

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 782**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2005 E 05718292 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1742659**

54 Título: **Emulsiones de aceite en agua microfluidificadas y composiciones de vacuna**

30 Prioridad:

05.04.2004 US 559677 P

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

27.06.2013

73 Titular/es:

**ZOETIS P LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park, New Jersey 07932, US**

72 Inventor/es:

**DOMINOWSKI, PAUL JOSEPH;
KLOSE, PAMELA KAY;
KREBS, RICHARD LEE y
MANNAN, RAMASAMY MANNAR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 409 782 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 microfluidificadas y composiciones de vacuna

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, al campo de las vacunas y, particularmente, a formulaciones adyuvantes para potenciar la respuesta inmune en animales de veterinaria. En particular, la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende un glicósido de saponina, un esteroles y un antígeno, en la que, en la formación de dicha composición de vacuna, dicho esteroles se añade a dicho glicósido de saponina y en la que dicho glicósido de saponina y dicho esteroles se asocian entre sí para formar complejos en forma de micelas helicoidales; y en la que dicho antígeno está en mezcla con, pero no integrado dentro de, dichas micelas helicoidales.

Antecedentes de la invención

10 Las infecciones bacterianas, virales, parasitarias y de micoplasma están extendidas en los animales de veterinaria tales como vacas, cerdos y animales de compañía. Las enfermedades provocadas por estos agentes infecciosos son con frecuencia resistentes a terapia farmacéutica antimicrobiana, lo que no deja ningún medio de tratamiento eficaz. En consecuencia, se está usando cada vez más un enfoque vacunológico para combatir la enfermedad infecciosa en los animales de veterinaria. Un patógeno infeccioso completo puede hacerse adecuado para su uso en una formulación de vacuna después de inactivación química o manipulación genética apropiada. Como alternativa, una subunidad proteica del patógeno puede expresarse en un sistema de expresión recombinante y purificarse para su uso en una formulación de vacuna.

20 El adyuvante generalmente se refiere a cualquier material que aumente la respuesta inmune humoral y/o celular a un antígeno. Las vacunas tradicionales están compuestas de preparación en bruto de microorganismos patógenos muertos, y las impurezas asociadas con los cultivos de microorganismos patológicos podrían actuar como adyuvante para potenciar la respuesta inmune. Sin embargo, cuando se usan preparaciones homogéneas de microorganismo patológico o subunidades proteicas purificadas para vacunación, la inmunidad inducida por dichos antígenos es escasa y se hace necesaria la adición de ciertos materiales exógenos como adyuvante. Además, las vacunas sintéticas y de subunidades son caras de producir. Por lo tanto, con la ayuda de adyuvante, puede requerirse una dosis menor de antígeno para estimular la respuesta inmune, ahorrando de este modo en el coste de producción de vacunas.

30 Se sabe que los adyuvantes actúan de varias maneras diferentes para potenciar la respuesta inmune. Muchos adyuvantes modifican la red de citocinas asociada con la respuesta inmune. Estos adyuvantes inmunomoduladores pueden ejercer su efecto incluso cuando no están junto con antígenos. En general, los adyuvantes inmunomoduladores provocan una regulación positiva general de ciertas citocinas y una regulación negativa conjunta de otras que conducen a una respuesta Th1 celular y/o una Th2 humoral.

35 Algunos adyuvantes tienen la capacidad de conservar la integridad conformacional de un antígeno de modo que los antígenos puedan presentarse eficazmente a células efectoras inmunes apropiadas. Como resultado de esta conservación de conformación de antígeno por la formulación de adyuvante, la vacuna tendría un periodo de caducidad aumentado como el mostrado para complejos inmunoestimulantes (ISCOM). Ozel M., y col; Quaternary Structure of the Immunestimulating Complex (Iscom), J.of Ultrastuc. and Molec. Struc. Res. 102, 240-248 (1989).

40 Algunos adyuvantes tienen la propiedad de conservar el antígeno como un depósito en el sitio de inyección. Como resultado de este efecto de depósito el antígeno no se pierde rápidamente por eliminación en el hígado. Las sales de aluminio y las emulsiones de agua en aceite actúan a través de este efecto de depósito durante una duración más corta. Por ejemplo, se puede obtener un depósito a largo plazo usando adyuvante completo de Freund (FCA) que es una emulsión de agua en aceite. El FCA típicamente permanece en el sitio de inyección hasta que la biodegradación permite la retirada del antígeno por células presentadoras de antígeno.

45 En base a su naturaleza física, los adyuvantes pueden agruparse en dos categorías muy amplias, concretamente adyuvantes en partículas y adyuvantes sin partículas. Los adyuvantes en partículas existen como micropartículas. El inmunógeno puede incorporarse o asociarse con las micropartículas. Las sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, complejos inmunoestimulantes, liposomas y nano y micropartículas son ejemplos de adyuvantes en partículas. Los adyuvantes sin partículas son generalmente inmunomoduladores y generalmente se usan junto con adyuvantes en partículas. El dipéptido de muramilo (un componente activo de adyuvante de un peptidoglicano extraído de micobacterias), copolímeros en 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 C12 a C16 de longitud), citocinas, polímeros de carbohidratos, polisacáridos derivatizados y toxinas bacterianas, tales como toxina de cólera y toxina lábil de *E. coli*, (LT) son ejemplos de adyuvantes sin partículas.

55 Algunos de los adyuvantes mejor conocidos son combinación de inmunomoduladores sin partículas y materiales en partículas que podrían transmitir efecto depósito a la formulación adyuvante. Por ejemplo, el FCA combina las propiedades inmunomoduladoras de componentes de *Mycobacterium tuberculosis* junto con el efecto de depósito a

corto plazo de las emulsiones de aceite.

Se han usado emulsiones de aceite como adyuvante de vacunas durante mucho tiempo. Le Moignic y Pinoy descubrieron en 1916 que una suspensión de *Salmonella typhimurium* muerta en aceite mineral aumentaba la respuesta inmune. Posteriormente en 1925, Ramon describió el aceite de almidón como una de las sustancias que aumentaban la respuesta antitóxica al toxoide diftérico. Sin embargo, las emulsiones de aceite no se hicieron populares hasta 1937 cuando Freund ideó su formulación de adyuvante ahora conocido como adyuvante completo de Freund (FCA). El FCA es una emulsión de agua en aceite compuesta de aceite mineral (parafina) mezclado con micobacterias muertas y Arlacel A. El Arlacel A es principalmente monooleato de manida y se usa como un agente emulsionante. Aunque el FCA es excelente en la inducción de una respuesta de anticuerpos, provoca dolor grave, formación de abscesos, fiebre e inflamación granulomatosa. Para evitar estas reacciones secundarias indeseables, se desarrolló adyuvante incompleto de Freund (IFA). El IFA es similar al FCA en su composición excepto por la ausencia de componentes micobacterianos. El IFA actúa mediante la formulación de depósitos en el sitio de inyección y liberación lenta del antígeno con estimulación de células productoras de anticuerpos.

Otro enfoque para mejorar el FCA se basó en la noción de que el reemplazo de aceite mineral con un aceite biocompatible ayudaría a eliminar las reacciones asociadas con FCA en el sitio de inyección. También se creyó que la emulsión debería ser de aceite en agua en lugar de agua en aceite, debido a que esta última produce un depósito de larga duración en el sitio de inyección. Hilleman y col. describieron un adyuvante basado en aceite "adyuvante 65", consistente en aceite de cacahuete 86%, Arlacel A 10% como emulsionante y monoestearato de aluminio 4% como estabilizador. Hilleman, 1966, Prog. Med. Virol. 8: 131-182; Hilleman y Beale, 1983, en New Approaches to Vaccine Development (Eds. Bell, R. y Torrigiani, G.), Schwabe, Basilea. En seres humanos, el adyuvante 65 fue seguro y potente pero mostró menos adyuvancia que IFA. No obstante, el uso del adyuvante 65 se interrumpió debido a su reatogenicidad para el hombre con ciertos lotes de vacuna y reducción de la adyuvancia cuando se usó un emulsionante purificado o sintético en lugar de Arlacel A. Las Patentes de Estados Unidos 5.718.904 y 5.690.942 enseñan que el aceite mineral en la emulsión de aceite en agua puede reemplazarse con aceite metabolizable para el fin de mejorar el perfil de seguridad.

Además de la adyuvancia y seguridad, la apariencia física de una emulsión también es una consideración comercial importante. La apariencia física depende de la estabilidad de la emulsión. La flotación, sedimentación y coalescencia son indicadores de la inestabilidad de la emulsión. La flotación se produce cuando las fases oleosa y acuosa de la emulsión tienen diferente gravedad específica. La flotación también se produce cuando el tamaño de gota inicial de la emulsión es grande y las gotas de emulsión no tienen ningún movimiento browniano. Cuando el tamaño de gota es grande, existe una tendencia a la ruptura interfacial y las gotas coalescen en partículas grandes. La estabilidad de la emulsión se determina por varios factores tales como la naturaleza y cantidad de emulsionante usado, el tamaño de la gota en la emulsión, y la diferencia en densidad entre la fase oleosa y la acuosa.

Los emulsionantes promueven la estabilización de gotas dispersadas reduciendo la energía libre interfacial y creando barreras físicas o electrostáticas para coalescencia de gotas. Se han usado detergentes no iónicos así como iónicos como emulsionantes. Los emulsionantes no iónicos se orientan en la interfaz y producen estructuras relativamente voluminosas, lo que conduce a evitación estérica de las gotas dispersadas. Los emulsionantes aniónicos o catiónicos inducen formación de una capa doble eléctrica atrayendo contraiones; las fuerzas repulsivas de doble capa provocan que las gotas se repelan entre sí cuando se acercan.

Además de usar los emulsionantes, la estabilidad de la emulsión también puede conseguirse mediante la reducción del tamaño de las gotas de la emulsión por medios mecánicos. Típicamente se han usado mezcladores de propulsor, rotores de turbina, molinos coloidales, homogeneizadores y sonicadores para fabricar emulsiones. La microfluidificación es otro medio para aumentar la homogeneidad del tamaño de las gotas en la emulsión. La microfluidificación puede producir una emulsión físicamente estable, elegante, con tamaño de partícula uniforme en el intervalo submicrométrico. Además de aumentar la estabilidad de la emulsión, el procedimiento de microfluidificación permite la filtración terminal que es un modo preferido de asegurar la esterilidad del producto final. Además, las partículas de aceite submicrométricas pueden pasar de sitios de inyección a los linfáticos y después a ganglios linfáticos de la cadena de drenaje, sangre y bazo. Esto reduce la probabilidad de establecer un depósito oleoso en el sitio de inyección que puede producir inflamación local y reacción en el sitio de inyección significativa.

Los microfluidificadores están ahora disponibles en el mercado. Se produce formación de emulsión en un microfluidificador a medida que dos corrientes fluidificadas interactúan a altas velocidades dentro de una cámara de interacción. El microfluidificador es conducido por aire o nitrógeno y puede actuar a presiones internas de más de 137,86 mPa. La Patente de Estados Unidos 4.908.154 enseña el uso de microfluidificador para obtener emulsiones esencialmente sin ningún agente emulsionante.

Se han descrito varias formulaciones de adyuvante de aceite en agua submicrométricas en la bibliografía. La Patente de Estados Unidos 5.376.369 enseña una formulación de adyuvante de emulsión de aceite en agua submicrométrica conocida como formulación de adyuvante Syntax (SAF). La SAF contiene escualeno o escualano como el componente oleoso, una cantidad formadora de emulsión de polímero en bloque Pluronic L121 (polioxi-propileno-polioxi-etileno) y una cantidad inmunopotenciadora de muramildipéptido. El escualeno es un hidrocarburo lineal precursor de colesterol hallado en muchos tejidos, notablemente en los hígados de tiburones y otros peces. El

escualano se prepara por hidrogenación de escualeno y es completamente saturado. Tanto el escualeno como el escualano pueden metabolizarse y tienen un buen registro de estudios toxicológicos. Se han usado emulsiones de escualeno o escualano en vacunas de cáncer humano con efectos secundarios leves y una eficacia deseable. Véase, por ejemplo, Anthony C. Allison, 1999, Squalene and Squalane emulsions as adjuvants, Methods 19:87-93.

- 5 La Patente de Estados Unidos 6.299.884 y Publicación de Patente Internacional WO 90/14837 enseñan que los copolímeros en bloque de polioxi-propilen-polioxi-etileno no son esenciales para la formación de emulsión de aceite en agua submicrométrica. Además, estas referencias enseñan el uso de aceite metabolizable no tóxico y excluyen expresamente el uso de aceite mineral y aceites destilados de petróleo tóxicos en sus formulaciones de emulsión.

- 10 La Patente de Estados Unidos 5.961.970 enseña otra emulsión de aceite en agua submicrométrica más para usar como un adyuvante de vacuna. En la emulsión descrita 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 incluido en esta emulsión puede ser un tensioactivo biológicamente compatible natural tal como fosfolípido (por ejemplo, lecitina) o un tensioactivo no natural farmacéuticamente aceptable tal como Tween-80. Esta patente también enseña la incorporación del antígeno en la emulsión en el momento en que se forma la emulsión, a diferencia de la mezcla del antígeno con la emulsión después de que la emulsión se haya formado de forma independiente y extrínseca.

- 15 La Patente de Estados Unidos 5.084.269 enseña que una formulación de adyuvante que contiene lecitina en combinación con aceite mineral provoca una reducción de la irritación dentro del animal huésped y simultáneamente induce inmunidad sistémica aumentada. La formulación adyuvante resultante de la Patente de Estados Unidos 5.084.269 se usa comercialmente en vacunas veterinarias bajo el nombre comercial AMPHIGEN®. La formulación AMPHIGEN® está compuesta de micelas - gotas de aceite rodeadas de lecitina. Estas micelas permiten que se unan más antígenos celulares completos que los adyuvantes basados en aceite tradicionales. Además, las formulaciones de vacunas basadas en AMPHIGEN® contienen un bajo contenido de aceite del 2,5 al 5% de aceite mineral, en comparación con otras formulaciones de vacuna que contienen adyuvantes de aceite, que típicamente contienen del 10% al 20% de aceite. Su bajo contenido de aceite hace a esta formulación de vacuna basada en adyuvante menos irritante para tejidos en el sitio de inyección, dando como resultado menos lesiones y menor reducción en el sacrificio. Además, el revestimiento de lecitina que rodea a las gotas de aceite reduce adicionalmente las reacciones en el sitio de inyección dando como resultado una vacuna que es tanto segura como eficaz.

- 20 La formulación de AMPHIGEN® se usa como un adyuvante en varias vacunas veterinarias y se necesita mantener la apariencia física del producto de vacuna durante períodos de almacenamiento cortos y largos así como en el momento de la reconstitución. Además, se mezcla un antígeno liofilizado con la formulación adyuvante pre-hecha justo antes de la inyección. Esta práctica no siempre asegura que haya una distribución uniforme del antígeno dentro de la emulsión de aceite en agua y la apariencia de la emulsión puede no ser deseable. Además, tras el reposo, la emulsión homogeneizada puede mostrar separación de fases. Por lo tanto, existe la necesidad de una formulación adyuvante estable que no muestre separación de fases tras periodo de caducidad largo. Un modo de prevenir la separación de fases es reducir el tamaño de las gotas y aumentar la homogeneidad de las partículas de la emulsión. Aunque se ha documentado el procedimiento de microfluidificación de formulaciones de emulsión basadas en aceite metabolizables, aún no se ha llevado a cabo microfluidificación de emulsiones de aceite en agua tales como la formulación AMPHIGEN®.

25 El documento WO 96/33739 desvela liposomas preparados añadiendo saponina a colesterol. El documento US 2003/095974 desvela una emulsión de aceite en agua que comprende colesterol y saponina. El documento US 5679354 desvela una composición de vacuna que comprende un esteroide y un glicósido de saponina ensamblados en una matriz.

- 30 Como se describe en el presente documento, la microfluidificación se ha usado para llevar el tamaño de gotas de aceite mineral rodeadas de lecitina al tamaño submicrométrico. Inesperadamente, se ha descubierto por los presentes inventores que la microfluidificación de formulaciones de vacuna con adyuvante de una emulsión de aceite en agua comprendidas por una mezcla de lecitina y aceite no solamente mejora la apariencia física de las formulaciones, sino que también potencia los efectos inmunizadores de las formulaciones. Las formulaciones microfluidificadas también se caracterizan por un perfil de seguridad mejorado.

Sumario de la invención

- 35 Se ha descubierto inesperadamente por los presentes inventores que la actividad adyuvante y el perfil de seguridad de las emulsiones de aceite en agua basadas en aceite no metabolizable pueden mejorarse mediante microfluidificación. Los antígenos incorporados en emulsiones microfluidificadas son estables incluso cuando los antígenos se incorporan de forma intrínseca en las emulsiones antes de la microfluidificación.

