

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 949**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/012** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2009 E 15197967 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3056214**

54 Título: **Composiciones adyuvantes novedosas**

30 Prioridad:

**27.06.2008 US 76232 P**

**24.04.2009 US 214557 P**

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

**29.10.2019**

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)**

**10 Sylvan Way**

**Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**BAGI, MARTIN CEDO;**

**YANCY, ROBERT J.;**

**ZHANG, SHUCHENG;**

**WEERATNA, RISINI DHAMMIKA;**

**THOMPSON, JAMES RICHARD;**

**DOMINOWSKI, PAUL J.;**

**MANNAN, RAMASAMY;**

**KREBS, RICHARD LEE;**

**CHILDERS, TEDD A. y**

**OLSEN, MARY KATHRYN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 728 949 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

Composiciones adyuvantes novedosas

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere, en general, a formulaciones adyuvantes novedosas para potenciar la respuesta inmunitaria a antígenos para usar en composiciones inmunógenas y de vacunas, sin producir efectos secundarios tóxicos o indeseables en el sujeto. La presente invención también se refiere al uso de la formulación adyuvante en composiciones de vacunas.

**Antecedentes y descripción de la técnica relacionada**

- 10 Las infecciones bacterianas, víricas y parasitarias están muy extendidas entre los seres humanos y los animales. Las enfermedades provocadas por estos agentes infecciosos a menudo son resistentes a la terapia farmacéutica antimicrobiana, no dejando así ningún medio eficaz de tratamiento. En consecuencia, cada vez se usa más una estrategia de vacunación para controlar la enfermedad infecciosa. Un patógeno infeccioso entero puede hacerse adecuado para usar en una formulación de vacuna después de inactivación química o de una manipulación genética apropiada. De forma alternativa, puede expresarse una subunidad proteínica del patógeno en un sistema de expresión recombinante y purificarse para usar en una formulación de vacuna. Las vacunas pueden hacerse más eficaces incluyendo un adyuvante apropiado en la composición.

- También hay cada vez un mayor interés en el uso de una estrategia de vacunación para tratar el cáncer en los animales y en los seres humanos. Esta estrategia terapéutica al tratamiento del cáncer supone vacunar a los pacientes de cáncer con una vacuna que comprende un antígeno específico de tumor y un adyuvante. Sin embargo, ninguna de las muchas vacunas contra el cáncer de esta naturaleza que se están desarrollando ha sido autorizada por las autoridades reguladoras. No se ha demostrado que las vacunas reduzcan los tumores, una medida estándar de una eficacia de los fármacos contra el cáncer.

- 25 El término 'adyuvante' generalmente se refiere a cualquier material que aumente la respuesta inmunitaria humoral o celular contra un antígeno. Se usan adyuvantes para lograr dos objetivos: muestran ralentizar la liberación de los antígenos a partir del sitio de inyección y estimulan el sistema inmunitario. Las vacunas tradicionales generalmente están compuestas por una preparación en bruto de microorganismos patógenos inactivados o muertos o vivos modificados. Las impurezas asociadas a estos cultivos de microorganismos patológicos pueden actuar como adyuvante para potenciar la respuesta inmunitaria. Sin embargo, la inmunidad que suscitan las vacunas que usan preparaciones homogéneas de microorganismos patógenos o subunidades proteínicas purificadas como antígenos a menudo es deficiente. Por lo tanto se hace necesaria la adición de ciertos materiales exógenos tales como un adyuvante. Además, la producción de las vacunas sintéticas y de subunidades es cara. La adición de un adyuvante puede permitir el uso de una menor dosis de antígeno para estimular una respuesta inmunitaria similar, reduciendo así el coste de producción de la vacuna. Así, cuando el agente se combina con un adyuvante puede aumentarse significativamente la eficacia de algunos agentes medicinales inyectables.

- 40 Deben considerarse muchos factores en la selección de un adyuvante. Un adyuvante debería provocar una relativamente lenta velocidad de liberación y de absorción del antígeno de forma eficaz con efectos indeseables mínimos de toxicidad, alergias, irritaciones y otros efectos indeseables en el huésped. Para que sea deseable, un adyuvante debería no ser viricida, ser biodegradable, ser capaz de crear de forma consistente un nivel de inmunidad alto, ser capaz de estimular una protección cruzada, ser compatible con antígenos múltiples, ser eficaz con múltiples especies, no ser tóxico y ser seguro para el huésped (por ejemplo, no provocar reacciones en el sitio de la inyección). Otras características deseables de un adyuvante son que pueda dosificarse en microdosis, que consiga ahorrar dosis, que tenga una excelente estabilidad en depósito, que pueda secarse, que pueda prepararse sin aceite, que pueda existir bien como un sólido o bien como un líquido, que sea isotónico, que pueda fabricarse fácilmente y que sea barato de producir. Finalmente, es muy deseable que un adyuvante pueda configurarse de forma que induzca bien una respuesta inmunitaria humoral o bien una respuesta inmunitaria celular o bien ambas, dependiendo de las necesidades de la situación de vacunación. Sin embargo, el número de adyuvantes que cumplen los requisitos anteriores es limitado.

- 50 La elección de un adyuvante depende de las necesidades de la vacuna, ya sea aumentar la magnitud o la función de la respuesta de anticuerpos, un aumento en la respuesta inmunitaria mediada por células, una inducción de la inmunidad en las mucosas o una reducción de la dosis de antígeno. Se ha presentado un número de adyuvantes, sin embargo, ninguno ha demostrado ser totalmente adecuado para todas las vacunas. El primer adyuvante que se reseñó en la bibliografía fue el adyuvante completo de Freund (FCA) que contiene una emulsión de agua en aceite y extractos de Mycobacterium. Desafortunadamente, el FCA se tolera mal y puede provocar una inflamación incontrolada. Desde el descubrimiento del FCA hace más de 80 años se han estado realizando tentativas de reducir los efectos secundarios indeseados de los adyuvantes.

Algunos otros materiales que se han usado como adyuvantes incluyen óxidos metálicos (por ejemplo, hidróxido de

aluminio), alumbre, quelatos inorgánicos de sales, gelatinas, diversos aceites de tipo parafina, resinas sintetizadas, alginatos, compuestos mucoides y polisacáridos, caseinatos y sustancias hemoderivadas como por ejemplo coágulos de fibrina. Aunque estos materiales son generalmente eficaces en la estimulación del sistema inmunitario, no se ha encontrado ninguno que sea totalmente satisfactorio debido a los efectos adversos en el huésped (por ejemplo, producción de abscesos estériles, daños a los órganos, capacidad carcinógena o respuestas alérgicas) o propiedades farmacéuticas indeseables (por ejemplo, dispersión rápida o control deficiente de la dispersión a partir del sitio de la inyección, o hinchazón del material).

Se han usado aceites sintetizados y derivados de petróleo como adyuvantes porque muestran una dispersión relativamente lenta en el cuerpo, pero pueden ser indeseables ya que con frecuencia se descomponen en hidrocarburos aromáticos, que pueden ser carcinógenos. Además, se ha encontrado que algunas de estas sustancias pueden producir abscesos estériles y pueden no eliminarse nunca completamente del cuerpo. Los aceites cuando se seleccionan y se formulan de forma apropiada a concentraciones apropiadas pueden ser relativamente seguros y no tóxicos.

Las saponinas obtenidas de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* se han usado como adyuvantes durante algún tiempo. Véase Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol. 2 páginas 363-386. 1996). Muchas de las vacunas veterinarias que se usan hoy en día contienen Quil A, que es la fracción de saponinas de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria molina*. El fraccionamiento adicional de Quil A ha proporcionado sub-fracciones, que incluyen QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21. (Véase la patente de Estados Unidos N.º: 5.057.540).

El uso de las saponinas como adyuvantes está asociado a un número de desventajas. Las saponinas son solubles y así estimulan una respuesta inmunitaria no específica. El objetivo de la vacunación, sin embargo, es estimular una respuesta dirigida contra un antígeno o antígenos específicos. Las saponinas tienen una gran afinidad por el colesterol. Forman un complejo con el colesterol que se encuentra en las membranas celulares provocando la hemólisis de la célula. También se ha demostrado que provocan necrosis en el sitio de la inyección y que es difícil formularlas en forma de estructuras particuladas. Cuando se usan en las vacunas que contienen virus con cubierta vivos, las saponinas alteran la cubierta vírica y así inactivan los antígenos víricos.

Para superar las propiedades hemolíticas y viricidas de Quil A, ello se ha combinado con colesterol y fosfolípidos, que forman una estructura específica conocida como complejo inmunoestimulador (ISCOM) o matriz ISCOM (ISCOMATRIX). Véase Ozel M., et al.; J. Ultrastruc. and Molec. Struc. Re 102, 240-248 (1989). Los ISCOM, cuando se combinan con un antígeno, generalmente inducen una respuesta de linfocitos T citotóxicos Th1. Sin embargo, aunque reduce mucho las propiedades hemolíticas de Quil A, la combinación de Quil A con colesterol no las elimina completamente. Otra limitación de los ISCOM es que un antígeno proteínico debe tener dominios hidrófobos lo suficientemente grandes como para interactuar con el ISCOM para que sea incorporado al ISCOM. Una proteína que es muy hidrófila no puede incorporarse en un ISCOM. Finalmente, los ISCOM pueden estimular una reacción autoinmunitaria indeseable en el sujeto.

Se han usado inmunomoduladores como adyuvantes y los ejemplos incluyen bromuro de dimetildioctadecilamonio (en lo sucesivo denominado, "DDA") y avidina. El DDA es un compuesto de amonio cuaternario lipófilo (amina) con dos cadenas alquílicas de 18 carbonos y dos grupos metilo unidos a una molécula de amonio cuaternaria con carga positiva con un peso molecular de 631. Su uso como adyuvante fue descubierto por Gall, (Immunol. V. 11, página 369, 1966). Se ha reseñado que el DDA estimula respuestas inmunitarias mediadas por células potentes y también se ha demostrado que induce respuestas inmunitarias humorales. Se han publicado muchos trabajos que muestran la eficacia del DDA como adyuvante para los antígenos proteínicos, haptenos, tumores, virus, protozoos y bacterias. (Véase Korsholm, K S., et al., Immunology, vol. 121, páginas 216-226, 2007). La mayoría de los estudios se han realizado con animales de laboratorio, mientras que solo unos pocos se han realizado en animales más grandes como por ejemplo pollos (Véase Katz, D., et al. FEMS Immunol Med Microbiol. Vol 7(4):303-313, 1993.), cerdos y ganado vacuno. El DDA es eficaz para inducir una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) tanto en animales de laboratorio como en animales más grandes. Sin embargo, es deficientemente soluble en agua.

También se han usado polímeros como adyuvantes, con ejemplos que incluyen dietil-aminoetil (DEAE)-dextrano, polietilenglicol y poli(ácido acrílico) (por ejemplo, CARBOPOL®). El polisacárido DEAE-dextrano se conoce en la técnica como un adyuvante muy potente. Sin embargo, se ha asociado a una capacidad reactogénica inaceptable. Los polímeros de CARBOPOL® son polímeros de ácido acrílico reticulados con éteres de polialquenoil o divinilglicol. El CARBOPOL® se ha usado en un número de vacunas, pero su uso como un adyuvante no se ha demostrado.

Se ha demostrado que algunos adyuvantes estimulan una respuesta Th2, con ejemplos que incluyen hidroacetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida, también conocido con el nombre comercial Bay R1005® cuando está en forma de acetato y aluminio. El Bay R1005® combinado con vacunas de virus purificados o vacunas de subunidades provoca una mayor producción de anticuerpos en ratones expuestos a virus. Los ensayos preclínicos en otras especies de animales (cerdo, oveja, caballo) proporcionaron resultados comparables con respecto a la producción de anticuerpos. El aumento de la síntesis de anticuerpos que indujo el Bay R1005® es dependiente específicamente del antígeno y no es el resultado de la estimulación policlonal.

El documento US 2005/220814 divulga el uso de formulaciones microfluidizadas que contienen formulación AMPHIGEN®, Quil A, colesterol, GPI-0100 y DDA y diversos polímeros. Los antígenos contenidos en estas formulaciones son estables. Pueden incorporarse adicionalmente carbopol y/o polímeros. La formulación puede adaptarse para la administración de antígenos veterinarios. El documento EP0024541 divulga el virus de la leucemia felina y vacunas contra el virus. Ñas vacunas descritas en la publicación pueden adyuvantarse con aluminio o adyuvante incompleto de Freund. El documento WO93/14190 también divulga el virus de la leucemia felina y vacunas contra el virus, incluyendo vacunas de subunidades y vacunas de células enteras. También se divulgan adyuvantes tales como Quil A e hidróxido de aluminio. El documento WO2007089753 divulga un subtipo H5 del virus de la gripe aviar, anticuerpos de unión al mismo y vacunas contra el virus. Las vacunas pueden adyuvantarse con el adyuvante completo de Freund, MPL-TDM (monofosforil lípido A en combinación con dicorinomicolato de trehalosa) y adyuvantes basados en aluminio. Aucouturier y col., Vaccine 19 (17-19):2666-2772 (2001) desvela emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua para su uso en vacunas veterinarias. El documento US 4.426.587 divulga

Ninguno de estos documentos divulga específicamente la composición reivindicada en el presente documento.

Antes de esta invención, ninguna formulación de adyuvante poseía el amplio abanico de características deseables que un adyuvante ideal debería tener. Se ha realizado un esfuerzo para encontrar nuevos adyuvantes para vacunas que superaran las deficiencias de las convencionales. En particular, es muy deseable una formulación de adyuvante que provoque respuestas inmunitarias mediadas por células y respuestas inmunitarias humorales potentes contra una amplia variedad de antígenos en seres humanos y animales, que sin embargo carezca de los efectos secundarios y de las dificultades de formulación de los adyuvantes convencionales.

## 20 **Sumario de la invención**

Esta invención se refiere a composiciones para su uso como una vacuna que comprende formulaciones adyuvantes novedosas. En particular, las formulaciones adyuvantes comprenden estimuladores de Th1, inmunomoduladores, polímeros y estimuladores de Th2. Esta invención se refiere a composiciones para su uso como una vacuna que comprenden dichas formulaciones adyuvantes y uno o más antígenos. También se divulgan en el presente documento procedimientos para preparar las composiciones adyuvantes y de vacunas.

En consecuencia, se proporciona en el presente documento una composición para su uso como una vacuna que comprende una formulación adyuvante y una cantidad terapéuticamente eficaz de un componente antigénico, en la que

- a) la formulación adyuvante comprende Quil A o una fracción purificada de la misma, un esteroles, bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA) y un polímero de ácido poliacrílico; y
- b) el componente antigénico comprende un antígeno del FeLV (Virus de la leucemia felina) que comprende la proteína gp70 de FeLV o el virus FeLV o un antígeno de la gripe aviar que comprende el virus de la gripe aviar o una proteína H5 de la gripe aviar.

Las composiciones adyuvantes comprenden una combinación de una saponina, un esteroles, un compuesto de amonio cuaternario y un polímero, por ejemplo, la combinación adyuvante es Quil A, colesterol, DDA y ácido poliacrílico.

35 Alternativamente, las composiciones adyuvantes comprenden una combinación de una saponina, un esteroles, un compuesto de amonio cuaternario, un polímero y un glucolípidos, por ejemplo, la combinación adyuvante es Quil A, colesterol, DDA, poli(ácido acrílico) y Bay R1005®.

Se prepara una composición inmunógena que comprende una formulación de adyuvante y una cantidad inmunológicamente eficaz de un antígeno, en la que la formulación de adyuvante comprende una saponina, un esteroles, un compuesto de amonio cuaternario y un polímero mediante el procedimiento que comprende

- a) preparar una composición del componente antigénico en un tampón;
- b) añadir la saponina a la composición de la etapa a;
- c) añadir el esteroles a la composición de la etapa b;
- d) añadir el compuesto de amonio cuaternario a la composición de la etapa c,
- e) añadir el polímero a la composición de la etapa d.

En un ejemplo de este procedimiento, la saponina es Quil A, el esteroles es colesterol, el compuesto de amonio cuaternario es DDA y el polímero es poli(ácido acrílico).

Se prepara una vacuna que comprende una formulación de adyuvante y una cantidad inmunológicamente eficaz de un antígeno, en la que la formulación de adyuvante comprende una saponina, un esteroles, un compuesto de amonio cuaternario, un polímero y un glucolípidos mediante el procedimiento que comprende

- a) preparar una composición del componente antigénico en un tampón;
- b) añadir la saponina a la composición de la etapa a;
- c) añadir el esteroles a la composición de la etapa b;
- d) añadir el compuesto de amonio cuaternario a la composición de la etapa c,
- e) añadir el polímero a la composición de la etapa d y

f) añadir el glucolípido a la composición de la etapa e.

En un ejemplo de este procedimiento, la saponina es Quil A, el esteroles es colesterol, el compuesto de amonio cuaternario es DDA, el polímero es poli(ácido acrílico) y el glucolípido es Bay R1005®.

5 Se ha encontrado que las composiciones adyuvantes que se reseñan en el presente documento tienen propiedades sorprendentes e inesperadas superiores a las que se podrían esperar de una combinación tal. Se ha descubierto sorprendentemente que la propiedad viricida de Quil A/colesterol se elimina en estas composiciones adyuvantes. Son adecuadas como diluyentes para antígenos víricos vivos modificados liofilizados. Las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento pueden configurarse para que provoquen una respuesta inmunitaria extremadamente potente dirigida bien a una respuesta inmunitaria mediada por células, bien a una respuesta  
10 inmunitaria humoral, o bien a ambas. Además, pueden evitarse en gran medida las reacciones en el sitio de la inyección usando estas formulaciones adyuvantes. La capacidad reactógena es menor que la de varios de los componentes individuales que comprenden las combinaciones adyuvantes. Además, estas formulaciones adyuvantes proporcionan una capacidad de almacenamiento a largo plazo.

15 Estas composiciones adyuvantes novedosas son muy inmunógenas cuando se combinan con uno o más de un número de antígenos diferentes de una gran variedad de especies. Pueden usarse con uno o más antígenos víricos, bacterianos, parasitarios, de proteínas recombinantes y de péptidos sintéticos y sus combinaciones. Las composiciones adyuvantes de vacunas novedosas pueden usarse en vacunas terapéuticas para tratar el cáncer.

20 Las composiciones para su uso para tratar una enfermedad como se divulga en el presente documento como su uso para preparar un medicamento para tratar a un sujeto contra una enfermedad, en particular contra enfermedades que se describen a continuación. También se proporciona su uso para preparar un medicamento para evitar o reducir una enfermedad en un sujeto

También se divulga en el presente documento su uso para preparar un medicamento para tratar a un felino contra la infección provocada por el virus de leucemia felina, para tratar un ave contra coccidiosis aviar, para tratar a un bóvido  
25 contra enfermedades provocadas por *Escherichia coli*, para tratar un bóvido contra enfermedades provocadas por el virus de la diarrea vírica bovina, para tratar un cerdo contra enfermedades provocadas por *Mycoplasma hyopneumonia*, para tratar un felino contra enfermedades provocadas por el virus de la gripe felina, a un sujeto contra cáncer, para tratar un cánido contra enfermedades provocadas por coronavirus canino, para tratar un bóvido contra enfermedades provocadas por rotavirus bovino y para tratar un cánido contra enfermedades provocadas por el virus de la gripe canina. También se divulga en el presente documento el uso de adyuvantes como una vacuna marcadora  
30 para ayudar a la identificación de animales que han sido vacunados. También se divulga el uso de CpG para potenciar los efectos de los adyuvantes.

### **Breve descripción de la figura**

35 La Figura 1 representa un gel de un ensayo de radioinmunoprecipitación que muestra las diferencias en el perfil de anticuerpos entre las proteínas NS2/3 y las proteínas E2 del Virus BVD. El grupo tratado con PreZent A muestra una respuesta de anticuerpos tanto contra las proteínas NS2/3 como contra las proteínas E2 mientras que los grupos tratados con QCDC y QCDCR demostraron una respuesta de anticuerpos solo contra la proteína E2 y no contra las proteínas NS2/3.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Definiciones**

40 "Alrededor de" o "aproximadamente", cuando se usa referido a una variable numérica cuantificable, se refiere al valor de la variable que se indica y a todos los valores de la variable que están dentro del intervalo de error experimental del valor que se indica (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95 % para la media) o dentro del 10 por ciento del valor que se indica, el que sea mayor, a no ser que se use aproximadamente para hacer referencia a intervalos de tiempo en semanas en los que "aproximadamente 3 semanas," es de 17 a 25 días y de aproximadamente  
45 2 a aproximadamente 4 semanas es de 10 a 40 días.

"Adyuvante" quiere decir cualquier sustancia que aumente la respuesta inmunitaria humoral o celular contra un antígeno. Los adyuvantes se usan generalmente para lograr dos objetivos: la ralentización de la liberación de los antígenos a partir del sitio de inyección y la estimulación del sistema inmunitario.

50 "Alquilo" se refiere a restos hidrocarburo saturados tanto lineales como ramificados. "Amina" se refiere a un compuesto químico que contiene nitrógeno. Las aminas son un grupo de compuestos que se derivan de amoniaco sustituyendo por grupos hidrocarburo los átomos de hidrógeno. "Amina cuaternaria" se refiere a un compuesto con base de amonio con cuatro grupos hidrocarburo.

55 "Anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse a un antígeno específico como resultado de una respuesta inmunitaria contra ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas serosas compuestas por cadenas polipeptídicas "ligera" y "pesada" que tienen regiones "constantes" y "variables" y se dividen en clases (por

ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) en base a la composición de las regiones constantes.

5 “Antígeno” o “inmunógeno” se refiere a cualquier sustancia que estimula una respuesta inmunitaria. El término incluye bacterias, virus, o parásitos muertos, inactivados, atenuados o vivos modificados. El término antígeno también incluye polinucleótidos, polipéptidos, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, extracto de proteínas, células (que incluyen células tumorales), tejidos, polisacáridos, o lípidos, o sus fragmentos, de forma individual o en cualquier combinación de los mismos. El término antígeno también incluye anticuerpos, como por ejemplo anticuerpos contra idiotipo o sus fragmentos y a mimótopos peptídicos sintéticos que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico (epítipo).

“Bacterina” quiere decir una suspensión de una o más bacterias muertas que puede usarse como componente de una vacuna o composición inmunógena.

10 “Tampón” quiere decir un sistema químico que evita el cambio en la concentración de otra sustancia química, por ejemplo, los sistemas donantes y receptores de protones sirven de tampones que evitan cambios marcados en la concentración de iones de hidrógeno (pH). Un ejemplo adicional de un tampón es una solución que contiene una mezcla de un ácido débil y su sal (base conjugada) o una base libre y su sal (ácido conjugado).

15 “Respuesta inmunitaria celular” o “respuesta inmunitaria mediada por células” es una mediada por linfocitos T u otros leucocitos o ambos e incluye la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas similares producidas por linfocitos T, leucocitos o ambos.

“Colesterol” se refiere a una sustancia cristalina blanca con la fórmula química de  $C_{27}H_{45}OH$ . Es un alcohol hidrocarburo cíclico, que se clasifica como lípido. Es insoluble en agua pero soluble en un número de disolventes orgánicos.

20 “Hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)” se refiere a una respuesta inflamatoria que se desarrolla de 24 a 72 horas después de la exposición a un antígeno que el sistema inmunitario reconoce como exógeno. Este tipo de respuesta inmunitaria implica principalmente a los linfocitos T más que a los anticuerpos (que son producidos por los linfocitos B).

25 “Dosis” se refiere a una vacuna o composición inmunógena administrada a un sujeto. Una “primera dosis” o “vacuna de sensibilización” se refiere a la dosis de una composición así administrada el día 0. Una “segunda dosis” o una “tercera dosis” o una “dosis anual” se refiere a una cantidad de dicha composición administrada posterior a la primera dosis, que puede ser o no la misma vacuna o composición inmunógena que la primera dosis.

“Emulsionante” quiere decir una sustancia que se usa para preparar una emulsión más estable.

30 “Emulsión” quiere decir una composición de dos líquidos no miscibles en la que pequeñas gotitas de un líquido se suspenden en una fase continua de otro líquido.

“Ésteres” se refiere a cualquiera de una clase de compuestos orgánicos que corresponden a las sales inorgánicas, que se forman a partir de una reacción de condensación en la que una molécula de un ácido orgánico se une a una molécula de alcohol con eliminación de una molécula de agua.

“Excipiente” se refiere a cualquier componente de una vacuna que no es un antígeno.

35 “Homogenización” se refiere a un procedimiento de mezclar uno o más componentes, ya sea similar o no similar, en forma de una mezcla uniforme.

“Respuesta inmunitaria humoral” se refiere a una que es mediada por anticuerpos.

“Hidrófobo” quiere decir insoluble en agua, que no absorbe humedad fácilmente, o que se ve afectado adversamente por el agua; ya sea incompatible con el agua o que tiene poca afinidad por ella.

40 “Respuesta inmunitaria” en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular, o una respuesta inmunitaria humoral y un célula contra un antígeno. Las respuestas inmunitarias habitualmente pueden determinarse usando inmunoensayos y ensayos de neutralización, que son conocidos en la técnica.

45 Una “cantidad inmunológicamente protectora” o “cantidad inmunológicamente eficaz” o “cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria” de un antígeno es una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunógena en el receptor. La respuesta inmunógena puede ser suficiente para fines de diagnóstico u otras pruebas, o puede ser adecuada para evitar signos o síntomas de enfermedad, que incluyen efectos sobre la salud adversos o sus complicaciones, provocados por la infección con un agente de enfermedad. Puede inducirse una inmunidad humoral o una inmunidad mediada por células o ambas. La respuesta inmunógena de un animal a una composición  
50 inmunógena puede evaluarse, por ejemplo, de forma indirecta midiendo las valoraciones de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través de los signos y síntomas de control después de la exposición a una cepa de tipo silvestre, mientras que la inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción de los signos clínicos, tales como mortalidad, morbilidad, número de temperatura, estado físico

global y salud global y respuesta del sujeto. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, inducción de inmunidad celular y/o humoral.

“Inmunógeno” quiere decir que provoca una respuesta inmunitaria o antigénica. Así una composición inmunógena sería cualquier composición que induce una respuesta inmunitaria.

5 “Complejo inmunoestimulador” o ISCOM se refiere a una estructura específica que se forma cuando Quil A se combina con colesterol y fosfolípidos.

“Molécula inmunoestimuladora” se refiere a una molécula que genera una respuesta inmunitaria.

10 “Lípidos” se refiere a cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos, que incluyen las grasas, aceites, ceras, esteroides y triglicéridos que son insolubles en agua pero son solubles en disolventes orgánicos no polares, son oleosos al tacto y junto con los carbohidratos y las proteínas constituyen el material estructural principal de las células vivas.

