

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 997**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/012 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2011** **PCT/FR2011/050069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011** **WO11092413**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2011** **E 11704289 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016** **EP 2531214**

54 Título: **Adyuvante para la preparación de composiciones de vacunas destinadas a la prevención de las coccidiosis**

30 Prioridad:

01.02.2010 FR 1050663

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

06.02.2017

73 Titular/es:

**SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR
LES INDUSTRIES CHIMIQUES SEPPIC (100.0%)
75 Quai d'Orsay
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DUPUIS, LAURENT;
BERTRAND, FRANÇOIS y
DEVILLE, SÉBASTIEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 599 997 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

Adyuvante para la preparación de composiciones de vacunas destinadas a la prevención de las coccidiosis

La presente invención se refiere a nuevos adyuvantes para la preparación de composiciones de vacunas destinadas a la prevención contra las coccidiosis en las aves de corral, a las composiciones de vacunas que comprenden dichos adyuvantes, así como a la utilización de un aceite mineral específico para la fabricación de dicho adyuvante.

Las coccidiosis son enfermedades parasitarias frecuentes en las aves de corral.

Un ave de corral es un ave doméstica, que pertenece generalmente a las gallináceas o a las palmípedas, criada para la producción de carne o de huevos, ya sea en una granja tradicional o en criaderos industriales.

Por aves de corral, se entiende: el pollo, el pavo, la oca, el pato, la gallina de guinea, la paloma, la codorniz, el faisán, el avestruz.

El agente etiológico (o portador de la enfermedad) es un parásito protozoario intracelular, que se denomina coccidio, y pertenece lo más frecuentemente al género *Eimeria*.

Hay varios tipos de coccidios para cada especie aviar:

Coccidios del pollo: *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox*.

Coccidios del pavo: *E. meleagritidis*, *E. adenoeides*, *E. dispersa*, *E. gallopavonis*.

Coccidios de la oca: *E. truncata* (que también puede afectar al pato de Berbería y al cisne), *E. anseris*.

Coccidios del pato: *Tyzzeria perniciososa*, *E. mulardi*. La enfermedad afecta sobre todo al pato mulard.

Coccidios de la gallina de Guinea: *E. Numidia*, *E. grenieri* (la más común, pero con menos poder patógeno).

Coccidios de la paloma: *E. labbeana*.

La prevención de la coccidiosis se basa en las siguientes soluciones:

a) Un método de quimioprevención:

Este método utiliza compuestos químicos del tipo antibióticos y tiene como inconvenientes:

- generar riesgos de desarrollo de alergias en los animales tratados con estos antibióticos, especialmente debido a la presencia de "residuos" o de sub-productos no deseados en estos antibióticos;
- generar riesgos de desarrollo de resistencias frente a los antibióticos en las especies tratadas;
- estar regulado por una reglamentación exigente;
- alterar el aspecto de la carne de las aves de corral comercializada, con el riesgo de no beneficiarse de los sellos de calidad que reivindican un criadero en condiciones "naturales".

b) Un método de vacunación que implica vacunas "vivas".

Las vacunas derivadas de agentes vivos atenuados se preparan por la multiplicación de los agentes infecciosos en el laboratorio hasta que pierden naturalmente o artificialmente, por mutación, su carácter patógeno.

Las cepas obtenidas son incapaces, entonces, de desarrollar plenamente la enfermedad que generaban antes.

Estas cepas conservan, sin embargo, sus antígenos, y su capacidad para inducir respuestas inmunitarias.

Este modo de vacunación permite, después de administración a los animales, colonizar las vías digestivas y evitar la implantación de cepas que tengan factores de virulencia.

Este método de vacunación presenta como inconvenientes:

- posibles retornos a la virulencia;
- tener que realizar cultivos a gran escala de bacterias potencialmente patógenas;
- los animales vacunados de este modo pueden excretar, constituyendo así una fuente potencialmente patógena en el medio ambiente y, por los tanto la potencial diseminación de estos patógenos.

Este último inconveniente, constituye, por tanto, una razón por la que no es favorable, en el caso de los criaderos de aves de corral al aire libre, para vacunar contra la coccidiosis que es una enfermedad parasitaria y por lo tanto fácilmente transmisible por diseminación.

5 Las vacunas anticoccidiales son medicamentos veterinarios. Por lo tanto, están sometidas a la legislación que se aplica a los medicamentos veterinarios, que depende a su vez de la legislación sobre los medicamentos.

Tres vacunas anticoccidiales están autorizadas en Francia: son vacunas vivas constituidas por cepas "precoces", atenuadas, pero inmunógenas y protectoras frente a las especies presentes sobre el terreno.

10 Estas tres vacunas no son utilizables más que para la especie pollo (*Gallus gallus*), ya que contienen solamente cepas susceptibles de parasitar esta especie de ave, no existe inmunidad cruzada frente a las diferentes especies de coccidios.

c) Los métodos de vacunación convencionales con un antígeno no vivo o "inactivado"

La eficacia de las vacunas existentes no es satisfactoria, porque el nivel del componente celular de la respuesta inmunitaria no es bastante elevado para inducir protecciones eficaces en el caso específico de enfermedades parasitarias, como la coccidiosis en particular.

15 Se han descrito muchos de los ADNc que codifican los antígenos de *Eimeria*, y están en curso ensayos de inmunización con algunos de ellos. El desarrollo de la resistencia depende también de los antecedentes genéticos y del modo de administración (y del adyuvante). Algunos antígenos han mostrado una protección parcial. La investigación tiene como objetivo antígenos comunes a varias especies de coccidios: por ejemplo, el antígeno GX3262 reactivo con un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de esporozoitos común para las siete
20 especies de coccidios de pollo, induce una protección parcial.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar estas composiciones de vacunas inactivadas.

25 El desarrollo de vacunas inactivadas o que contienen antígenos purificados, es cada vez más importante ya que permite evitar al máximo los efectos secundarios indeseables en los sujetos vacunados durante y después de la vacunación. Sin embargo, la mejora de la calidad de los antígenos se hace en detrimento de su inmunogenicidad. Es por esta razón por lo que se asocian con adyuvantes que permiten aumentar la respuesta inmunitaria en los sujetos vacunados.

30 Estos adyuvantes son de diversa naturaleza. Pueden consistir, por ejemplo, en liposomas, en emulsiones que comprenden al menos una fase oleosa y al menos una fase acuosa, del tipo de los adyuvantes denominados de Freund o, de manera más común, en sales minerales insolubles en agua. Entre las sales minerales utilizadas como adyuvantes de composiciones vacunales, se pueden citar, por ejemplo, el hidróxido de aluminio, el nitrato de cerio, el sulfato de zinc, el hidróxido de hierro coloidal o el cloruro de calcio. El hidróxido de aluminio es el adyuvante utilizado más comúnmente. Estas sales minerales utilizadas como adyuvantes de composiciones vacunales se describen especialmente en el artículo de Rajesh K. Gupta *et al.* "Adjuvants, balance between toxicity and adjuvanticity", Vaccine, vol. 11, Issue 3, 1993, pages 993-306.

35 Los adyuvantes mencionados antes, presentan como inconveniente una eficacia baja. Además, se sabe que el hidróxido de aluminio no induce eficazmente más que una inmunidad humoral, y no una inmunidad celular. Por otra parte, pueden inducir una cierta toxicidad frente a los sujetos tratados. Más particularmente, cuando estas composiciones vacunales se inyectan a los sujetos a vacunar, se puede observar la formación de lesiones y de otras reacciones locales, tales como granulomas en el sitio de inyección.

40 Otros adyuvantes, constituidos por sales de metales divalentes o trivalentes o incluso de compuestos simpaticomiméticos se describen, respectivamente, en las solicitudes de patentes internacionales publicadas con los números WO 96/32964, WO 98/17311 y WO 98/15288.