40 En una realización, la presente solicitud proporciona formulaciones de emulsión de aceite en agua submicrométricas útiles como un adyuvante de vacuna. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas descritas en el presente documento están compuestas de un aceite no metabolizable, al menos un tensioactivo, y un componente acuoso, en

los que el aceite está dispersado en el componente acuoso con un tamaño de gota de aceite medio en el intervalo submicrométrico. Un aceite no metabolizable preferido es el aceite mineral ligero. Los tensioactivos preferidos incluyen lecitina, TWEEN®-80 y SPAN®-80.

5 Una emulsión de aceite en agua preferida proporcionada por la presente solicitud está compuesta de una formulación AMPHIGEN®.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende un glicósido de saponina, un esteroles y un antígeno, en la que, en la formación de dicha composición de vacuna, dicho esteroles se añade a dicho glicósido de saponina, y en la que dicho glicósido de saponina y dicho esteroles se asocian entre sí para formar complejos en forma de micelas helicoidales; y en la que dicho antígeno está
10 en mezcla con, pero no integrado dentro de, dichas micelas helicoidales. Preferentemente, la composición de vacuna comprende además un vehículo veterinariamente aceptable; más preferentemente dicho vehículo veterinariamente aceptable es una emulsión de aceite en agua.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona la composición de vacuna de acuerdo con el primer aspecto; en la que dicho glicósido de saponina es un glicósido triterpenoide. Preferentemente, dicho
15 glicósido triterpenoide es Quil A.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona la composición de vacuna de acuerdo con el primer aspecto, en la que dicho esteroles es colesterol.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona la composición de vacuna de acuerdo con el primer aspecto, en la que dicho antígeno comprende un antígeno viral, un antígeno bacteriano o una
20 combinación de los mismos. Preferentemente, dicho antígeno comprende un antígeno de virus de diarrea viral bovina (BVDV) de tipo 1 o tipo 2.

Las emulsiones de aceite en agua desveladas en el presente documento pueden incluir componentes adicionales que son apropiados y deseables, incluyendo conservantes, agentes osmóticos, moléculas bioadhesivas y moléculas inmunoestimuladoras. Las moléculas inmunoestimuladoras preferidas incluyen, por ejemplo, Quil A, colesterol, GPI-
25 0100, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA).

En otra realización, la presente solicitud proporciona procedimientos para preparar una emulsión de aceite en agua submicrométrica. De acuerdo con la presente solicitud, los diversos componentes de la emulsión, incluyendo aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente apropiado para su uso en la emulsión, se mezclan entre sí. La mezcla se somete a un procedimiento de emulsificación primario para formar una emulsión
30 de aceite en agua, que después se pasa a través de un microfluidificador para obtener una emulsión de aceite en agua con gotas menores de 1 micrómetro de diámetro, preferentemente con un tamaño de gota medio menor de 0,5 micrómetros.

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

El antígeno que puede incluirse en las composiciones de vacuna de la presente invención puede ser un antígeno bacteriano, fúngico o viral, o una combinación de los mismos. El antígeno puede tomar la forma de una preparación viral o celular parcial o completa inactivada, o la forma de moléculas antigénicas obtenidas por purificación de proteínas convencional, técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

40 En una realización adicional; la presente invención proporciona procedimientos para preparar composiciones de vacuna que contienen un antígeno o antígenos combinados con una emulsión de aceite en agua submicrométrica.

Al preparar las composiciones de vacuna de la presente invención, el antígeno o los antígenos pueden combinarse de forma intrínseca (por ejemplo, antes de la microfluidificación) o extrínseca (por ejemplo, después de la microfluidificación) con los componentes de la emulsión de aceite en agua. Preferentemente, el antígeno se combina
45 con los componentes de la emulsión de aceite en agua de forma intrínseca.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona composiciones de vacuna que contienen un antígeno microencapsulado y una emulsión de aceite en agua submicrométrica descrita anteriormente en el presente documento, en las que el antígeno microencapsulado se combina con la emulsión de forma extrínseca.

Se ha descubierto sorprendentemente que una saponina y un esteroles, cuando se combinan en solución, se asocian entre sí para formar complejos en forma de micelas helicoidales. De acuerdo con la presente invención, estos complejos de micelas helicoidales tienen actividades inmunoestimuladoras y son especialmente útiles como adyuvantes en composiciones de vacuna.

En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones de vacuna que contienen una saponina y un esteroles, en las que la saponina y el esteroles forman complejos en forma de micelas helicoidales. La presente

invención también proporciona composiciones que contienen una saponina, un esteroles y un antígeno, en las que la saponina y el esteroles forman complejos en forma de micelas helicoidales y en las que el antígeno se mezcla con pero no se incorpora dentro de las micelas helicoidales.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La **Figura 1** representa el procedimiento para la preparación discontinua de composiciones de vacuna no microfluidificadas. En este procedimiento los diversos componentes de vacuna se añaden al frasco de adición a la izquierda y en última instancia se bombean al frasco de mezcla en el que los componentes se mezclan entre sí mediante medios mecánicos sencillos.
- 10 La **Figura 2** representa el procedimiento para la preparación de composiciones de vacuna microfluidificadas que contienen de forma intrínseca el antígeno incorporado. Los diversos componentes de vacuna se añaden al frasco de adición y se transfieren a la unidad de mezclado pre-emulsión para mezclar mediante medios mecánicos sencillos. Posteriormente, la emulsión se pasa a través de un microfluidificador y se recoge en la cámara post-microfluidificación.
- 15 La **Figura 3** representa la distribución de tamaños de gotas de la vacuna basada en formulación AMPHIGEN® no microfluidificada, la vacuna basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada y la preparación de vacuna de mezcla experimental.
- La **Figura 4** muestra ausencia de separación de fases en la preparación de vacuna microfluidificada.
- La **Figura 5** representa una comparación de la estabilidad de los antígenos incorporados de forma intrínseca en preparación de vacuna basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada (A907505) y tres preparaciones de vacuna basadas en formulación AMPHIGEN® no microfluidificadas de control (A904369, A904370 y A904371). Las cuatro preparaciones de vacunas se almacenaron a 4 °C durante dos años. En diferentes puntos durante el almacenamiento (0, 6, 12 o 24 meses), las cuatro formulaciones se usaron para vacunar a las vacas de tres meses de edad. La vacunación se realizó el día 0 y 21 con una dosis de vacuna de 2 ml y los sueros se recogieron dos semanas después de la segunda vacunación. Se determinó el título de anticuerpo neutralizante para virus BVD de Tipo II en cada una de las muestras de suero. Los datos se presentan como la media geométrica para 5 animales.
- 20 La **Figura 6** muestra los mínimos cuadráticos de la media de temperatura rectal de las vacas antes y después de la administración de vacunas microfluidificadas y no microfluidificadas. T01: Grupo de placebo - Dosis individual; T02: Grupo de placebo - Dosis doble; T03: Formulación no microfluidificada - Dosis individual; T04: Formulación no microfluidificada - Dosis doble; T05: Formulación microfluidificada - Dosis individual; T06: Formulación microfluidificada - Dosis doble.
- 25 La **Figura 7** representa los mínimos cuadráticos de la media de los volúmenes de reacción del sitio de inyección observados en vacas después de la administración de formulaciones de vacuna no microfluidificadas y microfluidificadas. T03: Formulación no microfluidificada - Dosis individual; T04: Formulación no microfluidificada - Dosis doble; T05: Formulación microfluidificada - Dosis individual; T06: Formulación microfluidificada - Dosis doble.
- 30 La **Figura 8** representa la media geométrica de los títulos de IgG para el antígeno PauA recombinante de *Streptococcus uberis* después de la vacunación con las diversas formulaciones de vacuna que contienen tanto antígeno PauA recombinante como antígeno de células completas de *E. coli*.
- 35 La **Figura 9** representa la media geométrica de los títulos de IgG para el antígeno de células completas de *E. coli* de *Streptococcus uberis* después de vacunación con las diversas formulaciones de vacuna que contienen tanto antígeno PauA recombinante como antígeno de células completas de *E. coli*.
- 40 La **Figura 10A** y **Figura 10B** representa la distribución de tamaños de partículas de una formulación Amphigen Microfluidificada en la producción inicial (Figura 10A) y a los 22 meses después de la producción (Figura 10B).
- 45 La **Figura 11** es una fotografía de microscopía electrónica que muestra micelas helicoidales formadas junto con micelas Quil A y cristales de colesterol.
- La **Figura 12** es una fotografía de microscopía electrónica que muestra complejos inmunogénicos helicoidales formados por Quil A y colesterol en la superficie del antígeno BVD de Tipo I.

Descripción detallada de la invención

- 50 Se ha descubierto, inesperadamente, por los presentes inventores que la microfluidificación de formulaciones de vacuna con adyuvante de emulsión de aceite en agua comprendida por una mezcla de lecitina y aceite mineral no solamente mejora la apariencia física de las formulaciones de vacuna, sino que también potencia los efectos inmunizadores de las formulaciones de vacuna. Las formulaciones de vacunas microfluidificadas también se caracterizan por un perfil de seguridad mejorado.
- 55 En base a estos descubrimientos, la presente solicitud proporciona emulsiones de aceite en agua submicrométricas útiles como un adyuvante en composiciones de vacuna. También se proporcionan procedimientos para preparar esas emulsiones de aceite en agua submicrométricas usando un microfluidificador. Además, la presente invención proporciona composiciones de vacuna submicrométricas en las que un antígeno se combina con una emulsión de aceite en agua submicrométrica. También se proporcionan procedimientos para preparar dichas composiciones de vacuna. La presente invención proporciona además composiciones de vacuna que contienen antígenos microencapsulados combinados con una emulsión de aceite en agua submicrométrica y procedimientos para preparar dichas vacunas.
- 60

Para una mayor claridad de la divulgación, y sin 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 de aceite-en-agua submicrométricas

5 En una realización, la presente solicitud proporciona formulaciones de emulsión de aceite en agua submicrométricas útiles como un adyuvante de vacuna. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas descritas potencian la inmunogenicidad de antígenos en composiciones de vacuna, son seguras para la administración a animales y estables durante el almacenamiento.

10 Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas de la presente solicitud se componen de un aceite no metabolizable, al menos un tensioactivo, y un componente acuoso, en los que el aceite se dispersa en el componente acuoso con un tamaño de gota de aceite medio en el intervalo submicrométrico.

Por "submicrométrico" se entiende que las gotas son de un tamaño menor de 1 μm (micrómetro) y la media o promedio del tamaño de gota de aceite es menor de 1 μm . Preferentemente, el tamaño de gota medio de la emulsión es menor de 0,8 μm ; más preferentemente, menor de 0,5 μm ; y aún más preferentemente, menor de 0,4 μm o de aproximadamente 0,1-0,3 μm .

15 El "tamaño de gota medio" se define como el tamaño de partícula de Diámetro Medio de Volumen (VMD) dentro de una distribución de volumen de tamaño de partículas. El VMD se calcula multiplicando cada diámetro de partícula por el volumen de todas las partículas de ese tamaño y sumando. Esto después se divide por el volumen total de todas las partículas.

20 La expresión "aceite no metabolizable" como se usa en el presente documento se refiere a aceites que no pueden metabolizarse por el cuerpo del sujeto animal al que se administra la emulsión.

Los términos "animal" y "sujeto animal" como se usan en el presente documento se refieren a todos los animales no humanos, incluyendo vacas, ovejas y cerdos, por ejemplo.

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

30 La expresión "aceite mineral" se refiere a una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos de vaselina mediante una técnica de destilación. La expresión es sinónima de "parafina licuada", "vaselina líquida" y "aceite mineral blanco". También se pretende que la expresión incluya "aceite mineral ligero", es decir, aceite que se obtiene de forma similar por destilación de vaselina, pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que el aceite mineral blanco. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1990, en las páginas 788 y 1323). El aceite mineral puede obtenerse de diversas fuentes comerciales, por ejemplo, 35 J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). Es aceite mineral preferido el aceite mineral ligero disponible comercialmente con el nombre DRAKEOL®.

Típicamente, el componente oleoso de las emulsiones submicrométricas descritas en el presente documento 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%.

40 Las emulsiones de aceite en agua de la presente solicitud típicamente incluyen al menos un (es decir, uno o más) tensioactivo. Los tensioactivos y emulsionantes, usándose dichos términos de forma intercambiable en el presente documento, son agentes que estabilizan la superficie de las gotas de aceite y mantienen las gotas de aceite dentro del tamaño deseado.

45 Los 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 fosfolípidicos o una mezcla de fosfolípidos. Los fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolinas (lecitina), tales como lecitina de soja o huevo. La lecitina puede obtenerse como una mezcla de fosfatidas y triglicéridos lavando con agua aceites vegetales en bruto, y separando y secando las gomas hidratadas resultantes. Puede obtenerse un producto refinado fraccionando la mezcla para fosfolípidos y glicolípidos insolubles en acetona que permanecen después de la retirada de los triglicéridos y aceite vegetal por lavado de acetona. Como alternativa, 50 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 de forma convencional.

55 Los tensioactivos sintéticos no naturales adecuados para su uso en las emulsiones submicrométricas descritas incluyen tensioactivos no iónicos basados en sorbitán, por ejemplo tensioactivos de sorbitán sustituido con ácido

5 graso (disponibles en el mercado con el nombre SPAN® o ARLACEL®), ésteres de ácido graso 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 SIMULSOL M-53), polímero de formaldehído/isooctilfenol polietoxilado (TYLOXAPOL), éteres de alcohol graso de polioxietileno (BRIJ®); polioxietilén éteres no fenólicos (TRITON® N), polioxietilén isooctilfenil éteres (TRITON® X). Son

Los tensioactivos preferidos para su uso en las emulsiones de aceite en agua incluyen lecitina, Tween-80 y SPAN-80.

10 Hablando en general, el tensioactivo o la combinación de tensioactivos, si se usan dos o más tensioactivos, 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.

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

20 Se cree que las moléculas bioadhesivas pueden potenciar el suministro y unión de antígenos en o a través de la superficie mucosa diana que confiere inmunidad mucosa. Los ejemplos de moléculas bioadhesivas adecuadas incluyen polímeros de origen no natural ácidos 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 obtenibles de fuentes naturales tales como ácido algínico, ácido hialurónico, pectina, goma de tragacanto y goma karaya; y polímeros de origen no natural neutros, tales como polivinilalcohol; o combinaciones de los mismos.

25 La expresión "moléculas inmunoestimuladoras", como se usa en el presente documento, se refiere a las moléculas que potencian la respuesta inmune protectora inducida por un componente antigénico en composiciones de vacuna. Los materiales inmunoestimuladores adecuados incluyen componentes de la pared celular bacteriana, por ejemplo, derivados de N-acetil muramil-L-alanil-D-isoglutamina tales como murabutida, treonil-MDP y muramil tripéptido; glicósido de saponina y derivados de los mismos, por ejemplo, Quil A, QS 21 y GPI-0100; colesterol; y componentes de amonio cuaternario, por ejemplo, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) y N,N-dioctadecil-N,N-bis(2 hidroxietil)propanodiamina ("avridina").

Las saponinas son compuestos glicosídicos que se producen como metabolitos secundarios en una amplia diversidad de especies vegetales. La estructura química de las saponinas transmite una amplia serie de actividades farmacológicas y biológicas, incluyendo algunas actividades inmunológicas potentes y eficaces.

35 Estructuralmente, las saponinas consisten en cualquier aglicona unida a una o más cadenas de azúcares. Las saponinas pueden clasificarse de acuerdo con su composición de aglicona: glicósidos triterpenos, glicósidos esteroides y glicósidos alcaloides esteroides.

40 La saponina puede aislarse de la corteza de *Quillaja saponaria*. La saponina se ha conocido durante mucho tiempo como un inmunoestimulador. Dalsgaard, K., "Evaluation of its adjuvant activity with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease", Acta. Vet. Scand. 69: 1-40 1978. Extractos en bruto de plantas que contenían saponina potenciaron las vacunas de fiebre aftosa. Sin embargo, los extractos en bruto se asociaron con efectos secundarios adversos cuando se usaron en vacunas. Posteriormente, Dalsgaard purificó parcialmente el componente activo adyuvante de la saponina por diálisis, intercambio iónico y cromatografía de 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. 4.4: 243-254 1974. Un componente activo adyuvante purificado de este modo se conoce como "Quil A". En peso Quil A mostró potencia aumentada y mostró reacciones locales reducidas en comparación con saponina en bruto. Quil A se usa ampliamente en vacunas veterinarias.