“Lipófilo” quiere decir que muestra una marcada atracción a, o solubilidad en, los lípidos.

“Liposoma” se refiere a una partícula esférica microscópica formada por una bicapa lipídica que incluye un compartimiento acuoso, que se usa en medicina para portar un fármaco, antígeno, vacuna, enzima, u otra sustancia a células diana del cuerpo.

15 “Agente medicinal” se refiere a cualquier agente que es útil en la prevención, cura, o mejora de una enfermedad, o en la prevención de alguna afección o suceso fisiológico.

“Administración parenteral” se refiere a la introducción de una sustancia, como por ejemplo una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante una vía que no incluye el tubo digestivo. La administración parenteral incluye administración subcutánea, intramuscular, transcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraocular e intravenosa.

20 “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a sustancias, que según el criterio médico informado, son adecuadas para usar en contacto con los tejidos de sujetos sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, que se corresponde con una relación razonable entre beneficio y riesgo y eficaz para el uso que se pretenda.

25 “Capacidad reactógena” se refiere a los efectos secundarios provocados en un sujeto como respuesta a la administración de un adyuvante, un inmunógeno, o una composición de vacuna. Puede ocurrir en el sitio de administración y habitualmente se evalúa en términos de desarrollo de un número de síntomas. Estos síntomas pueden incluir inflamación, enrojecimiento y abceso. También se evalúa en términos de ocurrencia, duración y gravedad. Una reacción “baja”, por ejemplo, supondría inflamación que solo puede detectarse por palpación y no a simple vista o que sería de duración corta. Una reacción más grave sería, por ejemplo, una que sea visible a simple vista o que sea de mayor duración.

30 “Temperatura ambiente” quiere decir una temperatura de 18 a 25 °C.

“Saponina” se refiere a un grupo de glucósidos tensioactivos de origen vegetal compuestos por una región hidrófila (habitualmente de varias cadenas de azúcares) asociada a una región hidrófoba bien de estructura esteroide o bien de estructura triterpenoide.

35 “Esteroides” se refiere a cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos que pertenecen a una clase bioquímica de lípidos, que son fácilmente solubles en disolventes orgánicos y ligeramente solubles en agua. Los esteroides comprenden un sistema de cuatro anillos condensados de tres anillos de ciclohexano (de seis carbonos) condensados más un cuarto anillo de ciclopentano (cinco carbonos).

40 “Esteroides” se refiere a compuestos en animales que se producen biológicamente a partir de precursores de terpenoides. Comprenden una estructura de anillos de esteroides, que tienen un grupo hidroxilo (OH), habitualmente unido al carbono-3. La cadena de hidrocarburo del sustituyente de ácidos grasos varía en longitud, habitualmente de 16 a 20 átomos de carbono y puede ser saturada o insaturada. Los esteroides habitualmente contienen uno o más enlaces dobles en la estructura de anillos y también una variedad de sustituyentes unidos a los anillos. Los esteroides y sus ésteres de ácidos grasos son esencialmente insolubles en agua.

45 “Sujeto” se refiere a cualquier animal para el que se desee la administración de una composición adyuvante. Incluye mamíferos y no mamíferos, que incluyen primates, ganado, animales de compañía, animales de laboratorio, animales salvajes cautivos, aves (incluidos los huevos), reptiles y peces. Así, este término incluye pero sin limitación monos, seres humanos, cerdos, ganado vacuno, ovejas, cabras, equinos, ratones, ratas, cobayas, hámsters, conejos, felinos, cánidos, pollos, pavos, patos, otras aves de corral, ranas y lagartijas.

50 “DOCT<sub>50</sub>” se refiere a “dosis de infección de cultivo tisular” y se define como aquella dilución de un virus necesaria para infectar el 50 % de un lote dado de cultivos celulares inoculados. Pueden usarse diversos procedimientos para calcular la DOCT<sub>50</sub>, incluyendo el procedimiento de Spearman-Kärber que se utiliza en toda esta memoria descriptiva. Para una descripción del procedimiento de Spearman-Kärber, Véase B.W. Mahy & H.O. Kangro, *Virology Methods Manual*, páginas 25-46 (1996).

5 “Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un antígeno o vacuna que induciría una respuesta inmunitaria en un sujeto que recibe el antígeno o vacuna que es adecuada para evitar o reducir los signos o síntomas de enfermedad, que incluyen efectos adversos sobre la salud o sus complicaciones, provocadas por la infección con un patógeno, como por ejemplo un virus o una bacteria. Puede inducirse inmunidad humoral o inmunidad mediada por células o tanto inmunidad humoral como inmunidad mediada por células. La respuesta inmunógena de un animal a una vacuna puede evaluarse, por ejemplo, indirectamente midiendo las valoraciones de anticuerpos, los ensayos de proliferación de linfocitos o directamente controlando los signos y síntomas después de la exposición a una cepa de tipo silvestre. La inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción de los signos clínicos como por ejemplo mortalidad, morbilidad, número de temperatura, estado físico global y salud general y respuesta del sujeto. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del adyuvante particular que se use, del antígeno particular que se use, o del estado del sujeto y puede ser determinado por un experto en la técnica.

10 “Tratar” se refiere a evitar un trastorno, afección o enfermedad al que se aplique dicho término, o evitar o reducir uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

15 “Tratamiento” se refiere al acto de “tratar” según se define anteriormente.

“Triterpenoides” se refiere a una clase grande y diversa de moléculas orgánicas naturales, derivadas de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) de cinco carbonos, que pueden ensamblarse y modificarse de miles de formas. La mayoría son estructuras multicíclicas que difieren entre sí por los grupos funcionales y en sus esqueletos de carbonos básicos. Estas moléculas pueden encontrarse en todas las clases de organismos vivos.

20 “Vacuna” se refiere a una composición que incluye un antígeno, según se define en el presente documento. La administración de la vacuna a un sujeto provoca una respuesta inmunitaria, generalmente contra una o más enfermedades específicas. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del antígeno particular que se use, o del estado del sujeto y puede ser determinada por un experto en la técnica.

### **COMPONENTES DE LAS COMPOSICIONES**

#### **25 Triterpenoides y CpG**

Los triterpenoides adecuados para usar en las composiciones adyuvantes pueden provenir de muchas fuentes, ya sean derivados vegetales o equivalentes sintéticos, que incluyen pero sin limitación, *Quillaja saponaria*, tomatina, extractos de ginseng, champiñones y un glucósido de alcaloide estructuralmente similar a las saponinas esteroideas. Así, los triterpenoides adecuados para usar en las composiciones adyuvantes incluyen saponinas, escualeno y lanosterol. La cantidad de triterpenoides adecuada para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza del triterpenoide que se use. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 µg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 4.000 µg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3.000 µg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2.000 µg por dosis y de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1.000 µg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 750 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 200 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 100 µg por dosis y en una cantidad de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 75 µg por dosis.

40 Si se usa una saponina, las composiciones adyuvantes generalmente contienen una fracción de saponina inmunológicamente activa de la corteza de *Quillaja saponaria*. La saponina puede ser, por ejemplo, Quil A u otra preparación de saponinas purificada o parcialmente purificada que puede obtenerse comercialmente. Así, pueden usarse extractos de saponina como mezclas o componentes individuales purificados como por ejemplo QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21. En una realización la Quil A tiene una pureza de al menos 85 %. En otras realizaciones, la Quil A tiene una pureza de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %.

45 Los ODN con CpG son una clase de agentes farmacoterapéuticos recientemente descritos que se caracterizan por la presencia de un dinucleótido CG no metilado en contextos específicos de secuencias de bases (motivo CpG). (Hansel TT, Barnes PJ (editores): *New Drugs for Asthma, Allergy y COPD*. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2001, vol 31, páginas 229-232, que se incorpora al presente documento por referencia). Estos motivos CpG no se observan en el ADN eucariota, en el que los dinucleótidos CG están suprimidos y cuando están presentes, habitualmente están metilados, pero están presentes en el ADN bacteriano al que confieren propiedades inmunoestimuladoras. Estas propiedades inmunoestimuladoras incluyen inducción de una respuesta de tipo Th1 con liberación prominente de IFN-Á, IL-12 e IL-18. Los ODN con CpG (18-24 pb de longitud) poseen propiedades inmunomoduladoras similares al ADN bacteriano. Las proteínas de la superficie celular pueden captar estas moléculas con resultados variables. Sin embargo, con un vehículo como por ejemplo QCDC, QCDCR y otras combinaciones que se citan en esta patente, se potencian significativamente las propiedades de inmunomodulación y de captación de CpG.

55 La cantidad de CpG para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza de los CpG que se usen y de las especies que se pretendan. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a

aproximadamente 20 mg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 4 mg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3 mg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg por dosis y de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 750 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 200 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, de 10 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 100 µg por dosis y en una cantidad de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 75 µg por dosis.

## 10 **Esteroles**

Los esteroides adecuados para usar en las composiciones adyuvantes incluyen β-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. Estos esteroides son notorios en la técnica y pueden comprarse comercialmente. Por ejemplo el colesterol se describe en The Merck Index, 12ª Ed., página 369. La cantidad de esteroides adecuada para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza del esteroide que se use. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 µg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 4.000 µg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3.000 µg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2.000 µg por dosis y de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1.000 µg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 750 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 200 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 100 µg por dosis y de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 75 µg por dosis.

## **Inmunomoduladores**

Las composiciones adyuvantes además pueden incluir uno o más agentes inmunomoduladores como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario (por ejemplo, DDA) e interleucinas, interferones, u otras citocinas. Estos materiales pueden comprarse comercialmente. La cantidad de inmunomodulador adecuado para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza del inmunomodulador que se use y del sujeto. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 µg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 4.000 µg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3.000 µg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2.000 µg por dosis y de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1.000 µg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 750 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 200 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 100 µg por dosis y en una cantidad de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 75 µg por dosis. Como ejemplo específico, las composiciones adyuvantes que contienen DDA pueden prepararse simplemente mezclando una solución antigénica con una solución preparada recientemente de DDA.

## **Polímeros**

Las composiciones adyuvantes además pueden incluir uno o más polímeros tales como, por ejemplo, DEAE Dextrano, polietilenglicol y poli(ácido acrílico) y poli(ácido metacrílico) (por ejemplo, CARBOPOL®). Dicho material puede comprarse comercialmente. La cantidad de polímeros adecuada para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza de los polímeros que se usen. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % en volumen por volumen (v/v) a aproximadamente 75 % v/v. En otras realizaciones, se usan en una cantidad de aproximadamente 0,001 % v/v a aproximadamente 50 % v/v, de aproximadamente 0,005 % v/v a aproximadamente 25 % v/v, de aproximadamente 0,01 % v/v a aproximadamente 10 % v/v, de aproximadamente 0,05 % v/v a aproximadamente 2 % v/v y de aproximadamente 0,1 % v/v a aproximadamente 0,75 % v/v. En otra realización, se usan en una cantidad de aproximadamente 0,02 v/v a aproximadamente 0,4 % v/v. Los DEAE-dextranos pueden tener un tamaño molecular en el intervalo de 50.000 Da a 5.000.000 Da, o pueden estar en el intervalo de 500.000 Da a 2.000.000 Da. Dicho material puede comprarse comercialmente o prepararse a partir de dextrano.

Otro ejemplo específico es poli(ácido acrílico) (por ejemplo, los polímeros CARBOPOL®), que tienen un peso equivalente ponderado de 76. Pueden producirse a partir de partículas de polímeros primarios de aproximadamente 0,2 a 6,0 micrómetros de diámetro medio. Los polímeros CARBOPOL® se hinchan en agua hasta 1000 veces su volumen original y diez veces su diámetro original formando un gel cuando se exponen a un entorno de pH superior al pKa del grupo carboxilato. A un pH superior al pKa del grupo carboxilato, los grupos carboxilato se ionizan provocando repulsión entre las cargas negativas, lo que se añade a la hinchazón del polímero.

## **Estimulantes de Th2**

Las composiciones adyuvantes pueden incluir además uno o más estimulantes de Th2 como por ejemplo, por ejemplo, Bay R1005® y aluminio. La cantidad de estimulantes de Th2 adecuada para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza del estimulante de Th2 que se use. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 10 mg por dosis. En otras realizaciones, se usan en una cantidad de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 7.5 mg por dosis, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg por dosis, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 2,5 mg por dosis y de 1 mg a aproximadamente 2 mg por dosis. Un ejemplo específico es Bay R1005®, un glucolípido con el nombre químico “acetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanamida”. Puede sintetizarse de acuerdo con el procedimiento que se encuentra en Lockhoff, O. (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1611-1620; 1991). Se recomienda almacenarlo a 2-8° C en un envase hermético. Sus propiedades químicas o físicas son que es ligeramente higroscópico, no forma polimorfos, es químicamente estable en aire y luz a temperaturas de hasta 50° C y en disolventes acuosos a pH 2-12 a temperatura ambiente. Es una molécula anfipática que forma micelas en solución acuosa.

### **Antígenos y enfermedades**

Las composiciones adyuvantes pueden contener uno o más antígenos. El antígeno puede ser cualquiera de una amplia diversidad de sustancias capaces de producir una respuesta inmunitaria deseada en un sujeto. Aunque Quil A por sí solo es viricida, Quil A se desintoxica con la adición de colesterol al formar micelas helicoidales (véase la patente de Estados Unidos número 7.122.191). Se ha encontrado que las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento no son viricidas, ni hemolíticas ni membranolíticas. Así, los antígenos que se usan con estas composiciones adyuvantes pueden ser uno o más de virus (inactivados, atenuados y vivos modificados), bacterias, parásitos, nucleótidos, polinucleótidos, péptidos, polipéptidos, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, extractos de proteínas, células (que incluyen células tumorales), tejidos, polisacáridos, carbohidratos, ácidos grasos, ácido teiúico, peptidoglucanos, lípidos o glucolípidos, individualmente o en cualquier combinación de los mismos.

Los antígenos que se usan con los adyuvantes también incluyen fragmentos inmunógenos de nucleótidos, polinucleótidos, péptidos, polipéptidos, que pueden aislarse de los organismos a los que se hace referencia en el presente documento.

Las cepas vivas, vivas modificadas y atenuadas que no provocan enfermedad en un sujeto se han aislado en forma no virulenta o han sido atenuadas usando procedimientos notorios en la técnica, que incluyen pases seriados en una línea celular adecuada o exposición a luz ultravioleta o a un mutágeno químico. Las cepas víricas inactivadas o muertas son las que se han inactivado mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen el tratamiento con formalina, betapropiolactona (L), etilenoimina binaria (BEI), radiación esterilizante, calor u otros procedimientos de ese tipo.

Pueden combinarse dos o más antígenos produciendo una composición polivalente que puede proteger a un sujeto contra una amplia variedad de enfermedades provocadas por los patógenos. Actualmente, los fabricantes de vacunas comerciales, así como los usuarios finales, prefieren los productos de vacuna polivalentes. Aunque los adyuvantes convencionales a menudo se ven limitados en la variedad de antígenos con los que pueden usarse eficazmente (ya sea en vacunas monovalentes o polivalentes), los adyuvantes que se describen en el presente documento pueden usarse de forma eficaz con una amplia variedad de antígenos, tanto monovalentemente como polivalentemente. Así, los antígenos que se describen en el presente documento pueden combinarse en una única composición que comprende los adyuvantes que se describen en el presente documento.

Algunos ejemplos de bacterias que pueden usarse como antígenos con las composiciones adyuvantes incluyen, pero sin limitación, *Aceinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomphila spp.*, *Chromobacterium viscosum*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Ehrlichia canis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Helicobacter suis*, *Lawsonia intracellularis*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella sp.*, *Mycobacterium bovis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC*, *Clostridium perfringens*, *Odoribacter denticanis*, *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Photobacterium luminescens*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas salivosa*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens C9*, *Pseudomonas fluorescens SIKW1*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas sp B11-1*, *Alcaligenes eutrophus*, *Psychrobacter immobilis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsia*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica*, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella newport*, *Serratia marcescens*, *Spirulina platensis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptococcus suis*, *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Syechocystis sp.*, *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*, *Treponema vincentii*, *Treponema palladium* y especies de *Leptospira*, tales como los patógenos conocidos *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-prajitno*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona* y *Leptospira bratislava* y combinaciones de las mismas.

En las composiciones adyuvantes pueden usarse tanto virus inactivados como virus vivos atenuados. Algunos ejemplos de virus que pueden usarse como antígenos incluyen, pero sin limitación, herpesvirus aviarios, herpesvirus bovinos, herpesvirus caninos, herpesvirus equinos, virus de rinotraqueitis vírica felina, virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus ovinos, herpesvirus porcinos, virus pseudorrábico, paramyxovirus aviarios, virus sincitial respiratorio bovino, virus del moquillo canino, virus paragripal canino, adenovirus canino, parvovirus canino, virus paragripal bovino 3, virus paragripal ovino 3, virus de Rinderpest, virus de la enfermedad de la frontera, virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), BVDV de tipo I, BVDV de tipo II, virus de la fiebre porcina clásica, virus de leucosis aviaria, virus de inmunodeficiencia bovina, virus de leucemia bovina, tuberculosis bovina, virus de anemia infecciosa equina, virus de inmunodeficiencia felina, virus de leucemia felina (FeLV), virus de la enfermedad de Newcastle, virus de neumonía progresiva ovina, virus de adenocarcinoma pulmonar ovino, coronavirus canino (CCV), CCV pantrópico, coronavirus respiratorio canino, coronavirus bovino, Calicivirus felino, coronavirus entérico felino, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de diarrea epidémica porcina, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, parvovirus porcino, Circovirus porcino (PCV) de tipo I, PCV de tipo II, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus del pavo, virus de la fiebre efímera bovina, rabia, Rotovirus, virus de la estomatitis vesicular, lentivirus, gripe aviar, rinovirus, virus de la gripe equina, virus de la gripe porcina, virus de la gripe canina, virus de la gripe felina, virus de la gripe humana, virus de la encefalitis equina del este (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano, virus varicela-zóster, virus de la hepatitis B, rinovirus y virus del sarampión y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de antígenos peptídicos incluyen péptidos de *Bordetella bronchiseptica* p68, de GnRH, de IgE, de Fel d1 y antígenos de cáncer y sus combinaciones. Los ejemplos de otros antígenos incluyen nucleótidos, carbohidratos, lípidos, glucolípidos, péptidos, ácidos grasos y ácido teiquioco y peptidoglucanos y combinaciones de los mismos.

Algunos ejemplos de parásitos que pueden usarse como antígenos con las composiciones adyuvantes incluyen, pero sin limitación, *Anaplasma*, *Fasciola hepatica* (duela), *Coccidia*, *Eimeria spp.*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia*, *Dirofilaria* (gusanos cardiacos), *Ancylostoma* (tenia), *Trypanosoma spp.*, *Leishmania spp.*, *Trichomonas spp.*, *Cryptosporidium parvum*, *Babesia*, *Schistosoma*, *Taenia*, *Strongiloides*, *Ascaris*, *Trichinella*, *Sarcocystis*, *Hammondia* e *Isospora* y combinaciones de los mismos. También se contemplan los parásitos externos que incluyen, pero sin limitación, garrapatas, que incluyen especies de *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Boophilus*, *Hyalomma* y *Haemaphysalis* y combinaciones de los mismos.

La cantidad de antígeno que se usa para inducir una respuesta inmunitaria variará considerablemente dependiendo del antígeno que se use, del sujeto y del nivel de respuesta que se desee y puede ser determinado por un experto en la técnica. Para las vacunas que contienen virus vivos modificados o virus atenuados, una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno generalmente varía desde aproximadamente  $10^2$  de dosis infecciosa de cultivo tisular (DOCT)<sub>50</sub> a aproximadamente  $10^{10}$  DOCT<sub>50</sub>, inclusive. Para muchos de estos virus, una dosis terapéuticamente eficaz está generalmente en el intervalo desde aproximadamente  $10^2$  DOCT<sub>50</sub> a aproximadamente  $10^8$  DOCT<sub>50</sub>, inclusive. Alternativamente, los intervalos de dosis terapéuticamente eficaces son de aproximadamente  $10^3$  DOCT<sub>50</sub> a aproximadamente  $10^6$  DOCT<sub>50</sub>, inclusive. Alternativamente, los intervalos de dosis terapéuticamente eficaces son de aproximadamente  $10^4$  DOCT<sub>50</sub> a aproximadamente  $10^5$  DOCT<sub>50</sub>, inclusive.

Para las vacunas que contienen virus inactivados, una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno es generalmente al menos aproximadamente 100 unidades relativas por dosis y a menudo están en el intervalo desde aproximadamente 1.000 a aproximadamente 4.500 unidades relativas por dosis, inclusive. Alternativamente, la cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno están en un intervalo de aproximadamente 250 a aproximadamente 4.000 unidades relativas por dosis, inclusive, de aproximadamente 500 a aproximadamente 3.000 unidades relativas por dosis, inclusive, de aproximadamente 750 a aproximadamente 2.000 unidades relativas por dosis, inclusive, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.500 unidades relativas por dosis, inclusive.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de antígeno en vacunas que contienen virus inactivado puede medirse también en términos de potencia relativa (RP) por ml. Una cantidad terapéuticamente eficaz está a menudo en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 RP por ml, inclusive. En otras realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno está en un intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 RP por ml, inclusive, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 RP por ml, inclusive, de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 RP por ml, inclusive, de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 RP por ml, inclusive, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 RP por ml, inclusive.

En una realización se produjo un antígeno FeLV a partir de la línea celular FL74-UCD-1 (número de ATCC CRL-8012) que está infectada persistentemente con la cepa KT-FeLV-UCD-1 del virus de leucemia felina. La cantidad de antígeno FeLV en una vacuna puede medirse como la cantidad de proteína vírica gp70 por ml. Una cantidad terapéuticamente eficaz de antígeno FeLV, cuando se mide por la cantidad de proteína vírica gp70 por ml, generalmente está en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 350.000 ng/ml, inclusive. Alternativamente, el intervalo es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 300.000 ng/ml, inclusive, o de aproximadamente 2.500 a aproximadamente 250.000 ng/ml, inclusive, o de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 220.000 ng/ml, inclusive, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 150.000 ng/ml, inclusive, o de aproximadamente 10.000 ng/ml a aproximadamente 100.000 ng/ml, inclusive.

El número de células para un antígeno bacteriano que se administra en una vacuna varía desde aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis, inclusive. Alternativamente, el número de células varía en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^{10}$  UFC/dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^{10}$  UFC/dosis, inclusive. Alternativamente, el número de células varía en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^2$  a  $5 \times 10^{10}$  UFC/dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^9$  UFC/dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^9$  UFC/dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^9$  UFC/dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^9$  UFC/dosis, inclusive.

El número de células para un antígeno parasitario administrado en una vacuna varía en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^2$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  por dosis, inclusive. Alternativamente, el número de células varía en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$  por dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^4$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  por dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  por dosis, inclusive, o de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  por dosis, inclusive.

Es notorio en la técnica que con los adyuvantes convencionales, es necesaria una cantidad sustancialmente mayor de virus inactivado que de virus vivos modificados o atenuados para estimular un nivel comparable de respuesta serológica. Sin embargo, se ha encontrado sorprendentemente que con las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento, aproximadamente las mismas cantidades de virus inactivados y de virus vivos modificados estimulan niveles similares de respuesta serológica. Además, son necesarias cantidades más pequeñas de virus vivos modificados, atenuados e inactivados con los adyuvantes que se describen en el presente documento cuando se comparan con los adyuvantes convencionales para lograr el mismo nivel de respuesta serológica. Estos hallazgos inesperados demuestran la conservación de recursos y la reducción de costes para la preparación de composiciones inmunógenas y de vacunas. Para las vacunas con amplia utilidad es necesario fabricar millones de dosis al año, de forma que estos ahorros pueden ser cuantiosos.

### **Excipientes**

Los adyuvantes acuosos proporcionan ciertas ventajas. Generalmente son fáciles de formular y de administrar y pueden inducir pocas o menos reacciones graves en el sitio de la inyección. Sin embargo, los adyuvantes acuosos con un antígeno tienden a difundirse desde el sitio de la inyección, son aclarados por el hígado del sujeto y generan una respuesta inmunitaria no específica indeseada. Se ha encontrado sorprendentemente que las composiciones adyuvantes acuosas que se describen en el presente documento permanecen en el sitio de la inyección hasta que se biometabolizan, lo que se produce durante un largo periodo de tiempo y proporcionan una respuesta inmunitaria dirigida.

El aceite, cuando se añade como componente de un adyuvante, generalmente proporciona un perfil de liberación largo y lento. En la presente invención, el aceite puede ser metabolizable o no metabolizable. El aceite puede estar en forma de una emulsión de aceite en agua, de agua en aceite, o de agua en aceite en agua.

Los aceites adecuados para usar en la presente invención incluyen alcanos, alquenos, alquinos y sus ácidos y alcoholes correspondientes, sus éteres y ésteres y sus mezclas. Los compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarburos ligeros, es decir, dichos componentes tienen de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite puede prepararse sintéticamente o purificarse a partir de productos de petróleo. El resto puede tener una estructura de cadena lineal o ramificada. Puede estar totalmente saturada o tener uno o más enlaces dobles o triples. Algunos aceites no metabolizables para usar en la presente invención incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas, por ejemplo.

El término aceite también se pretende que incluya "aceite mineral ligero," es decir, aceite que se obtiene de forma similar por destilación de petrolato, pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que el aceite mineral blanco.

Los aceites metabolizables incluyen aceites metabolizables no tóxicos. El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite preparado sintéticamente que puede ser metabolizado por el cuerpo del sujeto al que se administrará el adyuvante y que no es tóxico para el sujeto. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos.

Una emulsión de aceite en agua proporcionada por la presente invención está compuesta por una formulación de AMPHIGEN®. Esta formulación comprende un componente acuoso, lecitina, aceite mineral y tensioactivos. Las patentes que describen los componentes de la formulación incluyen US 5.084.269 y US 6.572.861.

Habitualmente, el componente de aceite de la presente invención está presente en una cantidad de 1 % a 50 % en volumen; o en una cantidad de 10 % a 45 %; o en una cantidad de 20 % a 40 %.

Otros componentes de las composiciones pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables, como por ejemplo vehículos, disolventes y diluyentes, agentes isotónicos, agentes tamponadores, estabilizantes, conservantes, agentes vasoconstrictores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos y similares. Los vehículos, disolventes y diluyentes típicos incluyen agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, aceite y similares. Los agentes isotónicos representativos incluyen cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, lactosa y similares. Los estabilizantes útiles

incluyen gelatina, albúmina y similares.