45 Las emulsiones son mezclas estables constituidas por un sistema de dos líquidos no miscibles, de los cuales uno está dividido en gotitas en el otro. Así, las emulsiones comprenden aceites, una fase acuosa y agentes tensioactivos que tienen como función dispersar una de las dos fases en la otra y obtener una mezcla macroscópicamente homogénea y estable. A menudo se utilizan como adyuvantes de la inmunidad en las formulaciones vacunales (véase, por ejemplo, el artículo de J. Aucouturier *et al.* "Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines", Expert Review of Vaccines, vol. 1, nº 1, 1 juin 2002, pages 111-118).

50 La utilización de aceites minerales como adyuvantes de vacunas se conoce desde hace muchos años (Freund 1956, Herbert 1967). Los aceites minerales utilizados como adyuvantes de vacunas son hidrocarburos líquidos, que se obtienen por destilación del petróleo y por la realización de etapas de tratamiento posteriores, como por ejemplo, las etapas de desulfuración, desasfaltado, extracción de los compuestos aromáticos, extracción de las ceras, y otras etapas de tratamiento de acabado. Los estudios de la influencia de la calidad de los aceites sobre la respuesta inmunitaria sólo se han realizado gradualmente y de manera incompleta. En efecto, la composición de los aceites
55 minerales está muy influenciada por el origen geográfico de los productos brutos utilizados así como por el

procedimiento (productos químicos y equipo) que se utiliza para su preparación. Los estudios efectuados sobre las diferentes fracciones estaban destinados a evaluar el carácter tóxico para los trabajadores que los utilizan, pero no para su utilización en la salud animal o humana). Se han realizado optimizaciones de composición de estos aceites minerales, basadas en las caracterizaciones macroscópicas (viscosidad, punto de fusión), con los grados existentes de aceites minerales industriales o de productos químicos puros de laboratorio que no se corresponden con las definiciones ni con la caracterización de los grados de materias primas aceptables. Así, los estudios, incluso avanzados, efectuados sobre los grados industriales de aceites minerales definidos por parámetros que no reflejan sus propiedades biológicas, dieron lugar y todavía dan lugar a variaciones de comportamientos durante la utilización de las vacunas en función del origen de un lote de aceite mineral. Estos lotes, aunque responden a sus condiciones y especificaciones analíticas macroscópicas y tienen el mismo nombre comercial, tienen composiciones suficientemente diferentes para no dar las mismas propiedades a las vacunas. Además, la viscosidad de las emulsiones obtenidas a partir de los aceites minerales, sin optimización galénica, inducía un sesgo en la interpretación de los resultados.

La influencia de la distribución entre cadenas lineales y cíclicas ha sido evaluada para buscar una toxicidad eventual durante la utilización de los aceites minerales en inyectables, haciendo sospechar el papel teratogénico de las formas cíclicas. Los criterios de toxicidades han sido identificados además como procedentes de las formas insaturadas, eliminadas perfectamente en los procedimientos actuales por hidrogenación forzada.

No se ha realizado ningún estudio con el fin de evaluar la influencia de la relación de constituyentes de tipo lineal o cíclico sobre la calidad de la respuesta inmunitaria. Los aceites minerales han sido utilizados durante varios decenios como adyuvantes y para la preparación de adyuvantes destinados a aumentar la eficacia de la respuesta inmunitaria de las vacunas. En efecto, los antígenos previamente emulsionados en emulsiones de tipo agua en aceite mineral (W/O), después de administrados por vía parenteral, desencadenan respuestas inmunitarias (y en consecuencia, protecciones contra los patógenos) mucho más intensas y duraderas.

La naturaleza del aceite mineral utilizado para la preparación de un adyuvante tiene una influencia importante sobre la intensidad de la respuesta inmunológica y sobre las reacciones secundarias relacionadas con la inyección de la vacuna (reacciones locales y generales).

Hay dos tipos de respuestas inmunitarias:

- La respuesta inmunitaria humoral:

esta es la reacción que se produce cuando los linfocitos B que tienen receptores específicos, son estimulados por un antígeno y se diferencian en clones de plasmocitos que comienzan a segregar anticuerpos. Estos son eficaces contra los agentes patógenos que circulan en la sangre y en la linfa. Además, la activación selectiva de los linfocitos B dota al organismo de células de memoria con una duración de vida prolongada que intervienen en la respuesta inmunitaria secundaria, y

- La respuesta inmunitaria celular

La reacción inmunitaria humoral ayuda a la red de defensa a reconocer y destruir los agentes patógenos libres, pero es la reacción con mediación celular la que combate a los agentes patógenos ya introducidos en las células. Los principales actores de la inmunidad con mediación celular son los linfocitos T.

Los linfocitos T no reaccionan más que a los determinantes antigénicos expuestos en la superficie de las células del organismo. Los linfocitos T reconocen estos determinantes gracias a sus receptores, proteínas de superficie encastradas en su membrana plasmática. El receptor del linfocito T reconoce el antígeno combinado con una de las glucoproteínas del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) del organismo. Aparte de su papel en la respuesta humoral, los linfocitos T auxiliares pueden activar también otros tipos de linfocitos T para desencadenar las reacciones con mediación celular contra los antígenos. Los linfocitos T citotóxicos son las únicas células para matar a otras células (las células infectadas por agentes patógenos intracelulares).

Los adyuvantes oleosos son bien conocidos para aumentar el componente humoral de la respuesta inmunológica (medida en general por las dosis de inmunoglobulinas del grupo 1 o IGG1), mientras que las respuestas de tipo celular (medidas indirectamente por las IGG2) son muy difíciles de obtener.

Se sabe que las emulsiones de tipo agua en aceite (W/O), que dan las respuestas inmunitarias más fuertes, inducen también un componente de tipo celular, pero en menor proporción, por ejemplo, que ciertas moléculas solubles (tipo saponinas o tensioactivos catiónicos) reconocidas para orientar la respuesta hacia los mecanismos celulares.

Las emulsiones de fase acuosa continua que utilizan los aceites minerales que normalmente se encuentran en el mercado, son muy malas promotoras de la respuesta celular.

En efecto, el tipo de respuesta provocada por las vacunas está influenciada por la estructura del antígeno, pero también por la forma en que éste se presenta al sistema inmunitario a través de los adyuvantes. Los adyuvantes

tienen diferentes efectos sobre la respuesta inmunitaria, ya que pueden inducir una respuesta inmunitaria durante un período más o menos largo, con un carácter predominante de tipo celular o de tipo humoral.

La inmunidad con mediación celular es importante, a veces incluso esencial, para la protección contra las bacterias intracelulares, los virus y la mayor parte de los parásitos. Dicha inmunidad interviene en la mayor parte de los mecanismos de protección de la vacuna, como complemento de la respuesta humoral.

Se podrá clasificar, por ejemplo, la capacidad de un adyuvante para inducir una respuesta inmunológica de tipo celular para la composición vacunal que le comprende, comparando las relaciones IGG1/IGG2 medidas después de la administración por vía parenteral de la composición vacuna que le comprende, a los sujetos implicados, en diferentes períodos después del día de la vacunación de dichos sujetos. Cuanto más alta sea esta relación, más habrá orientado el adyuvante la respuesta inmunitaria de la composición vacunal hacia un componente humoral. Un valor de la relación IGG1/IGG2 próximo a la unidad, será considerado como el signo de una respuesta inmunitaria de la composición vacunal equilibrada entre sus dos componentes. Un valor de la relación IGG1/IGG2 inferior a la unidad será característico de una respuesta inmunitaria de la composición vacunal con predominio celular.

Un objetivo de la presente invención es disponer de un adyuvante para la preparación de composiciones vacunales, destinado a mejorar el componente celular de la respuesta inmunitaria, manteniendo a la vez el buen nivel del componente humoral. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener adyuvantes de vacunas que tengan una respuesta inmunitaria equilibrada incluso con predominio celular. Además, las vacunas preparadas con el adyuvante objeto de la presente invención deberán presentar una buena seguridad.

Con este fin, la presente invención tiene por objetivo un adyuvante de vacuna tal como se define en la reivindicación 1 y su utilización para la fabricación de una composición vacunal destinada a la prevención contra la coccidiosis tal como se define en las reivindicaciones 2 y 3.