50 El análisis posterior de Quil A por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) reveló una mezcla heterogénea de saponinas estrechamente relacionadas y condujo al descubrimiento de QS21, que era un potente adyuvante con toxicidad reducida o mínima. Kensil C.R. y col., "Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex", J. Immunol. 146: 431-437,1991. A diferencia de la mayoría de otros inmunoestimuladores, QS21 es soluble en agua y puede usarse en vacunas con o sin formulaciones de tipo emulsión. Se ha mostrado que QS21 induce una respuesta de tipo Th1 en ratones estimulando la producción de anticuerpos IgG2a y IgG2b e indujo CTL CD8+ (MHC de clase I) específico de antígeno en respuesta a antígenos de subunidades. Los estudios clínicos en seres humanos han demostrado su adyuvancia 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", Eds. Powell, M.F. y Newman, M. J. Plenum Publishing

Corporation, Nueva York. 1995, páginas 525-541.

La Patente de Estados Unidos 6.080.725 enseña los procedimientos para preparar y usar conjugado de saponina-lipófilo. En este conjugado de saponina-lipófilo, se une covalentemente un resto lipófilo tal como lípido, ácido graso, polietilenglicol o terpeno con una saponina triterpeno no acilada o desacilada mediante un grupo carboxi presente en el ácido 3-O-glucurónico de la saponina triterpeno. La unión de un resto lipófilo con el ácido 3-O-glucurónico de una saponina tal como desacilsaponina de Quillaja, luciósido P o saponina de *Gypsophila*, *Saponaria* y *Acanthophyllum* potencian sus efectos adyuvantes en inmunidad mediada por células y humoral. Adicionalmente, la unión de un resto lipófilo con el resto del ácido 3-O-glucurónico de no o desacilsaponina produce un análogo de saponina que es más fácil de purificar, menos tóxico, químicamente más estable, y posee iguales o mejores propiedades adyuvantes que la saponina original.

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

Compuestos de amonio cuaternario. Se han propuesto varias bases nitrogenadas alifáticas para su uso como adyuvantes inmunológicos, incluyendo aminas, compuestos de amonio cuaternario, guanidinas, benzamidinas y tiouronios. Compuestos específicos tales incluyen bromuro de dimetilodictadecilamonio (DDA) y N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietil) propanodiamina ("avridina").

La Patente de Estados Unidos 5.951.988 enseña formulación adyuvante que contiene sales de amonio cuaternarias tales como DDA junto con un componente oleoso. Esta formulación es útil junto con sustancias inmunológicas conocidas, por ejemplo antígenos virales o bacterianos en una composición de vacuna; para potenciar la respuesta inmunogénica. La composición también es 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-hidroxietil)propanodiamina y N,N- alquilo superior-xililehediaminas formuladas con emulsión de grasa o lípido como un adyuvante de vacuna. Se describe un procedimiento para inducir o potenciar la respuesta inmunogénica de un antígeno en el hombre o un animal mediante administración parenteral de la formulación adyuvante en la Patente de Estados Unidos 4.310.550.

En una realización preferida, la presente solicitud proporciona una emulsión de aceite en agua submicrométrica útil como adyuvante de vacuna, que está compuesta de una formulación AMPHIGEN®, con gotas de un tamaño menor de 1 µm y un tamaño de gota medio de aproximadamente 0,25 µm.

La expresión "formulación AMPHIGEN®" como se usa en el presente documento 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 AMPHIGEN® típica contiene 40% de aceite mineral ligero en volumen (v/v), aproximadamente 25% p/v de lecitina, aproximadamente 0,18% de TWEEN80 en volumen (v/v) y aproximadamente 0,08% de Span 80 en volumen (v/v).

Procedimientos para preparar emulsiones de aceite en agua submicrométricas

En otra realización, la presente solicitud proporciona procedimientos para preparar las emulsiones de aceite en agua submicrométricas descritas anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con la presente solicitud, los diversos componentes de la emulsión, incluyendo aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente apropiado para su uso en la emulsión, se combinan y mezclan entre sí.

La mezcla formada se somete a un procedimiento de emulsificación, típicamente mediante pase una o más veces a través de uno o más homogeneizadores o emulsionantes para formar una emulsión de aceite en agua que tiene una apariencia uniforme y un tamaño de gota medio de aproximadamente 0,5 µm. Puede usarse cualquier homogeneizador o emulsionante disponible en el mercado para este fin, por ejemplo, emulsionante de Ross (Hauppauge, NY), homogeneizador de Gaulin (Everett, MA).

La emulsión formada de este modo se somete después a microfluidificación para llevar el tamaño de gota al intervalo submicrométrico. La microfluidificación puede conseguirse mediante el uso de un microfluidificador comercial, tal como el modelo número 11 OY disponible de Microfluidics, Newton, Mass; Modelo Gaulin 30CD (Gaulin, Inc., Everett, Mass); y Rainnie Minilab Tipo 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, Wis.). Estos microfluidificadores actúan pasando fluidos a través de aperturas pequeñas bajo alta presión, de modo que dos corrientes de fluidos interactúen a altas velocidades en una cámara de interacción para formar emulsiones con gotas de un tamaño submicrométrico.

El tamaño de gota puede determinarse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, difracción con láser, mediante el uso de instrumentos de medición de tamaño disponibles en el mercado. El tamaño puede variar dependiendo del tipo de tensioactivo usado, la relación de tensioactivo y aceite, la presión de

funcionamiento, temperatura y similares. El experto en la materia puede determinar la combinación deseada de estos parámetros para obtener emulsiones con el tamaño de gota deseado sin experimentación indebida. Las gotas de las emulsiones de la presente invención son menores de 1 μm de diámetro, preferentemente con un tamaño de gota medio menor de 0,8 μm , y más preferentemente con un tamaño de gota medio menor de 0,5 μm , y aún más preferentemente con un tamaño de gota medio menor de 0,3 μm .

En una realización preferida de la presente solicitud, la solución de aceite 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 tensioactivos TWEEN® 80 y SPAN® 80 para formar una "solución AMPHGEN®" o "formulación AMPHIGEN®". La solución AMPHGEN® se emulsiona después con un emulsionante de Ross® (Hauppauge, NY 11788) a aproximadamente 3.400 rpm para formar una emulsión de aceite en agua. Posteriormente la emulsión se pasa una vez a través de un microfluidificador que actúa a aproximadamente 31,02 \pm 3,45 MPa. La emulsión de aceite en agua microfluidificada tiene gotas de un tamaño menor de 1 μm , con un tamaño de gota medio de aproximadamente 0,25 μm .

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

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones de vacuna que contienen un antígeno o antígenos y una emulsión de aceite en agua submicrométrica descrita anteriormente en el presente documento. Estas composiciones de vacuna se caracterizan por tener un efecto inmunogénico potenciado y una apariencia física mejorada (por ejemplo, no se observa separación de fases después de un periodo de almacenamiento prolongado). Además, las composiciones de vacuna de la presente invención son seguras para administración a animales.

De acuerdo con la presente invención, el antígeno puede combinarse con la emulsión de forma extrínseca, o, preferentemente, de forma intrínseca. La expresión "de forma intrínseca" se refiere al procedimiento en el que el antígeno se combina con los componentes de la emulsión antes de la etapa de microfluidificación. La expresión "de forma extrínseca" se refiere al procedimiento en el que el antígeno se añade a la emulsión después de que la emulsión se haya microfluidificado. El antígeno añadido de forma extrínseca puede ser antígeno libre o puede estar encapsulado en micropartículas como se describe adicionalmente posteriormente en el presente documento.

El término "antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula, compuesto o composición que sea inmunogénico en un animal y se incluye en la composición de vacuna para inducir una respuesta inmune protectora en el animal al que se administra la composición de vacuna.

El término "inmunogénico" como se usa en relación con un antígeno se refiere a la capacidad del antígeno para provocar una respuesta inmune en un animal contra el antígeno. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune celular mediada principalmente por linfocitos T citotóxicos, o una respuesta inmune humoral mediada principalmente por linfocitos T auxiliares, que a su vez activan linfocitos B que conducen a la producción de anticuerpos.

Una "respuesta inmune protectora" se define como cualquier respuesta inmune, bien respuesta inmune mediada por anticuerpos o bien por células, o ambas, que se producen en el animal que evita o reduce de forma detectable la aparición, o elimina o reduce de forma detectable la gravedad, o ralentiza detectablemente la velocidad de progresión del trastorno de enfermedad provocado 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 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.*; hongos patógenos tales como *Candida*; protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria spp.*; helmintos tales como *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Fasciola*, bien en forma de una preparación celular inactivada completa o parcial, o bien en forma de moléculas antigénicas obtenidas por purificación proteica convencional, técnicas de ingeniería genética o síntesis química. Los antígenos adicionales incluyen virus patógenos tales como herpesvirus bovino -1,3,6, virus de diarrea viral bovina (BVDV) de tipos 1 y 2, virus paragripal bovino, virus sincitial respiratorio bovino, virus de leucosis bovina, virus de la peste bovina, virus de fiebre aftosa, rabia, virus de fiebre porcina, virus de fiebre porcina Africana, parvovirus porcino, virus de PRRS, circovirus porcino, virus de la gripe, virus de enfermedad vesicular porcina, virus de fiebre de Techen, virus de Pseudorrabia, bien en forma de una preparación de virus inactivado completo o parcial, o bien en forma de moléculas antigénicas obtenidas por purificación práctica convencional, técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

La cantidad del antígeno debería ser tal que el antígeno que, en combinación con la emulsión de aceite en agua, sea eficaz para inducir una respuesta inmune protectora en un animal. La cantidad precisa de un antígeno que sea eficaz depende de la naturaleza, actividad y pureza del antígeno, y puede determinarse por un experto en la materia.

La cantidad de emulsión de aceite en agua presente en las composiciones de vacuna debería ser suficiente para potenciar la inmunogenicidad del antígeno o los antígenos en las composiciones de vacuna. Cuando sea deseable y apropiado, pueden añadirse cantidades adicionales de tensioactivo o tensioactivos o tensioactivo o tensioactivos adicionales en la composición de vacuna además del tensioactivo o los tensioactivos proporcionados por la emulsión de aceite en agua. Hablando en general, el componente oleoso está presente en el volumen final de una composición de vacuna en una cantidad de 1,0% a 20% en volumen; preferentemente, en una cantidad de 1,0% a 10%; más preferentemente, en una cantidad de 2,0% a 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 antígeno o los antígenos y la emulsión de aceite en agua, la composición de vacuna puede incluir otros componentes que sean apropiados y deseables, tales como conservantes, agentes osmóticos, moléculas bioadhesivas y moléculas inmunoestimuladoras (por ejemplo, Quil A, colesterol, GPI-0100, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA)), como se ha descrito anteriormente en el presente documento en relación con la emulsión de aceite en agua.

Las composiciones de vacuna de la presente invención también pueden incluir un vehículo veterinariamente aceptable. La expresión "un vehículo veterinariamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes de retardo de la adsorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros.

En una realización preferida, la presente solicitud proporciona una composición de vacuna que incluye al menos uno de un antígeno de BVDV de tipo I o BVDV de tipo II, incorporado de forma intrínseca en una emulsión de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño menor de 1 μm , preferentemente con un tamaño de gota medio menor de 0,8 μm , más preferentemente menor de 0,5 μm ; y aún más preferentemente con un tamaño de gota medio de aproximadamente 0,5 μm . El antígeno de BVDV de tipo I y/o II está preferentemente en forma de una preparación viral inactiva. La emulsión de aceite en agua submicrométrica preferentemente está compuesta de una formulación AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferentemente también incluye Quil-A, colesterol y timerosol.

En otra realización preferida, la presente solicitud proporciona una composición de vacuna que incluye un antígeno de Leptospira y al menos uno de antígeno de BVDV de tipo I o BVDV de tipo II en una emulsión de aceite en agua. Los antígenos, preferentemente en forma de célula inactivada o preparación viral, se incorporan de forma intrínseca en la emulsión de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño menor de 1 μm , preferentemente con un tamaño de gota medio menor de 0,8 μm , más preferentemente menor de 0,5 μm ; y aún más preferentemente con un tamaño de gota medio de aproximadamente 0,5 μm . La emulsión de aceite en agua submicrométrica está compuesta preferentemente de una formulación 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 seleccionadas de Quil-A, colesterol, DDA, GPI-100 e hidróxido de aluminio (AlOH).

En otra realización preferida más, la presente solicitud proporciona una composición de vacuna que incluye al menos un antígeno 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 antígeno o los antígenos se combinan de forma intrínseca con la emulsión de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño menor de 1 μm , preferentemente con un tamaño de gota medio menor de 0,8 μm , más preferentemente menor de 0,5 μm ; y aún más preferentemente con un tamaño de gota medio de aproximadamente 0,25 μm . La emulsión de aceite en agua submicrométrica está compuesta preferentemente de una formulación AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferentemente también incluye una o más moléculas inmonoestimuladoras seleccionadas de Quil-A, DDA y GPI-100.

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

Procedimientos para preparar composiciones de vacuna

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

Al preparar las composiciones de vacuna de la presente invención, el antígeno o los antígenos pueden 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 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, típicamente mediante pase una o más veces a través de uno o más homogeneizadores o emulsionantes, para formar una emulsión de aceite en agua que contenga el antígeno.

5 Puede usarse cualquier homogeneizador o emulsionante disponible en el mercado para este fin, por ejemplo, emulsionante de Ross (Hauppauge, NY), homogeneizador de Gaulin (Everett, MA) o Microfluidics (Newton, MA). Como alternativa, los diversos componentes del adyuvante de emulsión, incluyendo aceite, uno o más tensioactivos y un componente acuoso pueden combinarse en primer lugar para formar una emulsión de aceite en agua usando un homogeneizador o emulsionante; y después se añade el antígeno a esta emulsión. El tamaño de gota medio de la emulsión de aceite en agua después de la mezcla primaria es de aproximadamente 1,0-1,2 micrómetros.

La emulsión que contiene el antígeno se somete después a microfluidificación para llevar el tamaño de gotas al intervalo submicrométrico. Puede conseguirse microfluidificación mediante el uso de un microfluidificador comercial, tal como el modelo número 110Y disponible de Microfluidics, Newton, Mass; Modelo de Gaulin 30CD (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); y Rainnie Minilab Tipo 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, Wis.).

15 El tamaño de gotas puede determinarse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, difracción por láser, mediante el uso de instrumentos de medición de tamaño disponibles en el mercado. El tamaño puede variar dependiendo del tipo de tensioactivo usado, la relación de tensioactivo y aceite, presión de funcionamiento, temperatura y similares. Puede determinarse 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 solicitud son menores de 1 μm de diámetro. Preferentemente el tamaño de gota medio es menor de 0,8 μm . Más preferentemente, el tamaño de gota medio es menor de 0,5 μm . Aún más preferentemente, el tamaño de gota medio es de aproximadamente 0,1 a 0,3 μm .

25 En una realización preferida de la presente solicitud, la solución de aceite de lecitina DRAKEOL®, que contiene lecitina al 25% en aceite mineral ligero, se combina y mezcla con los tensioactivos TWEEN® 80 y SPAN® 80 y solución salina para formar una mezcla que contiene aceite mineral ligero al 40%, lecitina, TWEEN® 80 0,18% y SPAN® 80 0,08%. La mezcla se emulsiona después con un emulsionante Ross® (Hauppauge, NY 11788) a aproximadamente 3.400 rpm para formar un producto de emulsión, que también se denomina una "formulación AMPHIGEN®" o "solución AMPHIGEN®". Posteriormente, el antígeno o los antígenos deseados se combinan con la solución AMPHIGEN® y cualquier otro componente apropiado (por ejemplo, moléculas inmunoestimuladoras) con la ayuda de un emulsionante, por ejemplo, un homogeneizador Ross para formar una emulsión de aceite en agua que contenga el antígeno o los antígenos. Dicha emulsión se pasa una vez a través de un microfluidificador que funciona a aproximadamente $68,93 \pm 3,45$ MPa. La emulsión de aceite en agua microfluidificada tiene gotas de un tamaño menor de 1 μm , con el tamaño de gota medio de aproximadamente 0,25 μm .

35 En otra realización preferida, antes de combinar una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una formulación AMPHIGEN®) con un antígeno o antígenos deseados, el antígeno o los antígenos se combinan con un glicósido de saponina, por ejemplo, Quil A, para formar una mezcla. Esta mezcla de antígeno o antígenos-saponina se somete a homogeneización, por ejemplo, en un frasco de homogeneización. Después se añade un esteroil, por ejemplo, colesterol, a la mezcla de antígeno o antígenos-saponina homogeneizada. La mezcla que contiene el antígeno o los antígenos, saponina y esteroil se somete después a homogeneización adicional. La mezcla de antígeno o antígenos-saponina-esteroil homogeneizada se combina después con una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, una formulación AMPHIGEN®) con la ayuda de un homogeneizador, por ejemplo. La emulsión de aceite en agua homogeneizada que contiene el antígeno o los antígenos, saponina y esteroil se somete después a homogeneización de alta presión, tal como microfluidificación.

