

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 929**

51 Int. Cl.:

A61K 39/135 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2010** **PCT/US2010/048256**
87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011** **WO11031850**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2010** **E 10757885 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 2475384**

54 Título: **Nuevas formulaciones de vacuna que comprenden adyuvantes que contienen saponina**

30 Prioridad:

10.09.2009 US 241171 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2017

73 Titular/es:

MERIAL, INC. (50.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg, 500, Duluth
Georgia 30096, US

72 Inventor/es:

DETRAZ, NOEL JOSEPH, FRANCOIS y
RIGAUT, GUILLAUME

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 600 929 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas formulaciones de vacuna que comprenden adyuvantes que contienen saponina.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a emulsiones de aceite en agua, a su uso como adyuvantes, y a composiciones farmacéuticas, inmunológicas o de vacuna que comprenden las mismas.

10 INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

[0002] Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 61/241.171, depositada el 10 de septiembre de 2009, y además hace referencia a las siguientes solicitudes de patente: la solicitud de patente de EE.UU. Nº 12/027.776, depositada el 7 de febrero de 2008, la solicitud de patente de EE.UU. Nº 10/899.181, depositada el 26 de julio de 2004, ahora concedida como la patente de EE.UU. 7.371.395, y la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 60/490.345, depositada el 24 de julio de 2003.

ANTECEDENTES

[0003] El uso de adyuvantes en vacunas es bien conocido. Un adyuvante es un compuesto que cuando se combina con un antígeno de vacuna aumenta la respuesta inmunitaria frente al antígeno de la vacuna en comparación con la respuesta inducida por el antígeno de la vacuna solo. Entre las estrategias que promueven la inmunogenicidad con antígeno están aquellas que proporcionan un particulado de antígenos de vacuna, aquellas que polimerizan o emulsionan antígenos de vacuna, métodos para la encapsulación de antígenos de vacuna, formas para aumentar las respuestas de las citocinas innatas del hospedador y métodos que dirigen los antígenos de vacuna a las células presentadoras del antígeno (Nossal, 1999, en: Fundamental Immunology. Paul (Ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.; Vogel y Powell, 1995, en: Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach. Powell y Newman (Eds.), Plenum Press, NY, N.Y. pág. 141). Debido al papel fundamental que juegan los adyuvantes en la mejora de la inmunogenicidad de los antígenos de vacuna, el uso de adyuvantes en la formulación de vacunas ha sido prácticamente omnipresente (Nossal, 1999, *supra*; Vogel y Powell, 1995, *supra*; véase también la publicación PCT WO 97/18837).

[0004] Los adyuvantes convencionales, bien conocidos en la materia, tienen una naturaleza diversa. Pueden consistir, por ejemplo, en sales inorgánicas insolubles en agua, liposomas, micelas o emulsiones, es decir, adyuvante de Freund. Otros adyuvantes pueden encontrarse en Vogel y Powell, 1995, mencionado *supra*. Aunque no hay un único mecanismo para la acción adyuvante, una característica esencial es su capacidad para aumentar significativamente la respuesta inmunitaria frente a un antígeno de la vacuna en comparación con la respuesta inducida por el antígeno de la vacuna solo (Nossal, 1999, *supra*; Vogel y Powell, 1995, *supra*). A este respecto, algunos adyuvantes son más eficaces aumentando las respuestas inmunitarias humores; otros adyuvantes son más eficaces aumentando las respuestas inmunitarias mediadas por células (Vogel y Powell, 1995, *supra*); y otro grupo más de adyuvantes aumentan la respuesta inmunitaria tanto humoral como la mediada por células frente a los antígenos de vacuna (Vogel y Powell, 1995, *supra*).

[0005] Generalmente, las emulsiones usadas en las formulaciones de vacuna comprenden una mezcla de aceite, una solución acuosa y tensioactivos (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 2005/009462). Algunas emulsiones incorporan un tensioactivo lipófilo tal como SPAN 80® y un tensioactivo hidrófilo tal como TWEEN 80®.

[0006] Sin embargo, pueden observarse problemas de estabilidad con las emulsiones usadas como adyuvantes de vacuna, en particular durante el almacenamiento o el transporte. Esto es particularmente cierto cuando estas composiciones contienen inmunógenos concentrados, especialmente inmunógenos concentrados no purificados. Normalmente, este es el caso con los adyuvantes usados en las vacunas inactivadas (con células muertas). Este problema es incluso más significativo con las composiciones de vacunas multivalentes debido a que los inmunógenos están más concentrados en el mismo volumen de diluyente.

[0007] Otro problema del uso de adyuvantes está relacionado con un riesgo de acontecimientos adversos tales como toxicidad o una inflamación local en el sitio de la inyección. Por ejemplo, puede aparecer una respuesta inflamatoria local y/o granulomas después de la inyección. Con objeto de limitar dicha reacción adversa pueden reducirse los tensioactivos y otros componentes de la emulsión; sin embargo, la reducción puede dar como resultado después una disminución en la estabilidad de la composición de la vacuna. Por lo tanto, existe una necesidad de

nuevos adyuvantes y de composiciones de vacuna que contengan dichos adyuvantes con una mayor seguridad y estabilidad.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

- 5
- [0008]** La presente invención se refiere a una nueva emulsión de aceite en agua (O/A) con una mayor estabilidad en presencia de suspensiones bacterianas o víricas, especialmente aquellas que están concentradas y no están purificadas o están poco purificadas.
- 10 **[0009]** Describimos una emulsión O/A estable, segura y fácilmente administrable, en particular inyectable, que actúa como vehículo para la administración de una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo que puede ser, más particularmente, un inmunógeno.
- 15 **[0010]** Describimos una emulsión O/A estable, estable, segura e inyectable que actúa como adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria inducida por un inmunógeno. En particular, describimos un nuevo adyuvante que, cuando se usa en una composición de vacuna que contiene un inmunógeno, aumenta la respuesta inmunitaria celular, la respuesta inmunitaria humoral o, preferiblemente ambas, del vacunado frente al inmunógeno.
- 20 **[0011]** Adicionalmente describimos una composición o una vacuna estable, segura e inmunógena que comprende una emulsión O/A.
- [0012]** En el presente documento también se describe un método para la elaboración de una composición de vacuna mediante el uso del adyuvante descrito; la composición de vacuna así obtenida; y métodos de uso de la misma.
- 25 **[0013]** Adicionalmente describimos un kit que comprende uno o más viales. El kit comprende un vial que contiene el adyuvante de la presente invención y un inmunógeno u otro producto farmacéutico. El kit descrito comprende un inmunógeno u otro producto farmacéutico en un primer vial, y un adyuvante descrito en el presente documento en un segundo vial, con el adyuvante diseñado para ser mezclado con el inmunógeno o con otro
- 30 producto de vacuna antes de su uso.
- [0014]** La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una emulsión inyectable de aceite en agua (O/A), que comprende:
- 35 (i) una solución acuosa que comprende al menos un inmunógeno que es un virus inactivado de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMD), un virus inactivado del circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2) o una bacteria inactivada de *Mycoplasma hyopneumoniae*;
- (ii) una solución acuosa que comprende saponina en una cantidad de entre 0,35 mg/dosis y 3,0 mg/dosis;
- 40 (iii) una solución acuosa que comprende hidróxido de aluminio en la que la concentración del hidróxido de aluminio es de entre el 0,065 % p/v y el 1,0 % p/v;
- (iv) un aceite mineral;
- (v) un tensioactivo lipófilo no iónico;
- (vi) un tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un elevado valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de entre 13 y 40; y
- 45 (vii) un tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene por bajo valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de entre 9 y 13.
- [0015]** En otra forma de realización más, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una nueva emulsión que contiene al menos un inmunógeno adecuado para desencadenar una respuesta inmunitaria en un vacunado. Adicionalmente describimos dichas composiciones en las que la emulsión actúa como
- 50 un adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria inducida por el inmunógeno, en particular, para aumentar la respuesta celular, la respuesta humoral, o preferentemente ambas.
- [0016]** Describimos un método para la elaboración de una composición de vacuna en el que puede obtenerse un inmunógeno, especialmente un inmunógeno en forma seca, por ejemplo, mediante una liofilización o mediante
- 55 una vitrificación, o en una solución acuosa, especialmente en la que dicha forma seca o dicha solución acuosa que comprende adicionalmente un tensioactivo iónico, por ejemplo, saponina, y opcionalmente comprende adicionalmente hidróxido de aluminio, se mezcla con el adyuvante. El inmunógeno descrito puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: patógenos inactivados, patógenos atenuados, antígenos de subunidad, antígenos purificados, antígenos no purificados o antígenos producidos recombinantemente mediante el uso de células de

bacterias, de levaduras, de plantas, de insectos o de animales, de vectores de expresión incluyendo plásmidos, y similares. Los antígenos descritos pueden ser purificados mediante medios bien conocidos en la materia que incluyen, pero no se limitan a, ultrafiltración, ultracentrifugación, cromatografía de exclusión por tamaños, de filtración en gel, de intercambio iónico y purificación mediante PEG. El patógeno descrito puede ser de origen bacteriano, vírico, protozario o fúngico, o el inmunógeno puede constituir una antitoxina.

[0017] Describimos un método para la inducción de una respuesta inmunitaria en un vacunado frente a un patógeno que comprende la administración de la composición de vacuna descrita en el presente documento al vacunado.

[0018] También describimos kits que comprenden un vial individual que contiene inmunógenos purificados y la emulsión descrita en el presente documento. En una de dichas formas de realización, los inmunógenos contenidos en el vial individual comprenden antígenos de virus de la FMD purificados.

[0019] Además, describimos kits que comprenden al menos dos viales, en un primer vial un inmunógeno, especialmente un inmunógeno en forma seca o en solución en un medio acuoso, especialmente en el que dicha forma seca o dicha solución acuosa comprende adicionalmente un tensioactivo iónico, ventajosamente saponina, y opcionalmente comprende adicionalmente hidróxido de aluminio, y en un segundo vial un adyuvante o una emulsión descritos.

[0020] El uso de kits que comprenden al menos dos viales es particularmente eficaz en los casos en los que la combinación de los componentes individuales (es decir, la mezcla en un único vial del contenido de los al menos dos viales) daría como resultado una formulación de vacuna con una estabilidad reducida.

[0021] Se aprecia que en esta divulgación, y particularmente en las reivindicaciones, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido a dichos términos en la Ley de Patentes de EE.UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "incluyendo", y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente en" tienen el significado que les ha atribuido la Ley de Patentes de EE.UU., por ejemplo, permiten elementos que no están mencionados explícitamente, pero excluyen los elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o nueva de la invención.

[0022] Estas y otras formas de realización se divulgan o son evidentes a partir de, y están englobadas por, la siguiente Descripción Detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] En el resto de la memoria descriptiva se establece más particularmente una divulgación de la presente invención completa y capacitadora, incluyendo el mejor modo de la misma, para el experto habitual en la materia, incluyendo la referencia a las figuras anexas, en las que:

la FIG. 1 proporciona gráficos de la determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) (medida mediante conductividad) para las composiciones de vacuna de los ensayos 1 & 2 los días 7, 22, 121 y 330 (estudio de estabilidad de un año). La determinación de la TIF es una medición de la estabilidad de la formulación de vacuna.

la FIG. 2 proporciona gráficos de la determinación de la TIF para las formulaciones de vacuna de los ensayos 3 & 4 en múltiples días después de la producción (estudio de estabilidad de un año);

la FIG. 3 proporciona gráficos de la determinación de la TIF para las formulaciones de vacuna de los ensayos 5 & 6 en múltiples días después de la producción (estudio de estabilidad de un año);

la FIG. 4 proporciona gráficos de la determinación de la TIF para las formulaciones de vacuna de los ensayos 7 & 8 en múltiples días después de la producción (estudio de estabilidad de un año);

la FIG. 5 proporciona un gráfico de la determinación de la TIF para las formulaciones de vacuna del ensayo 9 en múltiples días después de la producción (estudio de estabilidad de un año);

la FIG. 6 proporciona gráficos de la determinación de la TIF para las formulaciones de vacuna (de los ensayos 1 - 9) producidas de acuerdo con la actual invención, y almacenadas 36 meses;

la FIG. 7 proporciona una gráfica que indica los cambios dependientes del tiempo en la temperatura rectal de cerdos tratados de acuerdo con los materiales y los métodos divulgados en el Ejemplo 6;

la FIG. 8 proporciona una gráfica que indica el cambio en la temperatura máxima observado en los cerdos tratados de acuerdo con los materiales y los métodos divulgados en el Ejemplo 6;

la FIG. 9 proporciona una gráfica que indica la potencia de la vacuna (DP50) frente a la carga útil (µg) en los

cerdos tratados de acuerdo con los materiales y los métodos divulgados en el Ejemplo 7.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 **[0024]** Otros objetos, características y aspectos de la presente invención se divulgan en, o son obvios a partir de, la siguiente Descripción Detallada. El experto habitual en la materia debe entender que el presente análisis es únicamente una descripción de los ejemplos de formas de realización, y no pretende limitar los aspectos más amplios de la presente invención, aspectos más amplios que están ejemplificados en el ejemplo de construcción. De hecho, será evidente para los expertos en la materia que pueden realizarse varias modificaciones y variaciones en la
- 10 presente invención sin desviarse del ámbito o del espíritu de la invención. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una forma de realización pueden usarse en otra forma de realización para producir otra forma de realización adicional más. Se pretende que la presente invención cubra todas esas modificaciones y variaciones como dentro del ámbito de las reivindicaciones anexas y de sus equivalentes.
- 15 **[0025]** Por conveniencia aquí se recogen algunos de los términos empleados en la Memoria Descriptiva, en los Ejemplos y en las Reivindicaciones anexas.
- [0026]** Según se usa en el presente documento, el término "animal" incluye todos los animales vertebrados, incluyendo los seres humanos. También incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo
- 20 las etapas embrionarias y fetales. En particular, el término "animal vertebrado" incluye, pero no se limita a, seres humanos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos); equinos (por ejemplo, caballos), bovinos (por ejemplo, vaca, reses), porcino (por ejemplo, cerdos), así como aves. Según se usa en el presente documento, el término "vaca" o "reses" se usa generalmente para referirse a un animal de origen bovino de cualquier edad. Algunos términos intercambiables incluyen "bovino", "ternero", "novillo", "toro", "vaquilla", "vaca" y similares. Algunos
- 25 términos intercambiables incluyen "lechón", "cerda" y similares. El término "ave", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier especie o subespecie de la clase taxonómica ave, tal como, pero no se limita a, pollos (reproductores, de engorde y ponedores), pavos, patos, un ganso, una codorniz, faisanes, periquitos, pinzones, halcones, grajos y ratites, incluyendo avestruz, emu y casuario. El término "cerdo" o "lechón" significa un animal de origen porcino, mientras que "cerda" se refiere a una hembra en edad y con capacidad reproductora.
- 30 **[0027]** Según se usa en el presente documento, el término "virulento" significa una cepa clínica que conserva su capacidad para ser infecciosa en un hospedador animal
- [0028]** Según se usa en el presente documento, el término "vacuna inactivada" significa una composición de
- 35 vacuna que contiene un organismo infeccioso o patógeno que ya no es capaz de replicarse ni de crecer. El patógeno puede ser de origen bacteriano, vírico, protozario o fúngico. La inactivación puede llevarse a cabo mediante diversos métodos que incluyen una congelación-descongelación, un tratamiento químico (por ejemplo, un tratamiento con formalina), la aplicación de ultrasonidos, de radiación, de calor o de cualquier otro medio convencional suficiente para impedir la replicación o el crecimiento del organismo, conservando su inmunogenicidad.
- 40 **[0029]** Según se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" significa capaz de producir una respuesta inmunitaria en un animal hospedador frente a un antígeno o antígenos. Esta respuesta inmunitaria forma la base de la inmunidad protectora desencadenada por una vacuna frente a un organismo infeccioso específico.
- 45 **[0030]** Según se usa en el presente documento, el término "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta desencadenada en un animal. Una respuesta inmunitaria puede referirse a una inmunidad celular (CMI); a una inmunidad humoral, o puede implicar ambas. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmunitario. Por ejemplo, una composición de vacuna de la presente invención puede inducir específicamente un aumento en la respuesta del interferón gamma.
- 50 **[0031]** Según se usa en el presente documento, el término "antígeno" o "inmunógeno" significa una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal hospedador. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o una porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; un trozo un fragmento de ADN capaz de
- 55 inducir una respuesta inmunitaria tras su presentación a un animal hospedador; una proteína, un polipéptido, un péptido, un epitopo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o el antígeno puede comprender una toxina o una antitoxina.
- [0032]** Según se usa en el presente documento, el término "multivalente" significa una vacuna que contiene

más de un antígeno de la misma especie (es decir, diferentes cepas clínicas de serotipos de virus de la FMD), de una especie diferente (es decir, cepas clínicas tanto de *Pasteurella hemolytica* como de *Pasteurella multocida*), o una vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida*, de *Salmonella*, de *Escherichia coli*, de *Haemophilus somnus* y de *Clostridium*).