Los tensioactivos se usan para ayudar a la estabilización de la emulsión seleccionada para actuar como vehículo para el adyuvante y el antígeno. Los tensioactivos adecuados para usar en las presentes invenciones incluyen tensioactivos naturales y tensioactivos sintéticos no naturales biológicamente compatibles. Los tensioactivos biológicamente compatibles incluyen compuestos fosfolípidicos o una mezcla de fosfolípidos. Los fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolinas (lecitina), como por ejemplo lecitina de soja o de huevo. La lecitina puede obtenerse en forma de una mezcla de fosfátidas y triglicéridos lavando con agua los aceites vegetales crudos y separando y secando las gomas hidratadas resultantes. Puede obtenerse un producto refinado fraccionando la mezcla entre fosfolípidos y glucolípidos insolubles en acetona que permanecen después de eliminar los triglicéridos y aceite vegetal lavando con acetona. De forma alternativa, la lecitina puede obtenerse de diversas fuentes comerciales. Otros fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse convencionalmente.

Los tensioactivos sintéticos no naturales adecuados para usar en la presente invención incluyen tensioactivos no iónicos con base de sorbitán, por ejemplo tensioactivos de sorbitán sustituidos con ácidos grasos (disponibles comercialmente con el nombre de SPAN® o ARLACEL®), ésteres de ácidos grasos de sorbitol polietoxilado (TWEEN®), ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos de fuentes como por ejemplo aceite de ricino (EMULFOR®); ácido graso polietoxilado (por ejemplo, ácido esteárico disponible con el nombre SIMULSOL M-53®), polímero de isooctilfenol polietoxilado/formaldehído (TYLOXAPOL®), éteres de alcoholes grasos de polioxietileno (BRIJ®); éteres no fenílicos de polioxietileno (TRITON® N), éteres de polioxietilenoisooctilfenilo (TRITON® X).

Hablando de forma general, el tensioactivo, o la combinación de tensioactivos, si se usan dos o más tensioactivos, está presente en la emulsión en una cantidad de 0,01 % a 10 % en volumen, preferiblemente de 0,1 % a 6,0 %, más preferiblemente de 0,2 % a 5,0 %.

Tal como se usa en el presente documento, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasan la adsorción y similares. El/los vehículo(s) deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de las composiciones y no ser perjudiciales para el sujeto. Habitualmente, los vehículos serán estériles y apirógenos y se seleccionaran basándose en el modo de administración a emplear. Se conoce bien por los expertos en la técnica que las formulaciones preferidas para el vehículo farmacéuticamente aceptable que comprenden las composiciones son los vehículos farmacéuticos aprobados en las regulaciones aplicables promulgadas por el Departamento de agricultura estadounidense o la Administración de medicamentos y alimentos estadounidense, o agencia gubernamental equivalente en un país diferente de los Estados Unidos. Por lo tanto, el vehículo farmacéuticamente aceptado para la producción comercial de las composiciones es un vehículo que ya está aprobado o que será aprobado por la agencia gubernamental apropiada en los Estados Unidos o país extranjero.

Las composiciones opcionalmente pueden incluir diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos compatibles farmacéuticamente aceptables (es decir, estériles o no tóxicos) que sirven como vehículos, excipientes o medios farmacéuticos. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, aceite y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina, entre otros.

Las composiciones también pueden contener antibióticos o conservantes que incluyen, por ejemplo, gentamicina, mertiolato o clorocresol. Las diversas clases de antibióticos o conservantes de los que pueden seleccionarse son notorias para el experto en la técnica.

### **Preparación de las composiciones**

#### **Preparación de formulaciones adyuvantes**

Un ISCOM puede prepararse combinando una saponina, un esteroles y un fosfolípido. Por ejemplo, un ISCOM puede contener de 5 % a 10 % en peso de Quil A, 1 % a 5 % de colesterol y fosfolípidos y el resto de proteína. La proporción entre saponina y esteroles en las formulaciones adyuvantes habitualmente será del orden desde 1:100 peso por peso (p/p) a 5:1 p/p. En algunos ejemplos, hay presente un exceso de esteroles, en el que la proporción entre saponina y esteroles es de al menos 1:2 p/p, o 1:5 p/p. En otras realizaciones, la saponina está en exceso relativa al esteroles y se usa una proporción entre saponina y esteroles de aproximadamente 5:1 p/p. ISCOM e ISCOMATRIX están disponibles comercialmente de Isconova AB (Suecia).

En algunos ejemplos, se usa CARBOPOL® combinado con DDA en una cantidad de al menos 0,1 partes en peso de CARBOPOL® por parte en peso de DDA. Alternativamente, se usan al menos 0,5 partes en peso de CARBOPOL® por parte en peso de DDA. Alternativamente, se usa al menos 1 parte en peso de CARBOPOL® por parte en peso de DDA. La combinación de CARBOPOL® y DDA forma un complejo por el que el grupo funcional de amina terciaria del DDA inmunofuncionaliza los grupos laterales de ácido carboxílico del polímero. Esto permite que las células inmunitarias específicas se dirijan al antígeno y al adyuvante de forma simultánea y coadministren el antígeno y adyuvante juntos en el momento y concentración óptimos a dichas células.

Los adyuvantes descritos en el presente documento generalmente no requerirán ningún vehículo específico y se formularán en un tampón acuoso u otro farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, las vacunas de las realizaciones descritas se presentarán en un vehículo adecuado, como por ejemplo, liposomas, microesferas o partículas antigénicas encapsuladas adicionales. El antígeno puede estar contenido en la membrana de las vesículas o estar contenido en el exterior de la membrana de las vesículas. Generalmente, los antígenos solubles están fuera y los antígenos hidrófobos o lipidados están bien contenidos en el interior o bien fuera de la membrana.

Las composiciones adyuvantes pueden prepararse en diversas formas dependiendo de la vía de administración, requisitos de almacenamiento y similares. Por ejemplo, pueden prepararse en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles adecuadas para uso inyectable, o prepararse en formas liofilizadas usando técnicas de liofilización, secado al vacío o secado por pulverización. Las composiciones liofilizadas pueden reconstituirse antes de su uso para estabilizar una solución, por ejemplo, solución salina o HEPES. Así, las composiciones adyuvantes pueden usarse como forma farmacéutica sólida, semisólida o líquida.

Los adyuvantes pueden fabricarse usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la saponina y el colesterol pueden mezclarse en un detergente adecuado, seguido de una técnica de extracción con disolvente formando liposomas o ISCOM. La saponina y el colesterol también pueden combinarse formando micelas helicoidales como se describe en la patente de Estados Unidos número 7.122.191.

Puede usarse solución salina tamponada con fosfato (PBS) como medio de tampón acuoso; el pH del tampón puede ser neutro o ligeramente alcalino o ligeramente ácido. Por consiguiente, el pH puede estar en el intervalo de pH de 6 a 8. Es habitual un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,3. La potencia del tampón puede estar entre  $PO_4$  10 a 50 mM y entre  $PO_4$  10 a 150 mM. En un ejemplo, se usa 0,063 % de PBS. El pH puede ajustarse usando NaOH o HCl según sea necesario. Las concentraciones habituales incluyen HCl de 1 N a 10 N y NaOH de 1 N a 10 N.

La cantidad de adyuvante usada depende del antígeno con el que se usa y la dosis antigénica a aplicarse. También depende de las especies a la que se dirija y de la formulación deseada. Habitualmente la cantidad está incluida en un intervalo convencionalmente usado para los adyuvantes. Por ejemplo, los adyuvantes habitualmente comprenden de aproximadamente 1  $\mu$ g a aproximadamente 1000  $\mu$ g, inclusive, de una dosis de 1 ml. De forma similar, los antibióticos habitualmente comprenden de aproximadamente 1  $\mu$ g a aproximadamente 60  $\mu$ g, inclusive, de una dosis de 1 ml.

Las formulaciones adyuvantes pueden homogenizarse o microfluidificarse. Las formulaciones se someten a un procedimiento de mezclado primario, habitualmente pasando una o más veces a través de uno o más homogenizadores. Puede usarse cualquier homogenizador disponible comercialmente para este fin, por ejemplo, emulsionante Ross (Hauppauge, NY), homogenizador Gaulin (Everett, MA), o Microfluidics (Newton, MA). En una realización, las formulaciones se homogenizan durante tres minutos a 10.000 rpm. La microfluidificación puede lograrse mediante el uso de un microfluidificador comercial, como por ejemplo el modelo número 110Y disponible en Microfluidics, (Newton, Mass.); Gaulin Modelo 30CD (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); y Rainnie Minilab Tipo 8.30H (Miro Atomizer Food y Dairy, Inc., Hudson, Wis.). Estos microfluidificadores operan forzando fluidos a través de pequeñas aperturas a presión elevada, de tal forma que dos chorros de líquido interactúen a velocidades elevadas en una cámara de interacción formando composiciones con gotitas de un tamaño submicrométrico. Por ejemplo, las formulaciones se microfluidifican pasándolas a través de una cámara de limitación de las dimensiones de 200 micrómetros a 68950000 +/- 3447380 pascales (10.000 +/- 500 psi).

Las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento pueden estar tanto homogeneizadas como microfluidificadas. Se añade un antígeno a un tampón apropiado. La solución se agita y se añade lentamente una saponina a la solución antigénica. Después se añade lentamente un esteroil a la solución de antígeno/saponina, seguido de la adición lenta de un compuesto de amonio cuaternario a la solución de antígeno, saponina y esteroil. La composición resultante se homogeniza y después se microfluidifica. Después de la microfluidificación, se añade un polímero a la composición microfluidificada. Dependiendo de los componentes que se usen, puede alterarse el orden de estas etapas para optimizar la preparación de las composiciones.

#### **Preparación de composiciones inmunógenas y de vacunas**

Las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento pueden usarse para la fabricación de composiciones inmunógenas y de vacunas. Para las composiciones de vacunas o inmunógenas, cada dosis contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno o antígenos que puede variar dependiendo de la edad y estado general del sujeto, de la vía de administración, de la naturaleza del antígeno y de otros factores. Pueden ajustarse las cantidades y concentraciones de los otros componentes de la vacuna o composiciones inmunógenas para modificar las propiedades físicas y químicas de la composición y pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la técnica. Una característica ventajosa de las composiciones adyuvantes es que son completamente configurables dependiendo de las características que se deseen para la composición. Por ejemplo, si se desea una mayor respuesta Th1, puede aumentarse la cantidad del estimulador de Th1. Del mismo modo, si se desea una mayor respuesta Th2, puede aumentarse la cantidad del estimulador de Th2. También puede lograrse una respuesta equilibrada entre Th1/Th2. Las composiciones inmunógenas y de vacunas también pueden homogenizarse o microfluidificarse como se describe anteriormente.

## **ADMINISTRACIÓN Y USO DE LAS COMPOSICIONES**

### **Administración de las composiciones**

5 Los tamaños de las dosis de las composiciones habitualmente varían desde aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml, inclusive, dependiendo del sujeto y del antígeno. Por ejemplo, para un cánido o felino, habitualmente se usa una dosis de aproximadamente 1 ml, mientras que en el ganado vacuno habitualmente se usa una dosis de aproximadamente 2-5 ml. Sin embargo, estos adyuvantes también pueden formularse en microdosis, en las que las pueden usarse dosis de aproximadamente 100 µl.

10 Las vías de administración para las composiciones adyuvantes incluyen parenteral, oral, oronasal, intranasal, intratraqueal, tópica y en el huevo. Puede usarse cualquier dispositivo adecuado para administrar las composiciones, que incluyen jeringuillas, goteros, dispositivos para inyección sin agujas, parches y similares. La vía y el dispositivo que se seleccionen para usar dependerán de la composición del adyuvante, el antígeno y el sujeto y estos son notorios para el experto en la técnica.

### **Uso de las composiciones**

15 Uno de los requisitos para cualquier preparación de vacuna adyuvante para uso comercial es establecer la estabilidad de la solución adyuvante durante los periodos de almacenamiento largos. En el presente documento se proporcionan formulaciones adyuvantes que son fáciles de fabricar y estables durante al menos 18 meses, por ejemplo, las formulaciones son estables durante aproximadamente 18 meses. Alternativamente, las formulaciones son estables durante aproximadamente 18 a aproximadamente 24 meses. Alternativamente, las formulaciones son estables durante aproximadamente 24 meses. Los procedimientos de pruebas aceleradas también indican que las formulaciones que se describen en el presente documento son estables.

25 Una característica ventajosa de las presentes composiciones adyuvantes es que pueden administrarse de forma segura y eficaz a una amplia variedad de sujetos. En la técnica, se espera que las combinaciones de adyuvantes demuestren mayor capacidad reactógena que los componentes individuales. Sin embargo, las composiciones que se describen en el presente documento muestran una menor capacidad reactógena cuando se comparan con composiciones en las que se usan uno o dos cualesquiera de los componentes, aunque se mantiene el efecto adyuvante. También se ha encontrado sorprendentemente que las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento demuestran mejoras en la seguridad cuando se comparan con otras composiciones adyuvantes.

30 Las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento son útiles para producir una respuesta inmunitaria deseada en un sujeto. Son eficaces en múltiples especies. Un sujeto adecuado es cualquier animal para el que se desee la administración de una composición adyuvante. Incluye mamíferos y no mamíferos, que incluyen primates, ganado, animales de compañía, animales de laboratorio, animales salvajes cautivos, aves (incluidos los huevos), reptiles y peces. Así, este término incluye pero sin limitación, monos, seres humanos, cerdos, ganado vacuno, ovejas, cabras, equinos, ratones, ratas, cobayas, hámsters, conejos, felinos, cánidos, pollos, pavos, patos, otras aves de corral, ranas y lagartijas.

35 Pueden usarse los adyuvantes que se describen en el presente documento para mostrar una diferenciación serológica entre los animales infectados y vacunados. Así, pueden usarse en una vacuna marcadora en la que el antígeno de la vacuna provoque en los animales vacunados un patrón de anticuerpos diferente del patrón del virus de tipo silvestre. Generalmente se usa una vacuna junto con una prueba de diagnóstico complementaria que mide la diferencia entre los patrones de los anticuerpos y demuestra qué animales han sido vacunados y qué animales están infectados con el virus de tipo silvestre. Dicha tecnología es útil en el control y la erradicación del virus de una población sujeto.

40 Los siguientes ejemplos se presentan como ejemplos ilustrativos. Para los expertos en la técnica serán obvios muchos cambios, variaciones, modificaciones y otros usos y aplicaciones de esta invención.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1. Soluciones de Quil A/Colesterol (QC)**

45 Se disolvió Quil A (Superfos) en agua y se preparó una solución madre de 50 mg/ml. Se disolvió colesterol (Fabri Chem Inc.) en etanol y se preparó una solución madre de 18 mg/ml. Se filtró después la solución madre de colesterol usando un filtro de 0,2 micrómetros.

50 El intervalo de concentraciones de Quil A y colesterol en las diversas formulaciones fue tan baja como 1/1 µg/ml de Quil A frente a colesterol hasta tan altas como 1000/1000 µg/ml. Para preparar una solución madre de Quil A/colesterol de 50/50 µg/ml, la solución madre de Quil A se diluyó con agua hasta una concentración de 50 µg/ml. Mientras se agita esta solución, la solución madre de colesterol se añadió lentamente a una concentración final de 50 µg/ml.

### **Ejemplo 2. Soluciones de DDA (D)**

Se disolvió bromuro de amonio de dimetildiocadecilo (DDA; Fluka Analytical), en etanol y se preparó una solución madre de 18 mg/ml. Se filtró después la solución madre de DDA usando un filtro de 0,2 micrómetros.

**Ejemplo 3. Soluciones de Quil A/Colesterol/DDA (QCD)**

Se preparó una solución madre de A Quil A/Colesterol como en el ejemplo 1 a las concentraciones deseadas. Se preparó una solución madre de DDA como en el ejemplo 2 y se añadió lentamente a la solución madre de Quil A/colesterol. Las soluciones se mezclaron para lograr las concentraciones finales deseadas. El pH de la solución se ajustó con NaOH o HCl según fue necesario para alcanzar el pH final deseado, que estuvo generalmente en un intervalo de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,5.

**Ejemplo 4. Soluciones de CARBOPOL® (C).**

El CARBOPOL® (Noveon, Méjico) se disolvió en agua desionizada y se preparó una solución madre del 1,5 %. En otra realización, se disolvió CARBOPOL® en agua desionizada y se preparó una solución madre del 0,75 %.

**Ejemplo 5. Soluciones de DDA/CARBOPOL® (DC).**

Se preparó una solución madre de DDA como en el ejemplo 2. Se preparó una solución madre de CARBOPOL® al 0,75 % como en el ejemplo 4. Las soluciones se mezclaron logrando las concentraciones finales deseadas.

**Ejemplo 6. Soluciones Quil A/Colesterol/DDA/CARBOPOL® (QCDC)**

Se preparó una solución madre de Quil A/colesterol/DDA como en el ejemplo 3. Se preparó una solución madre de CARBOPOL® al 0,75 % como en el ejemplo 4. La solución madre de CARBOPOL® se añadió lentamente a la solución madre Quil A/colesterol/DDA logrando la concentración final deseada. El pH de la solución se ajustó con NaOH o HCl alcanzando el pH final deseado, que estuvo generalmente en un intervalo de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,5.

**Ejemplo 7. Soluciones de Bay R1005® (R)**

Para preparar una solución madre de Bay R1005®, el glucolípido N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida se disolvió en etanol (al 60 % v/v). Se añadieron después Tween 20 y ácido acético glacial. En un ejemplo, se disolvieron 3,49 gr de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida en 44,64 ml de etanol/agua (al 60 % v/v). Esto se combinó con 1,12 ml de Tween 20 y 0,68 ml de ácido acético glacial.

**Ejemplo 8. Soluciones de Quil A/Colesterol/DDA/CARBOPOL®/Bay R1005® (QCDCR)**

Se preparó una solución madre de Quil A/colesterol/DDA/CARBOPOL® como en el ejemplo 6. Se preparó una solución madre de Bay R1005® como en el ejemplo 7. La solución de Bay R1005® se añadió lentamente a la solución de Quil A/colesterol/DDA/CARBOPOL® para lograr la concentración final deseada. El pH de la solución se ajustó con NaOH o HCl según fue necesario para alcanzar el pH final deseado, que estuvo generalmente en un intervalo de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,5.

**Ejemplo 9. Soluciones de DEAE Dextrano (X)**

Se preparó una solución madre de DEAE dextrano (X) disolviendo 200 mg/ml de DEAE dextrano en agua. La solución puede autoclavarse durante aproximadamente 20 minutos a 120° centígrados (C).

**Ejemplo 10. Soluciones de Quil A/Colesterol/DDA/DEAE (QCDX)**

Se preparó una solución madre de Quil A/colesterol/DDA de acuerdo con el ejemplo 3. Se preparó una solución madre de DEAE de acuerdo con el ejemplo 9. Se combinaron las soluciones añadiéndolas directamente dentro de un homogeneizador. El mezclado emplea un procedimiento de mezcla ultrarrápida usando una fuerza de cizallamiento mayor de 1.000 seg<sup>-1</sup>. El mezclado se hace suministrando la solución acuosa directamente dentro de la fase oleosa que contiene los adyuvantes no polares y los componentes antigénicos y mezclando hasta que se logra una mezcla estable homogénea. Típicamente esto puede ser un mínimo de varios minutos o más dependiendo del tamaño de partícula deseado.

**Ejemplo 11. Composiciones de Aceite (O)**

Se preparó una solución madre de aceite combinando aceite mineral Drakeol con Tween 85 y Span 85, calentando a aproximadamente 55°C y después enfriando y filtrando de forma estéril. Esta mezcla comprendería así el componente de base de la fase oleosa para un vehículo basado en aceite. Si el colesterol y/o el DDA se seleccionaron para ser un inmunomodulador colaborador para una de estas composiciones se añadirían después también a esta mezcla antes de filtración, dado que son solubles en la fase oleosa.

**Ejemplo 12. Composiciones de Quil A/Colesterol/DDA/DEAE/Aceite (QCDXO)**

Se preparó una solución madre de Quil A/colesterol/DDA/DEAE de acuerdo con el ejemplo 10. Se preparó una composición madre de aceite de acuerdo con el ejemplo 11. Las soluciones fueron una combinación de Quil-A, DEAE-dextrano y agua logrando la cantidad a dichas concentraciones. Se mezcló esta fase acuosa agitando continuamente

la reacción durante varios minutos o más a temperatura ambiente o más alta y después se filtró de forma estéril y se almacenó para adición a la fase oleosa. La fase acuosa se añadió lentamente dentro de una fase aceitosa que se mezcla de forma continua.

### **Ejemplo 13. Preparación de Composiciones Inmunógenas o Composiciones de Vacunas**

- 5 Para preparar una composición inmunógena o una composición de vacunas que comprenda un antígeno y uno de los adyuvantes anteriormente descritos, se añadió el antígeno deseado a un tampón apropiado. Después se añadieron los componentes del adyuvante deseado como se describe anteriormente. La solución resultante se llevó a un volumen final con el tampón.

#### **Ejemplo 13a. Antígeno, Quil A, Colesterol, DDA, CARBOPOL®**

- 10 Para preparar una composición inmunógena o una composición de vacuna que comprenda un antígeno, Quil A, colesterol, DDA y CARBOPOL®, el antígeno deseado se añadió a un tampón apropiado. Se preparó una solución madre de Quil A como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno. Se preparó una solución madre de colesterol como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A. Se preparó una solución madre de DDA como en el ejemplo 2 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A/colesterol. La solución de antígeno/Quil A/colesterol se homogeneizó y microfluidificó. Una solución de CARBOPOL® al 0,75 % se preparó como en el ejemplo 4. Después de microfluidificación, se añadió la solución de CARBOPOL® (0,05 % v/v) a una composición microfluidificada y se ajustó el pH con NaOH o HCl a aproximadamente 6,9 hasta aproximadamente 7,5.

#### **Ejemplo 13b. Antígeno, Quil A, Colesterol, DDA, CARBOPOL®, Bay R1005®**

- 20 Para preparar una composición inmunógena o una composición de vacuna que comprenda un antígeno, Quil A, colesterol, DDA, CARBOPOL® y Bay R1005®, se añadió el antígeno deseado a un tampón apropiado. Se preparó una solución madre de Quil A como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno. Se preparó una solución madre de colesterol como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A. Se preparó una solución madre de DDA como en el ejemplo 2 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A/colesterol. La solución de antígeno/Quil A/colesterol/DDA se homogeneizó y microfluidificó. Se preparó una solución de CARBOPOL® al 0,75 % como en el ejemplo 4. Después de microfluidificación, se añadió la solución de CARBOPOL® (al 0,05 % v/v) a una composición microfluidificada y se ajustó el pH con NaOH o HCl a aproximadamente 6,9 hasta aproximadamente 7,5. Se preparó una solución madre de Bay R1005® como en el ejemplo 7. Se añadió el componente de Bay R1005® a la fase acuosa después de que se añadió el DDA.

#### **Ejemplo 13c. Antígeno, Quil A, Colesterol, DDA, DEAE Dextrano**

- 30 Para preparar una composición inmunógena o una composición de vacuna que comprenda un antígeno, Quil A, colesterol, DDA y DEAE dextrano, el antígeno deseado se añadió a un tampón apropiado. Se preparó una solución madre de Quil A como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno. La composición se homogeneizó. Se preparó una solución madre de colesterol como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A durante la homogeneización. Se preparó una solución madre de DDA como en el ejemplo 2 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A/colesterol durante la homogeneización. Se preparó una solución madre de DEAE dextrano como en el ejemplo 9. Durante la homogeneización, se añadió la solución de DEAE dextrano y la composición resultante se llevó al volumen final.

#### **Ejemplo 13d. Antígeno, Quil A, Colesterol, DDA, DEAE Dextrano, Aceite**

- 40 Para preparar una composición inmunógena o una composición de vacuna que comprenda un antígeno, Quil A, colesterol, DDA, DEAE dextrano y aceite, se añadió el antígeno deseado a un tampón apropiado. Se preparó una solución madre de Quil A como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno. La composición se homogeneizó. Se preparó una solución madre de colesterol como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A durante la homogeneización. Se preparó una solución madre de DDA como en el ejemplo 2 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A/colesterol durante la homogeneización. Se preparó una solución madre de DEAE dextrano como en el ejemplo 9. Durante la homogeneización, se añadió la solución de DEAE dextrano. Se preparó una composición de aceite como en el ejemplo 11. Durante la homogeneización, se añadió la composición de aceite suministrando la fase acuosa dentro de la fase oleosa homogeneizando mientras y se llevó la solución resultante a volumen final.

### **Ejemplo 14. Vacunas del Virus de la Leucemia Felina (FeLV)**

- 50 Los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento usando un diseño de bloques completo distribuido de forma aleatoria. La tabla 1 muestra el diseño del estudio. Los bloques se basaron en fecha de nacimiento y camada. Los animales se clasificaron por fecha de nacimiento y después por camada. Se usaron bloques de cuatro. Dentro de un bloque, los animales se asignaron al azar al tratamiento. Para la fase de vacunación del estudio, se combinaron dos bloques consecutivos formando un grupo de ocho animales. Los grupos de animales se asignaron al azar a dos habitaciones de tal forma que cada habitación contenía cinco grupos (10 bloques) de animales. Dentro de un grupo de animales, los animales se asignaron al azar a cuatro jaulas localizadas cerca unas de otras de tal manera que cada

5 jaula contenía dos animales con el mismo tratamiento. Para la fase de prueba del estudio, los animales de una habitación de vacunación se asignaron al azar a bien una o bien dos habitaciones de prueba. La habitación de vacunación seleccionada para ir en dos habitaciones de prueba, tenía cinco bloques distribuidos al azar para cada habitación de prueba (2,5 grupos; 20 animales). La otra habitación de prueba contiene 10 bloques (5 grupos; 40 animales). Dentro de una habitación de prueba, los animales en el mismo bloque se asignaron al azar a cuatro jaulas localizadas una cerca de la otra.

10 Se prepararon las vacunas para este estudio como en el ejemplo 13 salvo porque se usó una solución madre de CARBOPOL® al 1,5 %. Específicamente, se preparó LEUKOCELL® 2 (Pfizer, Inc.) propagando FeLV, subgrupos A, B y C, en células linfoides transformadas con FeLV. Los antígenos víricos se inactivaron químicamente, se combinaron con un adyuvante estéril para lograr la respuesta inmune y se envasaron en forma líquida. Se preparó una cantidad total de 100 ml de Producto Veterinario de Investigación (IVP) conteniendo el virus de la leucemia felina y 25 µg de Quil A/hidróxido de aluminio (ALHYDROGEL®). Se mezcló un total de 94,5 ml de una solución madre de FeLV de  $1,106 \times 10^5$  ng/ml lentamente durante 15 minutos. El pH se ajustó a 5,9 a 6,1 con HCl 4 N o NaOH al 18 %, si fue necesario. Se añadieron, agitando mientras, 0,5 ml de una solución de 5,0 mg/ml de Quil A a la solución de antígeno. 15 Después, se añadieron lentamente 5,0 ml de ALHYDROGEL® al 100 % v/v. La composición se agitó durante un mínimo de 2 horas a 4°C. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18 % o HCl 1 N, según se necesitase.

