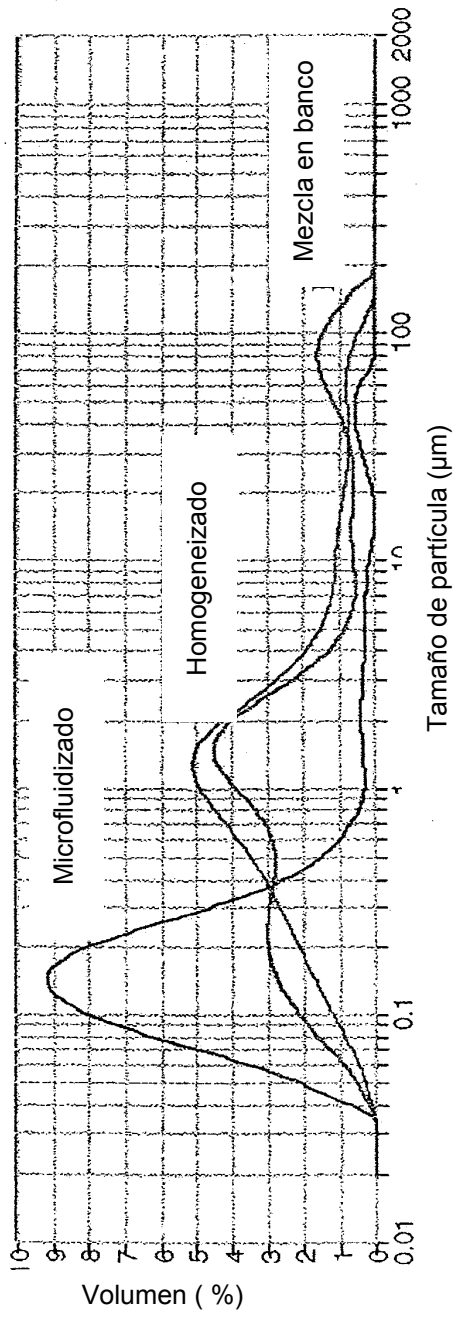


Figura 4

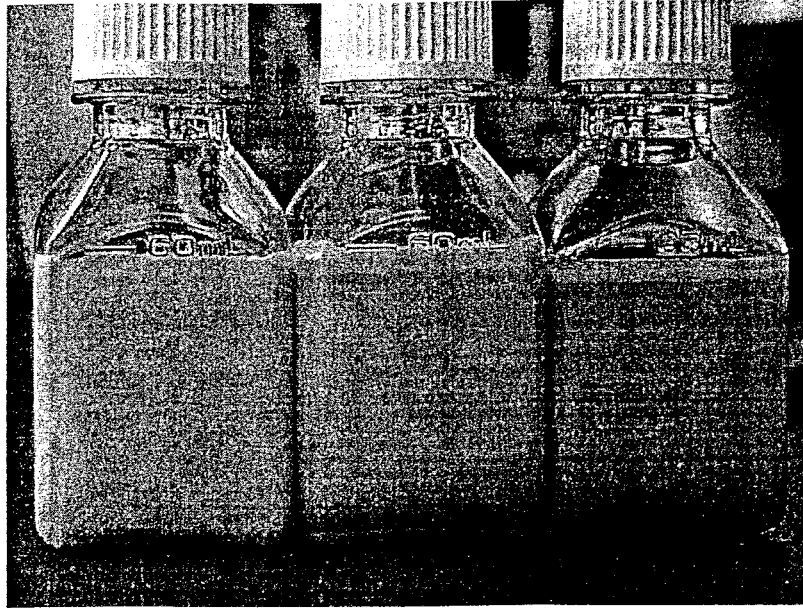


Figura 5