[0033] Según se usa en el presente documento, el término "adyuvante" significa una sustancia añadida a una vacuna para aumentar la inmunogenicidad de la vacuna. El mecanismo por el cual actúa un adyuvante no se conoce completamente. Se cree que algunos adyuvantes mejoran la respuesta inmunitaria liberando lentamente el antígeno, mientras que otros adyuvantes son fuertemente inmunógenos por sí mismos y se cree que funcionan de forma sinérgica. Algunos adyuvantes de vacuna conocidos incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de aceite y de agua (por ejemplo, adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund), *Corynebacterium parvum*, bacilo de Calmette-Guérin, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, Bacto-Adjuvante, algunos polímeros sintéticos tales como poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), "AVRIDINE" (N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina), aceite de parafina, dipéptido de muramilo y similares.

[0034] Según se usa en el presente documento, el término "emulsión" se refiere a una combinación de al menos dos sustancias, en la que se dispersa una primera sustancia en una segunda sustancia en la que la primera sustancia es insoluble. Un ejemplo de una emulsión de la presente invención es una fase oleosa dispersada en una fase acuosa.

[0035] Según se usa en el presente documento, el término "emulsión incompleta" se refiere a una composición a la que al menos debe añadirse un componente adicional para elaborar la "emulsión completa". Según se usa en el presente documento, el término "emulsión completa" puede considerarse equivalente a la composición inmunológica "lista para su uso" de la presente invención. Un ejemplo de una emulsión completa es una composición inmunológica según la presente invención que está lista para ser administrada a un animal de acuerdo con los métodos de la presente invención.

[0036] Según se usa en el presente documento, los términos "portador farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables y se refieren a un vehículo líquido para que contenga antígenos de vacuna que pueden ser inyectados en un hospedador sin efectos adversos. Algunos portadores farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la materia incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa o soluciones tamponadas. Algunos portadores pueden incluir agentes auxiliares que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos que mejoran la viscosidad, colores y similares.

[0037] Según se usa en el presente documento, el término "composición de vacuna" incluye al menos un antígeno o un inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para la inducción de una respuesta inmunitaria en un hospedador. Las composiciones de vacuna pueden ser administradas en unas dosis y mediante unas técnicas bien conocidas por los expertos en el arte médico o veterinario, teniendo en consideración factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y el estado del animal receptor, y la vía de administración. La vía de administración puede ser percutánea, una vía de administración a través de las mucosas (por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal) o a través de una vía parenteral (intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). Las composiciones de vacuna pueden ser administradas solas o pueden ser administradas conjuntamente o secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Algunas formas de administración pueden incluir suspensiones, jarabes o elixires, y preparaciones para su administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, una administración inyectable) tales como suspensiones o emulsiones estériles. Las composiciones de vacuna pueden ser administradas en forma de un aerosol o mezclarse con los alimentos y/o el agua, o administrarse en una mezcla con un portador, un diluyente o un excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, adyuvantes, aditivos gelificantes o mejoradores de la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes, colores, y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada. Pueden consultarse los textos farmacéuticos habituales, tales como "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990, para la preparación de preparaciones adecuadas sin una excesiva experimentación.

[0038] El término "purificado" según se usa en el presente documento no requiere una pureza absoluta; más

bien se pretende que sea un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación inmunógena purificada, tal como una proteína o un virus inactivado, es aquella en la que el inmunógeno está más enriquecido de lo que lo está el inmunógeno en su entorno natural. Una preparación inmunógena en el presente documento se indica ampliamente como "purificada" de forma que el inmunógeno representa al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 %, del contenido total en el inmunógeno de la preparación. Una "preparación en bruto", que representa el grado más bajo de purificación, puede contener tan poco como menos del 60 %, menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 % de los componentes inmunogénicos.

10 **[0039]** El término "muy purificado" según se usa en el presente documento pretende sugerir un "mayor grado de pureza" en comparación con el término "moderadamente purificado". Este "mayor grado de pureza" puede incluir, pero en modo alguno se limita a, o unos porcentaje reducidos de contaminantes, en una preparación inmunológica que ha sido "muy purificada" frente a una preparación inmunológica que ha sido "moderadamente purificada". Según se analiza en el presente documento, las preparaciones inmunológicas "muy purificadas" tendrán unos porcentajes
15 entre muy bajos e indetectables de contaminantes que puedan causar: una reducción en la respuesta inmunitaria deseada, un aumento en una respuesta inmunitaria no deseada (por ejemplo, una reacción de hipersensibilidad) o una reducción en la estabilidad de la formulación. De forma análoga, una preparación inmunológica que ha sido "moderadamente purificada" contiene unos porcentajes relativamente reducidos de contaminantes frente una preparación inmunológica que ha sido "mínimamente purificada", que asimismo tiene unos porcentajes reducidos de
20 contaminantes frente a una preparación indicada como una "preparación en bruto".

[0040] Los contaminantes de una preparación inmunológica pueden incluir, pero en modo alguno se limitan a, sustancias que contribuyen negativamente a una composición inmunológica según la presente invención. Uno de los muchos ejemplos de un contaminante que contribuye negativamente sería un contaminante que reduce la capacidad
25 de una composición inmunológica de la presente invención para desencadenar una respuesta inmunitaria en animales.

[0041] Los diversos niveles de pureza (por ejemplo, "muy purificada", "moderadamente purificada", y similares) pueden conseguirse mediante el uso de diversos métodos. Por ejemplo, una combinación de una
30 cromatografía y una filtración en gel de exclusión por tamaños puede dar como resultado preparaciones inmunológicas "muy purificadas" o "moderadamente purificadas". Las diferencias en la fuente/el tipo de inmunógenos, así como las ligeras variaciones en los procedimientos de purificación, pueden afectar significativamente al grado de pureza final del inmunógeno. En general, según se usa en el presente documento, las preparaciones inmunológicas que tienen del menor al mayor porcentaje de contaminantes se describirán como 1)
35 "muy purificadas, 2) "moderadamente purificadas", 3) "mínimamente purificadas", 4) "preparación en bruto", respectivamente. Una preparación "muy purificada" tendrá el menor nivel de todos los tipos de contaminantes. Una preparación "moderadamente purificada" tendrá unos niveles relativamente bajos de la mayor parte de los tipos de contaminantes, pero puede tener un tipo de contaminante con una abundancia mayor de la que se observaría en una preparación comparable "muy purificada". Asimismo, una "preparación mínimamente purificada" tendrá unos
40 niveles relativamente bajos de algunos tipos de contaminantes, pero puede tener más de un tipo de contaminante con una abundancia mayor que una preparación "moderadamente purificada" comparable. Como se esperaba, una "preparación en bruto" tiene el mayor nivel de contaminantes de todos los tipos de contaminantes en comparación con los otros tipos de preparaciones analizados en el presente documento.

45 **[0042]** La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una emulsión inyectable de aceite en agua (O/A), que comprende:

- (i) una solución acuosa que comprende al menos un inmunógeno que es un virus inactivado de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMD), un virus inactivado del circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2) o una bacteria inactivada de
50 *Mycoplasma hyopneumoniae*;
- (ii) una solución acuosa que comprende saponina en una cantidad de entre 0,35 mg/dosis y 3,0 mg/dosis;
- (iii) una solución acuosa que comprende hidróxido de aluminio en la que la concentración del hidróxido de aluminio es de entre el 0,065 % p/v y el 1,0 % p/v;
- (iv) un aceite mineral;
- 55 (v) un tensioactivo lipófilo no iónico;
- (vi) un tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un elevado valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de entre 13 y 40; y
- (vii) un tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene por bajo valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de entre 9 y 13.

[0043] Algunas de las emulsiones descritas en el presente documento se basan en una combinación de al menos cuatro (4) tensioactivos elegidos entre los miembros de cuatro grupos diferentes de tensioactivos, y es posible usar uno o más de un tensioactivo perteneciente a cada grupo. Tres (3) de estos grupos comprenden tensioactivos no iónicos, y uno (1) de estos grupos comprende tensioactivos iónicos, por ejemplo, saponinas.

5

[0044] La concentración del tensioactivo iónico en la emulsión descrita (en la presente memoria descriptiva esto significa la emulsión final que comprende todos los ingredientes, salvo que se indique de otro modo) es de entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 10 %.

10 **[0045]** En una de las varias formas de realización, la concentración del tensioactivo hidrófilo no iónico con un bajo EHL (vii) en la emulsión (en la presente memoria descriptiva esto significa la emulsión final que comprende todos los ingredientes, salvo que se indique de otro modo) es desde el 1 % hasta el 8 %, expresado en forma de un porcentaje en peso por volumen de la emulsión (p/v).

15 **[0046]** Este grupo de tensioactivos comprende tensioactivos hidrófilos no iónicos que tienen un bajo valor de EHL (un valor de EHL de entre 9 y 13). Este grupo incluye, pero no se limita a, monoéster de ácido graso de sorbitano etoxilado (en particular con 5 grupos etoxilo) (por ejemplo, monooleato de sorbitano etoxilado tal como TWEEN 81®), diésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados, triésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados (en particular con 20 grupos etoxilo) (por ejemplo, trioleato de sorbitano etoxilado tal como TWEEN 85®), triestearato de sorbitano etoxilado tal como TWEEN 65®, alcoholes grasos etoxilados (en particular con 5 - 10 grupos etoxilo) (por ejemplo, BRIJ 76®, BRIJ 56®, BRIJ 96®), ácidos grasos etoxilados (en particular con 5 - 10 grupos etoxilo) (por ejemplo, Simulsol 2599®, MYRJ 45®), aceite de ricino etoxilado (en particular con 25 - 35 grupos etoxilo) (por ejemplo, ARLATONE 650®, ARLATONE G®), y combinaciones de los mismos.

25 **[0047]** Se prefieren los diésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados y los triésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados, así como las combinaciones de ambas especies. El ácido graso se selecciona preferentemente del grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y las combinaciones de los mismos. Un triéster de ácido graso de sorbitano etoxilado preferido comprende trioleato de sorbitano etoxilado tal como TWEEN 85® o triestearato de sorbitano etoxilado tal como TWEEN 65®.

30

[0048] En una de las varias formas de realización, la concentración del tensioactivo hidrófilo no iónico de elevado EHL (vi) es de entre el 0,1 % y el 1,5 %, expresado en forma de un porcentaje en peso por volumen de la emulsión (p/v).

35 **[0049]** Este segundo grupo de tensioactivos comprende tensioactivos hidrófilos no iónicos que tienen un elevado valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) (en particular, un EHL > 13,5).

[0050] Este grupo comprende monoésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados (en particular con 20 grupos etoxilo) (por ejemplo, monolaurato de sorbitano etoxilado tal como TWEEN 20®, monopalmitato de sorbitano etoxilado tal como TWEEN 40®, monoestearato de sorbitano etoxilado (tal como TWEEN 60®, monooleato de sorbitano etoxilado tal como TWEEN 80®, alcoholes grasos etoxilados (en particular con 15 - 30 grupos etoxilo) (por ejemplo, BRIJ 78®, BRIJ 98®, BRIJ 721®), ácidos grasos etoxilados (en particular con 15 - 30 grupos etoxilo) (por ejemplo, MYRJ 49®, MYRJ 51®, MYRJ 52®, MYRJ53®), copolímeros en bloque no iónicos (por ejemplo, copolímero de polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP), tales como LUTROL F127®, LUTROL F68®), y combinaciones de los mismos.

45

[0051] Para los copolímeros en bloque no iónicos, los porcentajes pueden ser inferiores, y en particular desde el 0,1 % hasta el 0,5 %, más particularmente desde el 0,2 % hasta el 0,4 % (en peso por volumen de la emulsión (p/v)).

50

[0052] Los tensioactivos con un elevado EHL preferidos (vi) comprenden monoésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados, tales como los descritos anteriormente.

[0053] En una de las varias formas de realización, la concentración del tensioactivo lipófilo no iónico (v) es desde el 0,1 % hasta el 2,5 %, expresado en forma de un porcentaje en peso por volumen de la emulsión (p/v).

55

[0054] Este grupo de tensioactivos comprende ésteres de ácidos grasos de sorbitano (por ejemplo, monolaurato de sorbitano, como SPAN 20®, monopalmitato de sorbitano, tal como SPAN 40®, monoestearato de sorbitano, tal como SPAN 60®, triestearato de sorbitano, tal como SPAN 65®, monooleato de sorbitano, como SPAN

80®, trioleato de sorbitano, como SPAN 85®, monoisoestearato de sorbitano, tal como ARLACEL 987®, isoestearato de sorbitano, tal como CRILL 6®), ésteres de ácidos grasos de manida (por ejemplo, MONTANIDE 80®, monooleato de manida (tal como ARLACEL A®), dioleato de manida, trioleato de manida, tetraoleato de manida), ésteres de ácidos grasos de manida etoxilados (con 2, 3 o 4 grupos etoxilo) (por ejemplo, MONTANIDE 888®, MONTANIDE 103®, monooleato de manida etoxilado, dioleato de manida etoxilado, trioleato de manida etoxilado, tetraoleato de manida etoxilado), y combinaciones de los mismos.

[0055] El ácido graso se selecciona preferentemente del grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y combinaciones de los mismos.

[0056] Algunos tensioactivos preferidos (v) comprenden los ésteres de ácidos grasos de sorbitano, en particular los descritos anteriormente, y combinaciones de los mismos.

[0057] Los tensioactivos de la invención pueden tener ácidos grasos de origen animal o vegetal. El cambio entre un origen y otro (por ejemplo, de un TWEEN 80® animal a un TWEEN 80® vegetal) podría realizarse simplemente mediante un ajuste menor en la formulación de la emulsión.

[0058] Una emulsión según la invención tiene una concentración global de tensioactivos, en peso por volumen de la emulsión, del 4 % al 8 %.

[0059] Generalmente, la emulsión descrita en el presente documento puede tener una temperatura de inversión de fase (TIF) que es > 33 °C, en particular que varía desde 33 °C hasta 65 %.