Según otro aspecto, la invención tiene por objeto una vacuna tal como se define en las reivindicaciones 4 a 8.

Según otro aspecto, la invención tiene por objeto la utilización de un aceite mineral para la fabricación de una vacuna tal como se ha definido antes, caracterizada porque dicho aceite comprende, para el 100 % de su masa:

- de 0,05 % a 10 % de cadenas de cadenas hidrocarbonadas que tienen menos de 16 átomos de carbono;
- de 0,05 % a 5 % de cadenas de cadenas hidrocarbonadas que tienen más de 28 átomos de carbono;

y tiene una relación P/N, que corresponde a la relación de la cantidad másica de cadenas carbonadas de tipo parafínico sobre la cantidad másica de cadenas carbonadas de tipo nafténico, comprendida entre 2,5 y 3, con preferencia entre 2,8 y 2,9.

La composición según la invención puede comprender también ventajosamente uno o más agentes tensioactivos emulsionantes. Este último tiene un carácter lipófilo o hidrófilo caracterizado por un valor HLB (balance hidrófilo-lipófilo) comprendido entre 1 y 19.

Un tensioactivo tal puede consistir en:

- un poliglucósido de alquilo o una mezcla de poliglucósidos de alquilo de la fórmula $R_a-(O)-Zn$ donde R_a representa un radical alifático saturado, lineal o ramificado, que comprende de 4 a 24 átomos de carbono, Z es el residuo de un azúcar, preferiblemente glucosa y n está comprendido entre 1 y 5, con preferencia entre 1,1 y 2,
- saponinas,
- ésteres de sorbitán, como por ejemplo, el oleato de sorbitán, el estearato de sorbitán, el palmitato de sorbitán, el laurato de sorbitán;
- ésteres de manitán, como por ejemplo, el oleato de manitán, el estearato de manitán, el palmitato de manitán, el laurato de manitán;
- ésteres de sorbitán polioxietilados entre 5 moles y 20 moles de óxido de etileno, como por ejemplo, el oleato de sorbitán etoxilado con 20 moles de óxido de etileno;
- ésteres de manitán polioxietilados entre 5 moles y 20 moles de óxido de etileno, como por ejemplo, el oleato de manitán etoxilado con 20 moles de óxido de etileno;
- lecitinas;
- alcoholes polioxietilados como por ejemplo, los comercializados bajo el nombre BRIJ, y más particularmente el BRIJ 21 y el BRIJ 221 por la compañía UNIQEMA;

- polímeros tensioactivos que comprenden bloques de polioxietilenos y polioxipropilenos tales como los comercializados bajo la denominación PLURONICS por la compañía BASF;
- polihidroxiestearatos de poliglicol o de poliglicerol como por ejemplo los productos denominados HYPERMER™ B246, ARLACE™ P135 comercializados por la compañía UNIQEMA.

5 Por antígeno se entiende toda molécula que tiene propiedades inmunogénicas, que puede inducir una respuesta inmunitaria específica. Estos antígenos pueden ser patógenos inactivados, como por ejemplo, bacterias inactivadas, moléculas extraídas de patógenos, moléculas producidas por recombinación genética de microorganismos.

10 Los aceites minerales se obtienen a partir de la destilación después de hidrogenación forzada de productos de origen petrolífero. Están constituidos por moléculas químicas de la familia de los alcanos saturados. Para este tipo de moléculas, el número de átomos de carbono (n) es en general superior a 9 e inferior a 30, lo que confiere entonces un aspecto líquido a 25 °C. Se conocen también como parafinas líquidas. Las parafinas sólidas están constituidas por moléculas químicas de la familia de los alcanos, para las cuales n es superior a 30, pudiendo llegar hasta 50 y confieren entonces un aspecto sólido a 25 °C. Las parafinas líquidas o aceites minerales, son líquidos transparentes e inodoros, cuya viscosidad dinámica puede variar de 2 miliPascuales por segundo (mPa.s) a 1 Pascal por segundo. La viscosidad dinámica de los aceites minerales está directamente relacionada con la longitud media de las cadenas carbonadas de los alcanos que componen dichos aceites minerales. Los alcanos con cadenas hidrocarbonadas más largas son responsables de las viscosidades dinámicas más altas. Las moléculas concernidas se pueden presentar en forma de cadenas hidrocarbonadas lineales o ramificadas (reagrupadas bajo la denominación "parafínicas" (P) o cíclicas (nafténicas N)), pero siempre saturadas (sin dobles enlaces, que se eliminan durante el tratamiento por hidrogenación). Las viscosidades, puntos de fusión y puntos de ebullición están directamente relacionados con el número de carbonos que presenta la cadena hidrocarbonada. Un aceite mineral blanco podrá ser caracterizado, por tanto, por su intervalo de destilación, su viscosidad dinámica, su número medio de átomos de carbono, pero también por su fracción P/N, en moléculas lineales y ramificadas sobre la cantidad de moléculas cíclicas (determinada según el método DIN 51378). Se debe tener en cuenta que el criterio de viscosidad dinámica se puede modificar artificialmente por la mezcla de dos fracciones diferentes.

Ejemplos

I) Primera parte

Los siguientes ejemplos permiten poner de manifiesto las propiedades de las composiciones adyuvantes según la presente invención.

30 En este trabajo, un estudio de las propiedades adyuvantes de diferentes aceites, caracterizados finamente, ha permitido poner de relieve nuevas composiciones originales caracterizadas por los límites de las composiciones establecidos por cromatografía.

35 El estudio realizado sobre composiciones vacunales experimentales, en un primer tiempo con fórmulas que se presentan en la forma de emulsiones tipo agua en aceite (W/O), ha permitido establecer las condiciones óptimas de obtención de respuestas inmunitarias equilibradas entre sus dos componentes y de una respuesta inmunitaria con componente celular predominante para las fórmulas bien toleradas, en ratones. La continuación de los ensayos experimentales, realizados sobre otros tipos de fórmulas y diferentes animales ha permitido poner de manifiesto que las composiciones adyuvantes objetos de la presente invención, aseguran las mejores respuestas inmunológicas tanto cuantitativas como cualitativas.

40 En los ejemplos que siguen, los aceites minerales seleccionados se caracterizan por su:

- fracción corta (FC), expresada en porcentaje, que corresponde a la proporción de entidades que tienen un número de átomos de carbono $C < 16$.
- fracción pesada (FP), expresada en porcentaje, que corresponde a la proporción de entidades que tienen un número de átomos de carbono $C > 28$.
- distribución molecular (RM) (expresada en número de átomos de carbono C), calculada como el baricentro de la curva comprendida entre C16 y C28 asignando el coeficiente de superficie de las fracciones C16 a C20 asimiladas a 18 átomos de carbono, 20 átomos de carbono a 24 átomos de carbono asimiladas a 22 átomos de carbono y 24 átomos de carbono a C28 asimiladas a 26 C.
- relación P/N (obtenida según el método normalizado DIN 51378).

50 Los diferentes aceites ensayados se enumeran en la tabla 1.

Ref. Aceite	FC (<C16)	RM	FP >C28)	P/N
1	13,7	20,6	3,3	1,78
2	4,9	21,5	7,1	1,86
3	4,2	20,5	1,5	1,86
4	4,4	21,6	4,7	1,86
5	47,7	18,4	0,5	1,86
6	0,3	22,2	9,6	2,03
7	30	18,3	0,6	2,19
8	16	21,8	10	2,13
9	2	19,3	2,2	2,85
10	48,2	18,4	0,6	1,86
11	8,6	20,7	2,4	1,94
12	20,8	21,9	8,7	1,86

Tabla 1: Panel de aceites sintetizados y caracterizados por ensayos biológicos.

Estudio bajo la forma de emulsión tipo agua en aceite W/O:

La formulación se realiza en un modelo tipo adyuvante incompleto de Freund (IFA) utilizado al 50 % en la emulsión vacunal, que por la sencillez de su fórmula (15 % de monooleato de manida + 85 % de aceite mineral) permite una comparación pertinente.