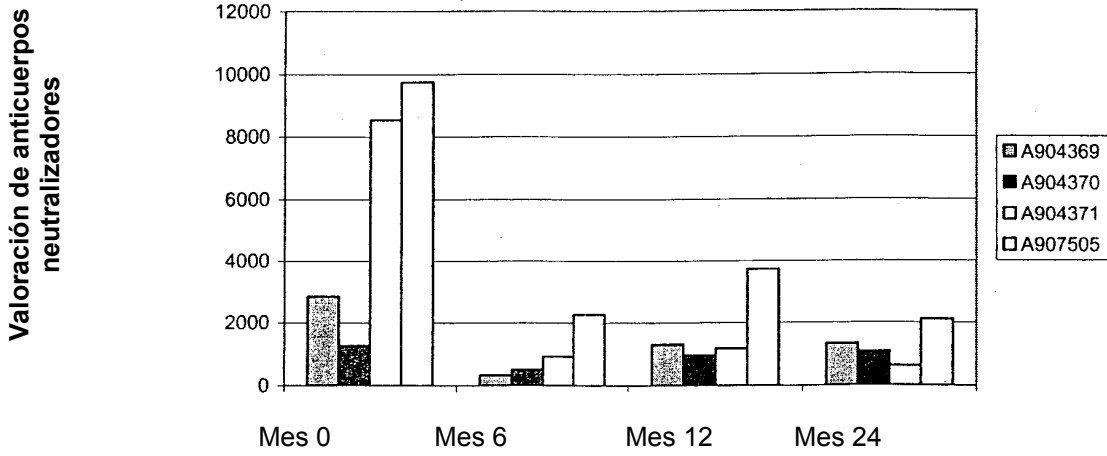


Figura 6

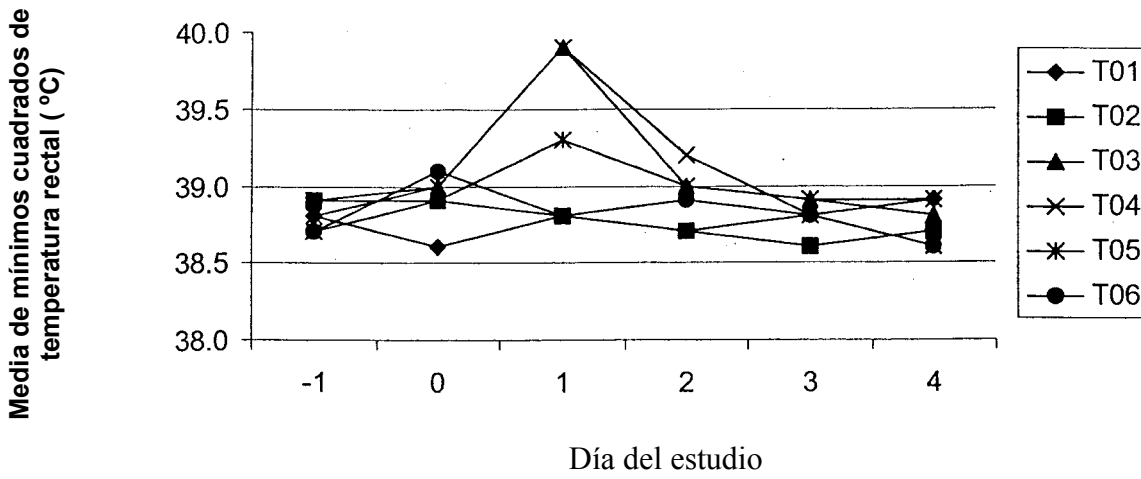


Figura 7

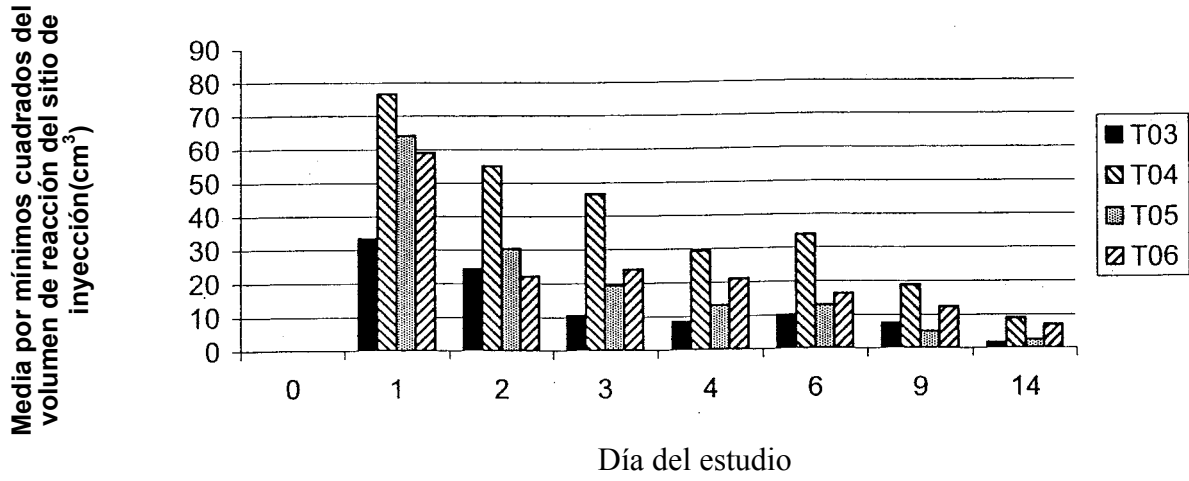