[0060] La TIF es la temperatura a la cual la emulsión de agua en aceite cambia a una emulsión de aceite en agua o se desfasa (ruptura de la emulsión y separación de las 2 fases). El valor de la TIF puede medirse mediante varios medios, como por ejemplo, mediante el aspecto visual (por ejemplo, véase el ejemplo 2) o mediante la conductividad. La emulsión se coloca a una temperatura inferior a la TIF de la emulsión, por ejemplo, a aproximadamente 25 °C en un baño de agua. La temperatura se aumenta progresivamente. Se observa el cambio en el aspecto visual de la emulsión en comparación con una emulsión de control, particularmente en la fluidez, en la viscosidad, en la separación de las dos fases, el cambio en el aspecto superficial debido a la migración de la fase oleosa a la superficie. La temperatura a la cual se observa este cambio en el aspecto visual es el valor de la TIF de la emulsión. Alternativamente, la TIF se determina mediante el rápido paso desde un valor de conductividad de aproximadamente 5 - 8 miliSiemens/centímetro (mS/cm) (de una emulsión de aceite en agua) a un valor de aproximadamente 0 mS/cm (de una emulsión de agua en aceite) medido mediante una sonda colocada en la emulsión, cerca de su superficie. La temperatura a la cual se observa la transición es el valor de la TIF de la emulsión. El experto habitual en la materia será capaz de determinar combinaciones de tensioactivos y de aceite, incluyendo sus respectivas concentraciones, con objeto de producir las emulsiones según la invención, y en particular unas emulsiones que tengan un valor de la TIF en el intervalo definido anteriormente, sin una experimentación excesiva.

[0061] Generalmente, las emulsiones según la presente invención pueden contener, en volumen por volumen de la emulsión, desde el 3 % hasta el 55 % de aceite, en particular desde el 5 % hasta el 50 % de aceite, preferentemente desde el 10 % hasta el 40 % de aceite, y más preferentemente, desde el 20 % hasta el 40 % de aceite. Por definición, los intervalos de los valores de la presente memoria descriptiva incluyen siempre el límite del intervalo, salvo que se indique de otro modo.

[0062] El aceite usado es un aceite mineral que incluye, pero no se limita a, aceite de parafina tal como aceite isoparafínico y/o aceite nafténico, escualano, pristano, aceite de poliisobuteno, aceite de poliisobuteno hidrogenado, aceite de polideceno, aceite de poliisopreno, aceite de poliisopropeno y similares. Un aceite mineral ventajoso útil en la presente invención pueden incluir un aceite que comprende una cadena carbonada lineal o ramificada que tiene un número de átomos de carbono mayor de 15, preferentemente desde 15 hasta 32, y está exenta de compuestos aromáticos. Dichos aceites pueden ser, por ejemplo, los comercializados con el nombre "MARCOL 52®" o "MARCOL 82®" (producidos por Esso, Francia) o "DRAKEOL 6VR®" o "DRAKEOL 5®" "DRAKEOL 7®" (producidos por Penreco, EE.UU.), "CLEAROL®" (producido por Sonneborn, EE.UU.), "paraffin Oil Codex AAB2®" (producido por Aiglon, Francia), BLANDOL (producido por Sonneborn, EE.UU.), ONDINA 915 (producido por Shell, Reino Unido). El aceite también puede ser una mezcla de aceites que comprende al menos 2 aceites seleccionados entre los aceites descritos en el presente documento, y en cualquier proporción. La mezcla de aceites también puede comprender al menos un aceite seleccionado entre los aceites descritos anteriormente, y al menos un aceite vegetal, y este aceite vegetal representa entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 33 % de la fase oleosa,

preferentemente entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 25 % v/v. Estos aceites vegetales son aceites insaturados ricos en ácido oleico que son biodegradables y preferentemente líquidos a la temperatura de almacenamiento (de aproximadamente +4 °C) o al menos hacen posible la obtención de emulsiones que son líquidas a esta temperatura. Por ejemplo, el aceite vegetal puede ser aceite de cacahuete, aceite de nuez, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de onagra y similares.

[0063] Describimos los tensioactivos hidrófilos (vi) y (vii) que incluyen preferentemente tensioactivos que tienen la misma parte hidrófila de las moléculas. Por ejemplo, se hace uso de ésteres de sorbitano de ácidos grasos etoxilados para cada uno de los tensioactivo hidrófilos (vi) y (vii). Por ejemplo, si se elige TWEEN 85® como tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un valor bajo de EHL, el tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un valor alto de EHL tendrá ventajosamente una parte hidrófila constituida por un sorbitano etoxilado, tal como TWEEN 80®.

[0064] También describimos una solución acuosa que comprende un vehículo, un excipiente o un diluyente veterinaria o farmacéuticamente aceptable adecuado que incluye, pero no se limita a, agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, tampón y similares. El vehículo, el excipiente o el diluyente también puede incluir polioles, glúcidos o agentes tamponantes del pH. El vehículo, el excipiente o el diluyente también puede comprender, por ejemplo, aminoácidos, péptidos, antioxidantes, compuestos bactericidas y bacteriostáticos. La solución acuosa se añade al aceite y a los tensioactivos en una cantidad para obtener el 100 % del volumen de la emulsión.

[0065] El equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de una emulsión permite la estimación de la fuerza hidrófila o lipófila de un tensioactivo. El EHL de una molécula anfifílica se calcula generalmente como sigue:

$$\text{EHL} = \frac{(20 \times \text{peso de la parte hidrófila})}{(\text{peso de la molécula anfifílica})}$$

[0066] El EHL puede tener un valor que varía desde 0 (para la molécula más lipófila) hasta 20 (para la molécula más hidrófila). Según la composición química del tensioactivo (particularmente, por ejemplo, la adición de grupos etoxilo o de óxidos de alqueno), esta estimación puede cambiar y el ámbito del valor de EHL puede aumentar (por ejemplo, el LUTROL F68® tiene un EHL de 29). En una mezcla de tensioactivos, el EHL de la mezcla es la suma del EHL de cada tensioactivo, equilibrada con su proporción ponderal:

$$\text{EHL} = \frac{(\text{EHL del tensioactivo X} \times \text{peso del tensioactivo X}) + (\text{EHL del tensioactivo Y} \times \text{peso del tensioactivo Y})}{(\text{peso del tensioactivo X} + \text{peso del tensioactivo Y})}$$

[0067] Describimos una emulsión en la que el EHL final de la emulsión es de desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 12, preferentemente de desde aproximadamente 9,5 hasta aproximadamente 11,5 y más preferentemente de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 11,5.

[0068] Describimos una emulsión que comprende un aceite de parafina (en particular a una concentración de entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 40 %, y preferentemente de entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 40 %, expresada en forma de volumen por volumen de la emulsión (v/v)); un monoéster de ácido graso de sorbitano etoxilado (como tensioactivo lipófilo no iónico), un triéster de ácido graso de sorbitano etoxilado (como tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un valor bajo de EHL); y un monoéster de ácido graso de sorbitano etoxilado (como tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un valor elevado de EHL). En particular, el monoéster de ácido graso de sorbitano etoxilado es un monooleato de sorbitano (en particular a la concentración de desde el 0,2 % hasta el 1,5 %, preferentemente de desde el 0,2 % hasta el 1,2 % expresada en forma de peso por volumen de la emulsión (p/v)), el triéster de ácido graso de sorbitano etoxilado es un trioleato de sorbitano etoxilado (en particular a la concentración de desde el 2 % hasta el 5 %; preferentemente de desde el 2,5 % hasta el 4 % p/v) y el monoéster de ácido graso de sorbitano etoxilado es un monooleato de sorbitano etoxilado (en particular a la concentración de desde el 0,3 % hasta el 1,3 %, preferentemente de desde el 0,4 % hasta el 1,2 % p/v). Por ejemplo, la emulsión comprende el aceite de parafina aproximadamente al 29,3 % en volumen por volumen de la emulsión, el monooleato de sorbitano al 0,6 % en peso por volumen de la emulsión, el trioleato de sorbitano etoxilado al 3,4 % en peso por volumen de la emulsión, y el monooleato de sorbitano etoxilado al 0,75 % en peso por volumen de la emulsión.

[0069] Describimos una emulsión que comprende un aceite de parafina (en particular a una concentración de desde el 10 % hasta el 40 %, preferentemente desde el 20 % hasta el 40 % v/v), un monoéster de ácido graso de

sorbitano etoxilado (como tensioactivo lipófilo no iónico), un triéster de ácido graso de sorbitano etoxilado (como tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un valor bajo de EHL) y un copolímero en bloque no iónico (como tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un valor elevado de EHL). En particular, el monoéster de ácido graso de sorbitano etoxilado es un monooleato de sorbitano (en particular a la concentración de desde el 0,2 % hasta el 1,5 % 5, preferentemente de desde el 0,2 % hasta el 1,2 % p/v), el triéster de ácido graso de sorbitano etoxilado es un trioleato de sorbitano etoxilado (en particular a la concentración de desde el 2 % hasta el 5 %, preferentemente de desde el 2,5 % hasta el 4 % p/v) y el copolímero en bloque no iónico es un polímero de polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP) (en particular a la concentración de desde el 0,1 % hasta el 0,5 %, preferentemente de desde el 0,2 % hasta el 0,4 % p/v). Por ejemplo, la emulsión comprende el aceite de parafina aproximadamente al 29,3 v/v, el 10 monooleato de sorbitano al 0,6 % p/v, el trioleato de sorbitano etoxilado al 3,4 % p/v, y el monooleato de sorbitano etoxilado al 0,25 % p/v.

[0070] Adicionalmente describimos una emulsión inyectable de aceite en agua (O/A) que comprende:

- 15 (1) una solución acuosa que comprende un principio activo tal como un fármaco o un inmunógeno, preferentemente un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende saponina
- (3) un aceite mineral;
- (4) un tensioactivo lipófilo no iónico; y
- 20 (5) un tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un valor bajo de EHL que comprende un diéster de ácido graso de sorbitano etoxilado (que puede tener un valor de EHL de entre 11 y 13).

[0071] Describimos una emulsión inyectable de aceite en agua (O/A) que comprende:

- 25 (1) una solución acuosa que comprende un principio activo tal como un fármaco o un inmunógeno, preferentemente un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende saponina
- (3) una solución acuosa que comprende hidróxido de aluminio
- (4) un aceite mineral;
- 30 (5) un tensioactivo lipófilo no iónico; y
- (6) un tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un valor bajo de EHL que comprende un diéster de ácido graso de sorbitano etoxilado (que puede tener un valor de EHL de entre 11 y 13).

[0072] La emulsión descrita anteriormente comprende diésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados que 35 pueden contener hasta 20 grupos etoxi. Los ácidos grasos pueden ser de origen animal o vegetal y pueden seleccionarse del grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y combinaciones de los mismos. El ácido graso etoxilado es preferentemente oleato. Los demás ingredientes, así como las propiedades generales de la emulsión, tales como la TIF, pueden tener las mismas características a las descritas anteriormente.

40 **[0073]** Preferiblemente, el tensioactivo (6) comprende diésteres de ácido graso de sorbitano etoxilado, tales como dioleato de sorbitano etoxilado, diestearato de sorbitano etoxilado o diisoestearato de sorbitano etoxilado, dipalmitato de sorbitano etoxilado, dilaurato de sorbitano etoxilado, y combinaciones de los mismos.

[0074] Opcionalmente pueden añadirse otros compuestos como coadyuvantes a la emulsión, incluyendo, 45 pero no se limita a, alumbre; oligonucleótidos CpG (ODN), en particular ODN 2006, 2007, 2059 o 2135 (Pontarollo R. A. y col., Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84: 43 - 59; Wernette C. M. y col., Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84: 223 - 236; Mutwiri G. y col., Vet. Immunol. Immunopath, 2003, 91: 89 - 103); poliA-poliU ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, 6: 03); bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) ("Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, volumen 6: 157), N,N-dioctadecil- 50 N',N'-bis(2-hidroxiethyl) propanodiamina (tal como AVRIDINE®) (*Ibid*, pág. 148), carbómero, chitosan (véase la patente de EE.UU. con número de serie 5.980.912, por ejemplo).

[0075] Describimos un método para la elaboración de una composición de vacuna o de una composición 55 inmunológica que comprende al menos una composición de un antígeno o de un inmunógeno y un adyuvante o una emulsión descrita en el presente documento. La composición del antígeno o del inmunógeno puede ser incorporada durante la formación de la emulsión, o en una forma de realización alternativa, la composición del antígeno o del inmunógeno, que preferentemente comprende adicionalmente saponina y que opcionalmente comprende adicionalmente hidróxido de aluminio, puede añadirse posteriormente a la emulsión, por ejemplo, justo antes de su

USO.

[0076] La cantidad total de la solución acuosa usada puede estar presente en la emulsión producida en primer lugar. O puede ser que sólo se use una parte de esta solución acuosa para formar la emulsión, y la cantidad restante de la solución acuosa se añada después de la incorporación del inmunógeno. El inmunógeno o el antígeno pueden estar en una forma seca o presentes en alguna otra forma sólida apropiada, y mezclarse después con la emulsión, o alternatively, el antígeno puede estar en la solución, en particular en una solución acuosa, y mezclarse esta solución con la emulsión.

10 **[0077]** Preferentemente, los tensioactivos se añaden a cualquiera de la solución oleosa o la acuosa según su solubilidad. Por ejemplo, los tensioactivos lipófilos no iónicos se añaden al aceite, mientras que los tensioactivos hidrófilos no iónicos que tienen un elevado valor de EHL se añaden a la solución acuosa.

[0078] La emulsificación puede prepararse de acuerdo con los métodos convencionales conocidos por el experto habitual en la materia. Por ejemplo, la emulsión descrita puede prepararse a una temperatura inferior a la TIF de la emulsión, en particular a la temperatura ambiente, por ejemplo, aproximadamente a 25 °C. La fase acuosa y la fase oleosa se mezclan entre sí mediante una agitación mecánica, por ejemplo, con una turbina equipada con un rotor-estator capaz de crear una elevada fuerza de cizallamiento. Preferiblemente la agitación se comienza con una baja velocidad de rotación y se aumenta lentamente en relación con la adición generalmente progresiva de la solución acuosa en el aceite. Preferiblemente la solución acuosa se añade progresivamente al aceite. La proporción de solución oleosa/acuosa puede ser adaptada para obtener una emulsión de agua en aceite (A/O), por ejemplo, a una concentración de desde aproximadamente el 40 % hasta aproximadamente el 55 % de aceite (v/v). Cuando se detiene la agitación, la emulsión cambia progresivamente a una emulsión O/A (inversión de fase). Después de la inversión, y si fuera necesario, la emulsión se diluye mediante la adición de una solución acuosa para obtener la concentración deseada del aceite en la emulsión final. La emulsión puede ser almacenada aproximadamente a 5 °C.

[0079] La emulsión puede ser preparada a una temperatura mayor que la TIF de la emulsión. En una primera etapa se mezclan entre sí la fase acuosa y la fase oleosa a una temperatura mayor que la TIF de la emulsión. Preferiblemente se añade progresivamente la solución acuosa al aceite. La proporción de la solución oleosa/acuosa puede ser adaptada para obtener una emulsión de agua en aceite (A/O), por ejemplo, a una concentración de entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 55 % de aceite (v/v). La emulsificación puede llevarse a cabo mediante una agitación con baja o ninguna fuerza de cizallamiento por ejemplo, con una mezcladora estática o una hélice marina o con una turbina a una velocidad de rotación muy baja. La emulsión obtenida es una emulsión de agua en aceite (A/O). En una segunda etapa, la emulsión se enfría progresivamente por debajo de la TIF. Durante esta etapa, la emulsión cambia a una emulsión O/A (inversión de fase). Después de la inversión, y si fuera necesario, la emulsión se diluye mediante la adición de una solución acuosa para obtener la concentración deseada del aceite en la emulsión final. La emulsión puede ser almacenada aproximadamente a 5 °C.