45 Composiciones de vacuna que contienen antígenos microencapsulados en una emulsión de aceite en agua submicrométrica y procedimientos de preparación

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

50 Se conocen en la técnica procedimientos para absorber o atrapar antígenos en vehículos en partículas. Véase, por ejemplo, Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications (Justin Hanes, Masatoshi Chiba y Robert Langer. Polymer microspheres for vaccine delivery. In: Vaccine design. The subunit and adjuvant approach. Eds. Michael F. Powell y Mark J. Newman, 1995 Plenum Press, Nueva York y Londres). Los vehículos en partículas pueden presentar múltiples copias de un antígeno seleccionado al sistema inmune en un sujeto animal y promover el atrapamiento y la retención de antígenos en ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden fagocitarse por macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígenos mediante liberación de citocinas. También se han descrito en la técnica vehículos en partículas e incluyen, por ejemplo, los derivados de polímeros de polimetilmetacrilato, así como los derivados de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas), conocidos como PLG. Los polímeros de polimetilmetacrilato son no biodegradables mientras que las partículas de PLG pueden biodegradarse mediante hidrólisis no enzimática aleatoria de enlaces de éster con ácidos láctico y glicólico que se excretan a lo

largo de rutas metabólicas normales.

También se han usado microesferas biodegradables para conseguir liberación de vacunas controlada. Por ejemplo, puede conseguirse una liberación de antígenos continua durante un periodo prolongado. Dependiendo del peso molecular del polímero y la relación de ácido láctico y glicólico en el polímero, un polímero de PLGA puede tener una tasa de hidrólisis de varios días o semanas a varios meses o un año. Una liberación lenta, controlada puede dar como resultado la formación de altos niveles de anticuerpos similares a los observados después de múltiples inyecciones. Como alternativa, puede conseguirse una liberación pulsátil de antígenos de vacuna seleccionando polímeros con diferentes tasas de hidrólisis. La tasa de hidrólisis de un polímero típicamente depende del peso molecular del polímero y la relación de ácido láctico y glicólico en el polímero. Las micropartículas compuestas de dos o más polímeros diferentes con diversas tasas de liberación de antígenos proporcionan liberaciones pulsátiles de antígenos e imitan regímenes de múltiples dosis de vacunación.

De acuerdo con la presente solicitud, un antígeno, incluyendo cualquiera de los descritos anteriormente en el presente documento, puede absorberse en un vehículo polimérico en partículas, preferentemente un polímero de PLG, usando cualquier procedimiento conocido en la técnica (tal como uno ejemplificado en el Ejemplo 17) para formar una preparación de antígeno microencapsulada. La preparación de antígeno microencapsulada se mezcla después con y se dispersa en una emulsión de aceite en agua submicrométrica, cuya emulsión se ha descrito anteriormente en el presente documento, para formar la composición de vacuna.

En una realización preferida, la presente solicitud proporciona una composición de vacuna que contiene un antígeno encapsulado en un polímero de PLG, en el que el antígeno microencapsulado se dispersa de forma extrínseca en una emulsión de aceite en agua microfluidificada que está compuesta de aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN80, SPAN80 y solución salina y tiene un tamaño de gota medio menor de 1,0 μm .

Complejos formados por una saponina y estero

En una realización, la presente invención proporciona composiciones que contienen una saponina y un estero, en las que la saponina y el estero forman complejos en forma de micelas helicoidales. De acuerdo con la presente invención, estos complejos tienen actividades inmunoestimuladoras.

Por "inmunoestimuladoras" se entiende que los complejos pueden potenciar la respuesta inmune inducida por un componente antigénico, o que los complejos pueden inducir una respuesta inmune independiente de un componente antigénico separado.

De acuerdo con la presente invención, una saponina preferida para su uso en una composición de la presente invención es Quil A.

Los esteroides preferidos para su uso en las composiciones adyuvantes de la presente invención incluyen beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. Estos esteroides se conocen bien en la técnica, por ejemplo se desvela colesterol en el Índice Merck, 11^a Edición, página 341, como un estero de origen natural hallado en la grasa animal. Más preferentemente el estero es colesterol.

La relación de saponina:estero en la composición está típicamente en el orden de 1:100 a 5:1 en peso. Preferentemente, la relación es 1:1.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones de vacuna que contienen una saponina, un estero y un antígeno, en las que la saponina y el estero forman complejos en forma de micelas helicoidales, y en las que el antígeno se mezcla con pero no se incorpora dentro de las micelas helicoidales.

A continuación se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos solamente, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ningún modo.

Ejemplo 1

Preparación de una formulación AMPHIGEN®

Se preparó una formulación AMPHIGEN® en un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se mezclaron entre sí 80 litros de solución de aceite de Lecitina Drakeol, 116 litros de solución salina de Toxoide del Tétanos, 1,2 litros de SPAN 80 y 2,8 litros de Tween 80 y se emulsionaron usando un emulsionante de Ross. La solución de aceite de lecitina Drakeol contenía lecitina de soja al 25% y aceite mineral al 75%. El producto emulsionado se recirculó a través de emulsionante de 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 emulsionante de Ross se transfirió a un homogeneizador de Gaulin y se homogeneizó durante 20 minutos bajo una presión de 31,02 MPa. La solución de aceite de Lecitina Drakeol al 40% resultante (en lo sucesivo en el presente documento la "formulación AMPHIGEN®" o "solución AMPHIGEN®") se distribuyó después en recipientes de carboxi polipropileno estériles. La distribución se realizó dentro de una campana de distribución de

clase 100 localizada en un ambiente controlado clase 10.000. Los recipientes se almacenaron a 2-7 °C. Esta formulación AMPHIGEN® se usó en los experimentos descritos posteriormente en el presente documento a no ser que se indique de otro modo.

Ejemplo 2

5 Mezcla primaria por homogeneización de mezcla instantánea de la vacuna de BVD

El aparato usado para este procedimiento de homogeneización 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 de Tipo I (una preparación viral de BVD de Tipo I inactivada) al orificio de la parte inferior en el recipiente de mezcla. Después de haberse completado la transferencia del volumen requerido del antígeno de BVD de Tipo I, el frasco de BVD de Tipo I se reemplazó con el frasco que contenía una preparación viral de BVD de Tipo II inactivada (una preparación viral de BVD de Tipo II inactivada). Después de haberse completado la cantidad requerida de transferencia de un antígeno de BVD de Tipo II, el homogeneizador Ross se unió al recipiente portátil y se inició la recirculación a rpm máximo (3.300 rpm). La agitación del frasco se mantuvo a velocidad media.

Usando técnica aséptica o válvula de cruce de corrientes, se unió un frasco que contenía Quil-A a concentración de 50 mg/ml con el orificio en línea del homogeneizador en el recipiente de mezcla. Se pasó una cantidad requerida de la solución de Quil-A al recipiente a través de succión en línea. Después de haberse completado la transferencia de la 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 recipiente de mezcla. Posteriormente, se añadieron una cantidad requerida de la formulación AMPHIGEN®, solución de timerosol 10% y soluciones expansoras de medio de Eagle modificado básico ("BME") al recipiente de mezcla.

Una vez que se hubieron completado todas las adiciones, la mezcla se continuó durante 15 minutos adicionales. La formulación resultante se separó en alícuotas en dosis de 2 ml y representó una vacuna de BVD basada en formulación de AMPHIGEN® no microfluidificada. Cada dosis de la vacuna contenía 500 µg de Quil-A, 500 µg de colesterol, formulación AMPHIGEN® 2,5% y timerosol 0,009%. La concentración de antígeno para las dos cepas de BVD diferentes se determinó con respecto al título de ELISA para gp53.

Ejemplo 3

Mezcla secundaria por microfluidificación

La **Figura 2** ilustra el procedimiento usado para la mezcla secundaria mediante microfluidificación. El microfluidificador se esterilizó por vapor. En primer lugar se instaló la cámara del módulo de procesamiento auxiliar en la unidad y se instaló la cámara de blanco en la segunda posición de cámara. El recipiente que contenía la vacuna de BVD completamente adyuvantada preparada como se ha descrito en el Ejemplo 2 se conectó con el microfluidificador uniendo una línea de transferencia de la válvula de drenaje de recipiente de suministro a la entrada del microfluidificador. Se conectó gas nitrógeno a la entrada de filtro de aire de recipiente de suministro y la posición de la presión del recipiente se ajustó a 137,90 +/- 34,47 KPa. La válvula de drenaje del recipiente de recogida se conectó a la línea de transferencia desde la salida del microfluidificador.

Después de realizar todas las conexiones necesarias, las válvulas se abrieron y se inició la microfluidificación a una presión de funcionamiento de 68,93 +/- 3,45 MPa. El contenido completo de la vacuna se pasó a través del microfluidificador una vez y se recogió en la cámara post-microfluidificación. Esta preparación se separó en alícuotas en dosis de 2 ml y representa la vacuna de BVD basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada.

40 Ejemplo 4

Preparación de una composición de vacuna mediante mezcla experimental

La formulación AMPHIGEN® preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1 se diluyó al 2,5% con la adición de antígenos de BVD y el expansor. La solución resultante se mezcló en el banco usando una barra de agitación en lugar de usar un homogeneizador. La preparación final contenía la siguiente composición: antígenos de BVD de Tipo I y Tipo II, formulación AMPHIGEN® al 2,5% (que contiene aceite, lecitina, SPAN® y TWEEN®, como se ha descrito 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

50 Comparación de la distribución de los tamaños de gotas entre las preparaciones de vacunas basadas en formulación AMPHIGEN® microfluidificadas y no microfluidificadas

La vacuna basada en formulación AMPHIGEN® no microfluidificada preparada como se ha descrito en el Ejemplo 2, la vacuna basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada preparada como se ha descrito en el Ejemplo 3 y la preparación preparada mediante mezcla experimental como se ha descrito en el Ejemplo 4, se usaron para comparar el tamaño de las gotas de las preparaciones de vacuna. Se añadieron 2 ml de la muestra de cada una de

las preparaciones a un medidor de difracción por Láser Malvern 2000 y se determinó la distribución de los tamaños de gotas. Como se muestra en la **Figura 3**, los resultados indican que la preparación de vacuna basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada tuvo el volumen de partículas máximo de aproximadamente 0,1 micrómetros mientras que la preparación de vacuna basada en formulación AMPHIGEN® no microfluidificada tuvo el volumen de distribución de partículas máximo de aproximadamente 1 micrómetro.

Ejemplo 6

Reducción de la separación de fases de la vacuna

Se compararon entre sí tres preparaciones de vacuna diferentes: la vacuna basada en formulación AMPHIGEN® no microfluidificada preparada como se ha descrito en el Ejemplo 2, la vacuna basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada preparada como se ha descrito en el Ejemplo 3 y la vacuna preparada mediante mezcla experimental como se ha descrito en el Ejemplo 4, para determinar sus propiedades de separación de fases tras almacenamiento largo. Todas estas preparaciones se dejaron reposar a 4 °C durante aproximadamente un mes y la separación de fases se supervisó con respecto a la aparición de una capa cremosa en la parte superior de las preparaciones de vacuna. Como se muestra en la **Figura 4**, no hubo separación de fases en la preparación basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada en comparación con las otras dos preparaciones.

Ejemplo 7

Preparación de vacuna de vacas microfluidificada y no microfluidificada contra virus de la diarrea viral bovina

Se incorporó de forma intrínseca antígeno viral de Diarrea Viral Bovina en la formulación AMPHIGEN® mediante microfluidificación. La expresión "incorporado de forma intrínseca" se refiere al procedimiento por el que el antígeno se añadió a la formulación AMPHIGEN® antes de la microfluidificación. El antígeno se sometió a las fuerzas físicas del procedimiento de microfluidificación junto con los componentes de la formulación adyuvante. En el grupo de control no microfluidificado, la preparación de antígeno se dispersó en la formulación AMPHIGEN® mediante mezclado.

La composición final de las preparaciones tanto de control como microfluidificada fue la siguiente: BVD tipo I con un título de ELISA después de inactivación de 2535 UR/dosis para gp53, BVD Tipo II con un título de ELISA después de inactivación de 3290 UR/dosis para gp53, Quil-A a la concentración de 1,25 mg/dosis, colesterol a la concentración de 1,25 mg/dosis, la formulación AMPHIGEN® a la concentración final de 2,5%, y timerosal a la concentración final de 0,009%. La dosis de la vacuna fue de 5 ml.

Ejemplo 8

Estabilidad a largo plazo de antígenos virales de BVD incorporados de forma intrínseca en la preparación de vacuna basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada

Este experimento se llevó a cabo para determinar la estabilidad del antígeno incorporado de forma intrínseca durante el almacenamiento a largo plazo. Se incorporó de forma intrínseca antígeno viral de BVD de Tipo II muerto en la formulación AMPHIGEN® durante el procedimiento de microfluidificación para obtener preparación de vacuna microfluidificada (A907505). Otras tres preparaciones de vacuna que contenían el mismo antígeno en formulación AMPHIGEN® no microfluidificada (A904369, A904370 y A904371) actuaron como el control. En las preparaciones no microfluidificadas, el antígeno se mezcló con formulación AMPHIGEN® y se mezcló mediante mezclado usando un homogeneizador Ross. Las cuatro preparaciones de vacuna se almacenaron a 4 °C durante dos años. En diferentes momentos durante el almacenamiento (0, 6, 12 o 24 meses), las cuatro formulaciones se usaron 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 recogió el día 35, y se midió la respuesta serológica a la vacuna con respecto al título de anticuerpo mediante ELISA BVDV-E2. Como se muestra en la Figura 5, la preparación de vacuna microfluidificada mostró un título de anticuerpo mayor en todos los puntos temporales ensayados (0, 6, 12, y 24 meses), lo que sugiere que no se pierde la estabilidad de la preparación de antígeno durante la incorporación intrínseca del antígeno durante el procedimiento de microfluidificación. Además, se descubrió también sorprendentemente que la preparación de vacuna microfluidificada indujo una respuesta inmune potenciada en todos los puntos temporales.

Ejemplo 9

Reducción del aumento inducido por vacuna de la temperatura rectal después de microfluidificación

Las preparaciones de vacuna microfluidificadas y no microfluidificadas preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 7 se usaron para vacunar a las vacas el día cero y la temperatura rectal se supervisó durante el periodo de un día antes de la vacunación hasta cuatro días después de la vacunación. La dosis de vacuna fue de 2 ml. Los

grupos se vacunaron con una dosis individual o doble de la vacuna. Las temperaturas rectales se midieron y registraron diariamente del Día -1 al Día 4, inclusive. Se midieron las temperaturas rectales el día 0 antes de la administración del artículo de ensayo.

- 5 Como se muestra en la **Figura 6**, los resultados indican que hubo un aumento considerable de la temperatura rectal en aproximadamente 24 horas después de la vacunación en esos animales vacunados con una dosis individual o doble de la formulación de vacuna no microfluidificada. Sin embargo, en los animales vacunados con formas microfluidificadas de vacuna, el aumento de la temperatura rectal después de la vacunación fue solamente mínimo y significativamente menor que en los animales vacunados con la formulación no microfluidificada (**Figura 6**).

Ejemplo 10

- 10 **El volumen de reacción del sitio de inyección se resolvió más rápido cuando se vacunó con formulaciones de vacuna microfluidificadas.**

Las preparaciones de vacuna microfluidificadas y no microfluidificadas preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 7 se usaron para vacunar a las vacas el día cero. Los animales incluidos en este estudio fueron vacas de carne cruzadas. Hubo tres animales en cada uno de los grupos de tratamiento con placebo (T01 y T02). Hubo seis animales en cada uno de los grupos T03 a T06. La dosis de vacuna fue de 2 ml y los grupos se vacunaron con una o dos dosis de la vacuna el día 0. El día 0, se administró el artículo de ensayo en el lado derecha del cuello. Los animales que recibieron la dosis doble (4 ml) del artículo de ensayo (T02, T04 y T06) recibieron la dosis doble completa como una inyección individual en un lateral. Se realizó observación de los sitios de inyección, incluyendo estimación del tamaño de la reacción en el sitio de inyección en el lado derecho del cuello desde el Día 0 hasta el Día 4, inclusive, y los Días 6, 9 y 14. El Día 0 se observaron los sitios de inyección antes de la administración de artículo de ensayo. Los grupos vacunados con una o dos dosis de placebo no mostraron ningún aumento significativo en el volumen de reacción del 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 microfluidificada, hubo un aumento proporcional en el volumen de reacción del sitio de inyección entre la vacunación de una dosis y dos dosis. Por otro lado, en el caso de la formulación de vacuna microfluidificada, aunque la dosis individual indujo un volumen de reacción de sitio de inyección mayor, la inyección con la segunda dosis no provocó ningún aumento adicional. Además, en el caso de los animales a los que se inyectó formulación de vacuna microfluidificada, el volumen del sitio de reacción de sitio de inyección se resolvió a una velocidad más rápida en comparación con el de los animales a los que se inyectó una formulación de vacuna no microfluidificada. Estos resultados se muestran en la **Figura 7**.