Las propiedades biológicas de las vacunas así formuladas (50 % de IFA + 50 % de solución isotónica de albúmina de huevo a 10 µg/dosis; 1 dosis = 100 µl de emulsión) se comparan entonces sobre un modelo de ratón para los parámetros de seguridad (tabla 2), y de eficacia para la respuesta humoral o celular.

La seguridad se evalúa mediante la observación del sitio de inyección 7 días después de la vacunación y la calificación posterior de las reacciones locales (RL) sobre una escala que va de 0 a 4. Los valores de 0 a 2 son aceptables (se trata como máximo de un depósito oleoso sin alopecia, sin induración palpable ni sitio de inyección visible); los valores superiores a 2 se consideran como no deseados e inaceptables (se trata de necrosis, alopecias, induración, palpables). Los resultados se agrupan en la tabla 2; los aceites minerales ensayados en la preparación de la formulación tipo agua en aceite (W/O) se han clasificado en función de su FC (fracción corta). Se ve muy claramente que las formulaciones W/O que comprenden aceites minerales que tienen una FC < 13,7 son apropiadas para la preparación de composiciones vacunales utilizables por vía inyectable.

Ref. Aceite	FC (<C16)	RM	FP >C28)	P/N	RL
1	13,7	20,6	3,3	1,78	2,5
2	4,9	21,5	7,1	1,86	0,5
3	4,2	20,5	1,5	1,86	0
4	4,4	21,6	4,7	1,86	0,5
5	47,7	18,4	0,5	1,86	4
6	0,3	22,2	9,6	2,03	0
7	30	18,3	0,6	2,19	3
8	16	21,8	10	2,13	2,5
9	2	19,3	2,2	2,85	0
10	48,2	18,4	0,6	1,86	4
11	8,6	20,7	2,4	1,94	0,5
12	20,8	21,9	8,7	1,86	3

Tabla 2: Evaluación de la seguridad de los diferentes aceites.

Las fórmulas aceptadas se han ensayado a continuación para determinar su eficacia inmunológica en el modelo de ratón. Se han eliminado las fórmulas que dan reacciones inaceptables. Las tablas 3 y 4 muestran los títulos de anticuerpos obtenidos, comparados con una referencia de hidróxido de aluminio (adyuvante sólido mineral utilizado en medicina veterinaria y humana). Los títulos se dan a los 14/28/42/56/90 días después de la fecha de las primeras inyecciones, para la respuesta humoral (IGG1) y celular (IGG2). Una segunda inyección de las fórmulas se realiza a los 28 días, después del registro de los títulos de anticuerpos. Los resultados de la respuesta a largo plazo (90 días)

indican una fuerte correlación entre los valores bajos de la fracción pesada y la intensidad de la respuesta humoral a los 90 días. La respuesta disminuye significativamente cuando esta fracción es superior a 4,7 % (7,1 % y 9,6 %).

Estos resultados demuestran que un aceite mineral como adyuvante de vacuna bajo la forma de emulsión tipo agua en aceite (W/O) que contenga menos de 10 % de FC (fracción corta), menos de 5 % de FP (fracción pesada) y una relación P/N superior o igual a 1,9, induce una buena respuesta de tipo celular.

5

Aceite Ref.	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	9.600	16.000	128.000	128.000	128.000
3	4,2	20,5	1,5	1,86	9.600	16.000	128.000	256.000	256.000
4	4,4	21,6	4,7	1,86	9.600	16.000	128.000	256.000	256.000
6	0,3	22,2	9,6	2,03	9.600	16.000	64.000	64.000	64.000
9	2	19,3	2,2	2,85	9.600	16.000	128.000	256.000	256.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	9.600	16.000	128.000	256.000	256.000
AIOH					16.000	4.800	4.800	2.400	2.400

Tabla 3: Respuesta de anticuerpos de tipo IgG1 contra OVA (ovoalbúmina) en el ratón, para diferentes aceites, después de inyección bajo la forma de emulsión agua en aceite (W/O), en función del tiempo.

Aceite Ref.	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	9.600	16.000	48.000	48.000	48.000
3	4,2	20,5	1,5	1,86	9.600	16.000	48.000	48.000	48.000
4	4,4	21,6	4,7	1,86	9.600	16.000	48.000	48.000	48.000
6	0,3	22,2	9,6	2,03	9.600	16.000	128.000	256.000	256.000
9	2	19,3	2,2	2,85	9.600	16.000	128.000	256.000	256.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	9.600	16.000	128.000	256.000	256.000
AIOH					16.000	4.800	4.800	2.400	2.400

Tabla 4: Respuesta de anticuerpos de tipo IgG2 contra OVA, en el ratón, para diferentes aceites después de inyección bajo la forma de emulsión agua en aceite (W/O).

10

Estudio bajo la forma de emulsión de fase continua acuosa:

Se han probado dos tipos de presentaciones galénicas que representan las emulsiones de fase continua acuosa (emulsión múltiple agua/aceite/agua (W/O/W) y microemulsión de aceite en agua (W/O)).

Microemulsión de aceite en agua:

15

La fórmula del adyuvante comprende, para el 100 % de su masa 40 % en masa, de un tensioactivo hidrófilo (polisorbato 80) y 60 % en masa, del aceite mineral a ensayar; la fase oleosa formulada de este modo, se emulsiona a temperatura ambiente mediante un homogeneizador de alta presión en presencia de una fase acuosa que comprende el antígeno (OVA); la fase oleosa preparada precedentemente, se utiliza al 10 % en masa, en la composición de vacuna final (OVA 10 µg/dosis, 100 µl por inyección); se incluye en el ensayo un testigo de hidróxido de aluminio. Los resultados se presentan en la tabla 5. La baja intensidad de la respuesta de IGG1 está directamente relacionada con la presencia de la fracción pesada, que inhibe la respuesta a corto plazo (28 días, Día 28) y a largo plazo (90 días, Día 90).

20

Del mismo modo, la tabla 6 presenta los títulos de IGG2.

25

Los resultados indican una correlación entre la relación P/N y la respuesta de IGG2; las fórmulas 6 y 9 se desmarcan de los demás productos.

Aceite Ref.	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 90
2	4,9	21,5	7,1	1,9	12.800	16.000	96.000	48.000	48.000
3	4,2	20,5	1,5	1,9	9.600	48.000	128.000	256.000	256.000
4	4,4	21,6	4,7	1,9	12.800	48.000	128.000	128.000	128.000
6	0,3	22,2	9,6	2,0	4.800	16.000	48.000	48.000	32.000
9	2,0	19,3	2,2	2,8	6.400	48.000	32.000	128.000	128.000
11	8,6	20,7	2,4	1,9	9.600	48.000	128.000	256.000	256.000
AIOH					16.000	4.800	4.800	2.400	2.400

Tabla 5: Respuesta de anticuerpos de tipo IgG1 contra OVA en el ratón, para diferentes aceites bajo la forma de microemulsión tipo aceite en agua, en función del tiempo.

Aceite Ref.	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	400	12.000	24.000	4.000	400
3	4,2	20,5	1,5	1,86	600	16.000	24.000	1.000	1.000
4	4,4	21,6	4,7	1,86	150	8.000	8.000	1.000	1.000
6	0,3	22,2	9,6	2,03	4.800	16.000	32.000	8.000	4.000
9	2	19,3	2,2	2,85	1600	32.000	48.000	96.000	96.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	600	16.000	24.000	1.000	4.000
AIOH					150	150	150	300	300

5 Tabla 6: Respuesta de anticuerpos de tipo IgG2 contra OVA en el ratón, para diferentes aceites bajo la forma de microemulsión tipo aceite en agua (O/W), en función del tiempo.

Las comparaciones de las relaciones IGG1/IGG2 indican claramente una diferencia de comportamiento de la respuesta para los grupos vacunados con el aceite 9 y a menor nivel con el aceite 6, con respecto a los otros aceites (tabla 7).