[0080] El tamaño de las gotitas de la emulsión puede ser de entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 500 nm. La emulsión puede usarse, por ejemplo, como adyuvante para la formulación de una composición de vacuna o de una composición farmacéutica. La emulsión también puede usarse como un disolvente para la disolución de un producto seco, especialmente de un producto seco que contiene, por ejemplo, microorganismos atenuados o vectores recombinantes vivos.

45 **[0081]** Describimos una pre-emulsión que se produce únicamente con una parte de la solución acuosa. Esta pre-emulsión puede ser diluida mediante la adición de una suspensión de un principio activo, tal como un fármaco o un inmunógeno, preferentemente un inmunógeno, para obtener la composición final. Alternativamente, la pre-emulsión puede ser diluida con una solución acuosa y usarse para disolver un producto seco, tal como un producto seco.

50

[0082] Los inmunógenos o los antígenos descritos pueden seleccionarse del grupo que consiste en patógenos inactivados, patógenos atenuados, subunidades inmunogénicas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos, epítopos, haptenos), o vectores de expresión recombinantes, incluyendo plásmidos que tienen insertos inmunogénicos. Describimos un inmunógeno que es un microorganismo inactivado o muerto. También describimos una composición de vacuna que comprende un inmunógeno seleccionado del grupo de los patógenos de aves que incluye, pero no se limita a, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus del síndrome de la caída del postura (EDS) o el virus de la bursitis infecciosa aviar (IBDV), el virus de la gripe aviar, y similares, y combinaciones de los mismos. Alternativamente, la composición de vacuna descrita comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno felino

tal como, pero no se limita a, un herpesvirus felino (FHV), un calicivirus felino (FCV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la rabia, y similares, y combinaciones de los mismos.

[0083] Otra composición de vacuna más descrita comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno canino que incluye, pero no se limita a, el virus de la rabia, un herpesvirus canino (CHV), un parvovirus canino (CPV), un coronavirus canino, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica* y similares, y combinaciones de los mismos.

[0084] Otra composición descrita comprende un inmunógeno seleccionados de un patógeno equino, tal como un herpesvirus equino (de tipo 1 o de tipo 4), el virus de la gripe equina, el del tétanos, el virus del Nilo occidental, y similares o combinaciones de los mismos.

[0085] Una composición descrita comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno bovino, tal como el virus de la fiebre aftosa (FMDV), el virus de la rabia, un rotavirus bovino, el virus paragripal bovino de tipo 3 (bPIV-3), un coronavirus bovino, el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* y similares y combinaciones de los mismos.

[0086] Otra composición descrita más comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno porcino tal como, pero no se limita a, el virus de la gripe porcina (SIV), el circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2), el virus del síndrome respiratorio reproductor porcino (PRRS), el virus de la pseudorrabia (PRV), un parvovirus porcino (PPV), el FMDV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* y similares, y combinaciones de los mismos.

[0087] Describimos composiciones de vacuna que comprenden al menos un inmunógeno y una emulsión en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunógenos que comprenden virus, bacterias, hongos y similares pueden ser producidos mediante métodos de cultivo *in vitro* mediante el uso de medios de cultivo o de líneas celulares hospedadoras adecuadas, y métodos convencionales bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Por ejemplo, el PRRS puede cultivarse en una línea celular apropiada, tal como la línea celular MA-104 (véanse las Patentes de EE.UU. nº. 5.587.164; 5.866.401; 5.840.563; 6.251.404, entre otras). De una forma similar, el PCV-2 puede cultivarse mediante el uso de la línea celular PK-15 (véase la Patente de EE.UU. Nº 6.391.314); el SIV puede cultivarse en huevos (Patente de EE.UU. Nº 6.048.537); y *Mycoplasma hyopneumoniae* puede cultivarse en un medio de cultivo apropiado (números de serie de EE.UU. US 5.968,525; US 5.338.543; Ross R. F. y col., Am. J. Vet. Res., 1984, 45: 1899 - 1905).

[0088] Con objeto de obtener una composición inmunológica, o de vacuna, inactivada, el patógeno es inactivado preferentemente después de ser recogido, y opcionalmente sometido a una clarificación mediante un tratamiento químico mediante el uso de, por ejemplo, formalina o formaldehído, beta-propiolactona, etilenoimina, etilenoimina binaria (BEI), y/o de un tratamiento físico (por ejemplo, un tratamiento con calor o con ultrasonidos). Los métodos de inactivación son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el virus de la FMD puede ser inactivado con etilenoimina (Cunliffe, H R, Applied Microbiology, 1973, pág. 747 - 750) o alta presión (Ishimaru y col., Vaccine 22 (2004) 2334 - 2339), el virus del PRRS puede ser inactivado mediante un tratamiento con beta-propiolactona (Plana-Duran y col., Vet. Microbiol., 1997, 55: 361 - 370) o mediante un tratamiento con BEI (Patente de EE.UU. Nº 5.587.164); la inactivación del virus PCV-2 puede llevarse a cabo mediante el uso de un tratamiento con etilenoimina o mediante un tratamiento con beta-propiolactona (Patente de EE.UU. Nº 6.391.314); el virus de la gripe porcina puede ser inactivado mediante el uso de un detergente como Triton, o con un tratamiento con formaldehído (Patente de EE.UU.

[0089] Nº 6.048.537); la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* puede ser inactivada mediante un tratamiento con formaldehído (Ross R. F. *supra*), con etilenoimina o mediante un tratamiento con BEI (véase el documento WO 91/18627).

[0090] El patógeno inactivado puede concentrarse mediante las técnicas de concentración convencionales, en particular mediante una ultrafiltración, y/o purificarse mediante los medios de purificación convencionales, en particular mediante el uso de técnicas cromatográficas que incluyen, pero no se limitan a, filtración en gel, ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa o precipitaciones selectivas, en particular en presencia de polietilenglicol (PEG).

[0091] Los inmunógenos útiles en las composiciones de vacuna según la presente invención también

incluyen vectores de expresión. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión recombinantes *in vivo* tales como un vector polinucleotídico o un plásmido (documento EP-A2-1001025; Chaudhuri P, Res. Vet. Sci. 2001, 70: 255 - 6), vectores víricos tales como, pero no se limitan a, vectores adenovíricos, vectores de poxvirus tales como vectores de la viruela aviar (Patentes de EE.UU. nº 5.174.993; 5.505.941; y 5.766.599) o de la viruela del canario (Patente de EE.UU. Nº 5.756.103) o vectores bacterianos

(*Escherichia coli* o *Salmonella* sp.)

[0092] Describimos la formulación de composiciones inmunológicas multivalentes o composiciones de vacuna de combinación. Por ejemplo, los antígenos útiles en una combinación son las bacterias bovinas que incluyen, pero no se limitan a, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella* sp., particularmente *P. multocida* y *P. haemolytica*, *Haemophilus* sp., particularmente *H. somnus*, *Clostridium* sp., *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *E. coli* y similares.

[0093] También describimos métodos para la inducción de una respuesta inmunitaria en un hospedador, por ejemplo, en un animal, que comprenden la administración al hospedador de una composición inmunológica o de una composición de vacuna según la invención. Las respuestas inmunitarias desencadenadas de esta forma son particularmente respuestas inmunitarias de anticuerpo y/o celulares, y en particular, una respuesta de interferón gamma.

[0094] En particular, describimos métodos para inmunizar frente a, o para prevenir o reducir los síntomas causados por, la infección de un animal por un organismo patógeno (por ejemplo, la infección por virus, bacterias, hongos o un parásito protozoario). El método descrito en el presente documento es útil en animales vertebrados que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos); equinos (por ejemplo, caballos), bovinos (por ejemplo, reses) y porcinos (por ejemplo, cerdos), así como en aves que incluyen, pero no se limitan a, pollos, pavos, patos, ganso, una codorniz, un faisán, periquitos, pinzones, halcones, grajos y ratites (avestruz, emu, casuario, y similares).

[0095] En un particular, estos métodos descritos consisten en la vacunación de hembras embarazadas antes del parto mediante la administración de una composición de vacuna elaborada según la invención. Estos métodos incluyen adicionalmente la inducción de anticuerpos protectores desencadenados por el protocolo de vacunación y la transferencia de estos anticuerpos protectores desde las hembras embarazadas vacunadas a su progenie. La transferencia de dichos anticuerpos maternos protege posteriormente a la progenie de la enfermedad.

[0096] La dosis de la composición de vacuna elaborada según la presente invención dependerá de la especie, de la raza, de la edad, del tamaño, de los antecedentes de vacunación y del estado de salud del animal que se va a vacunar. Otros factores como la concentración del antígeno, los componentes adicionales de la vacuna y la vía de administración (es decir, una administración por vía subcutánea, intradérmica, oral, intramuscular o intravenosa) también afectarán a la dosis eficaz. La dosis de la vacuna que se va a administrar se puede determinar fácilmente basándose en la concentración del antígeno en la vacuna, en la vía de administración y en la edad y el estado del animal que se va a vacunar. Cada lote de antígeno puede ser calibrado individualmente. Alternativamente, pueden usarse ensayos metódicos de inmunogenicidad de diferentes dosis, así como estudios de la DL₅₀ y otros procedimientos de cribado para la determinación de la dosis eficaz para una composición de vacuna de acuerdo con la presente invención sin una experimentación excesiva. Aparte de los ejemplos que se presentan a continuación, se apreciará fácilmente qué dosis aproximada y qué volumen aproximado serían apropiados para el uso de la composición de vacuna descrita en el presente documento. El factor crítico es que la dosis proporcione al menos un efecto protector parcial frente a la infección natural, evidenciado por una reducción en la mortalidad y en la morbilidad asociadas a la infección natural. El volumen apropiado puede ser asimismo fácilmente averiguado por el experto habitual en la materia. Por ejemplo, en especies de aves, el volumen de una dosis puede ser de entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 0,5 ml y, ventajosamente, de aproximadamente entre 0,3 ml y aproximadamente 0,5 ml. Para especies de felinos, caninos y equinos, el volumen de una dosis puede ser de entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 3,0 ml, ventajosamente de entre aproximadamente 0,3 ml y aproximadamente 2,0 ml, y más ventajosamente, de entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 1,0 ml. Para especies de bovinos y porcinos, el volumen de dosis puede ser de entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 5,0 ml, ventajosamente de entre aproximadamente 0,3 ml y aproximadamente 3,0 ml, y más ventajosamente desde 0,5 ml hasta aproximadamente 2,0 ml.

[0097] Pueden ser preferibles unas vacunaciones repetidas en unos intervalos temporales periódicos para mejorar la respuesta inmunitaria inicialmente o cuando haya transcurrido un largo periodo de tiempo desde la última

dosis. En una forma de realización de la presente invención, la composición de vacuna se administra en forma de una inyección parenteral (es decir, subcutáneamente, intradérmicamente o intramuscularmente). La composición puede ser administrada en forma de una dosis o, en formas de realización alternativas, administrarse en dosis repetidas de entre aproximadamente dos y aproximadamente cinco dosis administradas a unos intervalos de entre 5 aproximadamente dos y aproximadamente seis semanas, preferentemente de entre aproximadamente dos y aproximadamente cinco semanas. Sin embargo, el experto en la materia reconocerá que el número de dosis y el intervalo de tiempo entre las vacunaciones depende de diversos factores que incluyen, pero no se limitan a, la edad del animal vacunado; el estado del animal; la vía de inmunización; la cantidad de antígeno disponible por dosis; y similares. Para una vacunación inicial, el periodo será generalmente mayor de una semana, y preferentemente será 10 de entre aproximadamente dos y aproximadamente cinco semanas. Para animales previamente vacunados puede realizarse una vacunación de refuerzo, antes o durante el embarazo, aproximadamente en un intervalo anual.

[0098] La presente invención también contempla la administración de una composición de vacuna mediante el uso de un inyector sin agujas tal como PIGJET®, AVIJET®, DERMOJET® o BIOJECTOR® (Bioject, Oregon, 15 Estados Unidos). Una persona experta habitual en la materia es capaz de ajustar las especificaciones del inyector según sea necesario con respecto a factores tales como la especie del animal que se va a vacunar; la edad y el peso del animal, y similares, sin una experimentación excesiva.

[0099] Describimos un método que comprende una única administración de una composición de vacuna 20 formulada con una emulsión según la invención. Por ejemplo, la composición de vacuna descrita es una composición de un virus de la FMD inactivado, mientras que una composición alternativa descrita en el presente documento que es una vacuna que comprende una composición de un virus de PCV2 inactivado. Otras composiciones inmunológicas o vacunas que son adecuadas para su uso en un régimen de dosificación individual incluyen, pero no se limitan a, *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRS y SIV inactivados. 25

[0100] Adicionalmente describimos métodos para el tratamiento de un hospedador, por ejemplo, de un animal, que comprenden la administración al hospedador de una composición farmacéutica elaborada según la invención y que comprende al menos un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste en proteínas o péptidos, virus inactivados o atenuados, anticuerpos, alérgenos, ODN de CpG, factores de crecimiento, citocinas o 30 antibióticos, y en particular ODN de CpG o citocinas. Estas composiciones farmacéuticas pueden usarse para mejorar el rendimiento del crecimiento de un animal tal como un pollo, un cerdo, una vaca o reses.

[0101] Aún adicionalmente, describimos un kit que comprende un vial individual que contiene un ingrediente tal como un inmunógeno purificado combinado con una emulsión según se describe en el presente documento. 35

[0102] El kit puede comprender alternativamente un primer vial que contiene un ingrediente tal como un inmunógeno o una composición farmacéutica, combinado con saponina e hidróxido de aluminio, y un segundo vial que contiene una emulsión según se describe en el presente documento. El inmunógeno puede estar en forma seca, en una forma seca o en solución acuosa según se describe en el 40 presente documento.

[0103] La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo de referencia 1

45

Método de elaboración de la emulsión

[0104] La emulsión se preparó mediante el método de inversión. En una primera etapa, la fase acuosa y la fase oleosa se mezclaron conjuntamente a +40 °C. En una segunda etapa, la emulsión se enfrió progresivamente 50 por debajo de la TIF a +5 °C con objeto de obtener una emulsión O/A. Después de la inversión, la emulsión final (es decir, la formulación de vacuna) se mezcló y posteriormente se almacenó a +5 °C (resumido en la Tabla 1).

Tabla 1

	Porcentaje para cada fase	Porcentaje total (v/v)
Emulsión Incompleta - fase oleosa (120 ml):		33
• monooleato de sorbitano (SPAN 80®)	1,8 % p/v	

• trioleato de sorbitano (20 OE) (TWEEN 85®)	10,2 % p/v	
• aceite de parafina (MARCOL 82®)	88 % v/v	
Emulsión Incompleta - fase acuosa #1 (120 ml):		33
• solución al 20 % (p/v) de monooleato de sorbitano (20 OE) (TWEEN 80®)	11,25 % p/v	
• tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8)	85,75 % v/v	
Emulsión Incompleta = oleosa + acuosa #1		66
Proporción de Emulsión Incompleta / Emulsión Final (es decir, la formulación de vacuna)	2/3	
Añadir la fase acuosa #2 (120 ml):		33
• [tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M a pH 7,8, saponina, hidróxido de aluminio, antígenos, M102]*		
Emulsión Incompleta (oleosa + Ag1) + Ag2 = Emulsión Final (es decir, la formulación de vacuna)		100
* Intervalos de concentración/cantidad o Hidróxido de aluminio - desde aproximadamente un 0,0 % hasta aproximadamente un 1,0 % (p/v), con respecto al volumen de la formulación de vacuna o Saponina - desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 2 mg por ml de la formulación de vacuna o Antígenos - desde aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 200 µg por ml de la formulación de vacuna o M102 & Fosfato hasta volumen		

[0105] Se introdujeron el monooleato de sorbitano (SPAN 80®) y el trioleato de sorbitano (20 OE) (TWEEN 85®) en la fase oleosa. El monooleato de sorbitano (20 OE) (TWEEN 80®) no era miscible en el aceite de parafina. Se preparó una solución de TWEEN 80® al 20 % (p/v) en el mismo tampón que la vacuna, por ejemplo, en tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8). Cuando se detuvo la agitación, la emulsión cambió a una emulsión de aceite en agua. La emulsión se puso en una cámara fría a 5 °C durante al menos 4 horas. En esta etapa, la emulsión era una pre-emulsión que contenía un 50 % de la fase oleosa.