Figura 8

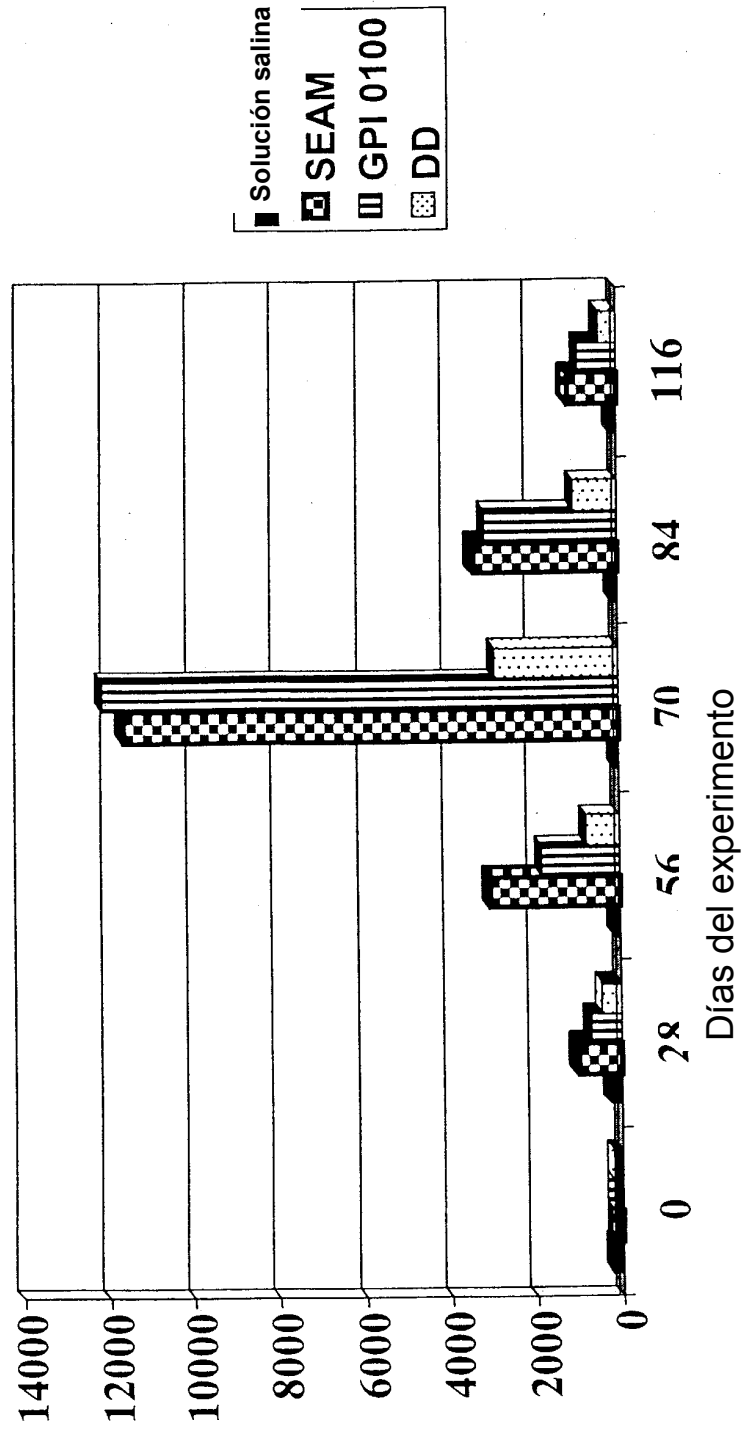
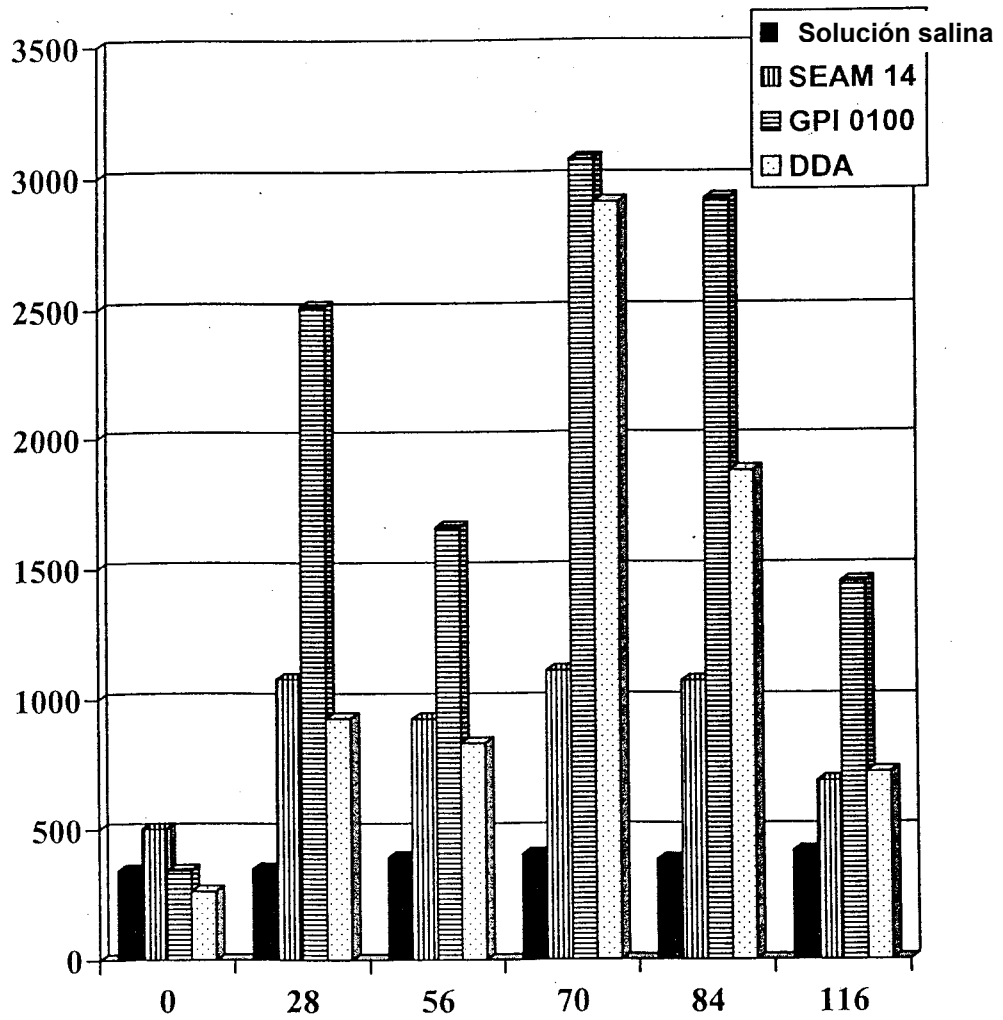