10

Aceite Ref.	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	32	1	4	12	120
3	4,2	20,5	1,5	1,86	16	3	5	256	256
4	4,4	21,6	4,7	1,86	85	6	16	128	128
6	0,3	22,2	9,6	2,03	1	1	2	6	8
9	2	19,3	2,2	2,85	4	2	1	1	1
11	8,6	20,7	2,4	1,94	16	3	5	256	64
AIOH					107	32	32	8	8

Tabla 7: Relación IgG1/IgG2 contra OVA en el ratón, para diferentes aceites bajo la forma de microemulsión tipo aceite en agua (O/W) en función del tiempo.

Emulsión múltiple tipo agua-en aceite-agua (W/O/W):

15 La fórmula del adyuvante está compuesta esta vez, de un éter octadecenoato de manitol anhidro de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) = 9, dispersado al 15 % en masa en el aceite mineral a ensayar. La composición vacunal se prepara mezclando a 30 °C una parte en peso del adyuvante con una parte en peso de medio antigénico (fase acuosa) que comprende el antígeno OVA.

20 Ensayo sobre ratón: los resultados del ensayo sobre ratón para las respuestas IGG1 y para las respuestas IGG2 se presentan en las tablas 8 y 9, respectivamente. En cuanto a la respuesta celular, la evolución de los valores de las respuestas de IGG2 indica que el aceite 9 induce una respuesta intensa y duradera, especialmente después de 28 días.

Ensayo sobre modelo bovino: en este caso, las mismas vacunas se han ensayado sobre 5 bovinos inyectados con 2 ml por vía subcutánea; se han comparado las fórmulas 9 y 11. Los resultados se presentan en la tabla 10. No se observa ninguna diferencia para los títulos de IGG1 (no se presentan datos). Se observa un fuerte efecto adyuvante con respecto al antígeno solo. La respuesta de IGG2 es muy intensa con el aceite 9, es débil con el aceite 11 y es inexistente para el antígeno solo.

5

Aceite Ref.	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 90
2.0	4,9	21,5	7,1	1,9	16.000	32.000	64.000	64.000	64.000
3.0	4,2	20,5	1,5	1,9	16.000	64.000	128.000	128.000	128.000
4.0	4,4	21,6	4,7	1,9	16.000	64.000	128.000	128.000	128.000
6.0	0,3	22,2	9,6	2,0	16.000	64.000	64.000	64.000	64.000
9.0	2	19,3	2,2	2,8	16.000	64.000	128.000	128.000	128.000
11.0	8,6	20,7	2,4	1,9	16.000	64.000	128.000	128.000	128.000
AIOH					16.000	4.800	4.800	2.400	2.400

Tabla 8: Respuesta de anticuerpos de tipo IgG1 contra OVA en el ratón, para diferentes aceites bajo la forma de emulsión tipo agua/aceite/agua (W/O/W), en función del tiempo.

Aceite Ref.	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	400	12.000	24.000	4.000	400
3	4,2	20,5	1,5	1,86	400	12.000	24.000	4.000	400
4	4,4	21,6	4,7	1,86	400	12.000	24.000	4.000	400
6	0,3	22,2	9,6	2,03	400	4.000	12.000	4.000	400
9	2	19,3	2,2	2,85	9.600	16.000	128.000	256.000	256.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	300	600	1.200	1.200	1.200
AIOH					150	150	150	300	300

10 Tabla 9: Respuesta de anticuerpos de tipo IgG2 contra OVA en el ratón, para diferentes aceites bajo la forma de emulsión tipo agua/aceite/agua (W/O/W), en función del tiempo.

Aceite Ref.	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	Día 0	Día 28	Día 60	Día 140
9	2	19,3	2,2	2,85	-	600	6.000	10.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	-	10	600	2.000

Tabla 10: Respuesta de anticuerpos de tipo IgG2A contra OVA en el bovino, para los aceites 9 y 11, bajo la forma de emulsión tipo agua/aceite/agua (W/O/W), en función del tiempo.

15

Como una mejora del componente celular de la respuesta inmunitaria, se entiende:

- A) obtener una respuesta inmunitaria que se caracteriza por una relación IgG1/IgG2 comprendida entre 0,25 y 4, y
- B) obtener una respuesta inmunitaria cuyo componente celular es también intenso, esto es caracterizada por una IgG2 superior o igual a 32.000 después de la vacunación de refuerzo practicada después de 28 días y después de la medida del título de IGG2 en esa fecha (respuesta secundaria y a largo plazo).

20

A- relación IgG1/IgG2

a) en el caso de los adyuvantes de vacunas que se presentan bajo la forma de una emulsión tipo agua/aceite/agua (W/O/W), los resultados experimentales de IgG1/IgG2 son los siguientes:

25

- para el aceite 6: 40 (Día 14), 16 (Día 28), 5,3 (Día 42), 16 (Día 56) y 160 (Día 90).
- para el aceite 11: 53,3 (Día 14), 107 (Día 28), 107 (Día 42), 107 (Día 56) y 107 (Día 90).

- para el aceite 9: 1,7 (Día 14), 4 (Día 28), 1 (Día 42) 0,5 (Día 56) y 0,5 (Día 90).

El aceite 9 permite obtener una relación IgG1/IgG2 comprendida entre 0,25 y 4 antes y después de la vacunación de refuerzo del Día 28 (la vacunación de refuerzo realizada el Día 28, se realiza después de la medida de la respuesta inmunitaria).

- 5 b) en el caso de los adyuvantes de vacunas que se presentan bajo la forma de una microemulsión tipo aceite en agua (O/W), la declaración de la invención comprende los siguientes resultados experimentales de IgG1/IgG2:

- para el aceite 6: 1 (Día 14), 1 (D28), 2 (Día 42), 6 (Día 56) y 8 (Día 90)
- para el aceite 11: 16 (Día 14), 3 (Día 28), 5 (Día 42), 256 (Día 56) y 64 (Día 90)
- para el aceite 9: 4 (Día 14), 2 (Día 28), 1 (Día 42), 1 (Día 56) y 1 (Día 90)

- 10 Para el aceite 9, la relación IgG1/IgG2 comprendida entre 0,25 y 4, se obtiene siempre antes de la vacunación de refuerzo del Día 28, y se mantiene constante en el tiempo.

Para el aceite 6, la relación IgG1/IgG2 comprendida entre 0,25 y 4, se obtiene también antes de la vacunación de refuerzo (respuesta primaria), pero no permanece en el tiempo durante la medida de la respuesta secundaria (después de la vacunación de refuerzo del Día 28) y de la respuesta a largo plazo (Día 90).

- 15 Para el aceite 11, la relación IgG1/IgG2 comprendida entre 0,25 y 4, no se observa para la respuesta secundaria ni para la respuesta a largo plazo.

c) en el caso de los adyuvantes de vacunas que se presentan bajo la forma de una emulsión tipo agua en aceite (W/O), la declaración de la invención comprende los siguientes resultados experimentales de IgG1/IgG2:

- para el aceite 9: 1 (Día 14), 1 (Día 28), 1 (Día 42), 1 (Día 56) y 1 (Día 90)

- 20 Todos estos resultados registrados son buenos resultados para la relación IgG1/IgG2.

B- Intensidad de las respuestas IgG2.

a) en el caso de los adyuvantes de vacunas que se presentan bajo la forma de una emulsión tipo agua/aceite/agua (W/O/W), los resultados experimentales de IgG2 son los siguientes (tabla 9):

- a. para el aceite 6: (Día 14), 4.000 (Día 28), 12.000 (D42), 4.000 (Día 56) y 400 (Día 90)
- 25 b. para el aceite 11: 300 (Día 14), 600 (Día 28), 1200 (día 42), 1200 (Día 56) y 1200 (Día 90)
- c. para el aceite 9: 9600 (Día 14), 16.000 (Día 28), 128.000 (Día 42), 256.000 (Día 56) y 256.000 (Día 90)

El aceite 9 permite tener una respuesta celular intensa (según los criterios definidos anteriormente) después de la vacunación de refuerzo practicada después de 28 días.