Segunda etapa: la fase acuosa #2 se preparó con 120 ml de tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M a pH 7,8 con los inmunógenos (FMDV inactivado, inmunógeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* o inmunógeno de PCV-2, según se describe *infra*), saponina e hidróxido de aluminio. La pre-emulsión según se preparó en la primera etapa se enfrió hasta aproximadamente 5 °C, se diluyó mediante la adición de la mitad del volumen de la fase acuosa #2 a la misma temperatura, y se mezcló mediante la rotación de una barra magnética durante 1 minuto. La concentración final de tensioactivo en la emulsión de TSAP era del 4,75 % (p/v).

[0106] En general, los componentes de las formulaciones de vacuna divulgadas en el presente documento se añadieron en el siguiente orden: 1) medio 102 a 5 °C, 2) saponina, 3) hidróxido de aluminio, 4) antígenos, y 5) la emulsión incompleta (es decir, la combinación de la fase oleosa más la fase acuosa #1). Según se han preparado en el presente documento, las vacunas TSAP son estables durante hasta 36 meses a 5 °C.

[0107] Mediante el uso del mismo método de preparación pueden obtenerse otras emulsiones según se describe en los siguientes ejemplos proféticos:

Emulsión TSAP-2

[0108] La emulsión TSAP-2 es una emulsión O/A que contiene un 33 % de una fase oleosa. La fase oleosa (120 ml) contiene MARCOL 82® al 88 % v/v, SPAN 80® al 1,8 % p/v y TWEEN 85® al 10,2 % p/v. La fase acuosa #1 (120 ml) contiene tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8) al 97,75 % v/v y LUTROL F127® al 0,75 % p/v. La fase acuosa #2 (120 ml) está constituida por el tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8), saponina, hidróxido de aluminio, y opcionalmente contiene inmunógenos. La concentración final de tensioactivo en la emulsión de TSAP-2 es de aproximadamente un 4,25 % p/v.

Emulsión TSAP-3

[0109] La emulsión TSAP-3 es una emulsión O/A que contiene un 50 % de una fase oleosa. La fase oleosa (160 ml) contiene MARCOL 82® al 92 % v/v, SPAN 85® al 1,8 % p/v y BRIJ 96® al 6,2 % p/v. La fase acuosa #1

(160 ml) contiene tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8) al 98,5 % v/v y LUTROL F127® al 0,5 % p/v, saponina, hidróxido de aluminio, y opcionalmente contiene inmunógenos. La concentración final de tensioactivo en la emulsión de TSAP-3 es de aproximadamente un 4,25 % p/v.

5 Emulsión TSAP-4

[0110] La emulsión TSAP-4 es una emulsión O/A que contiene un 10 % de una fase oleosa. La fase oleosa (120 ml) contiene MARCOL 82® al 60 % v/v, SPAN 40® al 17,2 % p/v y ARLATONE 650® al 22,8 % p/v. La fase acuosa #1 (120 ml) contiene tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8) al 97,5 % v/v y TWEEN 20® al 2,5 % p/v. La fase acuosa #2 se preparó con 400 ml de tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M a pH 7,8, saponina, hidróxido de aluminio, y opcionalmente contiene inmunógenos. Se diluyeron 100 ml de la pre-emulsión con los 400 ml de la fase acuosa #2 para obtener la emulsión TSAP-3. La concentración final de tensioactivo en la emulsión de TSAP-4 es del 4,25 % p/v.

15 Ejemplo de referencia 2

Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) de una emulsión

[0111] Se pusieron 10 ml de la emulsión TSAP en un tubo de vidrio en un baño de agua a una temperatura de aproximadamente 25 °C. La emulsión TSAP era una emulsión homogénea de color blanco. La temperatura del baño de agua se aumentó progresivamente. Los cambios en la emulsión se observaron visualmente (la emulsión se separó en dos fases debido a la migración de la fase oleosa de color amarillo parduzco a la superficie). Este cambio es característico de la ruptura de la emulsión. La temperatura a la que se observó este cambio es el valor de la TIF de la emulsión. Para la emulsión TSAP, la TIF varía entre aproximadamente 36 °C - 46 °C. Las Figuras 1 - 5 proporcionan las gráficas de la determinación de la TIF para las formulaciones de vacuna descritas en el presente documento (estudio de estabilidad de 1 año). La Figura 6 proporciona una gráfica de la determinación de la TIF para las formulaciones de vacuna descritas en el presente documento y almacenadas durante 36 meses (estudio de estabilidad de 3 años).

30 Ejemplo comparativo 3

Estudio #1: estabilidad de las formulaciones de vacuna preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1

[0112] Esta tabla indica la estabilidad (es decir, el tiempo en meses durante el cual las formulaciones permanecen en forma de emulsiones de aceite en agua) de las formulaciones de vacuna preparadas de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1. Las formulaciones están formadas por los ingredientes constituyentes indicados (véanse las formulaciones 1 - 13), y los antígenos usados para cada una de estas formulaciones comprendían cepas clínicas del virus de la FMD inactivado que se consideraban entre moderadamente y muy purificadas.

[0113] Según indica la Tabla 2, la presencia de hidróxido de aluminio proporciona un aumento en la estabilidad de la vacuna, especialmente cuando se usa la concentración de antígeno más alta (compárese el aumento en la estabilidad de las formulaciones 9, 11 y 13 con la estabilidad relativamente reducida a los 12 meses de las formulaciones 3, 5 y 7). De media, la presencia de hidróxido de aluminio en las formulaciones que contienen la mayor cantidad de antígeno (es decir, las formulaciones 9, 11 y 13) aumenta el tiempo de estabilidad del aceite/agua en aproximadamente 3 - 6 meses (es decir, la estabilidad del aceite/agua observada para las formulaciones 3, 5 y 7) hasta aproximadamente doce (12) meses (es decir, la estabilidad del aceite/agua observada para las formulaciones 9, 11), o incluso hasta aproximadamente veinticuatro (24) meses (es decir, la estabilidad del aceite/agua observada para la formulación 13).

50

Tabla 2

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Antígeno (µg/dosis)	0	15	60	15	60	15	60	15	60	15	60	15	60
Saponina (mg/dosis)	0	0	0	0,5	0,5	1	1	0	0	0,5	0,5	1	1
Al(OH) ₃ (% final)	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3
Número de dosis	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75

T0 Mos	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A
T3 Mos	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A
T6 Mos	O/A	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A
T9 Mos	O/A	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A
T12 Mos	O/A	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A	O/A
T 24 Mos	O/A	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	A/O	O/A	O/A

Ejemplo comparativo 4

Estudio #2: estabilidad de las formulaciones de vacuna preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1

5

[0114] Las formulaciones de vacuna se prepararon según se ha descrito en el Ejemplo 1 y según las cantidades de componentes indicadas en la Tabla 3. Como se ha descrito previamente, el orden de adición de los componentes era 1) medio 102, 2) saponina, 3) hidróxido de aluminio, 4) antígenos purificados, y 5) emulsión incompleta (consúltese el Ejemplo 1, en el que la emulsión incompleta se define como la fase gaseosa más la fase acuosa #1). Los antígenos purificados eran los antígenos del FMDV 01 Campos, A24 Cruzeiro y C3 Indaial. El volumen total se ajustó mediante el uso de medio 102 (M102, la receta se indica a continuación).

10

Tabla 3

Número de ensayo ->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
emulsión incompleta (ml)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
fase acuosa (ml)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
saponina 4MIL1R159B (mg)	0	0	250	9.570	0	250	9.570	0	250	9.570
01 (ml) [aproximadamente 1.500 µg]	0	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8
A24 (ml) [aproximadamente 1.500 µg]	0	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7
C3 (ml) [aproximadamente 1.500 µg]	0	15	15	15	15	15	15	15	15	15
hidróxido de aluminio al 1,5 % (ml)	0	0	0	0	25	25	25	150	150	150
medio 102	CSP 200 ml									
volumen total (ml)	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
volumen total (dosis)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300

15

Tabla 4

Descripción del componente	Para 1 l de M102	Solución madre
MgCl ₂	95	170 mM
KCl	190	400 mM
CaCl ₂	238	260 mM
CHCl ₃	5 ml	puro
Alanina	276 g	-
Glucosa	1.880	4.500 mM
Bicarbonato de sodio	2.180	2.540 mM
Peptona	3.000 g	-
Hidrolizado de lactoalbúmina	4.000 g	-

La estabilidad de la vacuna fue determinada de acuerdo con la Tabla 5.

Tabla 5

Ensayo	Criterios de aceptación
Análisis del tamaño de la gota **	Modo < 0,18 µm; SPAN < 0,8 *
Temperatura de inversión de fase (TIF)	>= 36 °C
* Para las vacunas sin gel de alúmina	
** Se llevaron a cabo controles al final del estudio de estabilidad	

[0115] Se determinó la temperatura de inversión de fase (TIF) para cada formulación de vacuna según se ha descrito en el Ejemplo 2. La cantidad de antígeno añadida está indicada como "unidades de hemaglutinina" (UH) por dosis de vacuna. La Tabla 6 resume los datos de la TIF e indica que la TIF permaneció generalmente estable durante hasta 36 meses. La Figura 6 proporciona gráficas de la determinación de la TIF mediante conductividad para las formulaciones de vacuna de los ensayos 1 - 10 (resumidas en la Tabla 6). El aumento en la TIF que se observa con las formulaciones coadyuvadas con saponina (es decir, los ensayos 3, 4, 6, 7, 9 y 10) constituye por sí mismo una mejora con respecto a la estabilidad relativa a otras formulaciones no coadyuvadas con saponina (es decir, los ensayos 2, 5 y 8).

Tabla 6

Ensayos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Días	7	7	7	8	7	9	9	9	14	14
	22	22	23	23	24	24	29	38	38	41
	121	121	121	122	121	121	127	123	133	133
	330	330	330	340	340	340	340	340	340	340
	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	11.00	1.100
Antígeno	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponina (mg/dosis)	0	0	0,8	2,5	0	0,8	2,5	0	0,8	2,5
Gel de alúmina (%)	0	0	0	0	0,065	0,065	0,065	0,39	0,39	0,39
T.I.F.	39	36	39	39,5	36	39	39,5	37,5	40	40
	32,5 (*)	36,5	39	40	36,5	39	39,5	37,5	39,5	40,5
	35	36,5	36,7 (*)	39,5	37	39	40	32 (*)	40	40,5
	36,5	37	39	39	37	39	39	38	40	39,5
	38,5	39,0	40,5	40	39	40,5	40	41	41,5	40,5

[0116] La distribución del tamaño de partícula (Tabla 7) de las emulsiones permanecía en el intervalo establecido en los criterios del estudio a lo largo del periodo de tiempo de 36 meses.

Tabla 7

Muestras	Fecha de elaboración	Fecha del análisis	Ag (+/-)	Saponina (mg/dosis)	Gel de alúmina (% final)	Modo (µm)	SPAN
Emulsión incompleta	04/07/05	05/07/05	-	0	0	0,158	0,644
Ensayo 1	27/09/05	04/12/09	-	0	0	0,146	0,650
Ensayo 2	27/09/05	04/12/09	+	0	0	0,145	0,661
Ensayo 3	27/09/05	04/12/09	+	0,8	0	0,148	0,633

Ensayo 4	27/09/05	04/12/09	+	2,5	0	0,154	0,582
Ensayo 5	27/09/05	04/12/09	+	0	0,065	0,144	0,670
Ensayo 6	27/09/05	04/12/09	+	0,8	0,065	0,144	0,672
Ensayo 7	27/09/05	04/12/09	+	2,5	0,065	0,144	0,672
Ensayo 8	27/09/05	05/12/09	+	0	0,39	0,146	0,790
Ensayo 9	27/09/05	05/12/09	+	0,8	0,39	0,145	0,789
Ensayo 10	27/09/05	05/12/09	+	2,5	0,39	0,145	0,787

Ejemplo comparativo 5

Resultados de la serología tras la administración de múltiples dosis de una vacuna del virus de la fiebre aftosa (FMD) coadyuvada con la emulsión TSAP - Estudio Bovino.

- [0117]** Materiales y métodos: 90 reses, de entre 12 y 14 meses de edad, nunca vacunadas y sin anticuerpos contra la FMD, fueron seleccionadas y distribuidas aleatoriamente entre 10 grupos de 9 animales que se iban a vacunar. Los animales fueron vacunados con las formulaciones de vacuna indicadas (9807 - 9814) el día 1. Cada una de las formulaciones recogidas en las Tablas 8, 9, 10 y 11 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1 y comprende todos los componentes mencionados en el Ejemplo 1, variando las cantidades de saponina y de hidróxido de aluminio según lo siguiente: la cantidad de saponina es de 0, de 0,7, de 1,3 o de 2,7 mg/dosis, y la cantidad de hidróxido de aluminio Algell es del 0 % o del 0,37 %. Se vacunaron ocho (8) grupos por vía intramuscular (el grupo IM) y se vacunaron dos (2) grupos por vía subcutánea (el grupo SC). Cada animal del grupo IM fue revacunado con la respectiva vacuna el día 56 por vía intramuscular y el día 84 por vía subcutánea. Cada animal del grupo SC fue revacunado con la respectiva vacuna los días 56 y 84 por vía subcutánea.

- [0118]** La Tabla 8 resume la estabilidad de las formulaciones de vacuna.

20

Tabla 8

Número de formulación	6 °C			Entorno		
	1 Semana	2 Semanas	30 Días	1 Semana	2 Semanas	30 Días
9807	OK	OK	OK	OK	OK	OK
9808	OK	OK	OK	OK	OK	OK
9809	OK	OK	OK	OK	OK	OK
9810	OK	OK	OK	OK	OK	OK
9811	OK	OK	OK	OK	OK	OK
9812	OK	OK	OK	OK	OK	OK
9813	OK	OK	OK	OK	OK	OK
9814	OK	OK	OK	OK	OK	OK

- [0119]** No se produjo ninguna lesión después de la primera vacunación por vía intramuscular. Se produjeron algunas lesiones después de la segunda vacunación por la vía intramuscular, pero todas estas lesiones desaparecieron 28 días después de la segunda vacunación por la vía intramuscular. La Tabla 9 resume la seguridad de las formulaciones de vacuna, según se indica por la medición del peso corporal del animal en las fechas específicas.