- 30 **Ejemplo 11**

Preparación de preparaciones de vacuna basadas en formulación AMPHIGEN® microfluidificadas con antígenos de *Leptospira* y viral de BVD incorporados y moléculas inmunoestimuladoras tales como Quil A y DDA

35 Se formuló *Leptospira hardjo-bovis* cepa CSL inactivada por formalina en el adyuvante apropiado a recuentos directos de aproximadamente $1,4 \times 10^9$ organismos/5 ml de dosis. Se formuló *Leptospira pomona* cepa T262 inactivada por formalina a aproximadamente 2400 Unidades Nefelométricas/5 ml de dosis. Las unidades nefelométricas se calcularon en base a la medición nefelométrica de fluido de fermentación preprocesado. Se formuló virus BVD de Tipo 1 a título de Elisa E2 de aproximadamente 3000 Unidades Relativas/5 ml de dosis. Se formuló virus BVD de Tipo 2 a título de Elisa E2 de aproximadamente 3500 unidades relativas/5 ml de dosis. La Unidad Relativa se calculó en base a el título de ELISA E2 de volumen de fluido después de la activación antes del ensamblaje. Se usaron tanto Quil-A como colesterol a la concentración de 0,5 mg por dosis. Se usaron timerosol y la formulación AMPHIGEN® a la concentración final de 0,009% y 2,5%, respectivamente. Se usó hidróxido de aluminio (Rehydragel LV) a la concentración final de 2,0%. Cuando se usó DDA como un inmunomodulador, se incluyó DDA dentro de la formulación AMPHIGEN®. La formulación AMPHIGEN® (es decir, la solución madre de lecitina Drakeol al 40%) contenía 1,6 mg/ml de DDA y, cuando se diluyó de forma apropiada, la preparación de vacuna final contenía formulación AMPHIGEN® 2,5% y 0,1 mg/ml de DDA.

50 En la preparación de diferentes formulaciones de vacuna, se añadieron fracciones de BVD, Leptos, Quil-A, colesterol, timerosol, la formulación AMPHIGEN® y solución salina como un expansor a un homogeneizador Silverson y se mezclaron durante 15 minutos a 10.000 ± 500 RPM. Los componentes se microfluidificaron después a través de un tamiz de 200 micrómetros a 68,93 MPa.

Cuando la formulación de vacuna contenía hidróxido de aluminio, la microfluidificación se llevó a cabo sin hidróxido de aluminio. Después de completarse la microfluidificación, se añadió hidróxido de aluminio y se mezcló con una barra de agitación durante una noche a 4 °C.

Ejemplo 12

- 55 **Preparación de vacuna viral de BVD para estudios de exposición**

La preparación de vacuna usada en este experimento contenía antígenos tanto del virus BVD de tipo 1 como de

virus BVD de tipo 2. Se usó antígeno BVD1-5960 al título de ELISA después de inactivación de 2535 UR/dosis para gp53. Se usó el antígeno BVD2-890 al título de ELISA después de inactivación de 3290 UR/dosis para gp53. Se usaron Quil A y colesterol a la concentración de 0,5 mg/ml. Se usaron timerosal y la formulación AMPHIGEN® a la concentración final de 0,009% y 2,5%, respectivamente. Cuando se usó DDA como un inmunomodulador, se incluyó DDA dentro de la formulación AMPHIGEN®. La solución madre de AMPHIGEN® (solución de lecitina Drakeol al 40%) contenía diversas cantidades de DDA y, cuando se diluyó apropiadamente, la preparación de vacuna final contenía formulación AMPHIGEN® al 2,5% y concentración de DDA que variaba de 0,5 mg/dosis a 2,0 mg/dosis. Se usó gel de aluminio (Rehydragel-LV) a la 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 microfluidificaron pasándolos a través de una cámara de 200 micrómetros con 68,93 MPa. Cuando la preparación de vacuna contenía hidróxido de aluminio, la microfluidificación se llevó a cabo sin hidróxido de aluminio. Después de completarse la microfluidificación, se añadió hidróxido de aluminio y se mezcló con una barra de agitación durante una noche a 4°C.

Ejemplo 13

Protección contra exposición a *Leptospira* después de vacunación con una formulación de vacuna Amphigen microfluidificada con antígenos de *Leptospira*.

Tabla 1 - Grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	Composición de adyuvante
T01	Solución salina
T02	Quil-A, colesterol y la formulación AMPHIGEN® (QAC)
T03	Quil-A, colesterol, la formulación AMPHIGEN® y AIOH (OAC-AIOH)
T04	DDA, colesterol y la formulación AMPHIGEN® (DDA)
T05	DDA, colesterol, la formulación AMPHIGEN® y AIOH (PDD-AIOH)

La Tabla 1 muestra la composición de las formulaciones adyuvantes en las preparaciones de vacunas ensayadas en este estudio. Las preparaciones de vacunas se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 11. Hubo seis animales en cada grupo. Se usaron novillas cruzadas para carne de aproximadamente siete meses de edad en este estudio. Se realizó vacunación el día 0 y el día 21 por vía subcutánea con 5 ml de volumen de vacuna. Se realizó exposición con *L. hardjo-bovis* cepa 203 de NADC (Centro Nacional de Enfermedades agrícolas). Se realizó la exposición durante los días 57-59 con un inóculo de 1 ml. Se administró la exposición conjuntamente en el ojo y por vía vaginal. El material de exposición contenía 5,0 X 10⁶ leptospiros/ml. Se recogió orina semanalmente para cultivo de leptospiros, FA y PCR. Se realizó recogida de riñones durante los días 112 y 113.

Tabla 2 - Resultados del estudio de exposición a *Leptospira*

Tratamiento	Porcentaje de terneros siempre positivos para <i>Leptospira</i> en orina y riñón mediante cultivo	Porcentaje de terneros siempre positivos para <i>Leptospira</i> en orina y riñón mediante FA	Porcentaje de terneros siempre positivos para <i>Leptospira</i> en orina y riñón mediante PCR	Porcentaje de terneros siempre positivos para <i>Leptospira</i> en orina y riñones 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

5 La Tabla 2 muestra los datos del estudio de exposición a Leptospira. Al determinar el porcentaje de infección de Leptospira en el animal expuesto, se usaron los siguientes criterios. Si el cultivo de riñón era positivo para solamente una muestra, se consideraba que el animal era positivo para Leptospira. Si un animal es positivo en solamente una muestra para FA o PCR, se considera que el animal es negativo. Si la muestra es positiva tanto para FA como para PCR en solamente una muestra, se consideró positivo para Leptospira.

Los resultados mostrados en la Tabla. 2 indican que hubo una duración significativamente más corta de difusión urinaria en todos los grupos de vacuna en base a los tres ensayos. En lo que respecta a la colonización urinaria y de riñón, las eficacias de las formulaciones que contenían QAC y DDA sin AIOH eran comparables. AIOH no mejoró e incluso redujo las eficacias de las vacunas que contenían QAC o DDA en este estudio de exposición.

10 **Tabla 3 – Intervalo de título de aglutinación microscópica el día de máxima media geométrica del título 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

15 Se detectaron respuestas serológicas contra ambos antígenos de Leptospira en la formulación de vacuna en el animal vacunado y se observó la respuesta máxima el día 35. No hubo 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 protección aunque la respuesta serológica se potenció por la presencia de gel de aluminio en la vacuna.

Ejemplo 14

Inducción de respuesta inmune al antígeno viral de BVD y protección contra la exposición a virus BVD de tipo 2 después de inmunización con una preparación de vacuna microfluidificada que contiene formulación AMPHIGEN® y DDA.

20 En este experimento se usaron terneros de cuatro a siete meses de edad seronegativos. Hubo seis grupos diferentes y cada grupo tuvo diez animales (Tabla 4). El día 0 y día 21 cada animal recibió una dosis subcutánea de 2 ml de la vacuna o placebo en el lateral del cuello aproximadamente a medio camino entre la escápula y la nuca.

Tabla 4 - Grupos de tratamiento

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

25 Se administró una dosis de 5 ml de la preparación de virus para exposición (aproximadamente 2,5 ml por orificio nasal) por vía intranasal el día 44 del estudio. Se usó virus BVD de tipo 2 no citopático, aislado N° 24515 (cepa Ellis), lote N° 46325-70 en este estudio como la cepa de exposición. Se titularon las muestras conservadas de material de exposición (dos repeticiones por titulación) en el momento en que se inició la exposición e inmediatamente después de su compleción. El título de virus vivo medio por 5 ml de dosis fue 5,3 log₁₀ FAID₅₀/5 ml antes de la exposición y 5,4 log₁₀ FAID₅₀/5 ml después de la exposición (FAID es equivalente a TCID₅₀).

30

Los animales se supervisaron diariamente desde el día -3 hasta el día 58. Se realizaron puntuaciones de enfermedad clínica de 0, 1, 2 o 3 en base a señales clínicas atribuibles a infección por BVD 2 para cada animal los días 42 a 58. Las puntuaciones el día 44 se registraron antes de la exposición. Se recogieron muestras de sangre (2 tubos de separación de suero de 13 ml, SST) de cada animal los días 0, 21, 35, 44 y 58 para la determinación de títulos de suero de anticuerpos de neutralización de virus BVD de tipo 1 y BVD de tipo 2.

Se recogieron muestras de sangre de cada animal del día 42 al día 58, inclusive, y se determinó la presencia de virus BVD en células de la capa leucocítica. El día 44, se obtuvieron muestras antes de la exposición.

Para determinar los recuentos de glóbulos blancos, se recogieron muestras sanguíneas (un tubo de EDTA de 4 ml) de cada animal el día 42 al día 58, inclusive. El día 44, se obtuvieron muestras antes de la exposición.

La leucopenia se definió como una reducción del 40% o mayor en el recuento de WBC desde la línea basal (media de recuentos de WBC antes de la exposición desde dos días antes, y el día de la exposición).

Se usaron puntuaciones de enfermedad clínica para definir el estado de enfermedad como sigue: si la puntuación es ≤ 1 , entonces la enfermedad = no, si la puntuación es > 2 , entonces la enfermedad = sí.

Como se muestra en las Tablas 5 y 6, los grupos vacunados con vacunas que contenían antígenos virales de BVD junto con la formulación AMPHIGEN®, Quil A o DDA y microfluidificadas, se seroconvirtieron con títulos de neutralización de virus en suero significativos para virus tanto BVD de tipo 1 como BVD de tipo 2. En esos grupos hubo también una reducción significativa en el porcentaje de animales que mostraban viremia después de la exposición, mientras que en el grupo de control el 100% de los animales eran virémicos (Tabla 7). Además, en esos grupos vacunados la frecuencia de la enfermedad también se redujo significativamente (Tabla 8). De forma similar, el porcentaje de animales que mostraban leucopenia también se redujo en los grupos de vacuna y la reducción de 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 hubo una reducción significativa del aumento de peso en comparación con los grupos vacunados (Tabla 10).

Serología

Antes de la vacunación el día 0, todos los animales en el estudio eran seronegativos (SVN $< 1:02$) para anticuerpos para virus BVD de tipo 1 y 2 (datos no mostrados). Catorce días después de la segunda vacunación (día 35), todos los animales a los que se había administrado el placebo (T01) permanecieron seronegativos para anticuerpos para virus BVD de tipos 1 y 2; y todos los animales vacunados con el ITA (antígeno de ensayo de investigación) (T02, T03, T04, T05 y T06) eran seropositivos (SVN $\geq 1:08$) para anticuerpos para virus BVD, de tipos 1 y 2. Un animal al que se administró la vacuna con la formulación AMPHIGEN® como adyuvante a 2 mg/dosis de DDA tuvo un título de SVN de 3 para anticuerpos para virus BVD de tipo 2 el día 35 (Tablas 11 y 12).

Antes de la exposición el día 44, todos los controles (T01), excepto uno, fueron seronegativos (SVN $< 1:2$) para anticuerpos para virus BVD de tipos 1 y 2 (datos no mostrados). El control (N° 2497) fue seropositivo (SVN = 10) para anticuerpos para virus BVD de tipo 1 y seronegativo para anticuerpos para virus BVD de tipo 2. Catorce días después de la exposición, todos los animales en el estudio fueron seropositivos para anticuerpos para virus BVD de tipos 1 y 2.

Tabla 5. Media geométrica de los títulos de neutralización de virus en suero de virus BVD de tipo 1

Tratamiento		Media geométrica de títulos de SVN de BVDV de tipo 1 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 los títulos de neutralización de virus en suero de virus BVD de tipo 2

Tratamiento		Media geométrica de títulos de SVN de BVDV de tipo 1 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, AI	<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

Tabla 7. Aislamiento de virus BVD después de exposición

Tratamiento		Aislamiento de virus BVD		
		Días en estudio	Frecuencia (%) de animales virémicos	Media de mín. cuad. de días con 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, AI	---	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

5

Tabla 8. Señales clínicas de enfermedad de BVD después de exposición

Tratamiento		Frecuencia (%) con la enfermedad	Observaciones de frecuencia (%) con señales clínicas de enfermedad BVD				Obs. Totales
			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, AI	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

Tabla 9. Leucopenia después de exposición

Tratamiento		Leucopenia	
		Frecuencia (%) de animales leucémicos	Media de mín. cuad. de días con leucemia
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 aumento de peso corporal durante el estudio

Tratamiento		Peso corporal medio (kg) el día de Estudio				Aumento de peso (kg)
		-1	43	50	58	
T01	Solución salina	171,46	219,95	22,72	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, AIOH	186,20	233,33	242,31	262,63	76,43
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	169,51	214,23	223,44	244,08	74,57
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	162,8	204,75	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 Como muestran los datos en la Tabla 13, durante el período de exposición (días 44 a 58), los diez animales en el control (T01) eran virémicos (se aisló virus BVD en uno o más días). En los grupos a los que se administró el ITA, la frecuencia de animales virémicos fue 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 administró ITA fue estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$). La media de mínimos cuadrados del número de días de viremia también fue significativamente mayor (10,4 días) para el control en comparación con los grupos a los que se administró el 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 señales de enfermedad de BVD. Como se muestra en la Tabla 14, la frecuencia de animales con señales clínicas de enfermedad de virus BVD fue 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 administró el ITA (T02, T03, T04, T05 y T06, respectivamente). La diferencia entre el control y los grupos a los que se administró el ITA fue estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Leucopenia

- 20 Como se muestra en la Tabla 15, durante el período de exposición (días 44 a 58), los diez animales en el control (T01) eran leucémicos (una reducción del 40% en recuento de glóbulos blancos desde la línea basal antes de la exposición, días 42-44). La frecuencia de animales con leucemia fue seis, dos, cuatro, tres y dos de los diez animales en cada uno de los grupos a los que se administró ITA (T02, T03, T04, T05 y T06, respectivamente). La diferencia entre el control y el grupo al que se administró vacuna que tenía como adyuvante la formulación AMPHIGNEN® a 0,5 mg/dosis e hidróxido de aluminio (T03) fue estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$). La media

de mínimos cuadráticos del número de días de leucemia fue significativamente mayor (7,8 días) para el control en comparación con los grupos a los que se administró el ITA (0,2 a 1,2 días).

Ejemplo 15

5 Inducción de respuesta inmune al antígeno viral de BVD y protección contra exposición al virus BVD de tipo 2 después de inmunización con formulación de vacuna microfluidificada que contiene GPI-0100.

10 Se siguió un conjunto de condiciones experimentales como se ha descrito 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 basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada que contenía Quil A o GPI-0100 tuvieron un título de anticuerpos significativo para virus tanto BVD de tipo 1 como BVD de tipo 2. El título de anticuerpo para virus BVD de tipo 1 fue mucho mayor que para virus BVD de tipo 2. Sin embargo, la exposición posterior a virus BVD de tipo 2 mostró una fuerte protección y la incidencia de enfermedad se redujo significativamente en los terneros vacunados con la preparación de vacuna basada en formulación AMPHIGEN® microfluidificada que contenía GPI-0100.