Se prepararon el IVP que comprende el virus de la leucemia felina y 37,5 µg de Quil A/hidróxido de aluminio (ALHYDROGEL®) de la misma manera que para los 25 µg de Quil A IVP pero se añadieron 7,5 ml de la solución madre de Quil A a la solución de antígeno.

20 Se preparó una cantidad total de 350 ml de Producto Veterinario de Investigación (IVP) conteniendo el virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol, DDA y CARBOPOL®. Mientras que se agitaban 349,3 ml de una solución madre de FeLV a  $1,106 \times 10^5$  ng/ml, se añadieron lentamente 0,14 ml de una solución de 50,0 mg/ml de Quil A a la solución de antígeno. Después, se añadieron lentamente 0,39 ml de una solución de colesterol/etanol de 18 mg/ml. La composición se homogeneizó durante tres minutos a 10.000 rpm. Se añadió un total de 0,19 ml de una solución de DDA/etanol de 18,0 mg/ml a la composición mientras que se agitaba. Se añadió lentamente un total de 5,0 ml de una 25 solución de CARBOPOL® al 1,5 % a 145,0 ml de la composición de virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol y DDA. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18 % o HCl 1 N, según se necesitase.

**Tabla 1: Diseño Experimental**

Grupo de Tratamiento	IVP <sup>a</sup>	Número de Animales	Fase de Vacunación			Fase de Prueba			Recogida de Muestras	
			Día de Vacunación	Dosis (ml)	Vía	Día de Prueba	Dosis (ml)	Vía	Día	
T01	Solución Salina	20	0, 21	1,0	SC <sup>c</sup>	37, 40, 42 <sup>d</sup> , 44	1,0	ON <sup>e</sup>	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155	
T02	25 µg de LEUKOCELL® 2 Quil A/ A(OH) <sup>b</sup>	20	0, 21	1,0	SC	37, 40, 42 <sup>d</sup> , 44	1,0	ON	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155	
T03	37,5 µg de LEUKOCELL® 2 Quil A/ A(OH) <sup>b</sup>	20	0, 21	1,0	SC	37, 40, 42 <sup>d</sup> , 44	1,0	ON	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155	
T04	20 µg de LEUKOCELL® 2 Reformulada Quil A/ colesterol/ DDA/ CARBOPOL® <sup>b</sup>	20	0, 21	1,0	SC	37, 40, 42 <sup>d</sup> , 44	1,0	ON	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155	

<sup>a</sup>Producto Veterinario de Investigación  
<sup>b</sup>Mezclado para contener una potencia relativa comparable con la vacuna de referencia (Lots de Referencia de Fel.V n.º: 12) <sup>c</sup>SC = subcutáneo  
<sup>d</sup>Depo-Medrol® día 42 (aproximadamente 5,0 mg/kg) por la vía intramuscular <sup>e</sup>ON = oronasal  
 Quil A – colesterol = Adyuvante de saponina Quil A, incorporado en partículas lipídicas de colesterol  
 CARBOPOL® = carbómero  
 DDA = bromuro de dimetildioctadecilamonio

Se observaron diariamente todos los animales y se registraron las observaciones. Se registraron las temperaturas corporales de todos los animales por la vía timpánica en el día -1 antes de la primera administración de dosis de vacuna y en el día 20 antes de la segunda administración de dosis de vacuna. Se recogió una muestra de sangre (1,0 – 2,0 ml) a partir de cada animal por venopunción de la vena yugular, en el día -2. Se administraron dosis sedantes de TELAZOL® (Fort Dodge Animal Health) de acuerdo con el peso corporal (aproximadamente 5,0 mg/kg) mediante la vía intramuscular con el fin de minimizar el estrés animal y para evitar daño a los manipuladores de animales durante la recogida de sangre. La sangre se recogió en tubos de separación de suero (SST) y se procesó para separación de suero. El suero se almacenó a –20°C o a más frío hasta someterse a ensayo.

Se administraron vacunas placebo o vacunas de FeLV a gatitos por la vía subcutánea a una dosis de 1,0 ml. La primera vacunación se llevó a cabo en el día 0 y la segunda administración de vacuna se llevó a cabo en el día 21. Todos los animales se observaron durante aproximadamente una hora tras las vacunaciones primera y segunda para reacciones de dolor local inmediatas (reacciones de picadura). Se documentaron las observaciones. Las temperaturas corporales de todos los animales se midieron por la vía timpánica en los días 1 y 2 tras la primera administración de dosis de vacuna y en los días 22 y 23 tras la segunda administración de dosis de vacuna. Se determinaron también reacciones del sitio de inyección (hinchazones) en el día 1 después de la primera vacunación y en los días 22 y 23 después de la segunda vacunación. Se recogió una muestra de sangre (1,0 – 2,0 ml) de cada animal por venopunción de la vena yugular, en el día 35, se procesó para la separación de suero y se almacenó a –20°C o a más frío hasta someterse a ensayo.

En el día 35, se situaron animales dentro de jaulas de aislamiento individual. El virus de prueba fue Virus de la Leucemia Felina (FeLV) virulento, cepa de Rickard, valorado a aproximadamente  $10^{6,1}$  TCID<sub>50</sub>/ml. El material de prueba de FeLV se descongeló y se mantuvo en hielo húmedo de forma anterior a su administración. Los animales se pusieron a prueba en los días 37, 40, 42 y 44, administrando 1,0 ml por la vía nasal de material de prueba no diluido. Se cargó una jeringuilla de tuberculina de 1 ml, sin la aguja, con el material de prueba. Cada gatito se administró con 0,5 ml por fosa nasal. En el día 42, se llevó a cabo la administración de prueba aproximadamente 5 h tras la administración de DEPO-MEDROL®. Después de cada día de prueba, se retuvo una muestra del material de prueba para valoración confirmatoria.

Tras la prueba, se recogió una muestra de sangre (1,0 – 2,0 ml) de cada animal por venopunción de la vena yugular, en los días 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148 y 155. Se administraron las dosis sedantes de TELAZOL® (Fort Dodge) como se describe anteriormente. La sangre se recogió en tubos de separación de suero (SST), se procesó para separación de suero y se almacenó a –20°C o a más frío hasta someterse a ensayo. Se probaron las muestras de suero para la presencia de antígeno p27 de FeLV (marcador de infección de FeLV) mediante ELISA (IDEXX; Westbrook, ME). Los resultados finales se evaluaron por la intensidad de desarrollo del color y mediante espectrofotómetro a una densidad óptica de 405/490 nm. Para una prueba válida, la densidad óptica del control positivo tuvo que caer entre 0,131 y 2,999 y el control negativo tendría densidad óptica por debajo de o igual a 0,0039.

Se llevó a cabo el aislamiento del virus usando muestras de suero recogidas en días –2 y 35. Se consideraron las muestras de suero de días 127 a 155 para evaluar la eficacia de la vacuna de FeLV. Las muestras de suero del día 127 (semana 12), del día 134 (semana 13), del día 141 (semana 14), del día 148 (semana 15) y del día 155 (semana 16) se sometieron a ensayo para la presencia de antígeno p27 de FeLV. Un animal se consideró infectado persistentemente si tuvo tres o más resultados de prueba de antígeno p27 de FeLV positivos durante los días 127 (semana 12) a 155 (semana 16).

Se analizaron las temperaturas usando un modelo mixto de medidas repetidas lineales y usando comparaciones de tratamientos de dos en dos entre el tratamiento T01 y los tratamientos T02, T03 y T04 en cada punto temporal si el tratamiento general y/o el tratamiento por efecto de punto temporal fueron significativos. Se calcularon promedios de mínimos cuadrados, intervalos de confianza del 95 %, mínimos y máximos para cada tratamiento en cada punto temporal.

Se calcularon las distribuciones de frecuencia de la presencia de reacciones de picadura para cada tratamiento y se recogieron los datos de puntos temporales. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de la presencia de hinchazones de sitios de inyección para cada tratamiento y se recogieron los datos de puntos temporales. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de la presencia de reacciones sistémicas tras la vacunación para cada tratamiento.

No se observaron reacciones inmediatas en cualquiera de los grupos de tratamiento durante la primera y segunda vacunación. No se observaron reacciones adversas en cualquiera de los grupos de tratamiento a aproximadamente una hora tras las vacunaciones primera y segunda. No se observaron ni pirexia (temperatura corporal  $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ ) ni hipotermia (temperatura corporal  $< 37,0^{\circ}\text{C}$ ) en cualquiera de los grupos de tratamiento después de las vacunaciones primera y segunda. No hay diferencias significativas en la temperatura corporal promedio entre grupos de tratamiento en cualquier punto temporal ( $p > 0,08$ ). No se observaron hinchazones de sitio de inyección en cualquiera de los grupos de tratamiento después de las vacunaciones primera y segunda.

Los resultados finales de la semana 12 a la semana 16 tras la prueba indicaron que 16 animales por cada 19 (84 %) que recibieron la vacuna placebo (grupo T01) eran persistentemente virémicos para FeLV. 13 animales por cada 19 (68 %) en el grupo T02 estaban protegidos de la prueba virulenta de FeLV. El nivel de protección fue estadísticamente significativo ( $p= 0,0004$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. 12 animales por cada 19 (63 %) en el grupo T03 estaban protegidos de la prueba virulenta de FeLV. El nivel de protección fue estadísticamente significativo ( $p= 0,0013$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. 19 animales por cada 20 (95 %) en el grupo T04 estaban protegidos de la prueba virulenta de FeLV. El nivel de protección fue estadísticamente significativo ( $p= 0,0001$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo.

Así, las vacunas administradas a los grupos T02, T03 y T04 demostraron todas ser seguras en gatitos a la edad mínima cuando se administraron en un régimen de dos dosis, separadas tres semanas. Adicionalmente, las vacunas administradas a estos grupos fueron también capaces de reducir significativamente el nivel de viremia persistente de FeLV en gatitos a la edad mínima cuando se administraron en un régimen de dos dosis, separadas tres semanas. Hubo una reducción estadísticamente significativa en el establecimiento de viremia persistente de FeLV en gatitos en los grupos T02, T03 y T04. Adicionalmente, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre T04 y los otros grupos de vacunas (T02, T03). Fue sorprendente e inesperado que las vacunas que contienen la formulación de adyuvante novedosa demostraran ser más eficaces que aquellas que contienen componentes adyuvantes usados comúnmente en gatos.

#### **Ejemplo 15. Vacunas del Virus de la Leucemia Felina (FeLV)**

Se aclimataron los gatitos durante dieciséis días después de su llegada. Se asignaron los animales al azar a una habitación y dentro de una habitación, se asignaron al azar a tratamientos (1 animal por tratamiento en cada habitación). Se recogió una muestra de sangre (1,0 – 2,0 ml) de cada animal por venopunción de la vena yugular, en el día de estudio -1. Se administraron dosis sedantes de TELAZOL® (Fort Dodge Animal Health) de acuerdo con el peso corporal (aproximadamente 5,0 mg/kg) mediante la vía intramuscular con el fin de minimizar el estrés animal y para evitar daño a los manipuladores de animales durante la recogida de sangre. La sangre se recogió en tubos de separación de suero y se procesó para separación de suero. Todos los animales se observaron diariamente y las observaciones se registraron.

Se prepararon las vacunas como en el ejemplo 13 salvo porque se usó una solución madre de CARBOPOL® al 1,5 %. Se preparó LEUKOCELL® 2 (Pfizer, Inc.) propagando FeLV, subgrupos A, B y C, en células linfoides transformadas con FeLV. Los antígenos víricos se inactivaron químicamente, se combinaron con un adyuvante estéril logrando la respuesta inmune y se empaquetaron en forma líquida. Se preparó una cantidad total de 500,0 ml de IVP conteniendo el virus de la leucemia felina a una potencia relativa (RP) de 2, Quil A, colesterol y DDA de la siguiente manera. Se añadió un total de 20,7 ml de una solución madre de FeLV (50,0 RP/ml donde 1 RP = 3,624 ng/ml de antígeno) a 478,2 ml de tampón PBS al 0,063 %. Agitando mientras, se añadieron lentamente 0,21 ml de una solución de 50,0 mg/ml de Quil A a la solución de antígeno. Después, se añadieron lentamente 0,58 ml de una solución de colesterol/etanol de 18 mg/ml. Se añadió lentamente un total de 0,29 ml de una solución de DDA/etanol de 18,0 mg/ml a la composición agitando mientras. La composición se homogeneizó durante tres minutos a 10.000 rpm. La composición se microfluidificó mediante un paso a través de una cámara de dimensión limitante de 200 micrómetros a 68950000 (+ 3447380) pascales (10.000 (+ 500) psi). Agitando mientras, se añadieron lentamente 10,0 ml de una solución de CARBOPOL® al 1,5 % a 290,0 ml del virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol y composición de DDA. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18 % o HCl 1 N, según se necesitase.

Se preparó el IVP que contiene el virus de la leucemia felina a una RP de 5 de la misma manera que el IVP con una RP de 2 usando 51,7 ml de la solución madre de FeLV y 447,2 ml de tampón de PBS al 0,063 %, con las cantidades de los otros componentes siguiendo siendo las mismas.

Se preparó el IVP que contiene el virus de la leucemia felina a una RP de 10 de la misma manera que el IVP con una RP de 2 usando 93,1 ml de la solución madre de FeLV, 355,9 ml de tampón de PBS al 0,063 %, 0,19 ml de la solución de Quil A, 0,52 ml de la solución de colesterol y 0,26 ml de la solución de DDA (volumen total de 450 ml). Después, se añadieron lentamente 8,3 ml de una solución de CARBOPOL® al 1,5 % a 241,7 ml del virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol y composición de DDA.

Se preparó el IVP que contiene el virus de la leucemia felina a una RP de 15 de la misma manera que el IVP con una RP de 10 usando 139,7 ml de la solución madre de FeLV y 309,4 ml de tampón de PBS al 0,063 %, con las cantidades de los otros componentes siguiendo siendo las mismas.

Se preparó el IVP que contiene el virus de la leucemia felina a una RP de 20 de la misma manera que el IVP con una RP de 2 usando 206,9 ml de la solución madre de FeLV y 292,0 ml de tampón de PBS al 0,063 %, con las cantidades de los otros componentes siguiendo siendo las mismas.

Para administrar una dosis de 0,5 ml, se prepararon 300,0 ml de IVP que contiene el virus de la leucemia felina a una RP de 5, Quil A, colesterol, DDA y CARBOPOL® de la siguiente manera. Se añadió un total de 21,7 ml de una solución madre de FeLV (35,8 RP/ml donde 1 RP = 1,864 ng/ml de antígeno) a 277,7 ml de tampón de PBS al 0,063 %. Agitando mientras, se añadieron lentamente 0,12 ml de una solución de 50,0 mg/ml de Quil A a la solución de antígeno.

Después, se añadieron lentamente 0,35 ml de una solución de colesterol/etanol de 18 mg/ml. Se añadió lentamente un total de 0,17 ml de una solución de DDA/etanol de 18,0 mg/ml a la composición agitando mientras. La composición se homogeneizó durante tres minutos a 10.000 rpm. La composición se microfluidificó después mediante un paso a través de una cámara de dimensión limitante de 200 micrómetros a 68950000 (+ 3447380) pascales (10.000 (+ 500) psi). Agitando mientras, se añadieron lentamente 3,3 ml de una solución de CARBOPOL® al 1,5 % a 96,7 ml del virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol y composición de DDA. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18 % o HCl 1 N, según se necesitase.

Se preparó el IVP para administrar una dosis de 1,0 ml del virus de la leucemia felina a una RP of 5, Quil A, colesterol, DDA y CARBOPOL® de la misma manera que la dosis de 0,5 ml con las cantidades apropiadamente ajustadas.

Se preparó una cantidad total de 300,0 ml de IVP conteniendo el virus de la leucemia felina a una RP de 10 y CARBOPOL®. Se añadió un total de 62,1 ml de una solución madre de FeLV (50,0 RP/ml donde 1 RP = 3,624 µg/ml de antígeno) a 237,9 ml de tampón de PBS al 0,063 %. La composición se homogeneizó durante tres minutos a 10.000 rpm. La composición se microfluidificó mediante un paso a través de una cámara de dimensión limitante de 200 micrómetros a 68950000 (+ 3447380) pascales (10.000 (+ 500) psi). Agitando mientras, se añadieron lentamente 3,3 ml de una solución de CARBOPOL® al 1,5 % a 96,7 ml de la composición del virus de la leucemia felina. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18 % o HCl 1 N, según se necesitase.

Se administraron vacunas placebo y vacunas de FeLV (tabla 2) a gatitos por la vía subcutánea usando una aguja de calibre 22 x 19,05 mm (0,75 pulgadas) y jeringuilla de 3 cc en el día de estudio 0 y en el día de estudio 20. El grupo de tratamiento T01 se administró con la vacuna placebo a dosis de 1,0 ml. Los grupos de tratamiento T02, T04, T05, T06, T07, T08 y T09 se administraron con las vacunas de FeLV a dosis de 1,0 ml. El grupo de tratamiento T03 se administró con la vacuna de FeLV a dosis de 0,5 ml. El grupo de tratamiento T10 se administró con la vacuna de la viruela del canario de FeLV (Merial) por la vía intradérmica usando un inyector de pistola intradérmico.

**Tabla 2: Diseño Experimental**

Grupo de Tratamiento	Número de Animales	Potencia Relativa Objetivo	Vía de Vacunación	Vacuna	Adyuvante	Medios de Cultivo Celular (Volumen de Recogida)
T01	10	N.A.	SC	PBS	Sin Adyuvante	Solución Salina Normal
T02	10	5 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	RPMI
T03	10	5 RP	SC/0,5 ml	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	RPMI
T04	10	20 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T05	10	15 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T06	10	10 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T07	10	5 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro

(continuación)

Grupo de Tratamiento	Número de Animales	Potencia Relativa Objetivo	Vía de Vacunación	Vacuna	Adyuvante	Medios de Cultivo Celular (Volumen de Recogida)
T08	10	2 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T09	10	10 RP	SC	FeLV Inactivado	CARBOPOL®	Cellgro
T10	10	rFeLV Vivo (Merial)	ID	rFeLV Vivo (Merial)	Sin Adyuvante	Registrado (Merial)

5 Todos los animales se observaron después de la primera vacunación (Estudio Día 0) y la segunda vacunación (Estudio Día 20) para las señales de dolor tras la administración de vacuna de ensayo que incluye vocalización, rasguños/picaduras e intento agresivo o de escape. También se documentó la actitud después de la vacunación (normal o anormal). Todos los animales se observaron durante aproximadamente una hora después de después de la administración de vacuna el Día de estudio 0 y el Día de estudio 20 para el desarrollo de reacciones sistémicas  
10 adversas. Se documentaron las observaciones. Los sitios de vacunación se palparon y se registraron el dolor en el sitio de inyección, el enrojecimiento en el sitio de inyección, la inflamación en el sitio de inyección y el tamaño de inflamación. Se realizaron observaciones los días de estudio 2, 5 y 9 después de la primera vacunación y los días de estudio 25, 28 y 32 después de la segunda vacunación. Se documentaron las observaciones.

15 Se recogió una muestra de sangre (1,0 - 2,0 ml) de cada animal mediante la venopunción en la vena yugular el Día de estudio 32 (antes de la exposición). Los animales se expusieron los días de estudio 34, 36, 39 y 41 mediante la administración de 1,0 ml por la vía nasal de material de exposición no diluido. Se llenó una jeringa de 1 ml de tuberculina, sin la aguja, con el material de exposición. A cada gatito se le administraron aproximadamente 0,5 ml por orificio nasal. El material de exposición FeLV tenía un título promedio de  $10^{6.1}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Después se recogió una  
20 muestra de sangre (1,0 - 2,0 ml) de cada animal mediante venopunción en la vena yugular los Días de Estudio 61, 83, 106, 126, 133, 138, 146 y 152.

### Resultados - Seguridad

25 Durante la primera vacunación (Día de estudio 0), tres animales en el grupo de tratamiento T09 demostraron reacciones inmediatas de tipo picadura. Durante la segunda vacunación (Día de estudio 20), un animal del grupo de tratamiento T05, cuatro del grupo de tratamiento T08 y dos del grupo de tratamiento T09 demostraron reacciones inmediatas de tipo picadura.

30 Durante la primera vacunación, tres animales del grupo de tratamiento T09 demostraron una vocalización secundaria. Los animales que presentan dolor en la primera vacunación también presentaron una vocalización secundaria en ese tiempo. Durante la segunda vacunación, un animal del grupo de tratamiento T05, cuatro del grupo de tratamiento T08 y dos del grupo de tratamiento T09 demostraron una vocalización secundaria. Los animales que presentan dolor en la segunda vacunación también presentaron una vocalización secundaria en ese tiempo.

Durante la primera vacunación, tres animales en el grupo de tratamiento T09 demostraron un comportamiento / intento agresivo para escapar. Durante la segunda vacunación, un animal del grupo de tratamiento T05, cuatro del grupo de tratamiento T08 y dos del grupo de tratamiento T09 demostraron un comportamiento / intento agresivo para escapar.

35 Ninguno de los grupos de tratamiento presentó rasguño/picada en el sitio de inyección tras la primera o segunda vacunación. No se observaron reacciones en el sitio de inyección en ninguno de los grupos de tratamiento tras la primera o segunda vacunación. Tampoco se observaron reacciones adversas en ninguno de los grupos de tratamiento.

### Resultados - Eficacia

40 Todos los animales se probaron que eran negativos antes de la vacunación para el antígeno FeLV p27 a partir de muestras de suero recogidas el Día 1. También se probó que todos los animales eran negativos antes de la exposición para el antígeno FeLV p27 a partir de muestras de suero recogidas el Día 32.

Los resultados finales de la semana 12 a la semana 16 después de la exposición (Tabla 3) indicaron que 9 de 10 animales (90 %) en el grupo de tratamiento T01 (placebo) eran persistentemente virémicos para FeLV. Los resultados del mismo período indicaron que 6 de 10 animales (60 %) en el grupo de tratamiento T02 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección no era estadísticamente significativo ( $p = 0,0573$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. Nueve de 10 animales (90 %) en el grupo de tratamiento T03 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección era estadísticamente significativo ( $p = 0,0011$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. 10 de 10 animales (100 %) en el grupo de tratamiento T04 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección era estadísticamente significativo ( $p = 0,0001$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. 10 de 10 animales (100 %) en el grupo de tratamiento T05 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección era estadísticamente significativo ( $p = 0,0001$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. 7 de 10 animales (70 %) en el grupo de tratamiento T06 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección era estadísticamente significativo ( $p = 0,0198$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. 10 de 10 animales (100 %) en el grupo de tratamiento T07 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección era estadísticamente significativo ( $p = 0,0001$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. 8 de 10 animales (80 %) en el grupo de tratamiento T08 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección era estadísticamente significativo ( $p = 0,0055$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. 5 de 10 animales (50 %) en el grupo de tratamiento T09 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección no era estadísticamente significativo ( $p = 0,1409$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo. Finalmente, 6 de 10 animales (60 %) en el grupo de tratamiento T10 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección no era estadísticamente significativo ( $p = 0,0573$ ) comparado con los gatitos vacunados con placebo.

**Tabla 3. Sumario del nivel de protección**

Grupo de tratamiento	Potencia relativa de vacuna	Nivel de Protección	Fracción preventiva
T01	ND	10 %	
T02	4,58	60 %	55,6 %
T03	4,58	90 %	88,9 %
T04	26,32	100 %	100 %
T05	18,58	100 %	100 %
T06	11,16	70 %	66,7 %
T07	4,77	100 %	100 %
T08	1,64	80 %	77,8 %
T09	11,12	50 %	44,4 %

## Discusión

Las vacunas usadas en los grupos de tratamiento T02, T03, T04, T06 y T07 demostraron un perfil de seguridad satisfactorio durante la primera vacunación, ya que no se observaron reacciones adversas en ese tiempo. Un único animal en el grupo de tratamiento T05 demostró una reacción inmediata (dolor en la administración, vocalización menor e intento agresivo/de escape) en la segunda vacunación. Este episodio podría estar asociado a una respuesta exacerbada a la vacunación para el animal particular en lugar de a un problema de formulación de vacuna. Todas las vacunas demostraron un perfil de seguridad satisfactorio después de la vacunación, ya que no se observaron ni reacciones locales ni episodios adversos relacionados con la vacunación.

Las vacunas de FeLV administradas a los grupos de tratamiento T03, T04, T05, T07 y T08 demostraron una eficacia significativa, ya que  $\geq 80$  % de protección ( $\geq 75$  % de fracción preventiva) se logró después de la exposición con FeLV virulento. Que la vacuna proporcionada al grupo T07 proporcionara una protección del 100 % es sorprendente e inesperado, ya que los animales en ese grupo recibieron 25 % y 33 % de la dosis de antígeno de los animales en los grupos T04 y T05, respectivamente. Una ventaja clara de los adyuvantes descritos y ensayados en el presente documento es que permiten que se use una dosis menor de antígeno, aunque se induce todavía una respuesta inmune protectora completamente. Las vacunas administradas a los grupos de tratamiento T02, T06 y T09 demostraron algo de disminución en la eficacia de protección ( $< 80$  % de protección; fracción preventiva  $< 75$  %) después de la exposición con FeLV virulento. La disminución en la eficacia de la vacuna administrada al grupo de tratamiento T02 se debía probablemente a la presencia de pocos animales respondedores en ese grupo.

**Ejemplo 16. Vacunación in Ovo contra Eimeria en Pollos**

La coccidiosis aviar es una enfermedad intestinal en general provocada por protozoos del género *Eimeria* y representa un grave problema en todo el mundo para la industria avícola. Los parásitos ingeridos en la alimentación se localizan en el tracto intestinal donde provocan graves daños a los tejidos intestinales y subyacentes. Las pérdidas económicas resultantes para la industria avícola son muy significativas, ya que la conversión de alimento y ganancia de peso de tanto los pollos como la puesta de huevos se ven alterados. Una adición general del estado de la técnica, que incluye los intentos de vacunar contra *Eimeria* que usan, por ejemplo, proteínas de *Eimeria* recombinantes como antígeno y una diversidad de sistemas de adyuvantes, se describen en las siguientes publicaciones, todas las cuales se incorporan en el presente documento como referencia, como si se establecieran completamente, (1) H.S. Lillehoj et al., *J. Parasitol.*, 91(3), 2005, p. 666 - 673; (2) H.S. Lillehoj et al., *Avian Diseases*, 49 2005, 112 - 117; y (3) R. A. Dalloul et al., *Expert Rev. Vaccines*, 5(1), 2006, p.143 - 163. El ejemplo presente se refiere al uso de composiciones de vacunas novedosas que emplean componentes de adyuvantes que proporcionan un comportamiento superior en el contexto de coccidiosis.