Tabla 9

Identificador del experimento	Estadísticas	Fecha en medición del peso corporal									
		17-Nov-08	8-Dic-08	15-Dic-08	12-Ene-09	15-Ene-09	9-Feb-09	12-Feb-09	16-Feb-09	9-Mar-09	
EXP 9807	Peso medio (kg) DT	294	303	305	331	330	354	352	355	372	
		33	30	31	35	33	34	34	32	37	
EXP 9808	Peso medio (kg) DT	293	304	305	331	328	352	355	354	370	
		34	36	35	35	41	39	42	41	42	
EXP 9809	Peso medio (kg) DT	293	304	304	327	325	351	345	348	365	
		33	33	32	29	33	29	37	35	37	
EXP 9810	Peso medio (kg) DT	293	305	307	330	330	350	348	351	374	
		33	32	30	39	36	37	34	34	40	
EXP 9811 G1	Peso medio (kg) DT	295	307	307	328	329	352	346	352	369	
		34	31	31	31	34	36	35	40	39	
EXP 9811 G2	Peso medio (kg) DT	293	304	305	328	329	346	342	345	364	
		31	32	34	34	37	41	39	41	43	
EXP 9812 G1	Peso medio (kg) DT	294	307	307	329	331	352	350	354	371	
		29	33	34	35	35	37	36	35	32	
EXP 9812 G2	Peso medio (kg) DT	292	304	304	330	329	352	349	355	369	
		30	32	32	34	37	35	32	37	33	
EXP 9813	Peso medio (kg) DT	293	304	304	332	331	357	354	360	378	
		30	27	27	28	30	33	30	30	35	
EXP 9814	Peso medio (kg) DT	293	304	305	327	325	348	343	346	365	
		30	31	29	31	30	32	35	31	29	

[0120] Resultados: la Tabla 10 resume los datos serológicos recogidos durante los ensayos experimentales. 01 Campos, A24 Cruzeiro y C3 Indaial son tres serotipos independientes del virus de la FMD, y la presencia de los anticuerpos 01, A24 y C3 es un indicador positivo de que la formulación de vacuna desencadenó una respuesta inmunitaria en los vacunados. "G1" indica que la formulación de vacuna fue administrada por vía intramuscular, y "G2" indica que la formulación de vacuna fue administrada por vía subcutánea. Para la presente invención, particularmente para los antígenos víricos de la FMD, existe una fuerte correlación directa entre el título de anticuerpos (es decir, los niveles séricos de 01 Campos, de A24 Cruzeiro y de C3 Indaial) y la cifra de Protección de la Población Equivalente (PPE). De una forma más simple, cuando los títulos de anticuerpos son elevados, los animales vacunados están correspondientemente muy protegidos frente a la infección vírica.

[0121] Sorprendentemente, la presencia de hidróxido de aluminio está asociada con una diferencia significativa en la respuesta inmunitaria que depende de la vía de administración. Cuando hay presente hidróxido de aluminio, como en las formulaciones 9812G1 y 9812G2, hay un aumento significativo en la respuesta inmunitaria del vacunado, según se mide mediante los títulos de anticuerpos, cuando la formulación de vacuna se administra por vía subcutánea. No existe una diferencia significativa similar en la eficacia debida a la vía de administración para las correspondientes formulaciones de vacuna que no contienen hidróxido de aluminio, a saber, 9811G1 y 9811G2.

[0122] La razón de este aumento en la respuesta inmunitaria debido a la presencia de hidróxido de aluminio coincidente con el uso de la vía de administración subcutánea no se conocen en este momento, pero una forma de realización eficaz de la actual invención podría incluir, pero en modo alguno se limita a, modificar la vía de administración de la vacuna dependiendo de los datos de eficacia actuales y futuros (por ejemplo, los títulos de anticuerpos).

[0123] En comparación con las formulaciones de vacuna de control no coadyuvadas con saponina (es decir, 9807 & 9808), las formulaciones de vacuna coadyuvadas con saponina desencadenan en los animales del estudio una respuesta inmunitaria más rápida frente a los tres antígenos víricos de la FMD, según indican los mayores títulos medios de anticuerpos para las formulaciones coadyuvadas con saponina en el Día 21. Tomadas conjuntamente, las pruebas indican que la presente invención proporciona una mejora en la estabilidad y permite una respuesta inmunitaria más rápida que las formulaciones no coadyuvadas con saponina.

Tabla 10

Saponina (mg/dosis)	Al(OH) ₃ (%)	ID de la Form.	01 CAMPOS						A24 CRUZEIRO						C3 INDAIAL						MEDIAS	
			D21			D56			D21			D56			D21			D56			D21	D56
			TIT	EPP	TIT	TIT	EPP	EPP	TIT	EPP	TIT	TIT	EPP	EPP	TIT	EPP	TIT	TIT	EPP	TIT	TIT	TIT
0	0	9807	1,47	37,7	2,07	80,4	45,6	1,9	55,1	1,66	30,5	2,08	77,3	2,14	85,8	1,88	1,8	2,1	2,2	2,2	2,2	2,2
0	0,37	9808	1,64	51,3	1,59	49,4	64,9	1,91	61,5	1,9	52,8	2,05	77,4	2,37	87,7	1,89	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
0,7	0	9809	1,66	49,4	1,91	64,9	64,9	1,91	61,5	1,9	52,8	2,05	77,4	2,37	87,7	1,89	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
0,7	0,37	9810	1,91	71,3	1,82	64,5	64,5	2,02	65,7	1,81	46,9	2,27	88,7	2,28	88	2,07	2	2	2	2	2	2
1,3	0	9811 G1	1,97	74,6	2,18	82,6	82,6	2,03	67,8	2,01	70,1	2,32	88,6	2,46	92,2	2,11	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
1,3	0	9811 G2	1,92	73,4	2,06	84	84	2,05	68,2	2,11	74	2,33	92,2	2,55	95,3	2,1	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
1,3	0,37	9812 G1	1,81	62,5	1,98	67,3	67,3	2,08	73,4	1,88	49,2	2,29	88,5	2,27	87,4	2,06	2	2	2	2	2	2
1,3	0,37	9812 G2	2,58	98,9	2,42	97	97	2,5	94,5	2,29	90	2,59	96,7	2,76	98,8	2,56	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
2,7	0	9813	2	79,5	2,31	93,5	93,5	2,22	87,5	2,23	88,6	2,43	93,4	2,69	96,5	2,22	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
2,7	0,37	9814	2,14	88,2	2,03	80,2	80,2	2,34	95,1	1,96	57,4	2,6	96,4	2,39	92,5	2,36	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
G1 - la formulación de vacuna se administró por vía intramuscular																						
G2 - la formulación de vacuna se administró por vía subcutánea																						

Ejemplo comparativo 6

Resultados de la serología tras la administración de dos dosis de una vacuna del virus de la fiebre aftosa (FMD) coadyuvada con la emulsión TSAP - Estudio porcino.

[0124] Materiales y métodos: 57 cerdos, no vacunados nunca y sin anticuerpos contra la FMD, se seleccionaron y se distribuyeron aleatoriamente entre 9 grupos de 6 animales que se iban a vacunar y 1 grupo de 3 animales que no se iban a vacunar (animales no vacunados). Los animales fueron vacunados con las formulaciones de vacuna indicadas (A-I) el día 1. Cada una de las formulaciones recogidas en la Tabla 11 se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1 y comprende todos los componentes mencionados en el Ejemplo 1, variando las cantidades de saponina y de hidróxido de aluminio según lo siguiente: la cantidad de saponina es de 0, de 0,7, de 1,3 o de 2,7 mg/dosis, y la cantidad de hidróxido de aluminio Algel es del 0 % o del 0,37 %. La seguridad de la formulación de vacuna fue evaluada a través de la medición de varios parámetros que incluían la temperatura rectal y los signos visuales de la reacción del animal a la vacunación.

Tabla 11

Formulación de vacuna	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Ag (µg/dosis)	0	10	10	10	10	10	10	10	10
Saponina (mg/dosis)	0	0	0	0,7	0,7	1,3	1,3	2,7	2,7
Algel (% final)	0	0	0,37	0	0,37	0	0,37	0	0,37
Emulsión incompleta	333	333	333	333	333	333	333	333	333
Fase acuosa 2 (166 ml)									
FMDV purificado (ml)	0	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1
Saponina (ml)	0	0	0	2,48	2,48	4,96	4,96	9,92	9,92
Algel al 3 % (ml)	0	0	61,7	0	61,7	0	61,7	0	67,7
M102 a 5 °C	166	154,9	93,2	152,4	90,8	149,9	88,2	145	83,3
Total									
Volumen total (ml)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Número total (dosis)	250	250	250	250	250	250	250	250	250

[0125] Resultados: todas las formulaciones de vacuna que contenían antígeno (las formulaciones B-I, descritas en la Tabla 11) indujeron en los animales del ensayo una respuesta de anticuerpos que era significativamente mayor que la inducida por el control sin antígeno (formulación I, descrita en la Tabla 11). Las formulaciones que contenían saponina indujeron unas respuestas de anticuerpos relativamente mayores en comparación con las formulaciones que no contenían saponina. La Tabla 12 resume los datos de los títulos de anticuerpos, y establece de nuevo las cantidades de antígeno, de saponina y de hidróxido de aluminio para cada formulación. En particular, los datos de los títulos de anticuerpos indican que la presencia en las formulaciones de vacuna de entre aproximadamente 0,7 mg/dosis y aproximadamente 2,7 mg/dosis de saponina aumenta la respuesta de anticuerpos con respecto a las formulaciones de vacuna que no contienen saponina.

Tabla 12

Grupo animal	Formulación de vacuna	Antígeno (µg/dosis)	Saponina (mg/dosis)	Algel	Datos de los títulos medios de anticuerpos		
					Estadística	D21	D44
G1	A	0	0	0	Media	0,75	0,67
					DT	0,26	0,26
G2	B	10	0	0	Media	1,45	3,17
					DT	0,50	0,48

G3	C	10	0	0,37	Media	1,40	2,92
					DT	0,18	0,31
G4	D	10	0,7	0	Media	1,60	3,12
					DT	0,31	0,42
G5	E	10	0,7	0,37	Media	1,87	3,20
					DT	0,69	0,45
G6	F	10	1,3	0	Media	1,40	3,41
					DT	0,37	0,27
G7	G	10	1,3	0,37	Media	1,80	3,37
					DT	0,22	0,43
G8	H	10	2,7	0	Media	1,72	3,47
					DT	0,66	0,30
G9	I	10	2,7	0,37	Media	1,47	2,97
					DT	0,18	0,57
G10	No vacunado	-	-	-	Media	0,67	0,67
					DT	0,17	0,09

Ejemplo (según la presente invención) 7

[0126] Determinación de la dosis protectora al 50 % (DP50) de tres vacunas experimentales contra la FMD en cerdos

[0127] *Resumen.* El fin del estudio era ensayar la eficacia frente a una exposición virulenta a la FMD en cerdos de 3 formulaciones de vacuna contra la FMD experimentales de acuerdo con la actual invención. Se prepararon cuatro vacunas (A, B, C y D) respectivamente sin antígeno (A), y con dosis variables del antígeno de la FMD 01 Manisa purificado inactivado (vacunas B, C y D) formuladas con adyuvante de acuerdo con la actual invención. Las vacunas se presentaron en forma de viales de 30 ml que contenían 25 ml y las dosis eran de 2 ml por dosis. La cepa de la exposición era la 01 Manisa de la FMD, 449402 4D:911, 20-07-1994 (que originalmente se aisló como 01 Manisa Turkey 1/78), y el título en las células renales porcinas secundarias era de 7,67 log₁₀ TCID₅₀/ml. El diluyente de la cepa de exposición era Hanks MEM, 2 % de suero bovino fetal (FBS) con los antibióticos habituales.

[0128] *Procedimiento.* En el estudio se usaron cerdos exentos del FMDV y no vacunados previamente contra la FMD. Cada uno de los 47 cerdos con una edad de 10 semanas (más o menos 1 semana) se aclimató durante al menos 24 horas antes de los procedimientos experimentales. Los cerdos se alojaron a entre 2 y 3 animales por sala, y fueron alimentados con pienso en gránulos estándar y agua *ad libitum*. El Día 1 (D1), los cerdos se ubicaron (independientemente del sexo) en 15 grupos de tres animales y un grupo de dos animales. Cada grupo fue alojado en una sala en particular y en cada sala los animales estaban separados individualmente por tableros de madera (de 1,5 M) desde la exposición hasta la finalización del estudio.

[0129] El D0 los animales fueron vacunados por vía intramuscular detrás de la oreja en el lado izquierdo, con jeringas individuales de acuerdo con las Tablas 13 y 14. Antes de la vacunación, los viales de la vacuna se invirtieron suavemente aproximadamente 10 veces para asegurar una suspensión homogénea.

Tabla 13 - composición de vacuna

Vacuna (emulsión final)	A	B	C	D
Ag (µg/dosis)	0	0,4	2	10
Saponina (mg/dosis)	0	0	0	0,7
Algél (% final)	0	0,42	0,42	0,42

Emulsión incompleta (ml)	333	333	333	333
Fase acuosa 2 166 ml				
FMD O-Manisa lote nº OMAAd-04-613 (ml)	0	0,66	3,29	16,46
Saponina pura 08-0314-P (ml)	0	2,48	2,48	2,48
Gel de alúmina al 3 % (ml)	0	61,4	61,4	61,4
Medio 102	166	102,5	99,8	86,7
Total				
Volumen total (ml)	500	500	500	500
# total (dosis)	250	250	250	250

Tabla 14

Grupo	Vacuna	Dosis	Volumen de vacuna inyectado (ml)	nº de cerdos
B1	B	Dosis	2,0	3
B2	B	1/2 dosis	1	3
B3	B	1/4 dosis	0,5	3
B4	B	1/8 dosis	0,25	3
B5	B	1/16 dosis	0,13	3
C1	C	Dosis	2,0	3
C2	C	1/2 dosis	1	3
C3	C	1/4 dosis	0,5	3
C4	C	1/8 dosis	0,25	3
C5	C	1/16 dosis	0,13	3
D1	C	Dosis	2,0	3
D2	D	1/2 dosis	1	3
D3	D	1/4 dosis	0,5	3
D4	D	1/8 dosis	0,25	3
D5	D	1/16 dosis	0,13	3
A (control)	A	1	2	2

5

[0130] *Exposición.* El D28 se diluyó el virus de la FMD de tipo O para obtener 100.000 TCID₅₀ por ml (la solución madre del virus se diluyó 2,67 log 10, o 468 veces). El mismo día, todos los animales fueron anestesiados mediante la administración de STRESSNIL (1 ml/20 kg) y de KETAMINE (2 ml/20 kg) por vía IM y se expusieron a 10.000 TCID₅₀ del virus en 0,1 ml por vía intradérmica, en el bulbo del talón de la garra externa de la pata trasera izquierda. Se comprobó diariamente el bienestar general de los animales desde el D0 hasta el D28. Se anotó cualquier observación clínica y tratamiento. Después de la exposición, los animales fueron observados diariamente durante 7 días (desde el D29 hasta el D35). Las observaciones se llevaron a cabo en el mismo orden, partiendo de las salas con los animales vacunados con la dosis más alta hasta aquellas con los animales vacunados con la dosis más baja, y finalizando con los controles (grupo A). Se comprobó diariamente el bienestar general de los animales, prestando una atención en particular a los signos de la FMD en el hocico y en las patas. Se recogió sangre de cada animal antes de la vacunación (el día D1 o el día D0), el día D14 y el día D28, antes de la exposición y al final del estudio. Las muestras fueron inactivadas con calor (a 56 °C durante 30 minutos) y se determinó el título de Ac contra el FMDV de tipo O en todos los sueros mediante una prueba VN (MERIAL R&D, Lelystad).

20 **[0131]** El D36 (al final del periodo de observación), los animales fueron sacrificados (con entre 4 y 6 ml por 50

kg de IV T61) y se inspeccionaron cuidadosamente para evaluar los signos del FMDV. Se tomaron muestras de cualquier lesión observada en los grupos vacunados con una dosis completa de vacuna (los grupos B1, C1 o D1) y se congelaron a -70 °C para un tipado adicional del virus. La presencia de lesiones en el hocico, en la boca y/o en las patas (excepto en la garra principal de la pata inoculada) se consideró como una prueba de la FMD. La prueba se consideró válida si cumplía los criterios, que establecían que ambos cerdos de control deben mostrar signos clínicos de la FMD. La DP50 de cada vacuna se calculó mediante el método de Spearman Karber.