- 30 b) en el caso de los adyuvantes de vacunas que se presentan bajo la forma de una microemulsión tipo aceite en agua (O/W), la declaración de la invención comprende los siguientes resultados experimentales de IgG2 (tabla 6):

- a. para el aceite 6: 4.800 (Día 14), 16.000 (Día 28), 32.000 (Día 42), 8.000 (Día 56) y 4.000 (Día 90)
- b. para el aceite 11: 600 (Día 14), 16.000 (Día 28), 24.000 (Día 42), 1000 (Día 56) y 40.000 (Día 90)
- c. para el aceite 9: 1600 (Día 14), 32 000 (Día 28), 48 000 (Día 42), 96 000 (Día 56) y 96.000 (Día 90)

- 35 El aceite 9 permite tener una respuesta celular intensa (según los criterios definidos anteriormente) para la respuesta secundaria (después de la vacunación de refuerzo) y para la respuesta a largo plazo (Día 90).

c) en el caso de los adyuvantes de vacunas que se presentan bajo la forma de una emulsión tipo agua en aceite (W/O), la declaración de la invención comprende los siguientes resultados experimentales de IgG2 (tabla 4):

- a. para el aceite 9: 9.600 (Día 14), 16.000 (Día 28), 128.000 (Día 42), 256.000 (Día 56) y 256.000 (Día 90)

Todos estos resultados registrados son buenos resultados para la respuesta de IgG2.

- 40 Según estos resultados se demuestra que una composición de un aceite mineral destinada a ser utilizada como adyuvante para vacunas inyectables, objeto de la presente invención, como el aceite 9 por ejemplo, que presenta las siguientes características:

- FC < 10 % y FP < 5 %;

- P/N comprendido entre 2,5 y 3 (aquí alrededor de 2,85);

garantiza una buena seguridad, una buena eficacia con respecto a la respuesta humoral y una fuerte respuesta celular tanto en la forma de emulsión tipo agua en aceite (W/O) y agua/aceite/agua (W/O/W) como en la forma de microemulsión tipo aceite en agua (O/W).

5 II) Segunda parte

Serie de ensayos 1: trabajo experimental en un modelo de "pollo"

En el marco de los ensayos experimentales llevados a cabo, la eficacia de la respuesta para cada fórmula se basa en los siguientes criterios:

- títulos de anticuerpos en los sueros;
- infiltración de glóbulos blancos en el sitio de inyección;
- prueba de virulencia que consiste en inocular a los animales 10.000 oocitos de la cepa *Eimeria acervulina* dos semanas después del tratamiento, y comparación:
 - del aumento de peso de los animales
 - del número de parásitos excretados

15 La tabla 11 indica las diferentes fórmulas que han sido ensayadas:

Grupo	A	B	C	D	E	F
Emulsión	W/O	W/O	W/O/W	W/O/W	CFA	Sin emulsión
Aceite	1	2	1	2	Mineral estándar	Sin aceite

Tabla 11

Los aceites implicados en los ensayos experimentales se caracterizan en la siguiente tabla

Ref. Aceite	FC (<C16)	RM	FP (>C28)	P/N	RL
Mineral estándar	4,9	21,5	7,1	1,86	0,5
Aceite 1 (O1)	2	19,3	2,2	2,85	0
Aceite 2 (O2)	8,6	20,7	2,4	1,94	0,5

20 Las formulaciones de los grupos A y B, es decir, las emulsiones tipo agua en aceite 1 (W/O1) (Grupo A) y las emulsiones tipo agua en aceite 2 (W/O2) (Grupo B), comprenden para el 100 % de su masa:

- 30 % en masa, de una fase acuosa que comprende el antígeno y el agua
- 70 % en masa, de adyuvante oleoso que comprende, para el 100 % de su masa:
 - o 15 % en masa, de oleato de manitán
 - o 85 % en masa, de aceite (aceite 1 o aceite 2)

25 El antígeno, la proteína 3-1 E, está presente en estas formulaciones en una proporción tal que una dosis de la formulación inyectada comprende 50 µg de antígeno, siendo el volumen de la dosis de formulación inyectada de 100 µl.

Las formulaciones de los grupos C y D, es decir, las microemulsiones agua-aceite 1-agua (W/O1/W) (Grupo C) y las microemulsiones agua-aceite 2-agua (W/O2/W) (Grupo D), comprenden para el 100 % de su masa:

- 90 % en masa, de una fase acuosa que comprende el antígeno y el agua
- 10 % en masa, de adyuvante oleoso que comprende, para el 100 % de su masa:
 - o 40 % en masa, de oleato de sorbitán etoxilado con 20 moles de óxido de etileno Polisorbato 80)
 - o 60 % en masa, de aceite (aceite 1 o aceite 2).

El antígeno, la proteína 3-1 E, está presente en estas formulaciones en una proporción tal que una dosis de formulación inyectada comprende 50 µg de antígeno, siendo el volumen de la dosis de formulación inyectada de 100 µl.

- 5 Al nivel de los títulos de anticuerpos en los sueros todos los grupos ensayados han presentado títulos de anticuerpos séricos importantes y equivalentes excepto el grupo que comprende la proteína sola (Grupo F). La respuesta humoral obtenida para cada uno de los grupos está en un nivel alto y satisfactorio (no se presentan los resultados).

Al nivel de las infiltraciones de glóbulos blancos en el sitio de inyección, las intensidades de las infiltraciones locales de dichos glóbulos blancos (linfocitos y macrófagos) han sido evaluadas por inmunofluorescencia indirecta sobre secciones de tejido para los diferentes grupos.

- 10 Las biopsias se han practicado en 3 animales de cada grupo, al nivel del sitio de inyección, con el fin de obtener muestras de la piel de estos animales. Esta biopsia se ha realizado un día después de la segunda inmunización de dichos animales, esto es 28 días después de la primera inmunización. Estas inmunizaciones han consistido en inyecciones de una mezcla de profilina y de las formulaciones ensayadas. Un testigo, que consiste en una inyección de profilina sin medio vacunal, se ha realizado también en las mismas condiciones operatorias. Las muestras así
- 15 obtenidas se han congelado inmediatamente en un medio que contiene nitrógeno líquido y se han conservado a una temperatura de - 20 °C. A continuación, se han puesto trozos de 5 µm de cada muestra sobre soportes previamente limpiados, y se han lavado con acetona durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C, y se han "fijado" con suero de caballo al 10 % durante 20 minutos a una temperatura de 20 °C. Se han añadido anticuerpos CD8 de pollo, diluidos 1/200, y después la mezcla resultante se ha incubado a temperatura ambiente (20 °C) durante 2 horas. A
- 20 continuación, se han lavado los soportes con una solución tampón de fosfato y se han incubado con un anticuerpo secundario IGG de pollo "Alexa Fluor 488-labeled antichicken" (comercializado con la denominación Invitrogen por la compañía Carlsbad) a una dilución de 1/500 durante 2 horas a temperatura ambiente (20 °C). Los soportes se han puesto entonces en contacto con un revelador colorimétrico, el Fluoromount-G, y se han observado con un microscopio electrónico (comercializado bajo la denominación LSM 510 META por la compañía Carl Zeiss).

- 25 Por este protocolo, la visualización de las células CD8+ ha sido evaluada mediante una calificación según la siguiente escala:

- calificación "0": ausencia de manchas de células CD8+ observadas,
- calificación "+": observación de una presencia, de débil densidad, de células CD8+,
- calificación "++": observación de una fuerte presencia, de densidad elevada, de células CD8+, y
- 30 - calificación "+++": observación de una presencia muy fuerte, de densidad muy elevada, de células CD8+.