Tabla 11. Media geométrica de títulos de neutralización de virus en suero de virus BVD de tipo 1

Tratamiento		Media geométrica de título de SVN				
		0	21	35	43	57
T01	Solución salina	<2	<2	<2	<2	35,5
T02	Amphigen, Quil A	<2	98,7	20171,0	12203,4	44762,4
T03	Amphigen, 2 mg de GPI-0100, AIOH	<2	84,6	10998,5	7383,2	25709,2
T04	Amphigen, 2 mg de GPI-0100	<2	106,0	18179,2	8933,2	28526,2
T05	Amphigen, 3 mg de GPI-0100	<2	62,9	15024,3	8780,1	19824,4
T06	Amphigen, 5 mg de GPI-0100	<2	71,1	12203,3	7512,0	16670,2

15

Tabla 12. Media geométrica de títulos de neutralización de virus en suero de virus BVD de tipo 2

Tratamiento		Media geométrica de títulos de SVN de BVDV de tipo 1 el día del estudio				
		0	21	35	44	58
T01	Solución salina	<2	<2	<2	<2	14,7
T02	Amphigen, Quil A	<2	12,9	2312,0	1692,5	1663,4
T03	Amphigen, 2 mg de GPI-0100, AIOH	<2	13,2	1663,5	1116,8	1562,3
T04	Amphigen, 2 mg de GPI-0100	<2	20,5	2610,2	1978,2	2478,7
T05	Amphigen, 3 mg de GPI-0100,	<2	11,4	1752,8	1305,2	2435,4
T06	Amphigen, 5 mg de GPI-0100	<2	12,0	3158,4	2120,2	1845,6

Tabla 13. Aislamiento de virus BVD después de exposición

Tratamiento		Aislamiento de virus BVD	
		Frecuencia (%) de animales virémicos	Media de mín. cuad. de los días con viremia
T01	Solución salina	10/10 (100,0)	8,4
T02	Amphigen, Quil A	3/10 (30,0)	0,3
T03	Amphigen, 2mg 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. Señales clínicas de enfermedad de BVD después de exposición

Tratamiento		Frecuencia (%) con la enfermedad	Observaciones de frecuencia (%) con puntuación de enfermedad clínica de			Obs Totales
			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

5

Tabla 15. Leucopenia después de exposición

Tratamiento		Leucopenia	
		Frecuencia (%) de animales leucopénicos	Media de mín. cuad. de días con 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 o mortalidad en los animales vacunados. Se demostró la potencia de cada vacuna por seroconversión (títulos de anticuerpo SVN para BVD-1 y BVD-2 > 1:08) en el 100% de los animales vacunados. Se demostró resistencia satisfactoria a la exposición por la vacuna con 2 mg de GPI-0100 solamente como adyuvante.

Ejemplo 16**Preparación de vacuna que contiene antígeno microencapsulado en emulsión de aceite en agua microfluidificada**

5 Se añadieron 3 g de Trehalosa (Fluka) a agua para obtener una reserva de 333 mg/ml de solución de Trehalosa. Se añadió antígeno PauA recombinante solubilizado en solución de SDS al 0,8% (SDS/rPauA) a solución de Trehalosa para obtener una concentración final de 494 µg de rPauA/ml. En la siguiente etapa se disolvieron 10 gramos de polilactida ácido glicólico (PLG- Resomer RE 503H, Boeringher Ingelheim) en 200 ml de cloruro de metileno (MeCl₂). La solución de PLG/MeCl₂ resultante se combinó con la solución de SDS-rPauA/trehalosa preparada en la primera etapa. La solución combinada se sometió a microfluidificación usando (Microfluidificador de Microfluidics Modelo M110EH) y la preparación microfluidificada se secó por pulverización usando (Secador por Pulverización Temco Modelo SD-05). El material secado por pulverización se recogió usando una malla de 500 micrómetros.

15 La concentración de rPauA en este material secado por pulverización se cuantificó usando un análisis de transferencia de Western. Se disolvieron 1,04 mg de material secado por pulverización en 50 µl de acetona y se centrifugó a 13.200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante. El sobrenadante y las fracciones de sedimentos se secaron en campana de seguridad biológica durante 2,5 horas. El sedimento se resuspendió 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 seca se resuspendió con 20 µl de solución de muestra. En el análisis de Western se usó PauA purificado como un patrón para cuantificar el contenido de rPauA del material secado por pulverización.

20 Se preparó una solución madre de manitol al 20% disolviendo 100 gramos de manitol (Sigma) en 500 ml de agua para inyección (WFI). La solución se calentó a 40 °C con placa térmica/agitador y se enfrió a 30 °C. La solución se esterilizó por filtración a través de un filtro estéril de 0,22 micrómetros (Millipore). Se preparó solución de carboximetilcelulosa al 2,5% disolviendo 12,5 gramos de carboximetilcelulosa (Sigma) en 500 ml de WFI y se mezcló durante una noche a 4 °C. La solución se esterilizó por autoclave a 121 °C.

25 El polvo resultante del secado por pulverización se reconstituyó en una solución que contenía manitol al 5%, carboximetilcelulosa al 0,3% y 1:5.000 de timerosol. La solución final se separó en alícuotas en recipientes de 3 ml y se liofilizó usando un liofilizador (USIFROID). El polvo liofilizado representa el rPauA microencapsulado. El antígeno proteico subunitario microencapsulado se resuspende en 2 ml de emulsión de aceite en agua microfluidificada que contiene una formulación AMPHIGEN® (tal como la emulsión microfluidificada descrita en el Ejemplo 20) y se usa como una vacuna.

Ejemplo 17**Preparación de formulación de vacuna microfluidificada que contiene tanto antígeno de célula completa bacteriana como antígeno proteico recombinante en emulsión de aceite en agua**

35 Se realizaron dos preparaciones de vacuna que contenían tanto proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante como células bacterianas de *Escherichia coli*, añadidas de forma intrínseca a emulsiones de aceite en agua como se ha descrito en los Ejemplos 2 y 3. El antígeno PauA recombinante estaba a una concentración de 100 µg por dosis y las células de *E. coli* estaban al recuento final de 4×10^9 por dosis. Las composiciones adyuvantes de la emulsión de las dos formaciones de vacuna se muestran en la Tabla 16.

40 **Tabla 16. Formulaciones de vacuna que contienen tanto la proteína recombinante como células *E. coli* completas**

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

Ejemplo 18

Respuesta inmune a vacuna microfluidificada que contiene el rPauA y agentes bacterianos de células completas en emulsión de aceite en agua

5 Se usaron vacas lecheras maduras en este experimento. Los animales estaban al final de su primera o segunda lactancia en el momento de la admisión. Se administraron 2 ml de cada formulación de vacuna por vía subcutánea tres veces, una vez en el momento del secado (D-0), 28 días después (D=28) y de nuevo de 4 a 10 días después del parto (C+4 - C+10). La primera y tercera dosis se administraron en el flanco izquierdo del cuello y la segunda dosis se administró en el flanco derecho del cuello. Se recogió sangre antes de cada vacunación y aproximadamente 14 días y 32 días después de la tercera vacunación. El título de anticuerpo para *E. coli* y el antígeno rPauA se determinó mediante ELISA. Como se muestra en la Figura 8, los resultados indican que el título de anticuerpo para rPauA fue mayor en el grupo vacunado con formulación de vacuna que contenía GPI-0100 como un inmuoestimulante y alcanzó el máximo el día 70 después de la vacunación inicial. El título de anticuerpo para antígeno de *E. coli* se muestra en la Figura 9. El título de anticuerpo para antígeno de *E. coli* fue comparable en ambas formulaciones de vacuna, aunque la presencia de GPI-0100 como un inmuoestimulante indujo un título de anticuerpo relativamente mayor en comparación con la formulación con DDA como un inmuoestimulante.

Ejemplo 19

Análisis de actividad viricida de las preparaciones de vacuna basadas en formulación AMPHIGEN® microfluidificada

20 Para determinar si la microfluidificación inactiva el virus, se determinaron las actividades viricidas de tres preparaciones de vacuna basadas en formulación AMPHIGEN® microfluidificada. Las tres preparaciones contenían tres virus infecciosos bovinos diferentes, concretamente virus de herpes bovino (BHV), virus paragripal 3 (PI3) y virus sincitial respiratorio bovino (BRSV).

Se realizó detección de la actividad viricida en las tres preparaciones de vacuna de acuerdo con los requisitos de USDA 9CFR.113.35.

25 Los resultados mostrados en la Tabla 16 indican que la microfluidificación de preparaciones de vacuna basadas en formulación AMPHIGEN® no provoca ninguna inactivación significativa de la preparación de vacuna.

Tabla 16. Análisis de actividades viricidas de vacunas microfluidificadas

Número de serie	BRSV	BHV	PI3
A	0	0,2	0
AM200	-0,2	0	-0,2
AM75	0	-0,3	-0,3
AM75a37C	0,1	-0,3	-0,2
B	0	-0,1	-0,2
BM200	0	0	-0,2
BM75	-0,2	-0,5	0
BM75a37C	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
CM75a37C	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= Microfluidificado con malla de 200 micrómetros
 M75= Microfluidificado con malla de 75 micrómetros
 M75a37C= Fluidos calentados a 37 °C antes de microfluidificación
 Un valor por encima de 0,7 es un indicio del efecto viricida.

Ejemplo 20**Preparación de una formulación AMPHIGEN® microfluidificada**

Se preparó una formulación AMPHIGEN® combinando la 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%) con mezclado durante 8-22 horas a 36 ± 1 °C. La mezcla oleosa se añadió después a solución salina con la ayuda de un emulsionante Ross® (Hauppauge, NY 11788) a aproximadamente 3.400 rpm. Posteriormente la mezcla se pasó una vez a través de un microfluidificador con una cámara de interacción de 200 μm a $31,02 \pm 3,45$ MPa. La Figura 10A y 10B muestra la estabilidad de la formulación AMPHIGEN® microfluidificada. La distribución del tamaño de partículas, como se midió por difracción de láser, en el punto temporal inicial, de partida (**Figura 10A**) fue casi idéntica a la distribución del tamaño de partículas después de 22 meses de almacenamiento a 4 °C (**Figura 10B**).

Ejemplo 21**Análisis de microscopía electrónica del complejo inmunogénico Quil A - colesterol**

Para determinar la naturaleza del complejo inmunogénico formado por Quil A y colesterol, se realizó una mezcla de estos dos componentes en presencia o ausencia de un antígeno.

En un vaso de precipitados que contenía 50 ml de tampón KR-Hals, se añadió antígeno de BVD de tipo I agitando a la vez la solución con una barra magnética. A continuación, se añadió una solución madre concentrada de Quil A (50 mg/ml) en gotas agitando a la vez la solución para conseguir una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. La adición de Quil A se siguió de la adición de una solución madre de colesterol en etanol (18 mg/ml) a la concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$.

En un segundo vaso de precipitados, se añadieron Quil A y colesterol del mismo modo al tampón de 50 ml sin ningún antígeno de BVD de tipo I.

Para microscopía electrónica de transmisión, se adsorbieron 10 μl de cada muestra en rejillas de cobre de malla 400 con una plataforma de apoyo de formvar/carbono (Electron Microscopy Sciences, Inc., Fort Washington, PA). Las muestras se tiñeron negativamente usando 10 μl de ácido fosfotúngstico 2% filtrado, pH 5,2, como un agente de contraste. Las muestras se examinaron usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230 (JEOL Inc., Tokio, Japón) a tensión acelerante de 80 kV. Se realizó captura de imágenes digital en una cámara Gatan BioScan 792. Se realizó microscopía en película en película 4489 EM y se imprimió en papel Kodabrome II RC F3 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY.)

En la solución que contenía solamente colesterol y Quil A sin ningún antígeno de BVD de tipo I, se detectaron micelas helicoidales junto con micelas de Quil A y cristales de colesterol (**Figura 11**). Las micelas helicoidales estaban entrelazadas y aparecían como una malla. En la muestra que contenía el antígeno de BVD de tipo I, se descubrió que las micelas helicoidales rodeaban aleatoriamente ciertas áreas densas (**Figura 12**). Las áreas densas representan el antígeno de BVD de tipo 1 y el complejo inmunogénico helicoidal resultante de la asociación de Quil A y colesterol se encontró adsorbido en la superficie del antígeno de BVD de tipo I.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende un glicósido de saponina, un esteroI y un antígeno, en la que, en la formación de dicha composición de vacuna, dicho esteroI es añadido a dicho glicósido de saponina, y en la que dicho glicósido de saponina y dicho esteroI se asocian entre sí para formar complejos en forma de micelas helicoidales; y en la que dicho antígeno está en mezcla con, pero no integrado dentro de, dichas micelas helicoidales.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que comprende además un vehículo veterinariamente aceptable.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que dicho vehículo veterinariamente aceptable es una emulsión de aceite en agua.
- 10 4. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho glicósido de saponina es un glicósido triterpenoide.
5. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en la que dicho glicósido triterpenoide es Quil A.
6. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho esteroI es colesterol.
- 15 7. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho antígeno comprende un antígeno viral, un antígeno bacteriano o una combinación de los mismos.
8. La composición de vacuna de la reivindicación 7, en la que dicho antígeno comprende un antígeno de virus de diarrea viral bovina (BVDV) de tipo 1 o tipo 2.