[0132] *Resultados.* La potencia frente a la carga útil se presenta en la FIG. 9, y los pertinentes datos del estudio se resumen numéricamente en las siguientes Tablas 15 y 16.

10

Tabla 15

	nº de cerdos protegidos por vacuna ensayada		
Volumen (ml)	B	C	D
2,000	3/3	2/2	3/3
1,000	2/3	3/3	3/3
0,500	1/3	1/3	3/3
0,250	1/3	1/3	2/3
0,125	0/3	0/3	1/3

Tabla 16

15

	Cálculo de la potencia de la vacuna mediante el uso de una regresión logística			
Vacuna	Carga útil (µg)	DP50	CI95-	CI95+
B	0,4	3 594	1,6046	2,896
C	2	4,5821	1,7021	2,6979
D	10	11,7	9,533	51,55

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende una emulsión inyectable de aceite en agua (O/A), que comprende:
5 (i) una solución acuosa que comprende al menos un inmunógeno que es un virus inactivado de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMD), un virus inactivado del circovirus porcino de tipo 2 (PCV-2) o una bacteria inactivada de *Mycoplasma hyopneumoniae*;
(ii) una solución acuosa que comprende saponina en una cantidad de entre 0,35 mg/dosis y 3,0 mg/dosis;
10 (iii) una solución acuosa que comprende hidróxido de aluminio en la que la concentración del hidróxido de aluminio es de entre el 0,065 % p/v y el 1,0 % p/v;
(iv) un aceite mineral;
(v) un tensioactivo lipófilo no iónico;
(vi) un tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene un elevado valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de entre 13 y 40;
15 y
(vii) un tensioactivo hidrófilo no iónico que tiene por bajo valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de entre 9 y 13.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo hidrófilo no iónico con un elevado EHL está presente a una concentración de entre el 0,1 y el 1,5 % expresada en forma de peso por volumen de la emulsión (p/v), y en la que la concentración global de tensioactivos, en peso por volumen de la emulsión (p/v), es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 8 %.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo hidrófilo no iónico con un bajo EHL está presente a una concentración de entre el 1 % y el 8 % expresada en forma de peso por volumen de la emulsión (p/v).
25
4. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo lipófilo no iónico está presente a una concentración de entre el 0,1 % y el 2,5 % expresada en forma de peso por volumen de la emulsión (p/v).
30
5. La composición de vacuna de la reivindicación 1 en la que el aceite mineral está presente a una concentración de entre el 20 % y el 40 % (v/v), y en la que la emulsión tiene una temperatura de inversión de fase (TIF) de entre aproximadamente 33 °C y aproximadamente 66 °C.
- 35 6. La composición de vacuna de la reivindicación 1 en la que el tensioactivo hidrófilo no iónico con un bajo EHL se selecciona entre el grupo que consiste en triésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados, diésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados, monoésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, aceite de ricino etoxilado y combinaciones de los mismos, y en la que el éster de dicho éster de ácido graso etoxilado se selecciona entre el grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y combinaciones de los mismos.
40
7. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo lipófilo no iónico se selecciona entre el grupo que consiste en ésteres de ácidos grasos de sorbitano, ésteres de ácidos grasos de manida, ésteres de ácidos grasos de manida dietoxilados, ésteres de ácidos grasos de manida trietoxilados, ésteres de ácidos grasos de manida tetratoxilados y combinaciones de los mismos, y en la que el éster de los ésteres de ácidos grasos se selecciona entre el grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y combinaciones de los mismos.
45
8. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el aceite mineral se selecciona entre el grupo que consiste en aceite de parafina, escualano, pristano, aceite de poliisobuteno, aceite de poliisobuteno hidrogenado, aceite de polideceno, aceite de poliisopreno, aceite de poliisopropeno y, combinaciones de los mismos.
50
9. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que comprende un aceite de parafina, un monoéster de ácido graso de sorbitano como tensioactivo lipófilo no iónico, un triéster de ácido graso de sorbitano etoxilado como tensioactivo hidrófilo no iónico con un bajo EHL y un copolímero en bloque no iónico como tensioactivo hidrófilo no iónico con un elevado EHL.
55
10. La composición de vacuna de la reivindicación 1 en la que el tensioactivo hidrófilo no iónico con un elevado EHL se selecciona entre el grupo que consiste en monoésteres de ácido graso de sorbitano etoxilados,

alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, copolímero en bloque no iónico, y combinaciones de los mismos, y en la que el monoéster de sorbitano etoxilado se selecciona entre el grupo que consiste en monolaurato de sorbitano etoxilado, monopalmitato de sorbitano etoxilado, monoestearato de sorbitano etoxilado, monooleato de sorbitano etoxilado, y combinaciones de los mismos.

5

11. La composición de vacuna de la reivindicación 9, en la que el monoéster de ácido graso de sorbitano es un monooleato de sorbitano, el triéster de ácido graso de sorbitano etoxilado es un trioleato de sorbitano etoxilado y el copolímero en bloque no iónico es un polímero de polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP).

10 12. La composición de vacuna de la reivindicación 11, en la que el aceite de parafina está presente a una concentración de entre el 10 % y el 40 % v/v, el monooleato de sorbitano está presente a una concentración de entre el 0,2 % y el 1,5 % p/v, el trioleato de sorbitano etoxilado está presente a una concentración de entre el 2 % y el 5 % p/v y el POE-POP está presente a una concentración de entre el 0,1 % y el 0,5 % p/v; o el aceite de parafina está presente a una concentración del 29,3 % v/v, el monooleato de sorbitano está presente a una concentración del
15 0,6 % p/v, el trioleato de sorbitano etoxilado está presente a una concentración del 3,4 % p/v y el POE-POP está presente a una concentración del 0,25 % p/v.

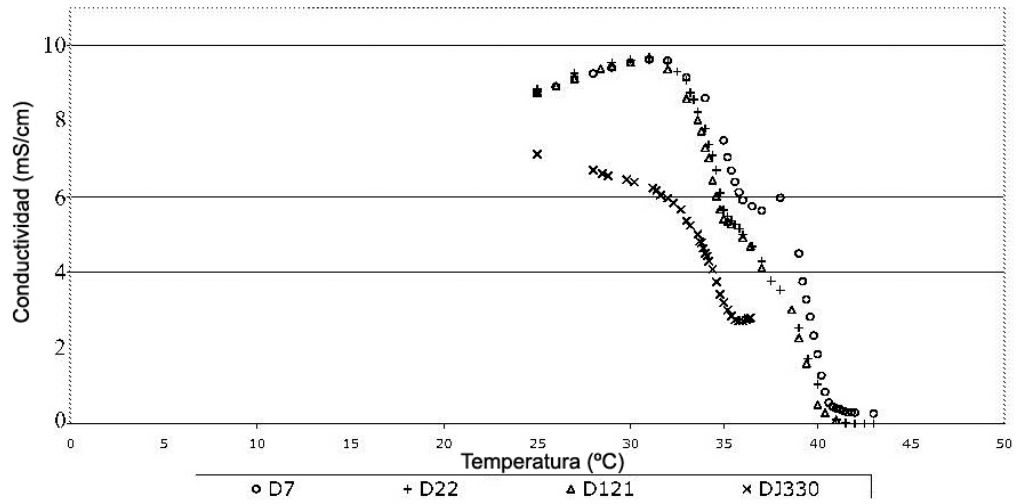
13. La composición de vacuna de la reivindicación 11 para su uso en la inducción de una respuesta inmunológica en un animal frente a un patógeno.

20

14. La composición de vacuna para el uso según la reivindicación 13, en la que la composición de vacuna va a ser administrada mediante una inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC), o en la que la administración se lleva a cabo con un inyector sin aguja.

Figura 1

Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) mediante conductividad -
Ensayo 1



Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) mediante conductividad -
Ensayo 2

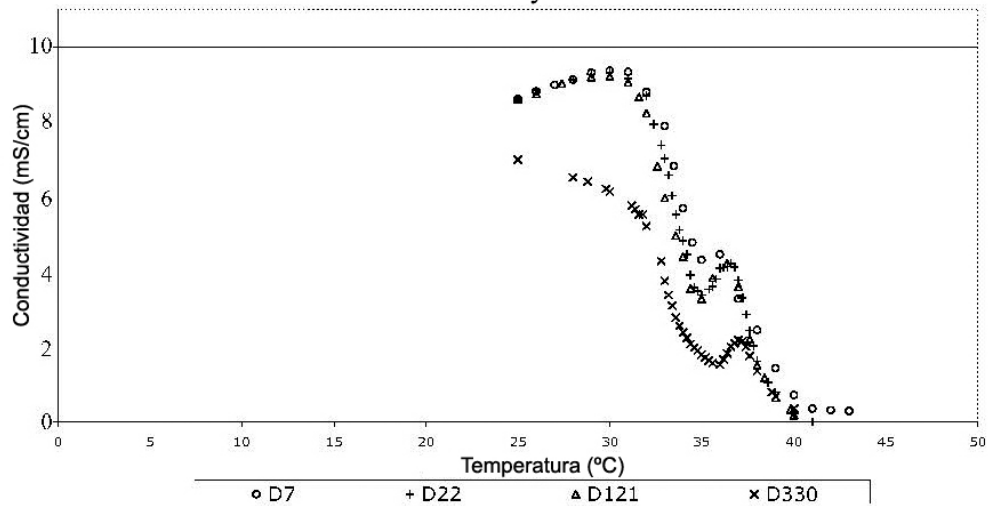
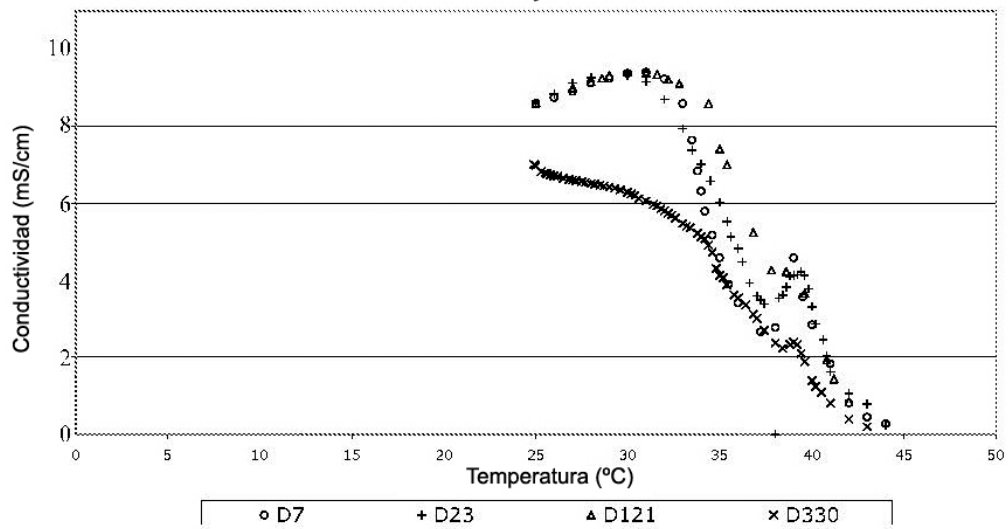


Figura 2

Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) mediante conductividad -
Ensayo 3



Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) mediante conductividad -
Ensayo 4

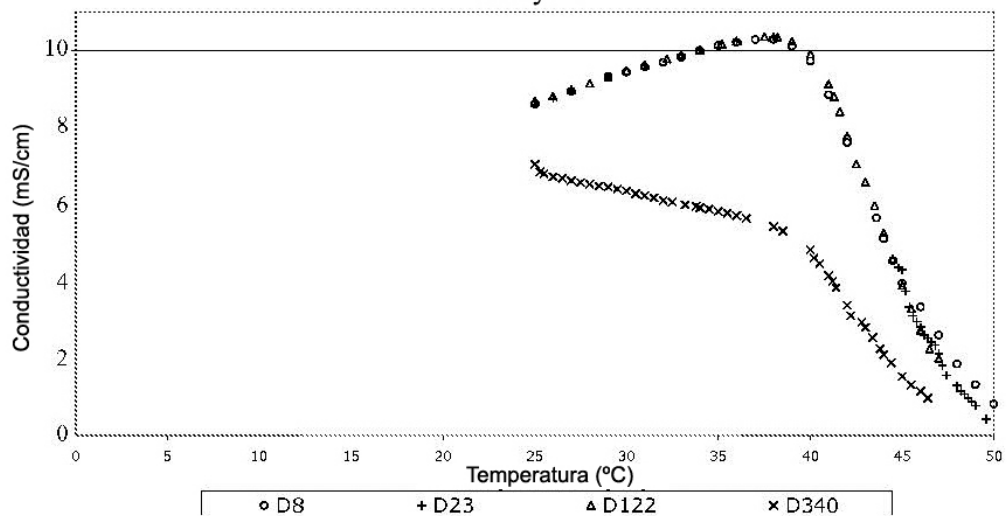
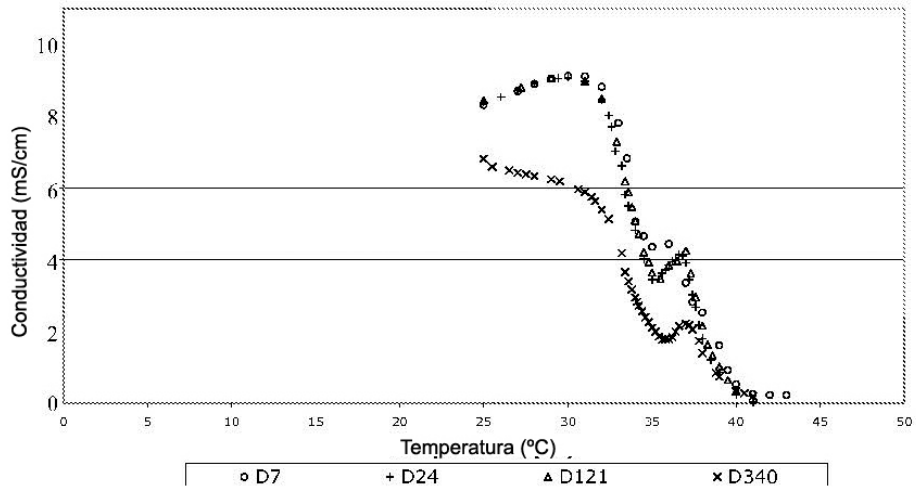


Figura 3

Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) mediante conductividad -
Ensayo 5



Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) mediante conductividad -
Ensayo 6