Cuanto mayor sea la cantidad y la densidad de linfocitos y de macrófagos observados al nivel del sitio de inyección, en mayor medida será posible para la vacuna ensayada, la capacidad de desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 12

Grupo	A	B	C	D	E	F
Adyuvante	W/O1	W/O2	W/O1/W	W/O2/W	CFA	Sin adyuvante
Antígeno	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Linfocitos	+++	+	++	++	+	0
Macrófagos	++	+	+	+	+	0

35 Tabla 12

Con respecto a la vacuna que comprende el adyuvante de la técnica anterior (Grupo E), las vacunas según la invención mejoran la producción de linfocitos en el sitio de inyección para los grupos D, C y A; mientras que para los macrófagos, sólo la vacuna según la invención del grupo A permite mejorar la producción de macrófagos y las otras vacunas según la invención permiten obtener resultados de producción de macrófagos sobre el sitio de inyección

40 similares a la vacuna que comprende el adyuvante de la técnica anterior.

Al nivel de la prueba de virulencia, una protección eficaz de las vacunas implicará que los animales:

- presentarán un aumento de peso similar con respecto a los testigos no vacunados y no sometidos a prueba;
- presentarán una reducción de la carga parasitaria (evaluada por el número de parásitos excretados) con respecto a los animales sometidos a prueba y no vacunados.

- 45 De forma general, la prueba de virulencia corresponde a la administración de una dosis precisa y controlada del agente patógeno contra el cual los animales han sido vacunados previamente. La protección inducida por las

vacunas experimentales se evalúa según diversos criterios, en función del modelo animal y de la naturaleza del agente patógeno.

Se han seguido dos criterios principales después de la prueba de virulencia:

- aumento de peso de los animales 10 días después de la infección, y
- 5 - reducción del número de agentes patógenos excretados.

Aumento de peso de los animales 10 días después de la infección.

La tabla 13 resume los resultados obtenidos durante la vacunación y la infección del pollo contra la coccidiosis aviar (cepa utilizada *Eimeria acervulina*). El poder patógeno de esta cepa es importante y da lugar a una modificación del aumento de peso de los animales infectados.

Grupo	A	B	C	D	E	F	G	H
Emulsión	W/O1	W/O2	W/O1/W	W/O2/W	CFA	Sin adyuvante	Sin vacuna	Sin vacuna
Antígeno	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
Prueba de virulencia	10.000 oocistos de <i>Eimeria acervulina</i>							Sin prueba
Aumento de peso diez días después de la prueba (g)	834	798	802	740	773	735	730	850

10 Tabla 13: aumento de peso de los diferentes grupos después de la prueba de virulencia.

Se puede observar que, para los sujetos sometidos a prueba, la vacunación sin adyuvante no indujo protección en términos de aumento de peso: los testigos sin adyuvante (Grupo F) y sin vacuna (Grupo G) indujeron resultados similares.

- 15 Con respecto al sujeto sometido a prueba y no vacunado (Grupo G), las vacunas según la invención que comprenden un adyuvante a base de aceites O1 y O2 permiten aumentos de peso significativos con excepción de las vacunas del Grupo D.

Con respecto a la vacuna que comprende el adyuvante de la técnica anterior (Grupo E), las vacunas según la invención inducen un aumento de peso superior con excepción de la vacuna que se presenta en forma de una emulsión W/O2/W (Grupo D).

- 20 Es preciso remarcar también que las vacunas según la invención que comprenden un adyuvante a base de aceite 1 inducen un aumento de peso más importante que las vacunas según la invención que comprenden un adyuvante a base de aceite 2.

Para las vacunas según la invención del grupo A, el aumento de peso no es inferior más que en un 1,9 % con respecto al aumento de peso de los sujetos no sometidos a prueba.

- 25 Además, para cada uno de los aceites minerales considerados (O1 u O2), se observará que las vacunas experimentales formuladas en emulsión de agua en aceite, parecen ser más protectoras que las fórmulas tipo agua/aceite/agua:

- para el aceite 1, el aumento de peso para una vacuna bajo la forma de una emulsión W/O1 (Grupo A) es de 834 g, esto es, un aumento de peso de 99 g con respecto a los animales del grupo sin adyuvante (Grupo F), mientras que para una vacuna bajo la forma de una emulsión W/O1/W, el aumento de peso (grupo C) es de 802 gramos y presenta un aumento de peso de 67 g con respecto a los animales del grupo sin adyuvante (grupo F).
- para el aceite 2, el aumento de peso para una vacuna bajo la forma de una emulsión W/O2 (grupo B) es de 798 g, esto es, un aumento de peso de 63 g con respecto a los animales del grupo sin adyuvante (Grupo F) mientras que para una vacuna bajo la forma de una emulsión W/O2/W, el aumento de peso (grupo D) es de 740 gramos y presenta un aumento de peso de 5 g con respecto a los animales del grupo sin adyuvante (grupo F).

Reducción del número de patógenos excretados:

Los resultados obtenidos se incluyen en la tabla 14.

Los resultados se expresan como la reducción del número de oocistos excretados (cuantos más infectados están los animales, más excretan, por lo tanto, estarían menos protegidos).

Grupo	A	B	C	D	E	F
Adyuvante	W/O1	W/O2	W/O1/W	W/O2/W	CFA	Sin adyuvante
Antígeno	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Media excretada (X10 E 8)	1,42	2,75	2,54	3,09	2,13	2,86
Desviación estándar	0,23	0,52	0,8	0,39	0,49	0,36

Tabla 14

5 Con respecto al testigo del grupo F (antígeno, pero sin adyuvante), las vacunas según la invención inducen por lo tanto una disminución de la media excretada.

Con respecto al grupo E (antígeno + adyuvante de la técnica anterior), la vacuna según la invención del grupo 1 proporciona una disminución de la media excretada.

10 Además, la desviación estándar para el grupo A es la más baja, lo que indica una respuesta más homogénea de los animales vacunados. Este criterio es un punto importante porque significa que las susceptibilidades individuales de respuesta biológica de los animales son borradas por la eficacia de la vacuna.

Conclusión del ensayo 1

Las vacunas que comprenden los adyuvantes según la invención permiten aportar una respuesta inmunitaria mejorada y una mejor eficacia para prevenir la coccidiosis de las aves de corral.

15 Por otra parte, la vacuna según la invención al presentarse en la forma de una emulsión W/O1, con el aceite 1 (O1) caracterizado por una relación P/N > 2, tiene la ventaja de estimular una mayor producción de glóbulos blancos al nivel del sitio de inyección, y de conciliar, tras una prueba de virulencia con la cepa *Eimeria acervulina*, a la vez el aumento de peso más elevado y una reducción muy importante de la excreción de oocistos.

Serie de ensayos 2: Teniendo en cuenta la serie de ensayo 1 y sus conclusiones, es decir la observación de los mejores resultados para una vacuna, que comprende:

- 20
- la proteína recombinante que consta de la secuencia 3-1 de *Eimeria acervulina*.
 - el aceite 1
 - el agua
 - un sistema tensioactivo

25 y que se presenta en la forma de una emulsión tipo agua en aceite, los inventores han realizado dos tipos de pruebas de virulencia:

- una prueba de virulencia con la cepa *Eimeria acervulina* (AE)
- una prueba de virulencia con la cepa *Eimeria tenella* (ET).

Las formulaciones ensayadas, es decir las emulsiones tipo agua en aceite 1 (W/O1), comprenden para el 100 % de su masa:

- 30
- 30 % en masa, de una fase acuosa que comprende el antígeno y el agua
 - 70 % en masa, de adyuvante oleoso que comprende, para el 100 % de su masa:
 - o 15 % en masa, de oleato de manitán;
 - o 85 % en masa, de aceite (aceite 1 o aceite 2).

35 El antígeno, la proteína 3-1 E, está presente en estas formulaciones en una cantidad tal que una dosis de formulación inyectada comprende 30 µg de antígeno, siendo el volumen de la dosis de formulación inyectada de 100 µl.

Para identificar las protecciones cruzadas que amplían las propiedades de la vacuna experimental ensayada. En efecto, la respuesta inmunitaria inducida de tipo celular, permite proteger después contra diferentes cepas de parásitos.