Los adyuvantes altamente eficaces de la presente invención se pueden usar en combinación con el material antigénico de todas las especies de *Eimeria*, incluyendo sus extractos de proteínas purificados o parcialmente purificados, o mediante una o más de sus proteínas expresadas de manera recombinante, o fragmentos de cualquiera y todas de tales proteínas, de este modo se incluyen materiales antigénicos proporcionados a partir de *Eimeria acervulina*, *Eimeria ahsata*, *Eimeria bovis*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria fraterculae*, *Eimeria maxima*, *Eimeria meleagridis*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, *Eimeria stiedae*, *Eimeria tenella* y *Eimeria zurnii*, entre otros.

La vacuna con adyuvante de la invención se puede proporcionar contra cualquier proteína o macromolécula que se produce en uno o más puntos en el ciclo de vida de los protozoos, que incluye, sin limitación, oocisto (tanto esporulado como no esporulado), esporocisto, esporozoito, esquizonte, merozoito, células de gametos masculinos o femeninos. En un ejemplo preferido las proteínas que se desprenden en las heces en cantidades significativas en la fase de oocisto son los materiales preferidos para que actúen como como la fuente de antígeno de proteína recombinante, o muestras parcialmente o completamente purificadas de tal proteína como se purifica mediante medios convencionales.

Los ejemplos adicionales de proteínas de *Eimeria* útiles como Fuentes de antígeno en la formulación de las presentes vacunas incluyen las descritas por Karkhanis et al. *Infection and Immunity*, 1991, p. 983 - 989, incluyendo antígenos protectores, como se describen en ese documento, que tienen un intervalo de masa entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 kDA. Ejemplos adicionales incluyen la proteína 3-1E de *Eimeria* de 23 kDA y la proteína Etp100, por ejemplo como la recuperada de *E. tenella*.

Los adyuvantes altamente eficaces de la presente invención se pueden usar en combinación con material antigénico de *Neurospora caninum*.

De manera adicional, los adyuvantes altamente eficaces de la presente invención se pueden usar en combinación con cualquiera de los siguientes patógenos de protozoos, *Cryptosporidium parvum* (criptosporidiosis), *Cyclospora cayetanensis* (ciclosporiasis), *Isospora belli* (isosporiasis), *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis), *Plasmodium* (malaria) y *Babesia spp.* (babesiosis) y protozoos relacionados, en general del grupo Apicomplexen que provocan estas o enfermedades relacionadas.

La eficacia de la distribución *in ovo* de vacunas que contienen sistemas adyuvantes particulares se evalúa como sigue.

**Materiales y Procedimientos:****1. Materiales:**

La proteína de *E. maxima* recombinante (de la proteína 3-1E) se expresó en *E. coli* y se purificó en columna de afinidad. La preparación in bruto de macromoléculas de células enteras de *E. maxima* (solubilizadas con detergente de células rotas) también se usaron como antígeno, con este antígeno in bruto que se llama "EM". En un ejemplo preferido, el adyuvante era como se ha descrito en el ejemplo 8 anterior y se prepara como se indica en el protocolo de Ejemplo (véase la página 41). Por lo tanto, en un ejemplo típico, cada embrión recibiría una inyección en el amnios (es decir, que incluye el tejido y espacio amniótico) de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 microlitros de solución de vacuna, que, por cada 1 ml de cada la misma comprende: aproximadamente 50 o 100 microgramos de proteína 3-1E recombinante u otras especies de proteínas, o como alternativa, aproximadamente 50 o 100 microgramos de extracto de células in bruto de "EM"; aproximadamente 20 microgramos de Quil A; aproximadamente 20 microgramos de colesterol; CARBOPOL a aproximadamente 0,075 % (v/v); aproximadamente 10 microgramos de DDA; y aproximadamente 250 microgramos de R1005, todas proporcionadas en, por ejemplo, PBS 20 mM.

En relación a la selección de la saponina para uso en el presente documento, es instructiva la siguiente información adicional. El término definido de saponina se refiere a los glucósidos derivados de plantas, numerosos de los cuales se han estudiado de manera extensiva para evaluar sus propiedades biológicas (The Plant Glycosides, McIlroy, R. J., Edward Arnold y co., Londres, 1951). Las saponinas usadas más predominantemente en la técnica para la producción de vacunas son las derivadas de las plantas *Quillaja saponaria molina*, *Aesculus hippocastanum* o *Gyophilla struthium*. Se conocen los extractos de la corteza de *Quillaja saponaria molina* que se sabe que tienen una actividad adyuvante,

por ejemplo Quil A. También se han descrito fracciones puras de Quil A que mantienen la actividad adyuvante y que son al mismo tiempo menos tóxicas que Quil A, por ejemplo QS21. QS21 también se describe en Kensil et al. (1991. *J. Immunology* vol 146, 431 - 437). Cuando se mezclan con los ingredientes adyuvantes adicionales de la presente invención, como se ha descrito anteriormente y a continuación en el presente documento, tales materiales que contienen saponina han llegado a ser altamente eficaces. Las formulaciones eficaces adicionales incluyen las que usan Escina, que se ha descrito en el índice Merck (edición 12: entrada 3737) como una mezcla de saponinas que se producen en la semilla del árbol castaño de Indias. En la realización preferida de la presente invención, saponina se refiere a "Quil-A" vendida en los Estados Unidos por la compañía E.M Sergeant.

Se debe entender además que los extractos de saponina se pueden usar como mezclas o componentes individuales purificados de los mismos tales como fracciones/productos que incluyen QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21 de Antigenics Company, Massachusetts, Estados Unidos o productos de saponina en bruto, purificados, fraccionados o refinados similares y las mezclas de los mismos ofrecidos por Isconova Company de Suecia. En una realización la Quil A tiene al menos un 85 % de pureza. En otras realizaciones, la Quil A tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de pureza.

## 2. Vacunación de embriones:

Se compraron los huevos de Moyers Hatchery, Quakertown, PA. Para inmunización in ovo, después se incubaron huevos de pollos de engorde durante 18 días y se observaron a la luz de una vela para seleccionar los huevos fértiles (después de los 18 días formación del embrión) y después se inyectaron con PBS 20 mM y bien adyuvante solo, o bien adyuvante formulado bien con proteína 3-1E recombinante o bien con una preparación de "EM". Se realizaron las inyecciones sobre un inyector in ovo "Intelliject" (Avitech, Hebron, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada huevo recibió muestras de 100 microlitros en la cavidad amniótica usando una aguja de 17,5 cm de longitud y calibre 18 proporcionada por Avitech (Hebron, MD). Las dosis de 50 microlitros también estaban entre las que pueden funcionar en la práctica de la presente invención.

## 3. Pollos:

Tan pronto como los pollos de engorde se empollaron (aproximadamente el día 21 - 22), se llevaron al laboratorio usando cajas de cartón de transporte de pollos desechables (Frederick Packaging, Inc., Milwaukee, WI) y los pollitos se alojaron después en las unidades de Petersime y se les proporcionó alimento y agua a voluntad.

Se mantuvieron las aves en gallineros de cría en una instalación sin *Eimeria* y se llevaron en jaulas suspendidas grandes en localizaciones separadas donde se infectaron con oocistos vivos de *Eimeria maxima* y se mantuvieron hasta el final del período de experimento.

## 4. Parásitos:

Se usó la cepa USDA BARC de *Eimeria maxima* n.º: 41, que se había mantenido en el Laboratorio de Enfermedades de Parásitos de Animales - BARC y se propagó de acuerdo con el procedimiento establecido en el Laboratorio del Dr. Lillehoj. Los oocistos recientemente producidos a partir de la cepa de *E. maxima* (Beltsville n.º: 41) se limpiaron mediante flotación sobre hipoclorito de sodio al 5 %, se lavaron tres veces con PBS y se enumeró la viabilidad mediante azul de triptano usando un hemocitómetro.

## 5. Infección de exposición de *Eimeria*:

Se marcaron aves de siete días de edad en las alas y las aves de todos los grupos experimentales salvo los grupos de control no infectados se inocularon por vía esofágica con *E. maxima* usando una aguja de inoculación y después se colocaron en jaulas de recogida de oocistos.

## 6. Determinación de la ganancia de peso corporal:

Se determinaron los pesos corporales individuales de las aves en los días 0 (sin infectar), 6 y 10 días después de la infección con *E. maxima*.

## 7. Determinación de la producción de oocistos fecales:

Se dio instrucciones a los cuidadores de animales para no limpiar las jaulas y se recogieron las deposiciones fecales. Las bandejas de recogida se colocaron debajo de cada jaula durante 5 días a partir del día 6 después de la infección y se recogieron los materiales fecales en grandes tarros de plástico (2 l). Las deposiciones fecales empapadas con agua corriente en cada tarro se molieron en un mezclador con más agua (el volumen total es 3 l) y se recogieron dos muestras al azar de 40 ml de cada muestra y se almacenaron en el frigorífico hasta que se contaron. Con el fin de contar los oocistos de coccidia, inicialmente se realizaron diversas diluciones para determinar las diluciones óptimas para determinar la enumeración de oocistos para cada muestra. Se contaron los oocistos de manera microscópica usando una cámara de recuento de McMaster usando un procedimiento de flotación de sacarosa que se ha establecido en el Laboratorio del Dr Lillehoj. Se calculó el número total de oocistos desprendidos por pollo usando la fórmula: oocistos totales /ave = (recuento de oocistos x factor de dilución x volumen de muestra fecal / volumen de la cámara

de recuento)/número de aves por jaula.

### 8. Recogida de muestras:

Se recogió sangre el día 6 después de la fecha de infección y se determinó la respuesta de anticuerpo en suero. Se obtuvieron muestras de sangre de aves individuales (N = 4 - 5/grupo), se permitió la coagulación 4 horas a 4 °C y se recogieron los sueros. Se ensayaron muestras de suero para la evaluación de anticuerpos anti-Eimeria usando ELISA. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación durante toda una noche con 10 µg/pocillo de los antígenos coccidiales recombinantes Ea3-1E, EtMIF o EtMIC2, se lavaron con PBS-Tween al 0,05 % y se bloquearon con PBS-BSA al 1 %. Se añadieron diluciones en suero (1:20, 1:40, 1:80, 1:160; 100 µl/pocillo), se incubaron con agitación continua, se lavaron y se detectó el Ab unido con IgG anti-pollo de conejo conjugada con peroxidasa (Sigma) y sustrato específico de peroxidasa. Se determinó la densidad óptica (DO) a 450 nm con un lector de microplacas (Bio-Rad, Richmond, CA).

Se recogieron los tejidos intestinales en la incubación y a los 6 y 10 días después y se ensayaron para evaluar la producción de citocinas (IFN-γ, IL-2) mediante el uso de RT-PCR en tiempo real, según se mide por la estimulación de Th1.

### 9. Síntesis de ADNc

Se extrajo el ARN de IEL intestinales usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se trataron cinco microgramos de ARN con 1,0 U de DNasa I y 1,0 µl de tampón de reacción 10X (Sigma), se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, se añadió 1,0 µl de solución de detención para inactivar la DNasa I y se calentó la mezcla a 70°C durante 10 minutos. Se transcribió de manera inversa el ARN usando el sistema de síntesis de primera hebra StrataScript (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 10. RT-PCR Cuantitativa

Los cebadores de oligonucleótidos de la RT-PCR cuantitativa para el interferón-γ de pollo (IFN-γ) y control GAPDH se enumeran en la Tabla 4. Se llevaron a cabo la amplificación y detección usando cantidades equivalentes de ARN total de IEL intestinales usando el sistema Mx3000P y mezcla maestra Brilliant SYBR Green QPCR (Stratagene). Se generaron curvas patrones usando ARN patrón diluido log<sub>10</sub> y se normalizaron los niveles de transcripciones individuales con los de GAPDH analizados mediante el programa Q-gene. Se realizó cada análisis por triplicado. Para normalizar los niveles de ARN entre las muestras dentro de un experimento, se calcularon los valores de ciclo de umbral medio (C<sub>t</sub>) para los productos de amplificación mediante la combinación de los valores de todas las muestras en ese experimento.

Tabla 4. Cebadores de oligonucleótidos usados para la RT-PCR cuantitativa de IFN-γ y GAPDH de pollo.

Diana de ARN	Secuencias de cebador	Tamaño del producto de PCR (pb)
GAPDH	Nº de acceso K01458	264
Directo	5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3'	SEC ID N.º: 1
Inverso	5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'	SEC ID N.º: 2
IFN-γ	Nº de acceso Y07922	259
Directo	5'-GCTGACGGTGGACCTATTATT-3'	SEC ID N.º: 3
Inverso	5'-GGCTTTGCGCTGGATTC-3'	SEC ID N.º: 4
IL-1β	Nº de acceso Y15006	244
Directo	5'-TGGGCATCAAGGGCTACA-3'	SEC ID N.º: 5
Inverso	5'-TCGGGTTGGTTGGTGATG-3'	SEC ID N.º: 6

(continuación)

Diana de ARN	de	Secuencias de cebador	Tamaño del producto de PCR (pb)
IL-15		Nº de acceso AF139097	243
Directo		5'-TCTGTTCTTCTGTTCTGAGTGATG-3'	SEC ID N.º:7
Inverso		5'-AGTGATTTGCTTCTGTCTTTGGTA-3'	SEC ID N.º:8

Se recogió el bazo antes de la inoculación con *E. maxima* y a 10<sup>th</sup> DPI (fecha después de la infección) para el ensayo de proliferación de esplenocitos. Se colocaron los bazos en una placa Petri con 10 ml de solución de sal equilibrada de Hank (HBSS) suplementada con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO). Se prepararon suspensiones de células individuales de linfocitos de bazo y se llevó a cabo la proliferación de linfocitos. En resumen, se ajustaron los esplenocitos a 5x10<sup>6</sup> o 1x10<sup>7</sup> células/ml en medio IMDM (Sigma) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma), que se llamará medio IMDM completo al 10 %. Se incubaron los esplenocitos (100 µl/pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos a 41°C en un incubador humidificado (Forma, Marietta, OH) con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire durante 48 hr. Se determinó la proliferación de células con sal monosódica de 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfufenil)-2H-tetrazolio (WST-8, Cell- Counting Kit-8®, Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD). La Densidad Óptica (DO) se midió a 450 nm usando un espectrofotómetro de microplacas (BioRad, Richmond, CA).

### Resultados

Los resultados mostraban que las aves de engorde vacunadas con 100 microlitros de formulación adyuvante (es decir, 100 microlitros que incluyen proteína 3-1E recombinante de acuerdo con las dosis definidas previamente) ganaron aproximadamente 45 a 85 gramos adicionales de peso corporal en comparación con las aves no vacunadas pero infectadas con *E. maxima*.

Las vacunas de la invención también mostraban efectos claros sobre la inmunidad mediada por células según se midió por ensayos de proliferación de linfocitos por mitógenos: Los resultados de la proliferación de linfocitos en bazo a 1 x 10<sup>7</sup> células/ml incubados con Con A durante 48 horas mostraban que los esplenocitos de pollos infectados con *E. maxima* inmunizados con adyuvante de Pfizer, con o sin antígeno muestran en general mayores niveles de proliferación de linfocitos, especialmente cuando se usaba una dosis de 50 µg. Se observó un aumento significativo de la producción de IL-1B, la producción de IFN-γ y la producción de IL-15, más particularmente en el bazo después de la administración de las composiciones de vacuna con adyuvante de la invención. En resumen, estos resultados indican claramente el efecto del presente adyuvante sobre la respuesta de citocinas y confirman su efecto sobre la potenciación de la respuesta inmune mediada por células más que de la humoral.

Las vacunas de la invención también mostraban efectos claros sobre la producción de oocistos fecales. Las aves de control sin infectar no eliminaban oocistos. Después de la infección por *E. maxima*, se produjeron reducciones significativas en la producción de oocistos fecales en grupos que se trataron con adyuvantes de Pfizer en solitario. Las aves vacunadas *in ovo* con *Eimeria maxima* en bruto y adyuvante demostraron una producción de oocistos fecales mucho menor en comparación con grupos inoculados con una preparación de *Eimeria maxima* en bruto en solitario. Grupos EM.

Debería señalarse que aunque se ha usado proteína de *E. maxima* recombinante purificada 3-1E en la práctica de los experimentos mencionados anteriormente, el uso de los antígenos Ea3-1E, EaMIF y EtMIC2 recombinantes, bien individualmente o bien en combinación con 3-1E o cada uno de los otros, o como cualquier combinación de cualquiera de los mismos, también es una realización preferida de la invención y generalmente todos los antígenos de proteínas de *Eimeria* pueden funcionar en la práctica de la presente invención, siempre que se mezclen con los adyuvantes de la presente invención.

### 40 Ejemplo 17. Evaluación de Bacterina de la cepa J5 de *Escherichia coli* en ganado

El objetivo del estudio es evaluar la respuesta inmunológica en ganado a antígeno de *Escherichia coli* (cepa J-5) cuando se administra en diversas nuevas formulaciones. La bacterina J5 comercial se comercializa como una vacuna preventiva para mastitis por coliformes en ganado de leche y es moderadamente eficaz en su actual formulación. Antes de la vacunación, se determinó que los animales tenían un bajo título de anticuerpos contra J5 de *E. coli*, basándose respectivamente en un análisis de muestras de suero sanguíneo tomadas antes de la vacunación.

#### Ganado Vacuno

Se formularon vacunas experimentales usando bacterina J5 de *E. coli* inactivada como el antígeno y se realizaron de acuerdo con el Ejemplo 13 anterior. Cada grupo de tratamiento contenía inicialmente siete animales (Tabla 5). Un grupo de tratamiento recibió solución salina (T01) y otro grupo recibió una vacuna J5 comercial (T02 - bacterina de

*Escherichia coli* J-5 Enviracor™ Pfizer). Los otros grupos de tratamiento recibieron diversas formulaciones que contenían los adyuvantes especificados en la Tabla 5. Todas las vacunaciones se administraron por inyección subcutánea en los días de estudio 0 y 21. El volumen de dosificación era de 5 ml.

**Tabla 5. Grupos de Vacunas – Ganado Vacuno**

Grupo de Trat.	N.º de Animales	Tratamiento	Día	Dosis (ml)	Vía
T01	7	Solución salina	0, 21	5,0	SC
T02	7	Bacterina de <i>Escherichia coli</i> , cepa J-5	0, 21	5,0	SC
T03	7	QCDCR	0, 21	5,0	SC
T04	7	QCDO	0, 21	5,0	SC
T05	7	QCDX	0, 21	5,0	SC
T06	7	QCDXO	0, 21	5,0	SC

5

En la Tabla 5, QC es la abreviatura para QuilA/colesterol, D para DDA, C para carbopol, R para R1005, X para DEAE-dextrano y O para aceite.

Se prepararon soluciones madre como en los Ejemplos 1 a 13 anteriores para lo siguiente: se administró *E. coli* a aproximadamente  $4-5 \times 10^9$  organismos por dosis según se determinó por recuento directo por microscopía óptica. Quil A en agua a 50 mg/ml, colesterol en etanol a 17 mg/ml, DDA en etanol a 17 mg/ml, R1005 en tampón fosfato 20 mM a 5 mg/ml, DEAE-dextrano en agua a 200 mg/ml, agonista de TLR en tampón TE a 20 mg/ml e Iscomatrix en agua a 5,4 mg/ml. Los componentes individuales se añadieron v/v en el orden de los símbolos de una letra de izquierda a derecha. Por ejemplo, en QCDC, se añadió el volumen apropiado de Quil A seguido de adición de colesterol, DDA y por último carbopol. Cuando las formulaciones contenían aceite, los componentes separados se mezclaron por adición después se emulsionaron en una mezcla de aceite mineral Drakeol® 5 LT con Span 80 y Tween 80 (QCDO) o Span 85 y Tween 85 (QCDXO). Drakeol® es un aceite mineral ligero disponible en el mercado.

Se recogieron muestras de sangre los días de estudio 0, 21 y 49 para ensayo serológico. Se determinaron los títulos de anticuerpo contra J5 de *E. coli* en muestras de suero por medio de un ensayo de ELISA indirecto específico de J5. Se determinaron los isotipos de anticuerpo IgG con conjugados de anticuerpo de oveja anti-bovino (Bethyl Labs). Se determinaron los títulos y se expresaron como sus medias geométricas.

### Resultados

Los resultados serológicos del estudio se muestran en las Tablas 6-8. Títulos más elevados de anticuerpos están generalmente asociados con mejor protección de vacunas. El título de IgG específica de J5 total se muestra en la Tabla 6. Varias de las formulaciones de la presente invención producían títulos mucho más elevados que el producto comercial, aun cuando estas formulaciones tenían una cantidad similar de antígeno J5 añadido. Las formulaciones QCDO, QCDX y QCDXO eran especialmente eficaces en la inducción de una buena respuesta inmune en este ganado.

**Tabla 6. Títulos de anticuerpo IgG.**

Grupo de Trat.	Tratamiento	Media geométrica del título de IgG contra J5 a día		
		0	21	48
T01	Solución salina	1573	3135	2795
T02	Bacterina de <i>Escherichia coli</i>	1402	7011	55524
T03	QCDCR	1573	13975	49494

(continuación)

Grupo de Trat.	Tratamiento	Media geométrica del título de IgG contra J5 a día		
		0	21	48
T04	QCDO	1764	62289	391951
T05	QCDX	993	22135	110672
T06	QCDXO	2221	69877	620779

5 Se determinaron los isotipos de anticuerpo IgG1 específico de J5. Estos resultados se muestran en la Tabla 7. De nuevo, las formulaciones QCDO, QCDX y QCDXO eran especialmente eficaces en la inducción de una buena respuesta inmune en este ganado. Estas formulaciones daban títulos mucho mayores incluso con una sola vacunación que la vacuna comercial con dos inyecciones.

Tabla 7. Títulos de anticuerpo IgG1.

Grupo de Trat.	Tratamiento	Media geométrica del Título de IgG1 contra J5 a día		
		0	21	48
		0	21	48
T01	Solución salina	1250	1250	627
T02	Bacterina de <i>Escherichia coli</i>	1114	11105	22135
T03	QCDCR	1250	12458	22135
T04	QCDO	1980	31250	139281
T05	QCDX	789	35057	62289
T06	QCDXO	1573	247472	439702

10 Los títulos de anticuerpo IgG2 se muestran en la Tabla 8. Este isotipo de anticuerpo se asocia con frecuencia con mejor fagocitosis por neutrófilos en la leche y protección para el animal. Las formulaciones QCDO, QCDX y QCDXO eran especialmente eficaces en la inducción de una buena respuesta inmune en este ganado.

Tabla 8. Títulos de anticuerpo IgG2.

Grupo de Trat.	Tratamiento	Media geométrica del Título de IgG2 contra J5 a día		
		0	21	48
		0	21	48
T01	Solución salina	199	396	396
T02	Bacterina de <i>Escherichia coli</i>	280	855	3136
T03	QCDCR	1114	1402	4966
T04	QCDO	558	1573	6250
T05	QCDX	176	3947	9899
T06	QCDXO	559	8824	87940

### Ganado de leche

15 Se formularon vacunas experimentales usando bacterina J5 de *E. coli* inactivada como el antígeno y se realizaron de acuerdo con el Ejemplo 13 anterior. Cada grupo de tratamiento contenía inicialmente siete animales (Tabla 9). Un grupo de tratamiento recibía solución salina (T01) y otro grupo recibía una vacuna de J5 comercial (T02 - Bacterina de *Escherichia coli* J-5 Enviracor™ Pfizer). Los otros grupos de tratamiento recibieron diversas formulaciones que contenían los adyuvantes especificados en la Tabla 9. Todas las vacunaciones se administraron por inyección subcutánea los días de estudio 0 y 21. El volumen de dosificación era de 5 ml.

20

Tabla 9: Grupos de vacunas – Ganado de leche

Grupo de Trat.	Nº de animales	Tratamiento	Día	Dosis (ml)	Vía
T01	7	Solución salina	0,21	5,0	SC
T02	7	Bacterina de <i>Escherichia coli</i> , cepa J-5	0,21	5,0	SC
T03	7	QCDCR	0,21	5,0	SC
T04	7	QCDO	0,21	5,0	SC
T05	7	TXO	21	5,0	SC

En la Tabla 9, QC es la abreviatura de QuilA/colesterol, D para DDA, C para carbopol, R para R1005, X para DEAE-dextrano, T para agonista de TLR (CpG-ODN) y O para aceite. Se prepararon soluciones madre para lo siguiente. Se administró *E. coli* como aproximadamente  $4-5 \times 10^9$  organismos por dosis según se determinó por recuento directo por microscopía óptica. Quil A en agua a 50 mg/ml, colesterol en etanol a 17 mg/ml, DDA en etanol a 17 mg/ml, R1005 en tampón fosfato 20 mM a 5 mg/ml, DEAE-dextrano en agua a 200 mg/ml, agonista de TLR en tampón TE a 20 mg/ml. Los componentes individuales se añadieron v/v en el orden de los símbolos de una letra de izquierda a derecha. Por ejemplo, en QCDC, se añadió el volumen apropiado de Quil A seguido de adición de colesterol, DDA y por último carbopol. Cuando las formulaciones contenían aceite, los componentes separados se mezclaron por adición después se emulsionaron en una mezcla de aceite mineral Drakeol 5 LT con Span 80 y Tween 80 (TXO, QCDO) o con Span 85 y Tween 85.

#### Recogida de sangre

Se recogieron muestras de sangre los días de estudio 0, 21 y 49 para ensayo serológico. Se determinaron los títulos de anticuerpo contra J5 de *E. coli* en muestras de suero por medio de un ensayo de ELISA indirecto, específico de J5. Se determinaron los isotipos de anticuerpo de IgG con conjugados de anticuerpo de oveja anti-bovino (Bethyl Labs). Se determinaron los títulos y se expresaron como sus medias geométricas.