FIG. 1

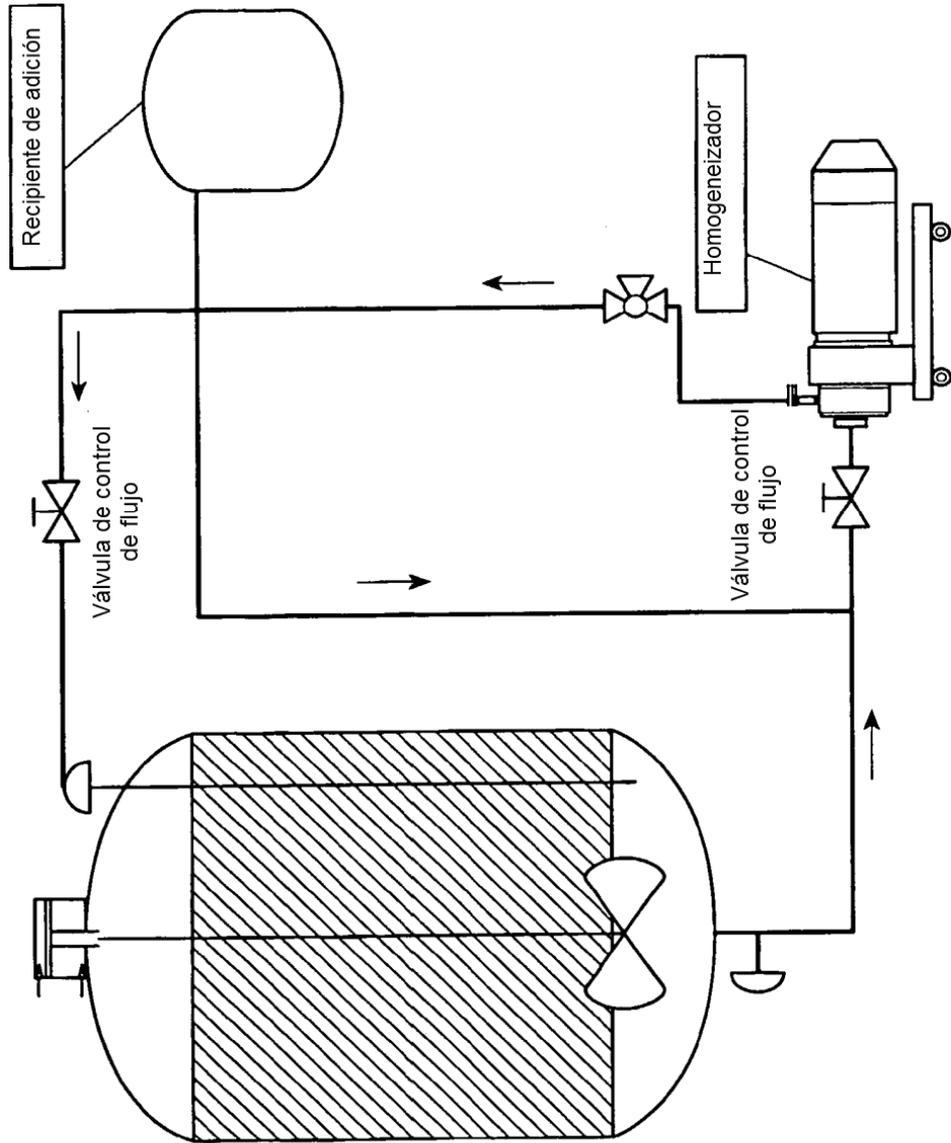


FIG. 2

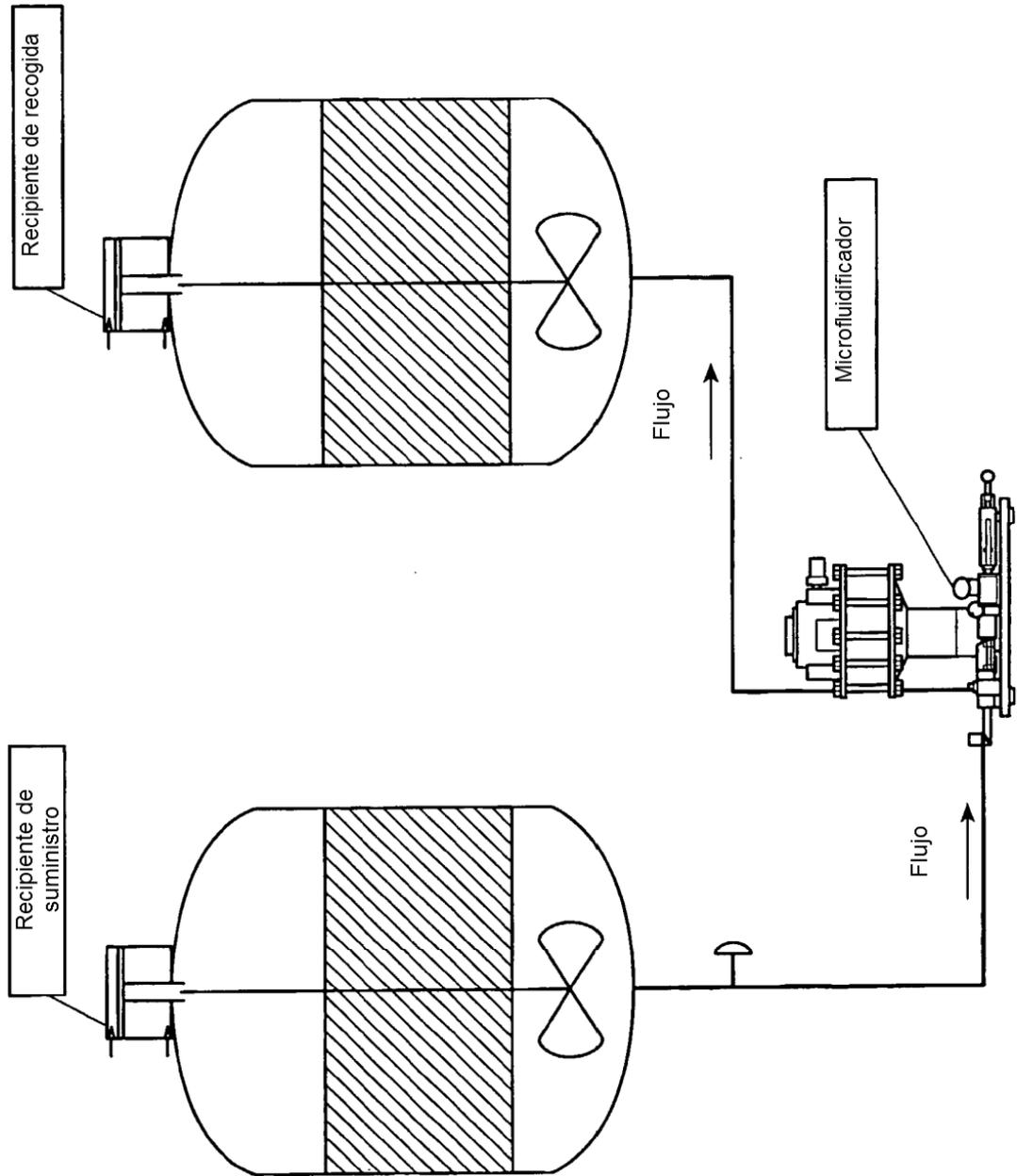


FIG. 3

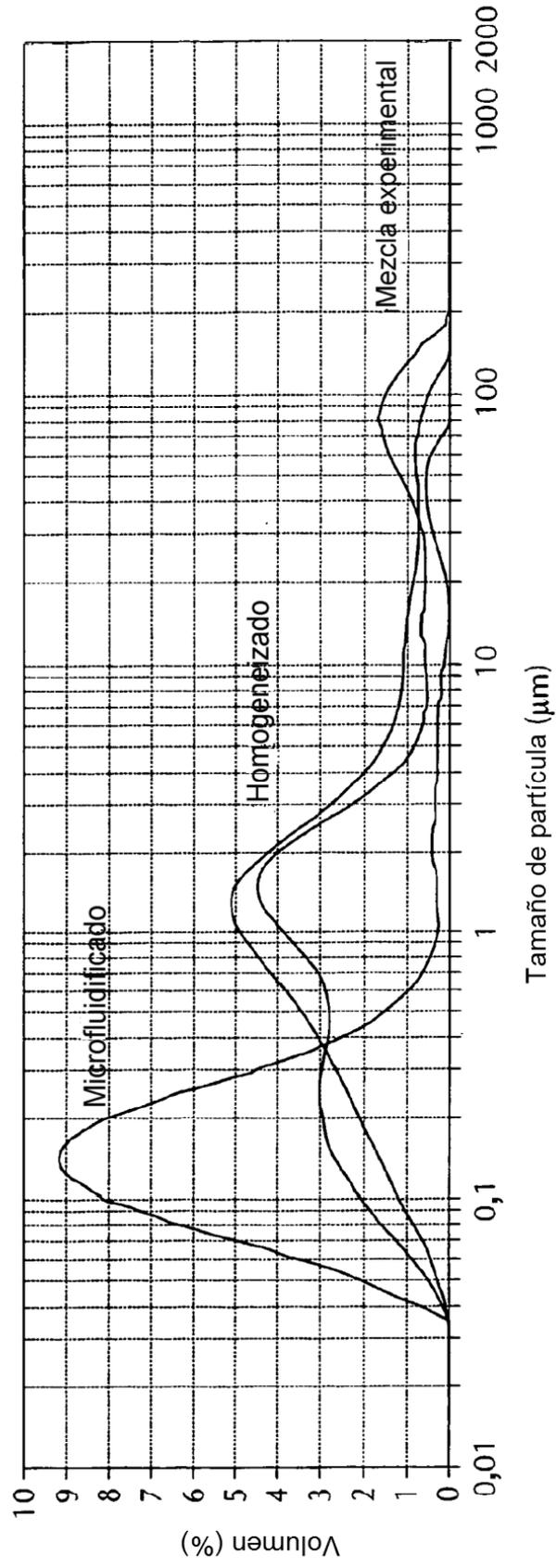


FIG. 4

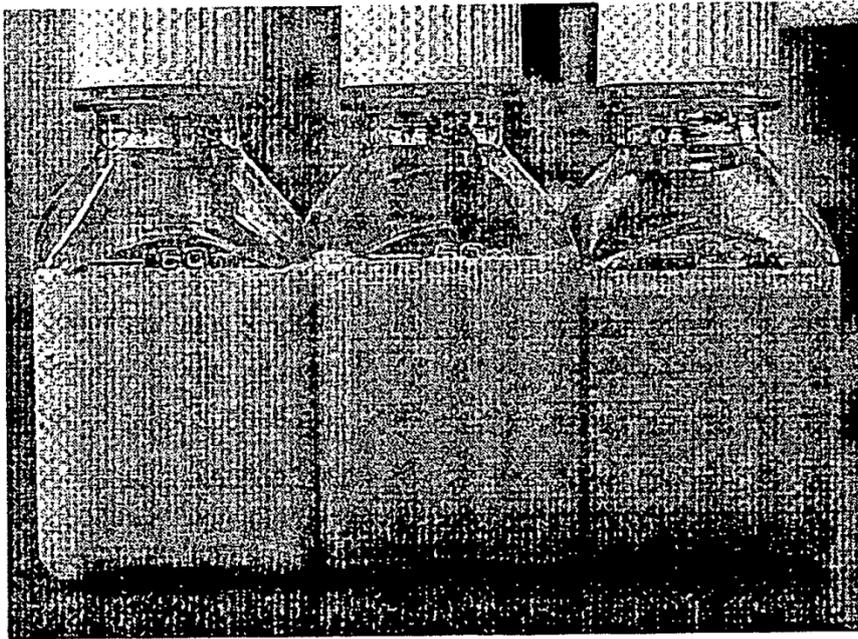


FIG. 5

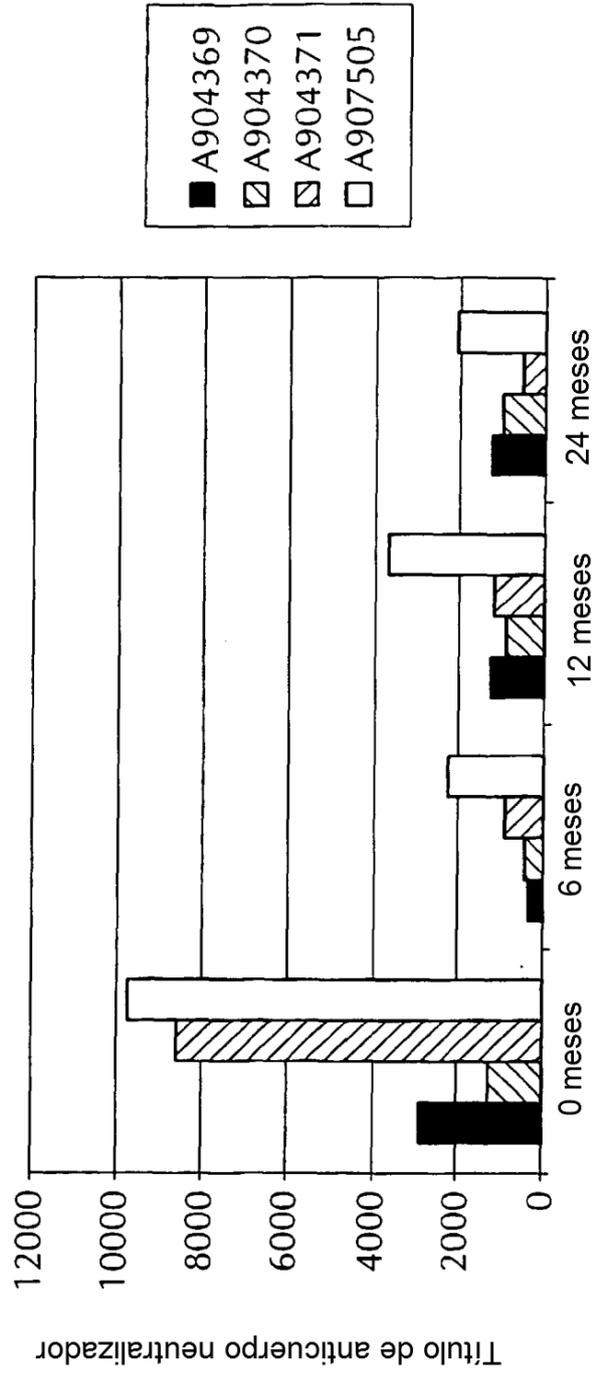


FIG. 6

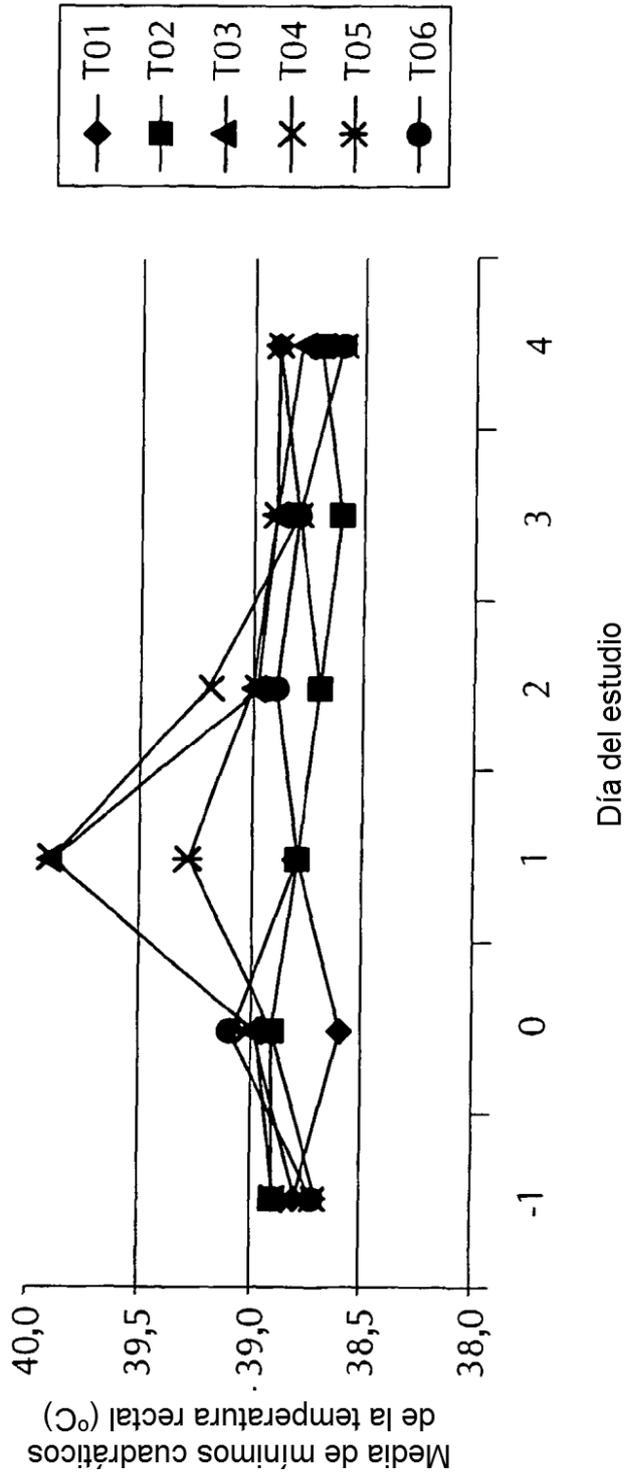


FIG. 7