- 5 La dosis de proteína utilizada es de 30 µg/ml. La prueba de virulencia se lleva a cabo mediante la administración de 10.000 oocistos por ave (tabla 15).

Los animales se controlan a continuación en cuanto a los parámetros de aumento de peso, de anticuerpos, de proliferación de los linfocitos del bazo después de la re-estimulación antigénica o por mitógenos (para cuantificar la respuesta celular) y la protección después de una prueba de virulencia.

E. acervulina: es moderadamente patógena.

- 10 Las lesiones se localizan en el intestino delgado sobre todo en el duodeno, con manchas después de las estrías blanquecinas en la mucosa = lesiones en "escala". Las lesiones son causadas por los oocistos.

E. tenella: es el coccidio más patógeno, siendo causadas las lesiones por los esquizontes.

Las lesiones se localizan en el intestino ciego, que se llena de sangre, que se puede romper o se puede gangrenar. La canal puede ser anémica. La mortalidad es con frecuencia elevada.

- 15 La tabla 15 describe los diferentes grupos ensayados:

Grupo	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Descripción	No vacunado	No vacunado	No vacunado	Vacunado	Vacunado	Vacunado	Vacunado	Vacunado	Vacunado
Antígeno 3-1 E (30 µl)	No	No	No	Sí	Sí			Sí	Sí
Adyuvante	No vacunado	No vacunado	No vacunado	No	No	CFA	CFA	W/O1	W/O1
Cepa de prueba de virulencia	Sin prueba	EA	ET	EA	ET	EA	ET	EA	ET

TABLA 15

CFA: Adyuvante completo de Freund (adyuvante de la técnica anterior)

Después se hace seguimiento de los pollos vacunados en los diferentes grupos, según los siguientes criterios diferentes:

- 20 a) aumento de peso;
- b) producción de títulos de anticuerpos (serología);
- c) evaluación de las intensidades de las infiltraciones locales de los glóbulos blancos (linfocitos) por el método de inmunofluorescencia indirecta sobre extracciones de esplenocitos de rata realizadas 48 horas después de la vacunación (o inmunización). Estas inmunizaciones han consistido en inyecciones de una mezcla de profilina y de las formulaciones ensayadas. En las mismas condiciones operatorias, se ha realizado también un testigo, que consiste en una inyección de profilina sin medio vacunal. El modo operatorio utilizado es idéntico al llevado a cabo sobre las extracciones de pieles de animales descritas anteriormente, a saber:
- 25 - conservación de las muestras extraídas de esplenocitos a -20 °C.
- 30 - instalación de las extracciones de los esplenocitos sobre soportes y lavado en acetona durante 20 minutos a 20 °C.
- adición de anticuerpos CD8 diluidos a 1/200 y posterior incubación durante 2 horas a 20 °C
- lavado de los soportes obtenidos con una solución tampón de fosfato, y posterior incubación con un anticuerpo secundario IGG de pollo "Alexa Fluor 488-labeled antichicken" a una dilución de 1/500 durante 2 horas a temperatura ambiente (20 °C)
- 35 - puesta en contacto con el revelador colorimétrico Fluoromount-G
- observación con un microscopio electrónico (comercializado con la denominación LSM 510 META por la compañía Carl Zeiss).

Por este protocolo, la visualización de las células CD8+ (linfocitos) ha sido evaluada mediante una calificación según la siguiente escala:

- calificación "0": ausencia de manchas de células CD8+ observadas
- calificación "+": observación de una presencia, de baja densidad, de células CD8+
- calificación "++": observación de una fuerte presencia, de alta densidad, de células CD8+
- calificación "+++": observación de una presencia muy fuerte, de una densidad muy alta, de células CD8+;

5 d) número de oocistos excretados.

Resultados:

- aumentos de peso: los grupos vacunados con la vacuna que se presenta en la forma de una emulsión agua/aceite 1, se caracterizan por un aumento de peso similar al observado en los otros grupos (no se presentan resultados);
- 10 - serología: una alta producción de títulos de anticuerpos, superior a la observada para los grupos vacunados con la vacuna que presenta como adyuvante el CFA y a la observada para los grupos vacunados con una vacuna que no comprende adyuvante (no se presentan resultados);
- proliferación de los linfocitos: las calificaciones más altas se obtienen para los grupos H e I vacunados con la vacuna que se presenta en la forma agua/aceite y que comprende el adyuvante con el aceite O1.

Grupo	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Índice de proliferación de linfocitos	0	0	0	0	0	0	0	++	++

15

- número de oocistos excretados:

Las tablas 16 y 17 indican los resultados del número de oocistos excretados, para los grupos que se han sometido a la prueba de virulencia con *Eimeria acervulina* (EA) y *Eimeria tenella* (ET) respectivamente.

Grupo	B	D	F	H
Media (X 10 E 8)	3,44	3,33	3,30	2,71
Desviación estándar	0,50	0,67	0,89	0,27

Tabla 16: Resultados de excreción después de la prueba de virulencia con la cepa EA

Grupo	C	E	G	I
Media (X 10 E 8)	1,49	1,20	1,11	0,95
Desviación estándar	0,23	0,27	0,42	0,13

20 Tabla 17: Resultados de excreción después de la prueba de virulencia con la cepa ET

Para las dos cepas, los grupos vacunados con la vacuna que comprende el adyuvante a base de aceite 1, muestran una media de excreción inferior a la observada en los grupos vacunados con la vacuna que comprende el adyuvante de la técnica anterior (CFA). Es lo mismo para la comparación con los grupos vacunados con una vacuna que no contiene adyuvante (grupos D y E).

25

REIVINDICACIONES

1. Adyuvante de vacuna, que comprende para el 100 % de su masa:
 - de 10 % a 95 % de un aceite mineral que comprende:
 - de 0,05 % en masa a 10 % en masa, de cadenas hidrocarbonadas que tienen menos de 16 átomos de carbono;
 - de 0,05 % en masa a 5 % en masa, de cadenas hidrocarbonadas que tienen más de 28 átomos de carbono;
 - y que tiene una relación P/N, que corresponde a la relación de la cantidad en masa, de las cadenas hidrocarbonadas de tipo parafínico sobre la cantidad en masa, de las cadenas hidrocarbonadas de tipo nafténico, comprendida entre 2,5 y 3.
2. La utilización de un adyuvante de vacunas tal como se ha definido en la reivindicación 1, para la fabricación de una composición vacunal destinada a la prevención contra la coccidiosis.
3. La utilización según la reivindicación 2, para la fabricación de una composición vacunal destinada a la prevención contra la coccidiosis en animales, en particular las aves de corral.
4. Una vacuna para utilización en la prevención contra la coccidiosis, que comprende el adyuvante tal como se ha definido en la reivindicación 1, así como al menos un antígeno.
5. La vacuna para utilización según la reivindicación 4, para utilización en la prevención contra la coccidiosis en animales, en particular las aves de corral.
6. La vacuna para utilización según una de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizada porque los coccidios se seleccionan del grupo que consiste en *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Neospora*, con preferencia *Eimeria*.
7. La vacuna para utilización según la reivindicación 6, caracterizada porque está en la forma de una emulsión de tipo agua en aceite (W/O).
8. La vacuna para utilización según una de las reivindicaciones 4 a 7, caracterizada porque el antígeno es una proteína recombinante que tiene la secuencia 3-1 de *Eimeria Acervulina*.
9. La utilización de un aceite mineral para la fabricación de una vacuna tal como se define en una de las reivindicaciones 4 a 8, caracterizado porque dicho aceite comprende, para el 100 % de su masa:
 - de 0,05 % a 10 % de cadenas hidrocarbonadas que tienen menos de 16 átomos de carbono;
 - de 0,05 % a 5 % de cadenas hidrocarbonadas que tienen más de 28 átomos de carbono;y tiene una relación P/N, que corresponde a la relación de la cantidad en masa, de cadenas carbonadas de tipo parafínico sobre la cantidad en masa, de cadenas carbonadas de tipo nafténico, comprendida entre 2,5 y 3.