#### Resultados

Los resultados serológicos del estudio se muestran en la Tabla 10. Los títulos de anticuerpos más elevados se asocian en general con mejor protección de vacunas. El título de IgG específica de J5 total se muestra en la Tabla 10. Varias de las formulaciones de la invención producían títulos mucho mayores que el producto comercial, aun cuando estas formulaciones tenían una cantidad similar de antígeno J5 añadido. Las formulaciones QCDO, TXO y QCDOX eran especialmente eficaces en la inducción de una buena respuesta inmune en este ganado.

Tabla 10. Títulos de anticuerpo IgG.

Grupo de Trat.	Tratamiento	Media geométrica del título de IgG contra J5 a día		
		0	21	48
T01	Solución salina	50	60	110
T02	Bacterina de <i>Escherichia coli</i>	175,2	275	245
T03	QCDCR	106,5	202,7	209
T04	QCDO	55,9	328,3	245
T05	TXO	90,6	328,3	889

Se determinaron los isotipos de anticuerpo IgG1 específico de J5. Estos resultados se muestran en la Tabla 10. De nuevo, las formulaciones QCDO, TXO y QCDOX eran especialmente eficaces en la inducción de una buena respuesta inmune en este ganado. Estas formulaciones proporcionaban títulos mucho mayores incluso con una sola vacunación que la vacuna comercial con dos inyecciones.

Este isotipo de anticuerpo se asocia con frecuencia con mejor fagocitosis por neutrófilos en la leche y mejor protección para el animal. La formulación QCDOX era especialmente eficaz en la inducción de una buena respuesta inmune en este ganado.

**Ejemplo 18. Vacuna del virus de la diarrea vírica bovina****Objetivo de estudio**

5 Este estudio comparaba la seguridad, eficacia y protección cruzada de dos vacunas muertas de virus de la diarrea vírica bovina tipo 1 y tipo 2 (BVDV-1 y BVDV-2 o BVD-1/2) y una vacuna de extracto de BVDV-1 y 2 formulada con adyuvantes de la invención con un control negativo (solución salina) y dos positivos (una vacuna viva modificada de BVDV-2 y una vacuna muerta de BVDV-1/2 actualmente disponible) frente a una exposición con BVDV-1 en terneros sin tratamiento anterior. La Tabla 11 presenta el diseño de estudio.

Este estudio también mostraba que los adyuvantes de la invención pueden usarse para distinguir animales vacunados con composiciones de vacunas de la presente invención de animales expuestos de forma natural a BVDV.

**10 Animales**

Se usó ganado vacuno destetado sano de cualquier sexo de entre 7 y 15 meses de edad que eran seronegativos para BVDV-1 y BVDV-2.

**Tabla 11. Diseño de estudio**

Grupo	Vacuna	Adyuvante	Dosis	Días	N.º de Animales	Día de exposición	Vía	Dosis
T01	Solución salina	Ninguno	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml
T02	BVD-2 MLV	Ninguno	2ml, SC cuello izquierdo	0	10	42	IN	5 ml
T03	BVD-1/2 inactivo	PreZent-A	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml
T04	BVD-1/2 inactivo	QCDC	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml
T05	BVD-1/2 inactivo	QCDCR	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml
T06	Extracto inactivo de BVD-1/2	QCDC	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml

QC es la abreviatura para QuilA/colesterol, D para DDA, C para Carbopol®, R para Bay R1005®

**15 Vacunación**

Los días de estudio 0 y 21, se vacunaron animales (N = 10/grupo) como se describe en la Tabla 11. El antígeno (BVDV) se administró como 5.500 Unidades de Potencia Relativa (RU) por dosis según se determinó por un ensayo de ELISA. Los terneros del grupo T01 servían como el grupo de control. Se les administró una solución estéril de cloruro sódico al 0,9 %. Los de los grupos T02 a T06 recibieron vacunas de BVDV 1/2 experimentales con el adyuvante que se muestra en la Tabla 11. El grupo T02 recibió solo una vacunación (Día de Estudio 0). Recibieron una vacuna de virus vivo modificado (MLV) BVDV-2 que no contenía adyuvante. El grupo T03 recibió una vacuna de virus muerto BVDV-1/2 que contenía una emulsión de aceite en agua al 2,5 % (Amphigen) y adyuvantes Quil A/colesterol (PreZent A®). El grupo T04 recibió una vacuna de virus muerto BVDV-1/2 que contenía Quil A/colesterol, DDA y Carbopol. El grupo T05 recibió una vacuna de virus muerto BVDV-1/2 que contenía Quil A/colesterol, DDA, Carbopol y R1005. El grupo T06 recibió una vacuna de extracto de alto título de virus muerto BVDV-1/2 que contenía Quil A/colesterol, DDA y Carbopol el día 0 y una vacuna de extracto de bajo título similar el día 21. Todos los tratamientos se administraron por vía subcutánea en una sola dosis de 2 ml los días 0 y 21 con la excepción del Grupo 2.

El QCDC +/- R contenía 100 µg de Quil A, 100 µg de Colesterol, 50 µg de DDA y Carbopol al 0,075 % e incluía 1.000 µg de R1005 por dosis de 2 ml como se ha descrito anteriormente.

**Exposición**

El día 42 todos los animales se expusieron por vía intranasal a aproximadamente 4 ml (aproximadamente 2 ml por orificio nasal) de una cepa de BVDV-1 no citopática (Cepa NY-1; CVB, USDA, Ames, IA) con una concentración de 5,4 log<sup>10</sup> DICT<sub>50</sub> por dosis de 5 ml.

5 **Observaciones**

Se registraron las observaciones del sitio de inyección los días de estudio 0 (prevacunación), 1, 2, 3, 7 y 21 para el primer sitio de inyección (cuello izquierdo). Se registraron las observaciones para el segundo sitio de inyección (también cuello izquierdo) los días de estudio 21 (prevacunación), 22, 23, 24, 28 y 35. Se midieron todas las reacciones de sitio de inyección palpables (L x A x A, cm). Se registraron las temperaturas rectales los días de estudio -1, 0 (prevacunación), 1, 2 y 3 para la vacunación primaria. Se registraron las temperaturas para la vacunación de refuerzo los días de estudio 20, 21 (prevacunación), 22, 23 y 24.

**Recogida de Muestras de Sangre**

15 Se recogieron muestras de sangre de cada animal disponible usando tubos de separación de suero (SST) los días de estudio -1, 20, 34 y 49. Se recogieron muestras de sangre usando tubos con EDTA los días de estudio 33 a 35 (preexposición) y 36 a 49. Se recogieron muestras de sangre usando tubos de preparación celular (CPT) los días de estudio 34 (preexposición) y 36 a 49.

**Resultados**

20 La Tabla 12 muestra la media de mínimos cuadrados geométrica (MMCG) del título de anticuerpos neutralizantes en suero contra virus BVD por un ensayo de hemaglutinación el día de estudio. Los resultados muestran que los adyuvantes de la invención proporcionaban un aumento en los títulos contra tanto BVDV-1 como BVDV-2 a medida que avanza el estudio. Un título aceptable para la UDSA está por encima de un título de 8. Estos datos demuestran títulos por encima de 5.000 que indican fuerte producción de anticuerpos que es capaz de detener al virus vivo cuando entra en el animal con el potencial para infección y enfermedad.

**Tabla 12. Título neutralizante de anticuerpos en suero**

Grupo (vacuna, adyuvante)	BVDV-1				BVDV-2				
	Día -1	Día 21	MMCG	Día 41	Día 56	Día -1	Día 21	Día 41	Día 56
	Media		MMCG	MMCG	Media	MMCG*	MMCG*	MMCG*	
Grupo T01 (solución salina, ninguno)	1,00 (1-1)	1,00 (1-1)	1,00 (1-1)	21,38 (11-54)	1,00 (1-1)	1,01 (1-1)	1,01 (1-1)	371,98 (128-861)	
Grupo T02 (BVDV-2 MLV, ninguno)	1,00 (1-1)	1,00 (1-1)	2,75 (1-27)	13,27 (1-45)	1,00 (1-1)	2,14 (1-10)	45,21 (1-1024)	454,09 (91-1218)	
Grupo T03 (BVDV-1/2, PreZent-A)	1,00 (1-1)	1,60 (1-6)	35,59 (1-181)	486,49 (91-2048)	1,00 (1-1)	6,40 (1-38)	877,75 (38-3444)	8950,83 (1024-77936)	
Grupo T04 (BVDV-1/2, QCDC)	1,00 (1-1)	1,20 (1-3)	12,66 (5-91)	1772,17 (512-16384)	1,00 (1-1)	8,71 (5-16)	329,56 (54-861)	11611,44 (4096-16384)	
Grupo T05 (BVDV-1/2, QCDCR)	1,00 (1-1)	1,12 (1-3)	18,92 (5-91)	2477,87 (861-6889)	1,00 (1-1)	5,30 (2-13)	692,34 (152-2048)	10517,89 (3444-46341)	
Grupo T06 (extracto de BVDV-1/2, QCDC)	1,00 (1-1)	1,07 (1-2)	(1-23)	(256-4096)	1,00 (1-1)	2,43 (1-7)	239,87 (64-1448)	9956,50 (4096-55109)	

25 La Tabla 13 presenta los datos de leucopenia para los días de estudio 43-56. Los resultados de leucopenia el día de estudio demuestran que la vacuna de MLV (T02) prevenía la infección por ese virus específico de la exposición. Una medida de leucopenia es un criterio para autorizar la comercialización de un producto de MLV por la USDA. Sin

embargo, para un virus inactivado la leucopenia no es un criterio para la USDA pero como sugieren los datos los adyuvantes de la invención producían una leucopenia de hasta solo el 20 % de los animales mientras que la mayoría de las vacunas de virus inactivados presentan una leucopenia del 100 %. Esto indica que los adyuvantes de la invención eran capaces de dirigir una respuesta Th1 fuerte con un antígeno inactivado. Esto es difícil de realizar y rara vez se observa en productos inactivados.

5

**Tabla 13. Leucopenia por Día de Estudio.**

Día de estudio	T01 Solución salina	T02 Vivo Modificado	T03 PreZent A	T04 QCDC	T05 QCDCR	T06 Extracto de QCDC
Día 43	0	0	0	0	0	0
Día 44	0	0	0	0	0	0
Día 45	0	0	0	0	0	0
Día 46	2	0	0	0	0	0
Día 47	5	0	1	1	1	3
Día 48	5	0	1	2	2	3
Día 49	8	0	1	2	2	6
Día 50	8	0	1	0	1	3
Día 51	6	0	0	0	0	0
Día 52	2	0	0	0	0	0
Día 53	2	0	0	0	0	0
Día 54	2	0	0	0	0	0
Día 55	2	0	0	0	0	0
Día 56	2	0	0	0	0	0

La Tabla 14 presenta los títulos de neutralización séricos el Día 41 (20 Días después de la segunda vacunación, preexposición). El virus vivo modificado es capaz de desarrollar respuestas de anticuerpo solamente contra el virus exacto en la vacuna. Esto se observa porque el Grupo T02 muestra protección solo contra BVDV-2. Sin embargo, las vacunas inactivadas con adyuvante de T03 (PreZent-A), T04 (QCDC) y T05 (QCDCR) generaban una fuerte respuesta de anticuerpos pronto al comienzo de la inmunidad y por toda la fase de vida del estudio animal contra un panel serológicamente diverso de BVDV. Esto muestra que estos adyuvantes tenían la capacidad de proporcionar seguridad y eficacia en un modelo de exposición para proteger al ganado no solo en una exposición homóloga sino en una heteróloga.

10

15

**Tabla 14. Títulos de Neutralización en Suero el Día 41.**

Protección Cruzada por Título Serológico de Grupo de Tratamiento, Log 2 de Título de Anticuerpo	T01 Solución Salina	T02 Vivo Modificado	T03 PreZent A	T04 QCDC	T05 QCDCR	T06 Extracto de QCDC
BVDV/1a Promedio	<1	0,8	4,0	2,5	2,9	1,9

(continuación)

Protección Cruzada por Título Serológico de Grupo de Tratamiento, Log 2 de Título de Anticuerpo						
BVDV1b Promedio	<1	0,7	3,9	2,4	2,9	1,5
BVDV2 Promedio	<1	4,5	8,8	8,1	8,0	6,5

5 **Actividad Marcadora.** En este documento se presentan datos que muestran que los adyuvantes de la invención pueden usarse para distinguir animales vacunados con composiciones de vacunas de la presente invención de animales expuestos de forma natural a BVDV. Esto puede observarse por determinación de las diferencias de perfil de anticuerpos entre productos génicos estructurales y no estructurales del virus. La actividad marcadora se demuestra por el procesamiento en gel mediante ensayo de radioinmunoprecipitación (Figura 1). Una respuesta de anticuerpos contra las proteínas NS2/3 y E2 del BVDV es muy pronunciada en un animal vacunado con una vacuna de MLV o en un animal expuesto de forma natural a BVDV o vacuna inactivada con adyuvante PreZent-A. Sin embargo, los adyuvantes de la invención demostraban una respuesta de anticuerpos solo contra la proteína E2 y no contra las proteínas NS2/3. Por lo tanto un animal vacunado con una vacuna de BVDV inactivado que comprende adyuvantes de la invención puede diferenciarse de un animal infectado de forma natural o un animal vacunado con MLV o animal vacunado con PreZent-A. Esta se consideraría una vacuna marcadora que es valiosa para la erradicación de estos tipos de enfermedades en poblaciones animales.

#### 15 **Ejemplo 19. *Mycoplasma hyopneumonia* en cerdos**

##### 15 **Antecedentes**

El *Mycoplasmal pneumonia* de cerdos (MPS) o la neumonía enzoótica es una enfermedad crónica muy extendida caracterizada por tos, retraso del crecimiento y eficacia de la alimentación reducida. El agente etiológico es *M. hyopneumoniae*; sin embargo, la enfermedad de origen natural es el resultado con frecuencia de una combinación de infecciones bacterianas y micoplásmicas.

20 El MPS causa pérdidas económicas considerables en todas las áreas en las que se crían cerdos. Encuestas realizadas en diversas localizaciones por todo el mundo indican que las lesiones típicas de las que se observan con MPS aparecen en el 30 %-80 % de los cerdos en peso en canal. Debido a que las lesiones micoplásmicas pueden resolverse antes de que los cerdos alcancen el peso de sacrificio, la incidencia real puede ser mayor. Se ha descrito que la prevalencia de la infección por *M. hyopneumoniae* en la neumonía porcina crónica oscila del 25 %-93 %. Cerdos de todas las edades son susceptibles a MPS, pero la enfermedad es más común en puercos en crecimiento y en terminación. Pruebas actuales indican que *M. hyopneumoniae* se transmite por aerosol o contacto directo con secreciones del tracto respiratorio de cerdos infectados. Es posible la transmisión de cerdas a lechones durante la lactación. Una vez establecido, el MPS aparece año tras año en piaras infectadas, variando en gravedad con factores ambientales como la estación, ventilación y concentración de cerdos.

##### 30 **Objetivo de Estudio**

Comparar la eficacia de vacunas de *Mycoplasma hyopneumoniae* formuladas con nuevos adyuvantes de la invención frente a la eficacia de una serie experimental de una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* disponible en el mercado después de la exposición intratraqueal a un homogeneizado pulmonar de *M. hyopneumoniae* virulento.

##### **Animales**

35 Se usaron en el estudio sesenta y seis (66) cerdos híbridos clínicamente sanos a aproximadamente 17 días de edad sin un historial de enfermedad causada por *M. hyopneumoniae* y PRRSV, o con vacunación contra los mismos organismos. Antes del transporte al sitio de estudio y durante 2 días después de su llegada, se trató a los cerdos con Naxcel® por vía intramuscular en la pata trasera, siguiendo las instrucciones de la etiqueta, para evitar enfermedades relacionadas con el estrés tales como *Streptococcus suis*. Los animales se asignaron a tratamientos y establos de acuerdo con un plan de aleatorización. El diseño de estudio se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Diseño Experimental

Grupo de Tratamiento	Tratamiento	N.º de Animales	Vacunación	Vía	Exposición
T01	Control Negativo 63464-70	12	Día 0 Día 14	Intra- muscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M. hyo</i>
T02	DDA/Carbopol/R1005 (DCR)	12	Día 0 Día 14	Intra- muscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M. hyo</i>
T03	QAC/ DDA/Carbopol (QCDC)	12	Día 0 Día 14	Intra- muscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M. hyo</i>
T04	QAC/DDA/Carbopol/R1005 (QCDCR)	12	Día 0 Día 14	Intra- muscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M. hyo</i>
T05	Bacterina de <i>M. hyo</i>	12	Día 0 Día 14	Intra- muscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M. hyo</i>
NTX	Ninguno	6	N/A	N/A	N/A

QAC es la abreviatura para QuilA/colesterol.

#### Productos Veterinarios de Investigación (IVP)

5 Los antígenos y Productos Veterinarios de Investigación (IVP) se muestran en la Tabla 16. Las vacunas para los grupos de tratamiento T02, T03 y T04 (todos salvo T05) se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 13 usando las concentraciones de componentes que se muestran en la Tabla 16 a continuación. Los componentes se añadieron en el orden enumerado en la tabla.

10 Se añadió un expansor de solución salina a un recipiente y se inició la homogeneización y se continuó durante todo el procedimiento de preparación. Se preparó *M. hyopneumoniae* inactivado a partir de un volumen mezclado de 75 litros de fermentado por 800 litros de producto final formulado y se añadió a una concentración de 0,09375 ml por dosis. Se añadió Quil A a la concentración enumerada en la Tabla 16. Después se añadió solución de colesterol/etanol. Se añadió solución de DDA/etanol, seguida de adición de la solución de glucolípido Bay R1005. Después se añadió carbopol y la solución se llevó al volumen final con el expansor de solución salina.

15 La vacuna para el Grupo de Tratamiento T05 (formulación de vacuna basada en Amphigen) era el producto disponible en el mercado Respisure® (Pfizer, Inc).

Tabla 16. Productos Veterinarios de Investigación (IVP)

IVP	Grupo de Tratamiento	Dosis de Antígeno	Adyuvante por Dosis	N.º de Dosis	Volumen/Dosis
Control Negativo Solución Salina	T01	N/A	N/A	24	2 ml
DDA/Carbopol/ R1005	T02	<i>M. hyo</i>	Mhyo + DDA/R1005/Carbopol (50/1000µg/dosis/0,075 % p/v)	24	2 ml
QAC/ DDA/ Carbopol	T03	<i>M. hyo</i>	Mhyo+ QuilA/colesterol/DDA/Carbopol (100/100/50 microgramos/dosis/0,075 % v/v)	24	2 ml
QAC/DDA/ Carbopol/R1005	T04	<i>M. hyo</i>	Mhyo+ QuilA/colesterol/DDA/Carbopol /R1005 diluyente adyuvante (100/100/50 v/v/1000µg/dosis) %	24	2 ml

(continuación)

IVP	Grupo de Tratamiento	Dosis de Antígeno	de Adyuvante por Dosis	N.º de Dosis	Volumen/Dosis
Bacterina de <i>M. hyo</i>	T05	<i>M. hyo</i>	Amphigen al 5 %	24	2 ml

### Vacunación

5 Los animales en el grupo de tratamiento NTX no se vacunaron ni se expusieron. A aproximadamente 3 semanas de edad (Día 0 – cuello derecho) y 5 semanas de edad (Día 14 – cuello izquierdo) los animales de T01, T02, T03, T04 y T05 se vacunaron por vía intramuscular, 2 ml por dosis, por un individuo cualificado a ciegas con respecto al grupo de tratamiento.

### Material de Exposición

10 Los animales en T01 a T05 se expusieron por vía intratraqueal 3 semanas después de la segunda vacunación (a aproximadamente 8 semanas de edad – Día de Estudio 35). Los animales se expusieron a una dosis de 5 ml de una dilución 1:50 en medio de Friis de un homogeneizado pulmonar congelado al 10 % de la cepa 11 de *M. hyo* (LI36).

### Recogida de Muestras de Sangre

15 El Día –1 o 0 (antes de la 1ª vacunación), Día 13 o 14 (antes de la 2ª vacunación), Día 34 o 35 (antes de la exposición) y Día 63 (en la necropsia), se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 5 a 10 ml en tubos separadores de suero) de todos los cerdos y se ensayaron para serología de *M. hyopneumoniae* (ELISA-IDEXX).

### Peso

Se pesaron todos los animales a la llegada con fines de distribución en lotes, el Día 34 o 35 (antes de la exposición) y el Día 62 o 63 (antes de la necropsia).

### Necropsia

20 El Día 63, todos los animales supervivientes se sometieron a eutanasia de acuerdo con procedimientos específicos de sitio. Se evaluaron macroscópicamente los pulmones para lesiones características atribuibles a una infección por *M. hyopneumoniae* y se les asignó una puntuación para las lesiones atribuidas a la exposición con *M. hyopneumoniae*. Se registraron las puntuaciones de lesiones pulmonares como el porcentaje de lesiones pulmonares por cada lóbulo pulmonar. El porcentaje de consolidación para cada lóbulo (craneal izquierdo, medio izquierdo, caudal izquierdo, craneal derecho, medio derecho, caudal derecho y accesorio) se puntuó como un valor real entre 0-100 %. El porcentaje para cada lóbulo pulmonar se usó en una fórmula ponderada para el cálculo del porcentaje total de pulmón con lesiones. Se realizó una necropsia de seis (6) animales NTX el Día 34 o 35 antes de la exposición y se puntuaron sus pulmones para lesiones.

### Puntuaciones de Lesión Pulmonar

30 El porcentaje de pulmón total con lesiones se calculó usando la siguiente fórmula: Porcentaje de pulmón total con lesiones =  $100 \times \{(0,10 \times \text{craneal izquierdo}) + (0,10 \times \text{medio izquierdo}) + (0,25 \times \text{caudal izquierdo}) + (0,10 \times \text{craneal derecho}) + (0,10 \times \text{medio derecho}) + (0,25 \times \text{caudal derecho}) + (0,10 \times \text{accesorio})\}$ . Se aplicó la transformación de raíz cuadrada del arco-seno al porcentaje de pulmón total con lesiones antes del análisis. Las lesiones pulmonares transformadas se analizaron con un modelo mixto lineal general. Se usaron combinaciones lineales de las estimaciones de parámetros en comparaciones a priori después del ensayo para determinar el efecto del tratamiento. Se calcularon también las medias de mínimos cuadrados retrotransformadas de un porcentaje significativo ( $P \leq 0,10$ ) de pulmón total con lesiones, sus errores típicos y sus intervalos de confianza del 90 %, así como los mínimos y máximos.

### Resultados

40 Como se indica por los resultados de la Tabla 17 a continuación, los adyuvantes de la invención se comportaban igual de bien que el grupo de tratamiento con adyuvante de aceite T05 que contenía el adyuvante Amphigen®. Típicamente una puntuación de lesión pulmonar por debajo de 3 se considera que ha conferido eficacia por el tratamiento de vacuna. Las combinaciones de los adyuvantes de la invención cumplen estos criterios y QCDCR tenía el mejor comportamiento en puntuación e intervalo entre animales individuales.

45

	Proporción Serológica Positiva (S/P) Día 34	Señal: MMC	Intervalo
T01 - Placebo	0,00	8,4	0-25,55
T02 - DRC	0,28	2,4	0-20,13
T03 - QCDC	0,15	2,1	0-23,18
T04 QCDCR	0,23	0,5	0-2,7
T05 - RespiSure	0,46	0,6	0-2,33
N = 12 por grupo con la excepción de T05 donde N = 11			

### Ejemplo 20. Virus de la gripe Aviar Felina (FAIV)

5 Este estudio evaluaba la eficacia en gatos de una vacuna de gripe usando un adyuvante de la invención por exposición a una cepa de virus de gripe aviar virulenta.

#### Procedimientos y Resultados

Antes de la vacunación, se determinó que los animales eran negativos tanto para virus de la gripe como para anticuerpos contra virus de gripe, basándose respectivamente en hisopos orofaríngeos y análisis de muestras de suero sanguíneo tomadas antes de la vacunación.

10 Se formularon vacunas experimentales usando gripe aviar patógena inactivada y hemaglutinina purificada (HA). Cada grupo de tratamiento contenía inicialmente seis animales (Tabla 18). Dos grupos de tratamiento recibieron las vacunas de FAIV experimentales (el antígeno de la vacuna T01 era proteína HA H5 purificada; y el antígeno de la vacuna T02 era cepa H5N2 inactivada), un grupo de tratamiento recibió una vacuna de cepa vírica H5N1 modificada inactivada (T03), un grupo de control con placebo recibió una vacuna solo con adyuvante (T04) y un grupo de control negativo recibió solo solución salina (T05). Todas las vacunaciones se administraron por inyección subcutánea los días de estudio 0 y 21. El volumen de dosificación era de 1 ml. Después de la vacunación se observó constantemente a los animales hasta que se recuperaron y eran capaces de sentarse derechos para asegurarse de que no había reacciones adversas. Se registraron las observaciones a aproximadamente una hora post-vacunación y se habría registrado cualquier otra complicación observada después de la vacunación.

20 La composición de adyuvante se ha descrito previamente anteriormente mediante el ejemplo QCDC que usa Quil A (20 µg), Colesterol (20 µg), DDA (10 µg) y Carbopol (0,05 %) por dosis. El antígeno es virus completo inactivado o proteína HA H5 purificada.

25 Se evaluaron los animales para reacciones en el sitio de inyección y respuesta serológica a la vacuna. Se sometieron a eutanasia tres animales (dos en T02-H5N2 inactivado y uno en T05-solución salina) debido a hiperoxaluria congénita antes de la exposición. El día de estudio 49, todos los gatos supervivientes se expusieron por la vía intratraqueal a la cepa H5N1 A/Vietnam/1194/04 para evaluar la eficacia de los candidatos a vacunas. Los animales se expusieron a 5,0 ml de material que contenía  $10^5$  DICT<sub>50</sub>, que se liberaba justo encima de la bifurcación usando un pequeño catéter que se introdujo en la traquea usando un traqueoscopio. Los animales se observaron y se tomaron muestras durante cinco días después de la exposición. Al final de la fase animal (día de estudio 54) todos los animales supervivientes se sometieron a eutanasia y se realizó una necropsia en cada uno.

**Tabla 18. Grupos de Vacuna**

Grupo de Tratamiento	Vacuna	Dosis	Vía de Administración	Día de Estudio	Animales
T01	Vacuna de proteína hemaglutinina (HA) recombinante purificada (25.600 unidades de HA/dosis)	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6

(continuación)

Grupo de Tratamiento	Vacuna	Dosis	Vía de Administración	Día de Estudio	Animales
T02	Vacuna de virus H5N2 modificado inactivado (25.600 unidades de HA/dosis)	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6
T03	Vacuna de virus H5N1 modificado inactivado (25.600 unidades de HA/dosis)	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6
T04	Placebo – Solo adyuvante	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6
T05	Placebo – Solo solución salina	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6

5 Se recogieron muestras de sangre los días de estudio -14 prevacunación, 0, 21 y 49 para ensayo serológico. En los días de estudio 49 y 54, se recogieron muestras de sangre para ensayo virológico. En el día de estudio 42, se tomó una muestra de sangre no programada de todos los animales supervivientes para someter a ensayo la función renal en sueros antes de la exposición.