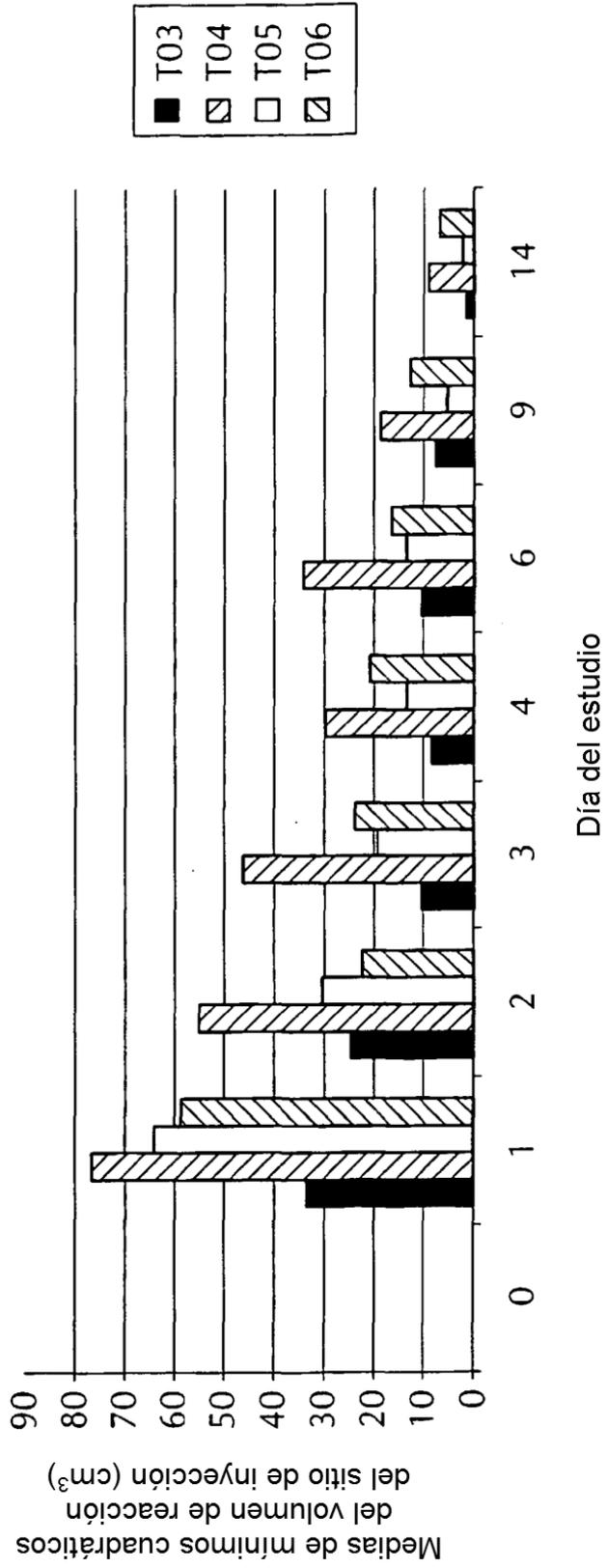


FIG. 8

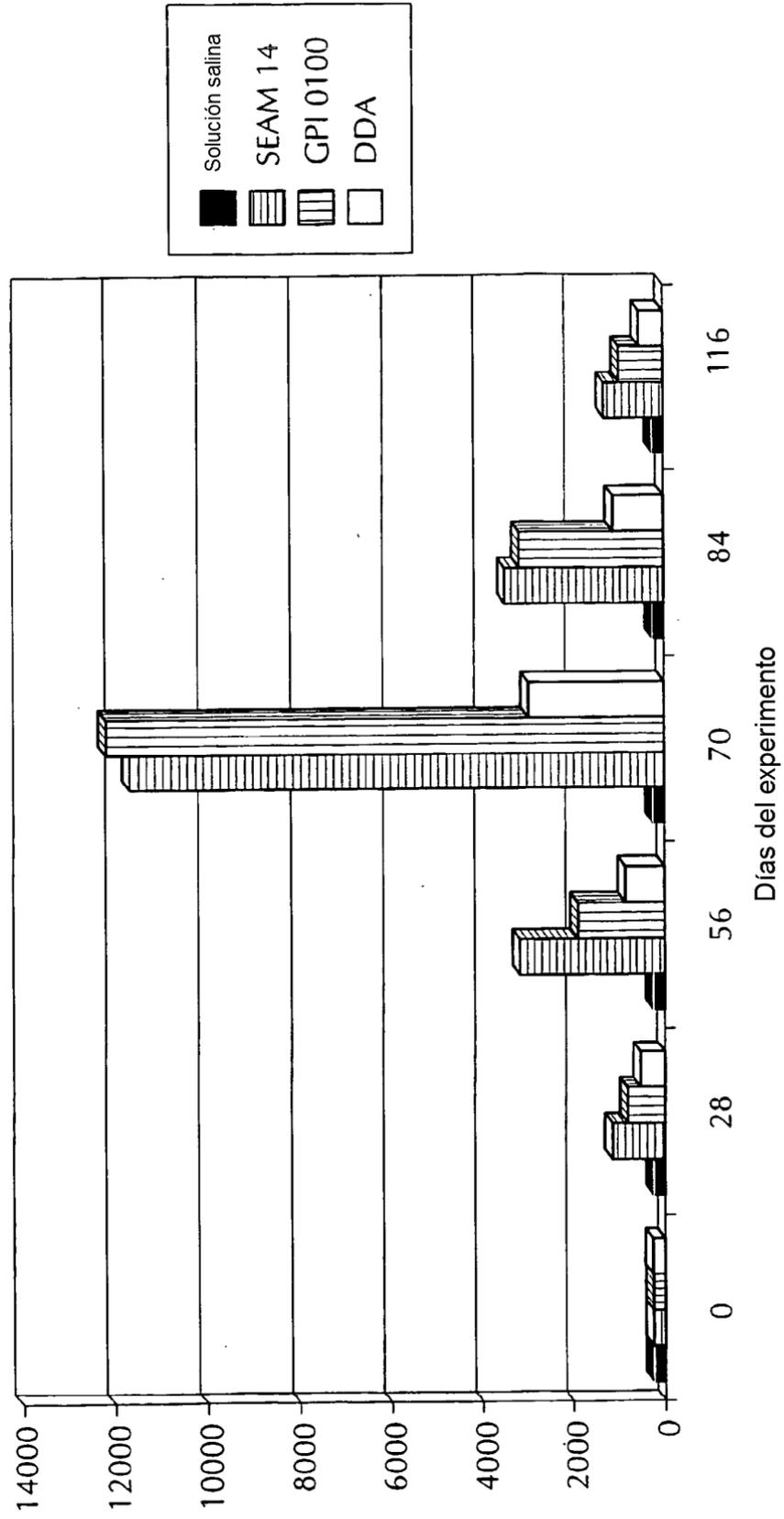


FIG. 9

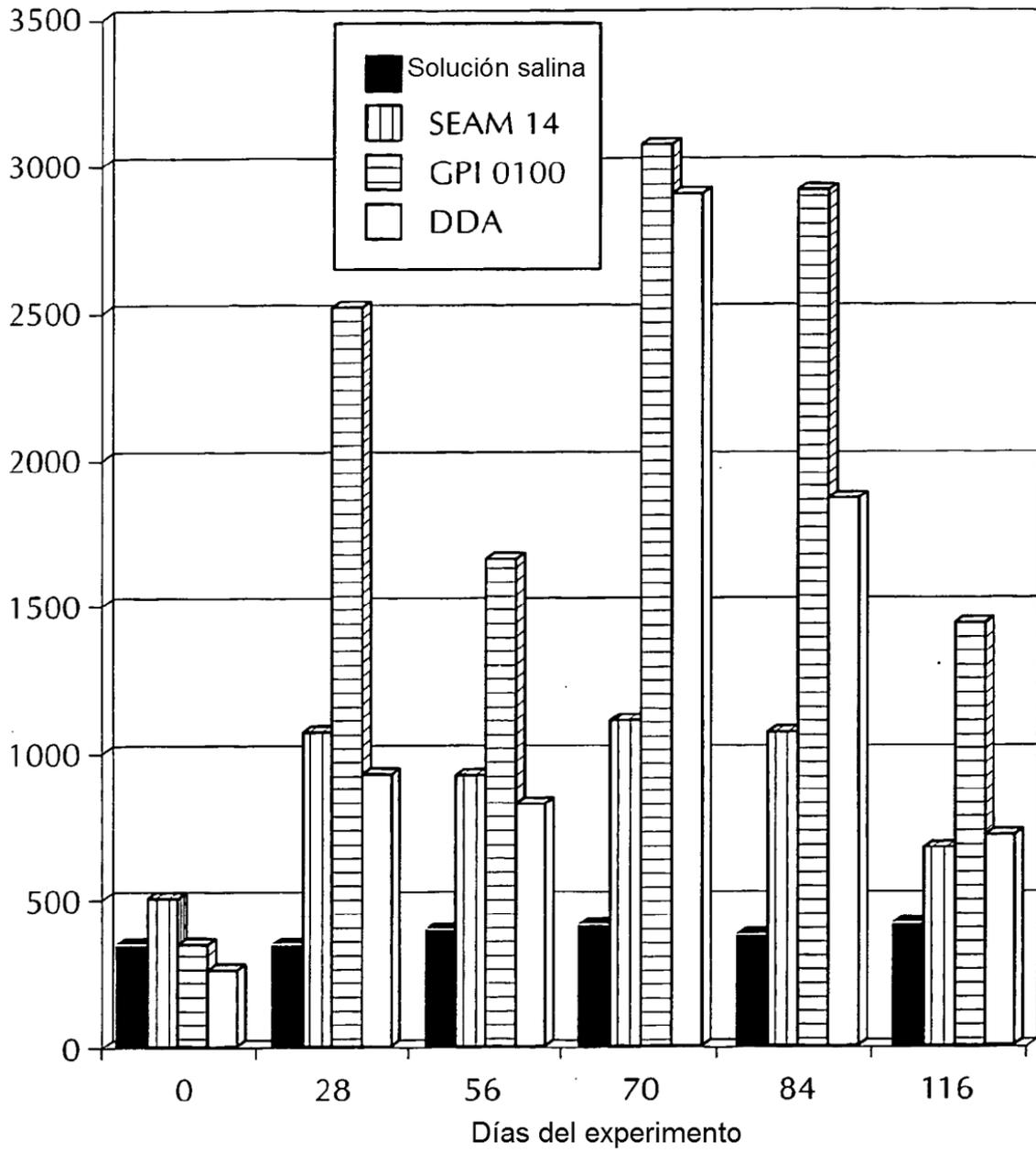


FIG. 10A

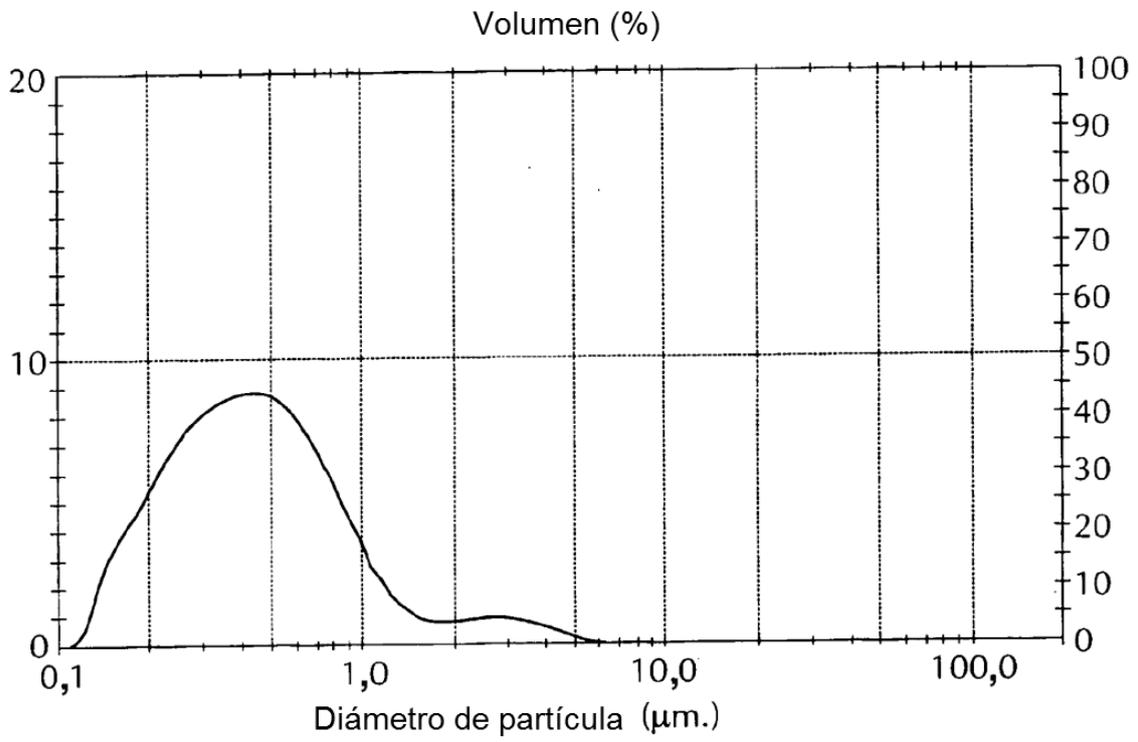


FIG. 10B

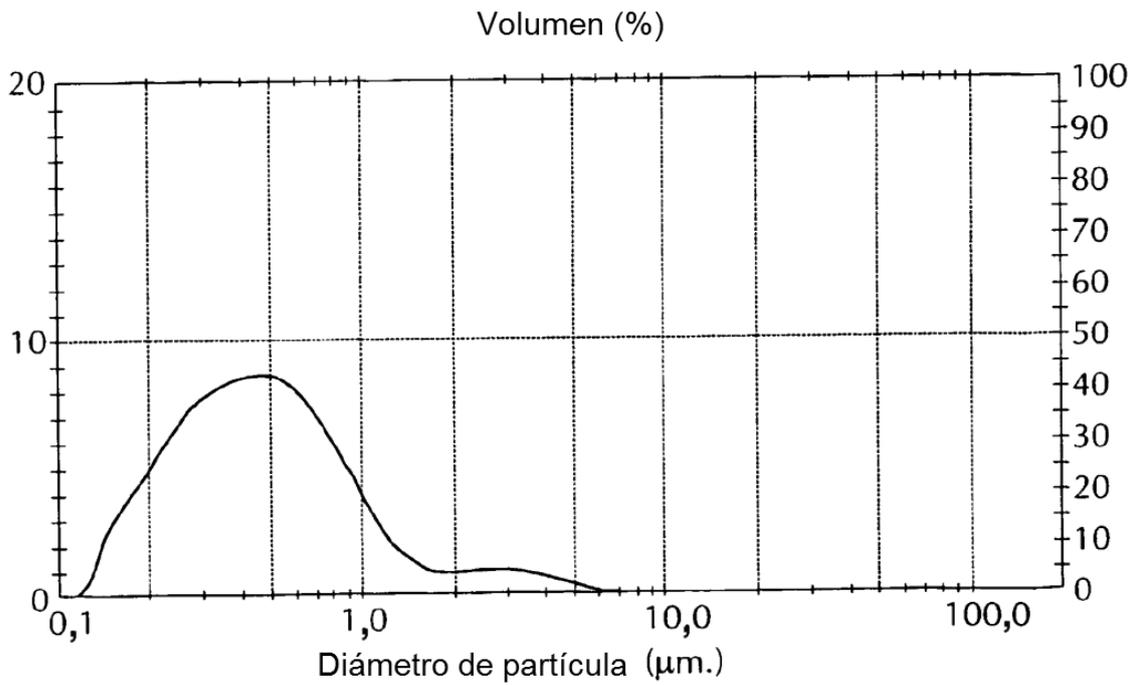


FIG. 11

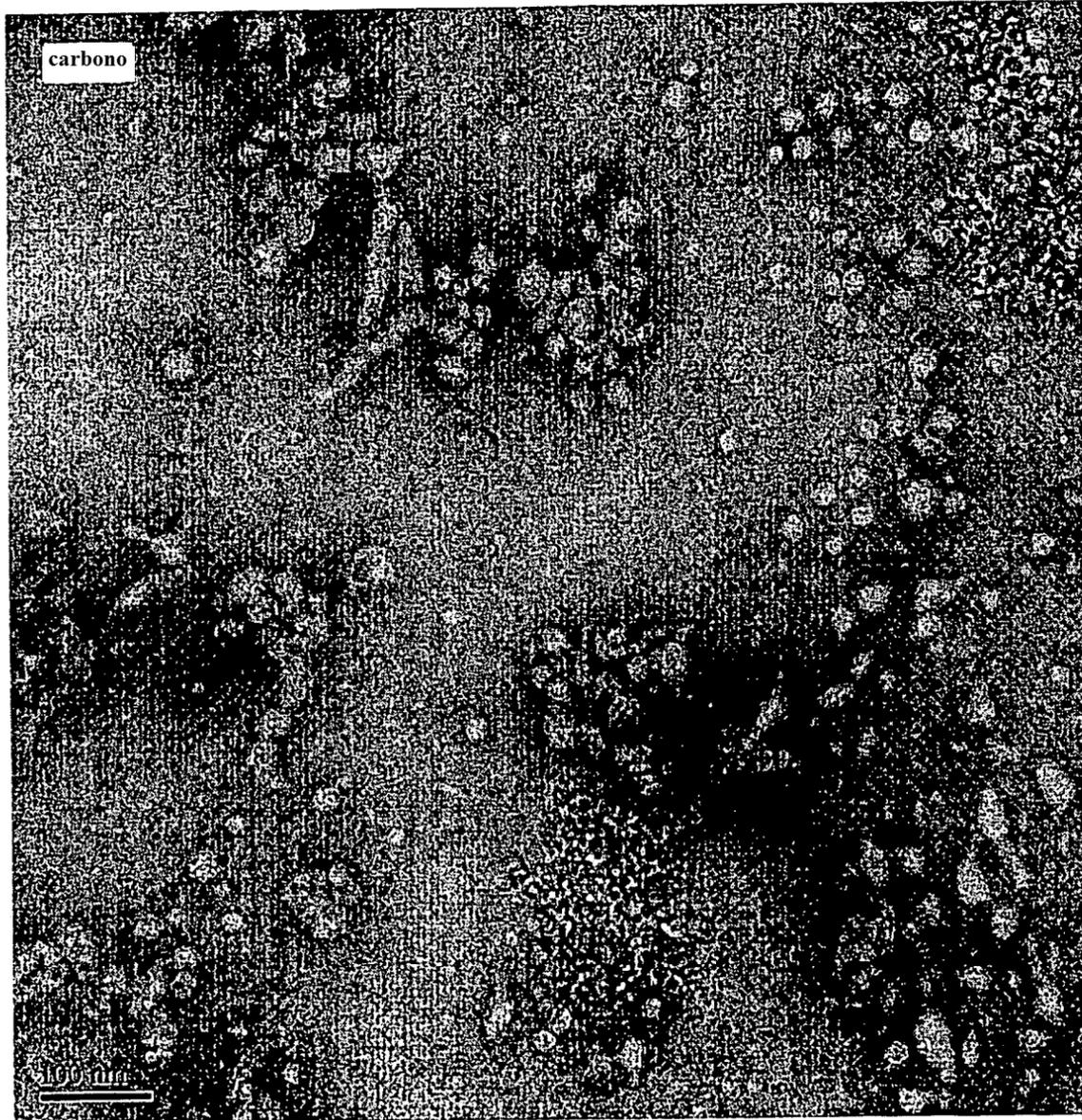


FIG. 12