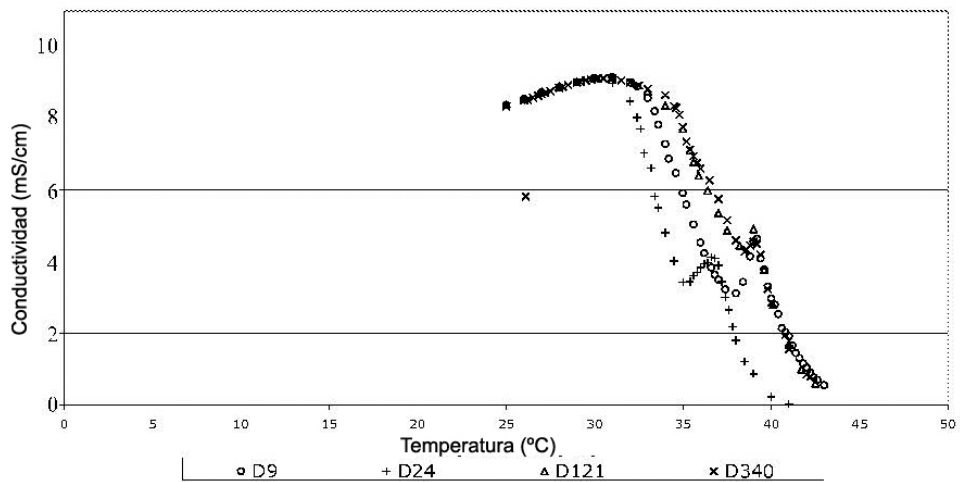
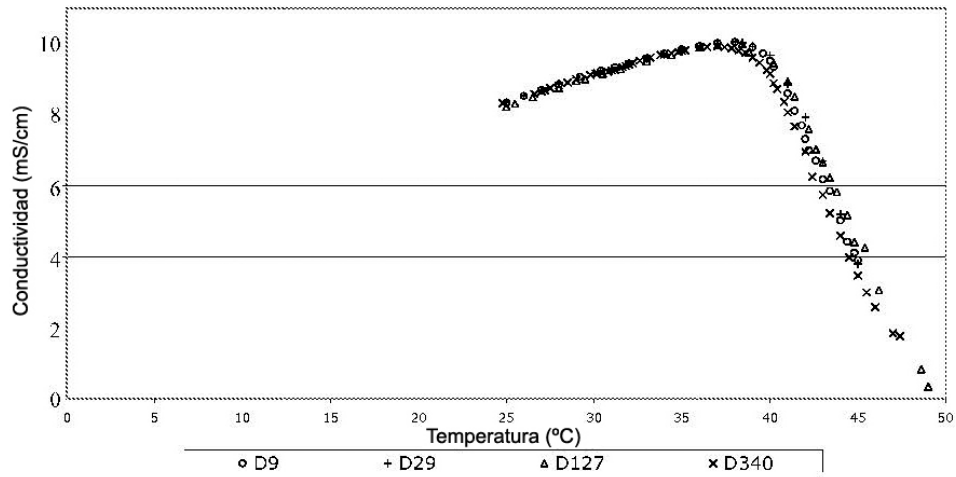


Figura 4

Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) mediante conductividad -
Ensayo 7



Determinación de la temperatura de inversión de fase (TIF) mediante conductividad -
Ensayo 8

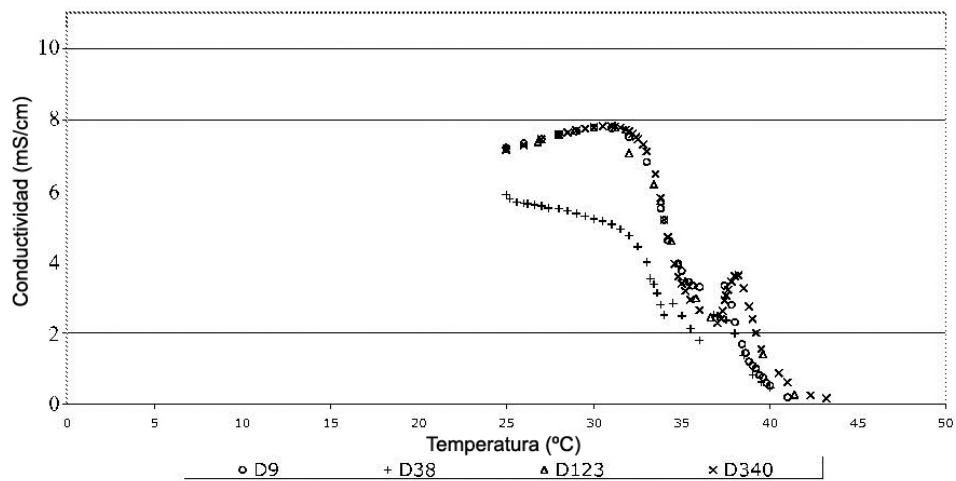


Figura 5

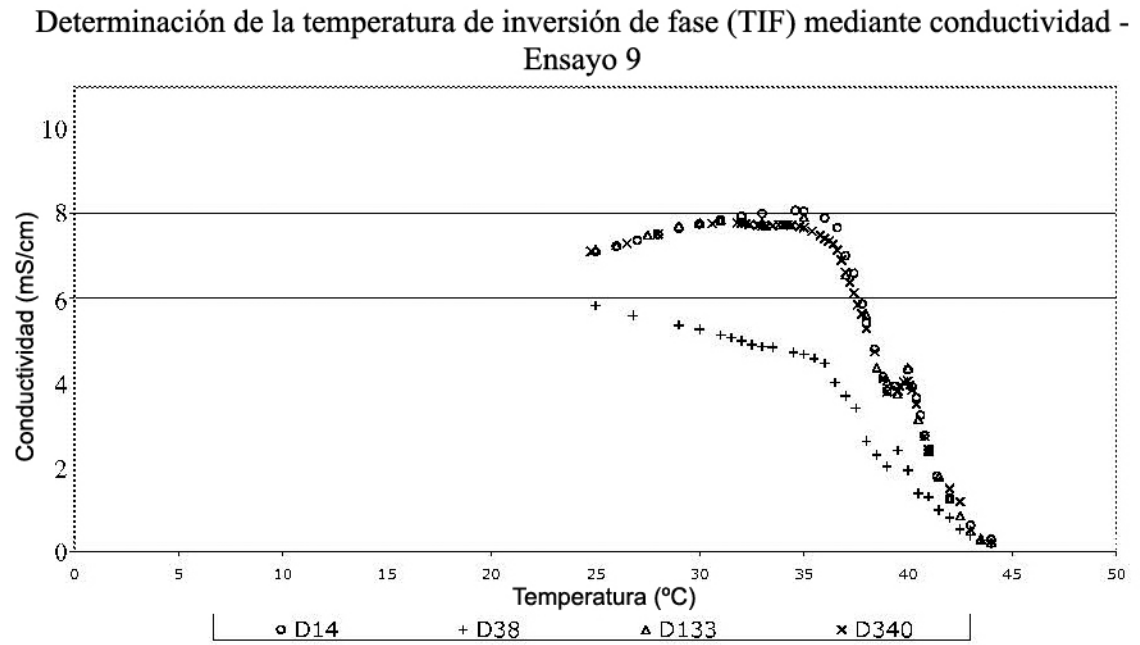


Figura 6

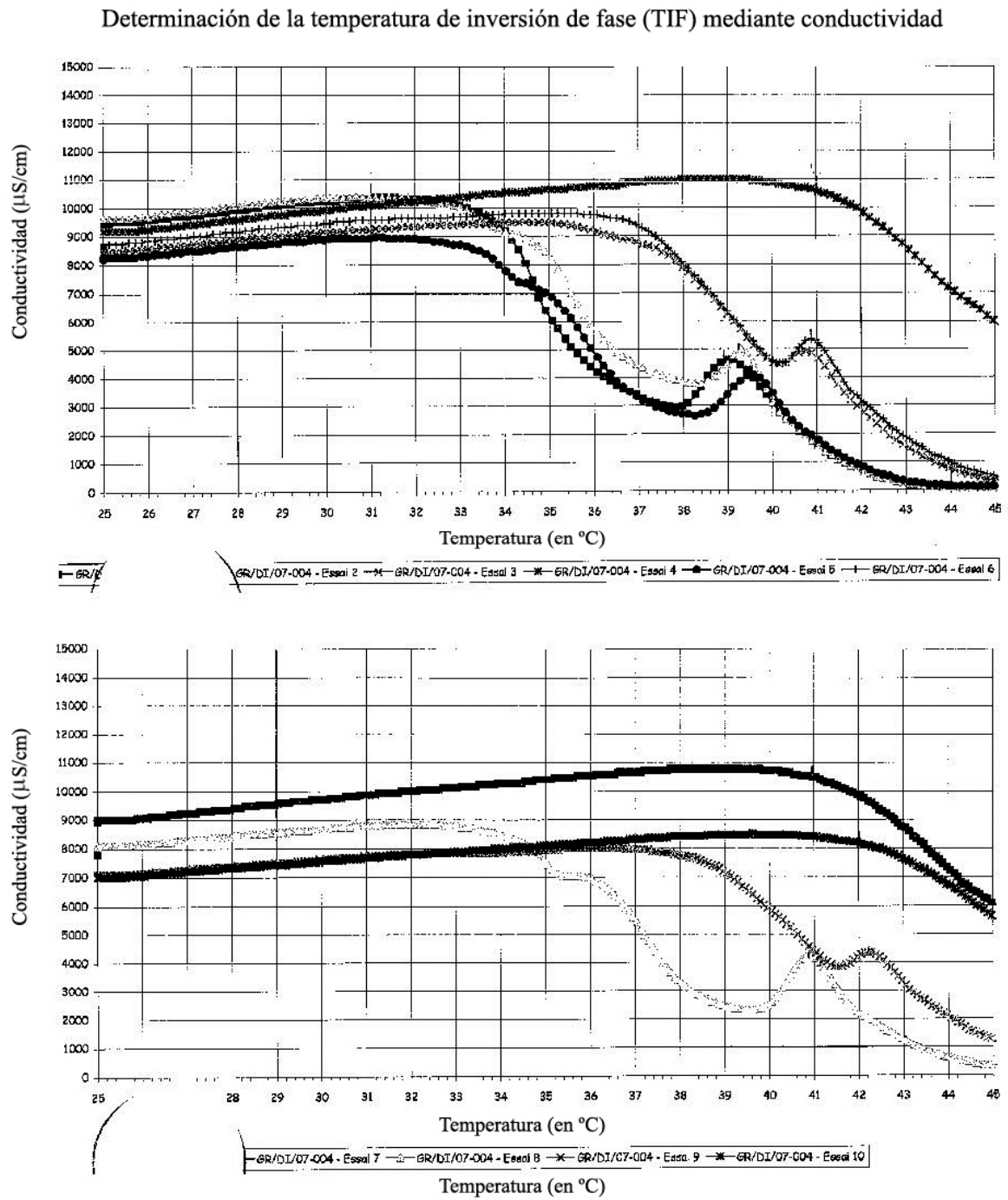


Figura 7

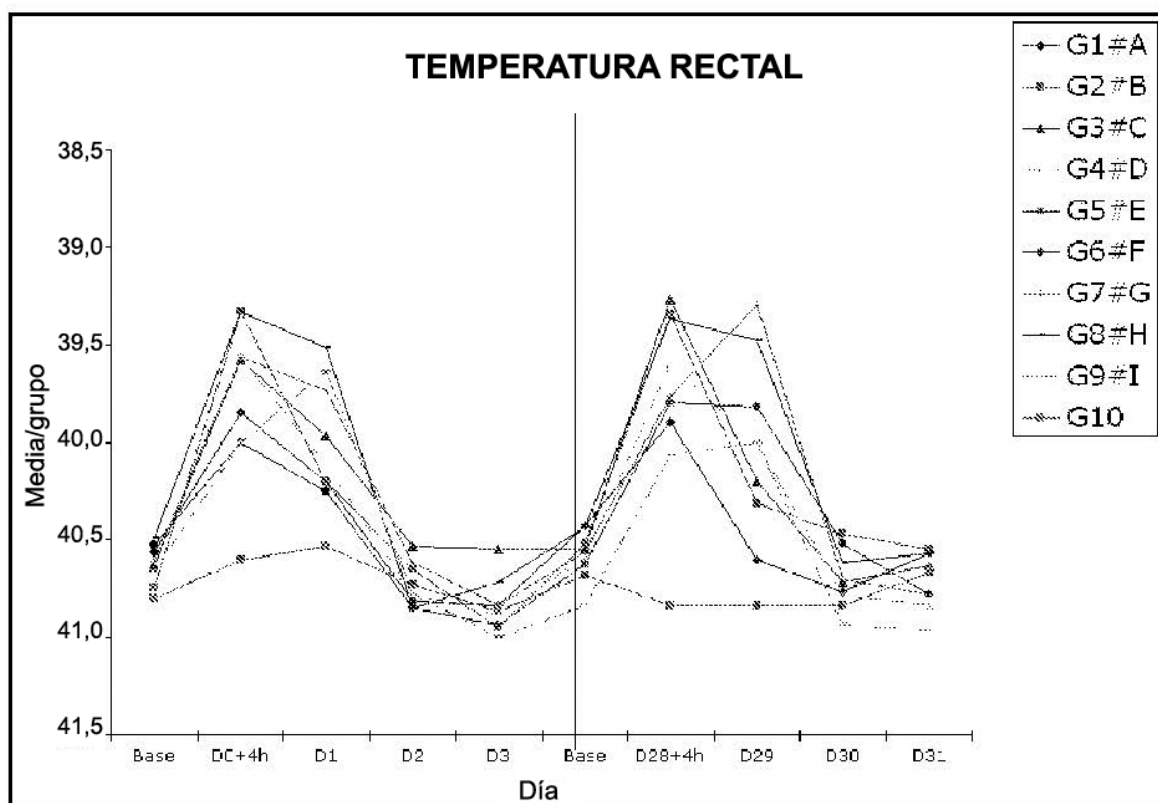


Figura 8

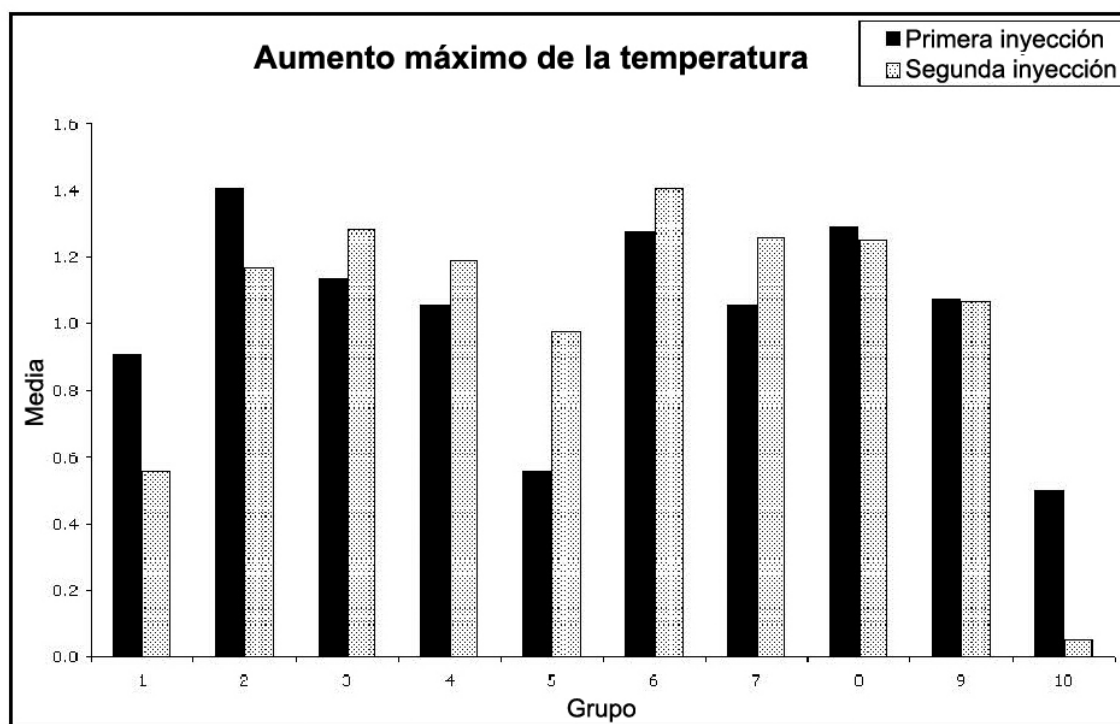


Figura 9