Se recogieron hisopos orofaríngeos de todos los animales los días de estudio -14, 49 antes de la exposición y 50 a 54. Se recogieron hisopos rectales de todos los animales los días de estudio 49 antes de la exposición y los días 50 a 54. La recogida de los hisopos se realizó justo antes de la exposición en el día de estudio 49.

10 Durante la necropsia, se extirparon asépticamente todos los lóbulos pulmonares, se pesaron y se evaluaron macroscópicamente para lesiones características atribuibles a una infección por FAIV. Se usaron porcentajes para identificar el grado de consolidación pulmonar. El pulmón izquierdo se fijó con formalina tamponada neutra al 10 % para histopatología. El pulmón derecho se recogió y se obtuvieron muestras para ensayo virológico. Además de los pulmones también se tomó una muestra de riñón y de cualesquiera tejidos con patología macroscópica y se almacenaron en formalina tamponada neutra al 10 % para histopatología.

15 Se determinaron los títulos víricos en muestras de sangre, hisopos orofaríngeos y rectales y en muestras de tejido pulmonar por medio de una PCR TaqMan específica de H5N1. Brevemente, se aisló ARN usando un sistema MagnaPure LC con el kit de aislamiento de ácido nucleico total MagnaPure LC (Roche Diagnostics; Almere, Países Bajos) y se detectó el virus de la gripe A mediante el uso de un ensayo de RT-PCR a tiempo real. Los datos se expresaron como unidades de dilución de control (UDC). Se determinaron las UDC a partir de una curva patrón producida a partir de una reserva de virus, que se diluyó de forma seriada, sufriendo cada dilución a una extracción de ácido nucleico y amplificación por PCR TaqMan de la misma forma que las muestras de ensayo.

20 También se analizaron hisopos orofaríngeos y muestras de tejido pulmonar positivas por RT-PCR por aislamiento de virus y titulación en células de riñón canino Madine Darby (MDCK). Los resultados se expresaron como  $\log_{10}$  de la dosis infecciosa al 50 % en cultivo de tejidos por mililitro o gramo de muestra ( $\log_{10}$  DICT<sub>50</sub>/ml o  $\log_{10}$  DICT<sub>50</sub>/g).

25 Se analizaron muestras de plasma por neutralización de virus y por inhibición de la hemaglutinación. Para el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI), se incubó una suspensión de virus de la cepa de gripe Vietnam 1194/04 (H5N1, clase 1) o Indonesia 05/2005 (H5N1, clase 2) con diluciones seriadas (2 veces) de muestra de suero pretratada con filtrado de cólera (obtenido de cultivos de *Vibrio cholerae*). Posteriormente, se añadieron eritrocitos a las diluciones y después de la incubación, la dilución máxima de los agentes que mostraba una inhibición completa de la hemaglutinación se definió como el título de HI.

30 El ensayo de neutralización de virus (VN) se basaba en una titulación de punto final de los sueros. Brevemente, se mezcló una cantidad constante de virus con una dilución seriada (2 veces) de una muestra de suero. Se leyó la neutralización de virus usando células MDCK como células indicadoras y se visualizó por aglutinación de eritrocitos. Se puntuaron los títulos de VN tomando la mayor dilución de suero a la que el 50 % de los cultivos celulares inoculados mostraban aglutinación de eritrocitos.

35 Se extirpó el pulmón izquierdo en la necropsia y se fijó con formalina tamponada neutra al 10 % para histopatología. Después de la fijación, los tejidos se embebieron en parafina, se prepararon secciones tisulares y se tiñeron con hematoxilina y eosina para examen histológico. Se registró la descripción y el grado de cambios patológicos observados.

## Resultados

Ninguno de los animales en los cinco grupos de tratamiento mostraba algún dolor o alguna hinchazón en el sitio de inyección después de la primera y segunda vacunación. Además, no se registraron anomalías en la piel en los sitios de inyección. Después de las vacunaciones y antes de la exposición, no había diferencias significativas al nivel de significación de 0,1 en las temperaturas corporales entre tratamientos por análisis de modelo mixto lineal. Un animal de T01 estaba febril ( $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ) antes de la primera vacunación el Día 0 y durante varios días después. Se registraron aumentos esporádicos de la temperatura corporal en animales individuales hasta  $40^{\circ}\text{C}$  o superiores después de las vacunaciones (Días 0 y 21). No se observó una salud anormal relacionada con la vacunación durante el estudio. Tres animales (dos en T02- H5N2 y uno en T05-solución salina) se sometieron a eutanasia debido a hiperoxaluria congénita antes de la exposición. Varios animales de todos los tratamientos presentaban complicaciones de heridas después de la implantación del registrador de temperatura. No se administraron tratamientos simultáneos desde el día 0 hasta el final del estudio.

Los animales vacunados de T01, T02 y T03 mostraban menos signos clínicos y no mostraron mortalidad después de la exposición en comparación con los animales de control de T04 y T05. En T01, un animal mostraba depresión y esfuerzo respiratorio aumentado dos días después de la exposición. Ninguno de los cinco animales de T01 que quedan mostró ninguna salud anormal después de la exposición. En T02 (n = 4) y T03 (n = 6), todos los animales permanecieron sanos después de la exposición. En T04 (n = 6) los primeros signos clínicos anormales (depresión y esfuerzo respiratorio aumentado) se observaron en dos animales dos días después de la exposición. Tres días después de la exposición, los seis animales en T04 estaban deprimidos y mostraban un aumento en el esfuerzo respiratorio. Por consiguiente se tuvieron que someter a eutanasia dos animales por razones de bienestar. Cuatro días después de la exposición (Día 53), se encontró un animal muerto y los tres animales que quedan de T04 presentaban depresión, esfuerzo respiratorio aumentado, protrusión del tercer párpado y descarga nasal y se sometieron a eutanasia por razones de bienestar. En T05 (n = 5), los primeros signos clínicos anormales de depresión y esfuerzo respiratorio aumentado se observaron en un animal un día después de la exposición. Dos días después de la exposición, dos animales más empezaron a mostrar esos signos. Tres días después de la exposición, se encontró un animal muerto y los cuatro animales que quedan presentaban depresión, esfuerzo respiratorio aumentado y protrusión del tercer párpado. Un animal se sometió a eutanasia posteriormente por razones de bienestar. Cuatro días después de la exposición, el esfuerzo respiratorio había empeorado en uno de los tres animales que quedaban y otro animal mostraba adicionalmente descarga nasal. Los tres animales que quedaban se sometieron a eutanasia por razones de bienestar cuatro días después de la exposición (Día 53).

Después de la exposición, las temperaturas medias corporales permanecieron por debajo de  $40,0^{\circ}\text{C}$  en los animales vacunados (T01, T02 y T03). Las temperaturas medias de los animales de control (T04 y T05) se elevaron hasta  $\geq 40,0^{\circ}\text{C}$  comenzando un día después de la exposición. Las diferencias en las temperaturas medias corporales entre tratamientos fueron significativas ( $p = 0,0001$ ) por análisis de modelo mixto lineal. Los datos de animales individuales mostraban que en una minoría de los animales de T01, T02 y T03, las temperaturas corporales se elevaron hasta  $40,0^{\circ}\text{C}$  y por encima en puntos temporales esporádicos el Día 53. En T01, dos animales estaban febriles (intervalo de  $40,0$  a  $40,1^{\circ}\text{C}$ ) en un punto temporal. En T02, dos animales estaban febriles (intervalo de  $40,0$  a  $40,3^{\circ}\text{C}$ ) en uno de los tres puntos temporales, respectivamente. En T03, unos de los animales estaba febril (intervalo de  $40,0$  a  $40,3^{\circ}\text{C}$ ) en tres puntos temporales. En T04 y T05 todos los animales estaban febriles durante al menos doce horas entre los Días 50 y 51.

Los títulos de anticuerpos de HI contra las cepas de gripe Vietnam 1194/04 (H5N1, clase 1) e Indonesia 05/2005 (H5N1, clase 2) se determinaron antes de la primera y segunda vacunación y antes de la exposición. El límite de detección inferior era de 5. Antes de la vacunación, los títulos en los 5 grupos de tratamiento estaban por debajo del límite inferior de 5. Después de la vacunación todos los animales vacunados (T01, T02 y T03) desarrollaron títulos de anticuerpo de HI por encima de 5 y mostraban al menos un aumento de seis veces en los títulos en comparación con los valores prevacunación. En T01 y T03, los títulos contra Vietnam 1194/04 oscilaban de 20 a 160 después de la primera vacunación y de 140 a 960 después de la segunda vacunación. En T02, los títulos contra Vietnam 1194/04 eran inferiores que los observados en T01 y T03, oscilando de 5 a 30 después de la primera vacunación y de 5 a 70 después de la segunda vacunación. Los títulos de anticuerpos de HI contra Indonesia 05/2005 eran similares a los observados contra Vietnam 1194/04.

Se ensayaron muestras de plasma tomadas antes y después de la exposición mediante RT-PCR a tiempo real específica de H5N1 para determinar la carga vírica. Todos los animales tenían muestras negativas a virus antes de la exposición. Después de la exposición, no se detectó virus en el plasma de animales de T01 y T03. Por el contrario, el 25 % (1 de 4) de los animales de T02, el 67 % (4 de 6) de los animales de T04 y el 60 % (3 de 5) de los animales T05 eran positivos a virus en plasma después de la exposición. Eran significativas diferencias entre tratamientos ( $p = 0,0247$ ) por análisis de modelo mixto lineal.

Se evaluó la eliminación de virus después de la exposición en muestras de hisopos de garganta mediante RT-PCR a tiempo real y titulación de virus y en muestras de hisopos rectales mediante RT-PCR a tiempo real. No se detectó eliminación de virus a partir de la garganta en animales de T01 después de la exposición. En T02, los cuatro animales (100 %) eliminaron virus en un punto temporal después de la exposición. En T03, en total dos de seis animales (33 %) eliminaron virus después de la exposición. En T04, tres de seis animales (50 %) eliminaron virus después de la exposición. En T05, cuatro de cinco animales (80 %) eliminaron virus después de la exposición. No se tomaron muestras de animales de T04 y T05 cinco días después de la exposición, puesto que todos los animales habían muerto

para entonces. Con el fin de un análisis estadístico, sin embargo, los animales que murieron o se sometieron a eutanasia antes del último día del estudio tuvieron sus últimos resultados de ensayo llevados adelante al último día del estudio.

5 También se usaron muestras de garganta con un resultado positivo por RT-PCR ( $\geq 1,8$  UDC) en ensayos de titulación de virus. La titulación de virus confirmó que todas las muestras positivas por RT-PCR contenían virus de la gripe infeccioso (no se muestran los datos). Los títulos de virus infeccioso eran inferiores en animales vacunados (T02 y T03) que en animales de control (T04 y T05). Estas diferencias eran significativas tres días después de la exposición cuando se comparaban con T02 o T03 con T04 y tres, cuatro y cinco días después de la exposición cuando se comparaban T02 o T03 con T05. Los títulos en animales de T02 y T03 eran de  $0,5 \log_{10}$  DICT<sub>50</sub>. Los títulos observados en T04 oscilaban de 2,3 a  $4,3 \log_{10}$  DICT<sub>50</sub>. Los títulos observados en T05 oscilaban de 1,5 a  $3,8 \log_{10}$  DICT<sub>50</sub>.

Se detectó la eliminación en heces según se evaluó por hisopos rectales en todos los grupos de tratamiento salvo T02 tres o cuatro después de la exposición. Las cantidades de virus detectadas por RT-PCR estaban entre 2,2 a  $2,3 \log_{10}$  UDC en T01,  $3,2 \log_{10}$  UDC en T03, 2,0 a  $2,7 \log_{10}$  UDC en T04 y  $2,2 \log_{10}$  UDC en T05. No había diferencias significativas en el nivel de significación de 0,1 entre tratamientos en ninguno de los días después de la exposición.

15 La patología pulmonar era menos grave en animales vacunados (T01, T02 y T03) que en animales de control (T04 y T05). Todos los animales vacunados se presentaron con una neumonía broncointersticial subaguda, multifocal, leve. Los animales de control mostraban una neumonía broncointersticial subaguda bien moderada (dos animales de T04 y un animal de T05) o bien grave (cuatro animales de T04 y cuatro de T05) con una distribución multifocal en todos salvo dos animales de control que mostraban (un animal de T04 y uno de T05) una distribución difusa. Se evaluó el pulmón completo para determinar el grado de consolidación, que se expresó en porcentaje de consolidación de tejido pulmonar total. De acuerdo con los hallazgos patológicos pulmonares, el porcentaje de consolidación era significativamente inferior en animales vacunados (T01, T02 y T03) que en animales de control (T04 y T05).

20 Se evaluó la carga vírica en tejido pulmonar recogido en el momento de la muerte o eutanasia por titulación de virus y RT-PCR de H5N1. El tejido pulmonar de animales vacunados (T01, T02 y T03) tenía títulos de virus medios significativamente inferiores que los de controles (T04 y T05). No había diferencias significativas entre los títulos medios en tejido pulmonar de animales vacunados (T01, T02 y T03). El análisis por RT-PCR daba los mismos resultados.

25 Después de la exposición con una cepa de gripe aviar H5N1 altamente patógena, se observaron signos clínicos incluyendo fiebre, mortalidades, viremia, eliminación vírica de garganta y en heces, infección vírica del pulmón y patología pulmonar, incluyendo consolidación, en animales de control que habían recibido adyuvante (T04) o solución salina (T05).

30 La vacunación con proteína HA H5 purificada (T01) evitaba la viremia, la eliminación vírica a partir de la garganta y la mortalidad en seis gatos jóvenes después de la exposición con una cepa de gripe aviar H5N1 altamente patógena. Además, la vacunación con proteína HA H5 purificada (T01) reducía los signos clínicos incluyendo fiebre, carga vírica en pulmón y patología pulmonar, incluyendo consolidación.

35 La vacunación con una cepa H5N2 inactivada (T02) evitaba los signos clínicos, eliminación vírica en heces y mortalidad en cuatro gatos jóvenes después de una exposición a una cepa de gripe aviar H5N1 altamente patógena. Además, la vacunación con la cepa H5N2 inactivada (T02) reducía la viremia, la fiebre, la eliminación vírica a partir de la garganta, la carga vírica en pulmón y la patología pulmonar, incluyendo consolidación.

40 La vacunación con una cepa H5N1 inactivada (T03) evitaba los signos clínicos, la viremia y la mortalidad en seis gatos jóvenes después de una exposición a una cepa de gripe aviar H5N1 altamente patógena. Además, la vacunación con la cepa H5N1 inactivada (T03) reducía la fiebre, la eliminación vírica de la garganta, la carga vírica en pulmón y la patología pulmonar, incluyendo consolidación.

## Sumario

45 No se observaron reacciones en el sitio de inyección con las vacunas formuladas con antígeno HA inactivado o purificado con adyuvante QC/DC. Las vacunas proporcionaron una protección completa de enfermedad clínica y mortalidad en gatos vacunados, una carga vírica significativamente reducida en sangre y tejidos y una eliminación de virus significativamente reducida.

## Ejemplo 21. Cáncer

### 50 Antecedentes

Este estudio se realizó en ratas inmunodeficientes e inmunocompetentes usando células de carcinoma hepatocelular humano y de rata para generar modelos heterotópicos y ortotópicos.

### Animales

Se adquirieron ratas macho atímicas (CrI: NIH-rmu) de 6-8 semanas de edad de Charles River (Wilmington MA). Las

ratas se alojaron en parejas en jaulas microaislantes de policarbonato y se les proporcionó agua *ad libitum* por ósmosis inversa y pienso de rata convencional irradiado; todo el agua y el material de cama estaban autoclavados. Se registraron los pesos corporales dos veces por semana; los animales se mantuvieron durante aproximadamente 7 semanas y se sometieron a eutanasia por inhalación de CO<sub>2</sub> al final del experimento.

- 5 El diseño experimental incorporaba dos fases. En la fase I, se distribuyeron al azar las ratas en dos grupos basándose en su peso corporal. Las ratas en el grupo 1 no recibieron inyección de células tumorales mientras que las ratas en el grupo 2 recibieron una inyección subcutánea de células tumorales. A las tres semanas después de la inyección tumoral, las ratas en el grupo 2 se distribuyeron al azar (basándose en el tamaño tumoral y el índice de ingesta - véase la Tabla 19) en dos grupos para la Fase II, incluyendo uno de los mismos dos subgrupos: 1) controles que no llevaban tumores que recibieron solución salina (el Grupo de Control); 2) controles que llevaban tumores tratados con adyuvante solamente (el Grupo Tumoral); y 3) sujetos que llevaban tumores (Tumores Tratados) dosificados con vacuna (dos inyecciones subcutáneas separadas por dos semanas). Se realizó la necropsia de todos los animales a los 14 días después de la segunda administración de vacuna.

### Vacuna

- 15 Se administró una vacuna por inyección subcutánea a 0,2 ml por dosis.

Tabla 19. Grupos de vacuna

Grupo de Tratamiento	Descripción	Número de Animales	Tipos de Células Tumorales (Antígeno)	Formulación	N.º de Vacunaciones	Dosis/Vía
Control Sin Tumor	Control Negativo (solución salina)	5	NA	Placebo de PBS al 0,63 %	2	0,2 ml/SC
Tumor (vehículo)	Vehículo sin antígeno	5	QCDC	Placebo de PBS al 0,63 %	2	0,2 ml/SC
Tumor (Tratado)	Dosis líquida homogeneizada-vehículo más HepG2	5	QCDCR y 100 µg de antígeno inactivado	Placebo de PBS al 0,63 %	2	0,2 ml/SC

QC es la abreviatura para QuilA/colesterol, D para DDA, C para Carbopol®, R para Bay R1005®, PBS para solución salina tamponada con fosfato.

### Preparación de Vacuna

- 20 Se prepararon vacunas usando Quil-A (20 µg/dosis), colesterol (20 µg/dosis), DDA (10 µg/dosis), Carbopol (0,05 %) con o sin glucolípido Bay R1005® (1.000 µg/dosis) y antígeno. La composición se mezcló usando un homogeneizador y se añadió en el orden de adición que se ha indicado anteriormente.

### Preparación de Antígeno

- 25 Se obtuvieron células HepG2 (clon HB-8065) de la Colección de Cultivos Tipo de los EE.UU. (ATCC, Manassas, VA). HepG2 es una línea celular perpetua que se deriva del tejido hepático de un sujeto masculino caucásico de 15 años de edad con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado. Las células se expandieron en condiciones de cultivo celular convencionales y se prepararon para inyección a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml en Matrigel. A cada rata se le inyectaron 0,5 ml de suspensión celular, por vía subcutánea en el sitio del segundo pezón.

### Mediciones

- 30 Se midió el tamaño tumoral dos veces por semana durante todo el estudio mediante el procedimiento de calibrador, donde el volumen en  $\text{cm}^3 = \{[(A \text{ (mm)} \times A \text{ (mm)})/2 \times L \text{ (mm)}]/1000$ . Se recogió sangre por sangrado retroorbitario para mediciones de química sérica y biomarcadores. Los animales se anestesiaron ligeramente durante el procedimiento de sangrado con CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. Se analizaron los criterios de valoración químicos usando un auto-analizador Hitachi 917 (Roche, Indianápolis, IN). Se obtuvo sangre terminal en anestesia con CO<sub>2</sub> por punción cardíaca. Se evaluaron los criterios de valoración séricos usando ensayos de ELISA comerciales: Alfa-fetoproteína (R & D Systems, Mineápolis MN) y Albúmina Humana (Bethyl Laboratories, Montgomery TX). Los animales se sometieron a eutanasia mediante
- 35 inhalación de CO<sub>2</sub>. Los tumores se extirparon, se pesaron y se colocaron en formalina para histología.

Se usó una prueba T de Student con datos desapareados para comparar diversos parámetros entre ratas de grupos

tratados y de control. Todos los valores se expresaron como media  $\pm$  DT y un valor de  $p < 0,05$  se consideraba que era estadísticamente significativo.

**Resultados**

5 Se corrigieron mediciones de peso corporal restando el peso tumoral (basado en los datos de volumen y en la suposición de que  $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ g}$ ). Los datos se analizaron de dos formas: por grupo de tratamiento y por animales que llevan o no llevan tumor. Cuando se comparaban los pesos corporales en animales que llevaban tumor respecto a animales que no llevaban tumor, había una diferencia significativa entre los grupos en el punto temporal terminal; no había diferencia en el nivel basal. Aun cuando los pesos corporales no eran significativamente diferentes cuando se comparaban por grupo de tratamiento probablemente debido a la corta duración del estudio había una tendencia apreciable hacia un peso corporal disminuido en ambos grupos que llevaban tumor respecto a los controles y una tendencia positiva hacia la recuperación en animales que recibían vacuna cuando se comparaban con los animales que llevaban tumor que recibían vehículo sin antígeno (Tabla 20). Además, también había una correlación razonable entre el porcentaje de cambio en peso corporal a lo largo de la duración del experimento y el volumen tumoral ( $r^2 = 0,72$ ) o el peso tumoral (extirpado) en la finalización ( $r^2 = 0,73$ ).

15 **Tabla 20.** Cambio en el peso corporal con el tiempo entre grupos experimentales. Las áreas sombreadas indican las fechas cuando se administró vacuna.

Día	Peso Corporal (g)		
	Control	Tumor	Tumor Tratado
0	242,7 $\pm$ 11,4	260,0 $\pm$ 16,3	245,0 $\pm$ 12,1
6	263,9 $\pm$ 13,5	278,1 $\pm$ 17,5	258,6 $\pm$ 14,6
9	270,1 $\pm$ 14,0	280,6 $\pm$ 19,2	260,1 $\pm$ 15,1
13	280,6 $\pm$ 16,2	290,3 $\pm$ 20,2	262,0 $\pm$ 15,1
16	283,8 $\pm$ 15,0	289,0 $\pm$ 18,5	261,1 $\pm$ 15,3
20	292,6 $\pm$ 16,1	284,1 $\pm$ 17,3	259,2 $\pm$ 14,6
23	299,8 $\pm$ 15,6	283,2 $\pm$ 17,0	252,7 $\pm$ 14,2
27	298,7 $\pm$ 14,0	276,1 $\pm$ 15,5	259,4 $\pm$ 14,4
30	307,6 $\pm$ 15,9	274,2 $\pm$ 3,4	260,9 $\pm$ 14,5
34	317,8 $\pm$ 16,2	262,6 $\pm$ 14,6	267,8 $\pm$ 15,1
37	318,1 $\pm$ 16,6	263,1 $\pm$ 15,0	268,4 $\pm$ 14,8
41	323,4 $\pm$ 15,3	264,4 $\pm$ 14,7	274,9 $\pm$ 15,2
44	328,5 $\pm$ 16,6	262,5 $\pm$ 14,6	278,3 $\pm$ 15,1
48	331,2 $\pm$ 17,0	263,0 $\pm$ 14,1	281,6 $\pm$ 15,0
49	330,5 $\pm$ 17,1	262,6 $\pm$ 14,4	281,2 $\pm$ 14,3

**Tamaño Tumoral**

20 El tamaño tumoral en ratas de control se comparó con el tamaño tumoral en ratas tratadas con vacuna a lo largo de un periodo de cuatro semanas. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados (debido a una gran variación en el tamaño tumoral), existía una fuerte tendencia hacia disminuir el volumen tumoral total (Tabla 21) y también hacia un peso tumoral extirpado medio disminuido (Tabla 22) en ratas que recibieron la vacuna.

25 **Tabla 21.** Cambio en el tamaño tumoral entre el grupo tratado con vehículo (Tumor) y el grupo tratado con vacuna (Tumor tratado). Las áreas sombreadas indican las fechas cuando se administró vacuna.

Tamaño Tumoral (cm <sup>3</sup> )
-----------------------------------

Día	Tumor	Tumor Tratado
6	4,6 ± 2,1	4,7 ± 2,0
9	4,9 ± 2,0	4,8 ± 1,8
13	4,6 ± 1,8	5,0 ± 2,2
16	12,2 ± 2,7	12,3 ± 2,5
20	22,6 ± 3,8	13,4 ± 2,6
23	33,3 ± 4,8	14,1 ± 2,8
27	34,5 ± 4,6	13,8 ± 2,8
30	35,6 ± 4,6	13,5 ± 3,4
34	37,7 ± 8,0	14,1 ± 2,9
37	38,6 ± 10,2	13,7 ± 2,3
Día	Tumor	Tumor Tratado
41	44,5 ± 12,1	12,5 ± 2,1
44	52,9 ± 13,9	13,0 ± 2,1
48	61,7 ± 15,1	16,9 ± 2,9

**Tabla 22.** Diferencia en peso tumoral en la necropsia.

	Grupo Experimental	
	Tumor	Tumor Tratado
<b>Peso Tumoral (g)</b>	<b>5,14 ± 6,08</b>	<b>1,24 ± 2,21</b>

### Ensayos de Suero

- 5 Se midió la alfa-fetoproteína humana (AFP) por ELISA a diversos puntos temporales durante el estudio. Estos datos se usaron junto con los datos de peso corporal y tamaño tumoral para distribuir al azar los animales en grupos de tratamiento. Los datos de este estudio y los datos históricos indican que la AFP solo es detectable en animales que llevan tumores. La comparación de los datos longitudinales de AFP en los grupos de control tumorales y en los grupos tratados tumorales indica que la AFP estaba disminuida en los animales tratados después de la primera inyección de vacuna y era mucho más baja en ratas tratadas con respecto a controles que llevan tumores al final del estudio;  $4,78 \pm 3,2$  ng/ml en ratas tratadas con vehículo con respecto a  $0,97 \pm 2,5$  ng/ml en ratas tratadas con vacuna, respectivamente. Además, la AFP demostraba una correlación tanto con el volumen tumoral como con el peso tumoral extirpado.
- 10
- 15 Se midió la albúmina humana (hALB) por ELISA a diversos puntos temporales durante el estudio. Los datos de este estudio y los datos históricos indican que la hALB solo es detectable en animales que llevan tumores. La comparación de los datos de hALB en los grupos tumorales de control y tumorales tratados indica que la hALB era inferior en ratas tratadas respecto a controles que llevan tumores al final del estudio (no se muestran los datos). Además, la hALB, de forma similar a la AFP, demostró una correlación tanto con el volumen tumoral como con el peso de tumor extirpado (no se muestran los datos).
- 20 Se ensayó un panel químico de suero central a diversos puntos temporales durante todo el estudio. El panel incluía: AST, ALT, colesterol, fosfatasa alcalina, GGT, BUN, glucosa, creatinina, bilirrubina total, proteína total, albúmina, globulina y minerales Ca, P, Na, K y Cl. De forma similar al peso corporal, los datos se analizaron de dos formas: por grupo de tratamiento y por animales que llevan o que no llevan tumores. Los únicos criterios de valoración en los que se observaron diferencias eran: AST, ALT y colesterol. Para ambas comparaciones, no había diferencias significativas
- 25 entre grupos en el punto temporal basal (no se muestran los datos). Cuando se comparaban los índices químicos en animales que llevaban tumor con animales que no llevaban tumor, había una diferencia significativa entre los grupos

en el punto temporal terminal con elevaciones en AST, ALT y colesterol en los animales que llevaban tumor (no se muestran los datos).