Figura 9



Días del experimento

Figura 10A

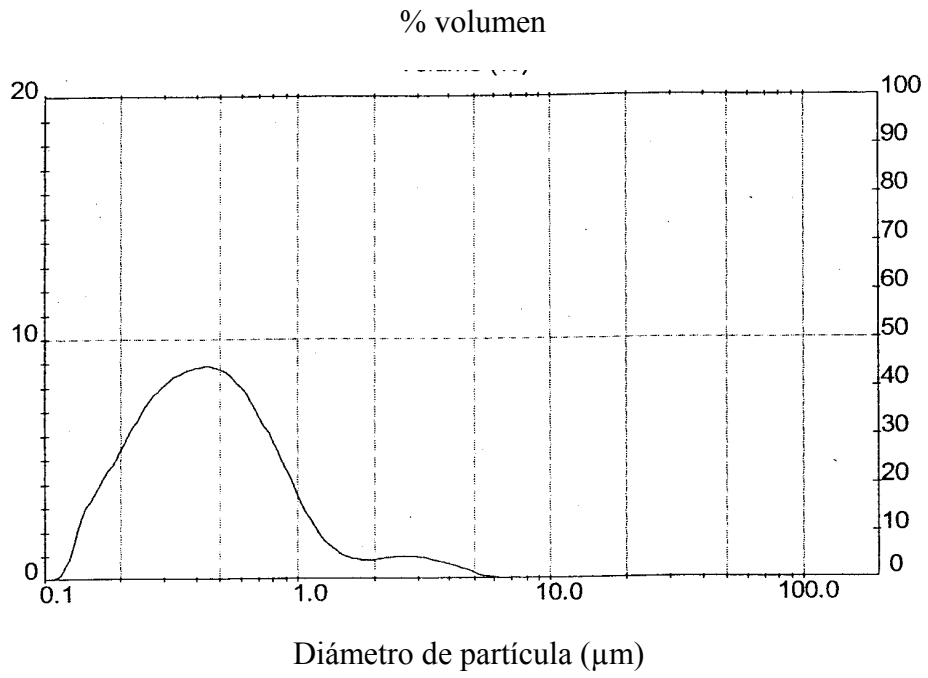


Figura 10B