### Conclusión

5 Tomados conjuntamente los datos de los autores demuestran que la carga tumoral se reducía en animales tratados con vacuna preparada contra la línea celular tumoral HepG2, respecto a un grupo que llevaba tumores de control que recibía vehículo.

### Ejemplo 22. CpG

#### Antecedentes

10 Los adyuvantes descritos en este documento son una plataforma adyuvante vacunal potente que puede potenciarse usando un ORN/ODN (CpG) para estimular la respuesta inmune mediante el uso de los adyuvantes como un sistema de administración para el CpG.

#### Materiales y Procedimientos

15 Se usaron en el estudio ratones C57Bl/6 hembra (n = 10 por grupo) con un peso corporal de aproximadamente 18-20 g. Se inmunizaron por inyección intramuscular (IM) en el músculo tibial anterior izquierdo con un volumen total de 50 µl los días de estudio 0, 14 y 21.

#### Dosis de Reactivo

Una dosis de la composición comprendía, en diversas combinaciones, uno o más de los siguientes componentes:

20 Tampón: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (229,32 mg/l), NaCl (1168,00 mg/l) y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1144,00 mg/l), disuelto en WFI y esterilizado por filtración con un filtro de 0,1 µm.  
 Ovoalbúmina (OVA-Antígeno): 10 µg  
 CpG ODN: 10 µg  
 Colesterol: 1 µg  
 Quil A: 1 µg  
 DDA: 0,5 µg  
 25 Carbopol: 0,0375 %  
 R1005: 50 µg

#### Preparación de Vacuna

30 Se colocó tampón en un matraz de 50 ml con una barra de agitación y se agitó a una velocidad constante durante todas las etapas siguientes. Los componentes se añadieron en el siguiente orden: Antígeno (OVA); CPG ODN; Quil A; colesterol (gota a gota); DDA (gota a gota); Carbopol®; y Bay R1005®. La composición se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente a 25°C) durante un mínimo de 30 minutos mientras se protegía de la luz cubriéndola con papel de aluminio. La solución se forzó a través de una aguja de 25G en una jeringa para romper cualquier partícula flotante de gran tamaño para obtener una suspensión uniforme (turbia) y se transfirió a viales de vidrio estériles para su almacenamiento.

#### 35 Recogida de Muestras

Se recogieron las siguientes muestras:  
 Plasma: 4 semanas después de la vacunación de sensibilización (1 semana después de la segunda vacunación de refuerzo)  
 40 Linfocitos T Citotóxicos (CTL) (6 semanas después de la vacunación de sensibilización (3 semanas después de la segunda vacunación de refuerzo)  
 Secreción de citocinas en sobrenadante (4 semanas después de la vacunación de sensibilización)  
 Sobrenadante de 24 horas (IL-2, IL-4, IL-10, TNF)  
 Sobrenadante de 72 horas (IFN-g)  
 45 Tetrámero (4 semanas después de la vacunación de sensibilización)  
 Células T productoras de citocinas (6 semanas después de la vacunación de sensibilización)

Los resultados se proporcionan como una puntuación relativa para cada adyuvante que muestra el efecto del adyuvante. Los criterios de valoración eran una escala relativa basada en la suma de las respuestas de linfocitos T citotóxicos individuales.

#### Resultados y Discusión

50 Como se presenta en la Tabla 23, QCDCR más OVA proporcionaba respuestas de CTL más fuertes que sus subcomponentes, sin embargo las respuestas de conjunto eran bajas (<20 %). La combinación de QCDCR o sus

5 subcomponentes con CPG mejoraba significativamente las respuestas de CTL específicos de OVA. QCDCR/CPG más OVA en conjunto dieron la respuesta de CTL más elevada, sin embargo, no había una diferencia significativa en las respuestas entre este grupo y el colesterol/CPG más OVA (a una proporción 25:1). Se ensayaron sobrenadantes de cultivo de esplenocitos estimulados con OVA (1 mg/ml) para determinar las citocinas por ELISA. QCDCR en solitario o sus subcomponentes dieron solamente respuestas muy débiles de citocinas. La combinación de QCDCR o sus subcomponentes con CPG aumentaban la secreción de IL-2 e IFN-g específicos de antígeno (citocinas Th1-predispuestas). QCDCR y CpG eran iguales en potencia para aumentar las respuestas inmunes celulares. La combinación de las dos muestras sinergia. Cuando se analizaron subcomponentes de QCDCR con CpG, las combinaciones con Quil A dieron las mejores respuestas seguidas de inclusión de colesterol con CpG.

10

Tabla 23. Respuestas Relativas de CTL

Grupos	CTL	IFN-g	Tetrámero	IL-2	Total
QCDCR-CpG+OVA	18	16	18	18	70
QCDC-CpG+OVA	15	18	17	16	66
Ch+CpG+CR+OVA	12	14	15	17	58
Ch+CpG+DC+OVA	8	17	13	15	53
Ch+CpG+DCR+OVA	16	9	14	13	52
C+CpG+OVA	9	13	16	11	48
DCR+CpG+OVA	13	13	12	9	47
CR+CpG+OVA	10	10	11	8	39
DC+CpG+OVA	11	11	8	6	36
CpG+OVA	14	8	9	3	34
QCDCR+OVA	7	5	7	14	33
CR+OVA	5	7	4	7	23
QCDC+OVA	3	6	2	10	21
CR+OVA	4	3	5	4	16
DCR+OVA	6	2	6	2	16
DC+OVA	2	4	3	5	14
OVA	1	1	1	1	4

QC es la abreviatura para QuilA/colesterol, Ch para colesterol, D para DDA, C para Carbopol®, R para Bay R1005®

### Ejemplo 23. Coronavirus Canino (CCV)

#### Ámbito

15 Se empleó un modelo murino usando coronavirus canino (CCV) y nuevos adyuvantes de combinación para evaluar el rendimiento de adyuvante con el componente antigénico dado.

#### Animales

A diez ratones CF-1 por grupo de tratamiento se les administró 0,2 ml por vía subcutánea por animal de cada grupo de tratamiento.

#### Grupos de Tratamiento

20 Las formulaciones de ensayo que se muestran en la Tabla 24 se prepararon como volúmenes de dosis de campo de 1,0 ml con las concentraciones proporcionadas a continuación. Solo se administraron 0,2 ml de la vacuna a cada ratón.

Tabla 24. Formulaciones de Ensayo.

Artículo N.º:	Formulaciones de Ensayo	Concentración de Adj.: µg/2 ml (salvo Carbopol)	CCV/dosis
1	PBS	NA	na
2	Antígeno	PBS	6,040
3	AbISCO-100	100	6,040
4	AbISCO-200	100	6,040
5	AbISCO-300	100	6,040
6	Quil-A/Colesterol	100/100	6,040
7	R1005	1000	6,040
8	R1005/Carbopol	1000/0,075 %	12,079
9	DDA/R1005/Carbopol	50/1000/0,075 %	12,079
10	Quil-A/Colesterol/R1005	100/100/1000	6,040
11	Quil-A/ Colesterol/DDA/Carbopol	100/100/50/0,075 %	6,040
12	Quil-A/ Colesterol/R1005/Carbopol	100/100/1000/0,075 %	12,079
13	Quil-A/Colesterol/DDA/R1005/Carbopol	100/100/50/1000/0,075 %	12,079

### Preparación de Vacuna

5 La preparación de vacuna para los adyuvantes de la invención se describe en los Ejemplos 1-13 anteriores. Las concentraciones de componentes adyuvantes se proporcionan en la Tabla 24. Se añadieron adyuvantes en el orden enumerado en la Tabla.

10 Se añadió un expansor de solución salina a un recipiente y se inició la homogeneización. Se añadió CCV inactivado a una concentración que se muestra en la Tabla 24. Se añadió Quil A a la concentración enumerada en la Tabla 24. El colesterol en solución de etanol se añadió después con homogeneización continua. La solución de DDA/etanol se añadió después durante la homogeneización. La mezcla se microfluidificó a 68950000 pascales (10.000 psi). Después se añadió Carbopol con mezcla y se ajustó el pH a 6,8 a 7,2. Se añadió después glucolípidos Bay R1005® con mezcla. Por último, la composición se llevó a un volumen final con el expansor de solución salina.

15 La vacuna para los grupos de tratamiento que recibían los productos de AbISCO disponibles en el mercado (Isconova, Suecia) se preparó de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta. Los productos de AbISCO están basados en saponinas de quillay y tecnología de ISCOM usando saponinas altamente purificadas.

### Procedimiento de Ensayo: La neutralización sérica de CCV beta

20 El suero se inactivó por calor a 56°C durante 30 a 40 minutos. En una placa estéril limpia se realizaron diluciones seriadas de cada suero (sin diluir, 2, 4, 8...) pasando 120 µl a 120 µl de diluyente. Se usaron al menos dos repeticiones de pocillos/dilución. Se usó inicialmente una dilución de 1:16 si era necesario. Se preparó una reserva de exposición de trabajo diluyendo CCV vivo a un nivel que contenía aproximadamente 240 partículas víricas en 120 µl. Después, se combinaron 120 µl de cada dilución sérica con 120 µl de solución vírica para un total de 240 µl. La solución se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante 30 a 60 minutos para permitir la neutralización. Después se transfirieron 120 µl de cada serie sobre monocapas desnudas en espera de células NLFK sembradas de 7 a 12 días antes. Se evaluó la CPE de 4 a 6 días después. La retrotitulación confirmó que de 50 a 316 partículas de virus afectaban a cada monocapa.

### Resultados

Tabla 25. Neutralización Sérica

Grupo de Tratamiento	Títulos Neutralizantes en Suero
Solución salina	2
Antígeno solo	64
AbISCO-100	256
AbISCO-200	23
AbISCO-300	11
Quil-A/Colesterol	315
R	512
RC	11
DRC	630
QCR	1024
QCDC	630
QCRC	724
QCDRC	1448

### Sumario

Los efectos combinados de los adyuvantes formulados con CCV teniendo en cuenta las propiedades químicas de cada componente han proporcionado excelentes propiedades para un adyuvante de vacuna.

- 5 Los resultados serológicos del estudio se muestran en la Tabla 25. Títulos de anticuerpo neutralizante en suero mayores generalmente están asociados con mejor protección proporcionada por las vacunas. Varias de las formulaciones adyuvantes de la invención producían títulos mucho mayores que los productos con adyuvante comerciales, aun cuando estas formulaciones tenían una cantidad similar de antígeno de CCV añadido. Las formulaciones QCDC, QCR, DRC, QCRC y QCDRC eran especialmente eficaces en la inducción de una buena respuesta inmune en los ratones.
- 10

### Ejemplo 24. Antígeno de Rotavirus Bovino

#### Ámbito

Se empleó un modelo murino usando Rotavirus Bovino y adyuvantes de combinación de la invención para evaluar el rendimiento de adyuvante con el componente antigénico dado.

#### 15 Animales

A diez ratones CF-1 por grupo de tratamiento se les administró 0,2 ml por vía subcutánea por animal para cada grupo de tratamiento.

#### Grupos de Tratamiento

- 20 Las formulaciones de ensayo que se muestran en la Tabla 26 se prepararon como volúmenes de dosis de campo de 2,0 ml con las concentraciones proporcionadas a continuación. Solo se administraron 0,2 ml de la vacuna a cada animal.

Tabla 26. Formulaciones de Ensayo

Artículo N.º	Formulaciones de Ensayo	Concentración de Adj.: µg/2ml (salvo Carbopol)	Rotavirus B223/dosis
1	Tampón fosfato	PBS	NA
2	Antígeno	PBS	6,09 µg
3	AbISCO-100	100	6,09 µg
4	AbISCO-200	100	6,09 µg
5	AbISCO-300	100	6,09 µg
6	Quil-A/Colesterol	100/100	6,09 µg
7	Quil-A/Colesterol/DDA/Carbopol	100/100/50/0,075 %	6,09 µg
8	R1005	1000	6,09 µg
9	Quil-A/Colesterol/R1005	100/100/1000	6,09 µg
10	Quil-A/Colesterol/DDA/R1005/Carbo-pol	100/100/50/1000/0,075 %	6,09 µg
11	Quil-A/Colesterol/DDA/Carbopol	100/100/50 /0,075 %	12,18 µg
12	Quil-A/Colesterol/Carbopol/R1005	100/100/0,075 %/1000	12,18 µg
13	Quil-A/Colesterol/DDA/R1005/Carbopol	100/100/50/1000/0,075 %	12,18 µg
14	DDA/R1005/Carbopol	50/1000/0,075 %	12,18 µg
15	R1005/Carbopol	1000/0,075 %	12,18 µg

### Preparación de Vacuna

5 La preparación de vacuna para los adyuvantes de la invención se describe en los Ejemplos 1-13 anteriores. Las concentraciones de componentes adyuvantes se proporcionan en la Tabla 26. Se añadieron adyuvantes en el orden enumerado en la Tabla.

10 Se añadió un expansor de solución salina a un recipiente y se inició la homogeneización. Se añadió Rotavirus Bovino inactivado a una concentración que se muestra en la Tabla 26. Se añadió Quil A a la concentración enumerada en la Tabla 26. Después se añadió la solución de colesterol/etanol con homogeneización continua. La solución de DDA/etanol se añadió después durante la homogeneización. La mezcla se microfluidificó a 68.950.000 pascales (10.000 psi). Después se añadió Carbopol® con mezcla y el pH se ajustó a 6,8 a 7,2. Se añadió después glucolípido Bay R1005® con mezcla. Por último, la composición se llevó a un volumen final con el expansor plasmático de solución salina.

15 La vacuna para los grupos de tratamiento que recibían los productos de AbISCO disponibles en el mercado (Isconova, Suecia) se preparó de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta. Los productos de AbISCO están basados en saponinas de quillay y tecnología de ISCOM usando saponinas altamente purificadas.

### Resultados

Tabla 27. Títulos de Neutralización en Suero

Formulaciones de Ensayo	Títulos Neutralizantes en Suero (SN)
Solución salina	≤3
Antígeno solamente	23
AbISCO-100	16

(continuación)

Formulaciones de Ensayo	Títulos Neutralizantes en Suero (SN)
AbISCO-200	16
AbISCO-300	14
Quil-A/Colesterol	14
QCDC	16
R	10
QCR	16
QCDCR	16
QCDC	3
QCCR	5
QCDCR	39
DRC	20
RC	3
QC es la abreviatura para QuilA/colesterol, D para DDA, C para Carbopol®, R para Bay R1005®	

5 Los efectos combinados de los adyuvantes formulados con Rotavirus Bovino y tener en cuenta las propiedades químicas de cada componente han proporcionado propiedades excelentes para un adyuvante de vacuna (véase la Tabla 27).

Aunque varias de las formulaciones adyuvantes proporcionaban niveles similares de títulos de anticuerpos neutralizantes séricos, el adyuvante QCDCR proporcionaba el nivel más alto.

### Ejemplo 25. Virus de la gripe Canina

#### Ámbito/Diseño de Estudio

10 Se empleó un modelo canino usando virus de la gripe canina (CIV) y adyuvantes de combinación novedosos para evaluar el rendimiento de adyuvante con el componente antigénico dado.

15 Este estudio tenía un diseño en bloques completamente aleatorizado (véase la Tabla 28). Los animales se clasificaron por fecha de nacimiento para formar bloques de un tamaño de 5. Dentro de un bloque los animales se asignaron al azar a tratamientos. Los animales en el mismo bloque se asignaron al azar a establos (jaulas) localizadas próximas entre sí. Los animales tenían buena salud sin historial de hipersensibilidad a vacunas disponibles en el mercado. Los animales no habían recibido vacunas contra CIV.

**Tabla 28. Diseño de Estudio**

Grupo de Trat.	N.º de Animales	Tratamiento	Día	Dosis	Vía
T01	8-10	Placebo Adyuvante (control neg.)	0	1 ml	SQ
T02	8-10	Formulación de estudio de seguridad de campo (control pos.)	0	1 ml	SQ
T03	8-10	QCDC dosis alta	0	1 ml	SQ
T04	8-10	QCDC dosis media	0	1 ml	SQ
T05	8-10	QCDC dosis baja	0	1 ml	SQ
QC es la abreviatura para QuilA/colesterol, D para DDA, C para Carbopol®					

**Tabla 29. Composición Vacunal**

<b>T01</b>	Adyuvante placebo, control negativo
<b>Formulación</b>	Quil A-colesterol-DDA-carbopol (20/20/10/0,075)
<b>T02</b>	
<b>Formulación</b>	Cepa IOWA-05 de gripe (H3N8) a 760 HA, combinada con Rehydrigel LV al 5 %
<b>T03</b>	
<b>Nombre Genérico</b>	CIV + QCDC de alta dosis
<b>Formulación</b>	Cepa IOWA-05 de gripe (H3N8) a 760 HA, combinada con Quil A-colesterol-DDA-carbopol (20/20/10/0,075)
<b>T04</b>	
<b>Nombre Genérico</b>	CIV + QCDC dosis media
<b>Formulación</b>	Cepa IOWA-05 de gripe (H3N8) a 760 HA, combinada con Quil A-colesterol-DDA-carbopol (10/10/10/0,075)
<b>T05</b>	
<b>Nombre Genérico</b>	CIV + QCDC de baja dosis
<b>Formulación</b>	Cepa IOWA-05 de gripe (H3N8) a 760 HA, combinada con Quil A-colesterol-DDA-carbopol (5/5/10/0,075)

**Preparación de Vacuna**

- 5 La preparación de vacuna para los adyuvantes de la invención se describe en los Ejemplos 1-13 anteriores. Las concentraciones de los componentes adyuvantes se proporcionan en la Tabla 29. Se añadieron adyuvantes en el orden enumerado en la Tabla.

10 Se añadió un expansor plasmático de solución salina a un recipiente y se inició la homogeneización. Se añadió virus de la gripe canina inactivado a una concentración que se muestra en la Tabla 29. Se añadió Quil A a la concentración enumerada en la Tabla 29. La solución de colesterol/etanol se añadió después con homogeneización continua. La solución de DDA/etanol se añadió después durante la homogeneización. La mezcla se microfluidificó a 68950000 pascales (10.000 psi). Después se añadió Carbopol con mezcla y se ajustó el pH a 6,8 a 7,2. Por último, la composición se llevó a un volumen final con el expansor de solución salina.

**Ensayo**

- 15 Se evaluó la serología usando un ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI) por el procedimiento de ensayo convencional según la USDA.

**Resultados/Sumario**

Se presentan en la Tabla 30 los resultados serológicos de los días 42 y 180 de los títulos medios geométricos de la HIA.

20

**Tabla 30. Títulos de HAI**

Tratamiento	Media Geo. de HAI	Media Geo. de HAI
	Día 42	Día 180
T01 (placebo)	8	8
T02 (control pos., alum.)	172	32
T03 (dosis baja)	65	41

(continuación)

Tratamiento	Media Geo. de HAI	Media Geo. de HAI
	Día 42	Día 180
T04 (dosis media)	65	32
T05 (dosis alta)	216	69

Los efectos combinados de los adyuvantes formulados con virus de la gripe y teniendo en cuenta las propiedades químicas de cada componente han proporcionado excelentes propiedades para un adyuvante vacunal.

- 5 Títulos de anticuerpo mayores se asocian generalmente con mejor protección de vacunas. Generalmente, tanto el adyuvante de aluminio (T02) como los adyuvantes de la invención (T03, T04 y T05) causaban un aumento en los títulos de HAI pero la respuesta causada por los adyuvantes de la invención era superior con títulos mayores a día 180 en el grupo de dosis alta (T05). Los títulos para las dosis baja y media de los adyuvantes de la invención eran equivalentes a los de la vacuna tradicional que contiene aluminio para gripe. Además, debido a que los adyuvantes de la invención proporcionan una respuesta inmune de T auxiliares 1 mientras que el aluminio no lo hace, se espera que la duración de la inmunidad sea mayor con un mecanismo de memoria más rápido.

LISTADO DE SECUENCIAS

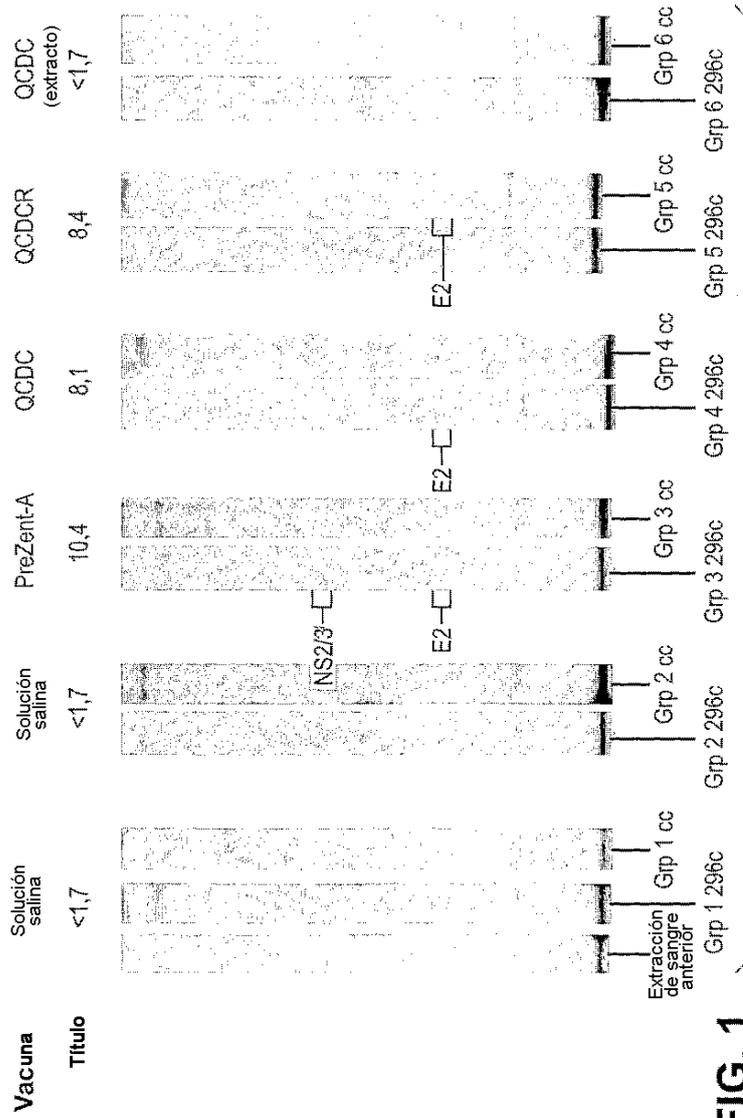
- 15 <110> Dominowski, Paul J.  
Mannan, Ramasamy M.  
Krebs, Richard L.  
Thompson, James R.  
Childers, Tedd A.  
Olsen, Mary K.  
Yancey, Jr., Robert J.
- 20 Weeratna, Risini Zhang, Shucheng Bagi, Cedo M.  
<120> COMPOSICIONES ADYUVANTES NOVEDOSAS  
<130> PC33245A  
<150> US 61/076,232  
<151> 27-06-2008
- 25 <150> US 61/214,557  
<151> 24-04-2009  
<160>8  
<170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1
- 30 <211> 20  
<212> ADN  
<213> ninguno  
<400> 1  
ggtggtgcta agcgtgttat 20
- 35 <210>2  
<211> 20  
  
<212> ADN  
<213> NINGUNO  
<400> 2  
acctctgtca tctctccaca 20
- 40 <210>3  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> NINGUNO  
PC33245A  
Page 90  
<400> 3  
agctgacggt ggacctatta tt 22
- 50 <210>4  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> NINGUNO  
<400> 4  
ggctttgctc tggattc 17

# ES 2 728 949 T3

	<210>5	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> NINGUNO	
5	<400> 5	
	tgggcatcaa gggctaca	18
	<210>6	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> NINGUNO	
	<400>6	
	tcgggttggt tggatg	18
	<210>7	
	<211> 24	
15	<212> ADN	
	<213> NINGUNO	
	<400>7	
	tctgtcttc tgtctgagt gatg	24
	<210>8	
20	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> NINGUNO	
	<400>8	
25	agtgatttgc ttctgtctt ggta	24

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para su uso como una vacuna que comprende una formulación adyuvante y una cantidad terapéuticamente eficaz de un componente antigénico, en la que
  - 5 a) la formulación adyuvante comprende Quil A o una fracción purificada de la misma, un esteroil, bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA) y un polímero de ácido poliacrílico; y
  - b) el componente antigénico comprende un antigénico del FeLV (Virus de la leucemia felina) que comprende la proteína gp70 de FeLV o el virus FeLV o un antigénico de la gripe aviar que comprende el virus de la gripe aviar o una proteína H5 de la gripe aviar.
- 10 2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en la que dicha Quil A o la fracción purificada de la misma está presente en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 µg por dosis, el esteroil está presente en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 µg por dosis, DDA está presente en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 µg por dosis y el polímero de poli(ácido acrílico) está presente en una cantidad del 0,0001 % v/v a aproximadamente el 75 % v/v.
- 15 3. La composición para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el antigénico FeLV comprende gp70 producido por una línea celular FL-74 persistentemente infectada con la cepa del virus de la leucemia felina KT-FeLV-UCD-1 de Número de ATCC CRL-8a12.
4. La composición para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el antigénico FeLV comprende el virus FeLV inactivado.
- 20 5. La composición para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el antigénico es el virus de la gripe aviar entero inactivado.
6. La composición para su uso de la reivindicación 5, en la que el virus de la gripe aviar es un virus H5N1 o un virus H5N2.
7. La composición para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el antigénico es una proteína H5 HA purificada.
- 25 8. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección provocada por el virus de la leucemia felina en un felino.
9. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5-7 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección provocada por el virus de la gripe aviar en un felino.



**FIG. 1**