



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 053**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/102** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04779201 .5**

86 Fecha de presentación : **26.07.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1651265**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54

Título: **Formulaciones de vacuna que comprenden una emulsión de aceite en agua.**

30

Prioridad: **24.07.2003 US 490345 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2008**

73

Titular/es: **Merial Limited**  
**3239 Satellite Blvd.**  
**Duluth, Georgia 30096, US**

72

Inventor/es: **Parisot, Alexis Guy Andre;**  
**Des Gouilles-Blechet, Stephanie Marie-Catherine;**  
**Nordgren, Robert M. y**  
**Charreyre, Catherine**

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 307 053 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**

Formulaciones de vacuna que comprenden una emulsión de aceite en agua.

**5 Campo de la invención**

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

**10 Descripción de la técnica relacionada**

El uso de adyuvantes en vacunas es conocido. Un adyuvante es un compuesto que, cuando se combina con un antígeno de vacuna, aumenta la respuesta inmune al antígeno de vacuna en comparación con la respuesta inducida por el antígeno de vacuna solo. Entre las estrategias que provocan la inmunogenicidad del antígeno están aquellas que hacen que los antígenos de vacunas estén en forma de partículas, aquellas que polimerizan o emulsionan los antígenos de vacuna, procedimientos de encapsulación de antígenos de vacuna, formas de aumentar las respuestas de citoquinas innatas al huésped, y procedimientos que dirigen los antígenos de vacuna a células que presentan antígenos (Nossal, 1999, En: *Fundamental Immunology*. Paul (Ed.), Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, Pa.; Vogel y Powell, 1995, En: *Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach*. Powell y Newman (Eds.), Plenum Press, NY, N.Y., pág. 141). Debido al papel esencial que juegan los adyuvantes en la mejora de la inmunogenicidad de los antígenos de vacuna, el uso de adyuvantes en la formulación de vacunas ha sido prácticamente omnipresente (Nossal, 1999, *supra*; Vogel y Powell, 1995, *supra*; véase también la publicación PCT WO 97/18837).

Los adyuvantes convencionales, conocidos en la técnica, son de diferente naturaleza. Pueden consistir, por ejemplo, en sales inorgánicas insolubles en agua, liposomas, micelas o emulsiones, es decir, adyuvante de Freund. Otros adyuvantes se pueden encontrar en Vogel y Powell, 1995, mencionado anteriormente. Aunque no existe un mecanismo único de acción del ayudante, una característica esencial es su capacidad de aumentar significativamente la respuesta inmune a un antígeno de vacuna en comparación con la respuesta inducida por el antígeno de vacuna solo (Nossal, 1999, *supra*; Vogel y Powell, 1995, *supra*). En este aspecto, algunos adyuvantes son más eficaces en el aumento de las respuestas inmunes humorales; otros adyuvantes son más eficaces en el aumento de las respuestas inmunes mediadas por células (Vogel y Powell, 1995, *supra*); e incluso otro grupo de adyuvantes aumentan tanto las respuestas inmunes humorales como las mediadas por células contra antígenos de vacuna (Vogel y Powell, 1995, *supra*).

En general, las emulsiones utilizadas en la formulación de vacunas comprenden una mezcla de aceite, solución acuosa y tensoactivos. Algunos emulsiones incorporan un tensoactivo lipofílico tal como Span 80<sup>®</sup> y un tensoactivo hidrofílico tal como Tween 80<sup>®</sup>. Estas emulsiones pueden contener también compuestos tales como lecitina o saponina que se sabe que tienen propiedades tensoactivas iónicas.

Sin embargo, se pueden observar problemas de estabilidad con emulsiones utilizadas como adyuvantes en vacunas, en particular durante el almacenamiento o transporte. Esto es particularmente cierto cuando estas composiciones contienen inmunógenos concentrados, especialmente inmunógenos concentrados no purificados. Habitualmente, este es el caso con adyuvantes utilizados en vacunas inactivadas (muertas). Este problema es incluso más significativo con composiciones de vacunas multivalentes, ya que los inmunógenos están más concentrados en el mismo volumen de diluyente.

Otro problema con el uso de adyuvantes está unido al riesgo de sucesos adversos tales como la toxicidad o la inflamación local en el punto de inyección. Por ejemplo, puede aparecer una respuesta inflamatoria local y/o granulomas después de la inyección. Con el fin de limitar dicha reacción adversa, se pueden reducir los tensoactivos y otros componentes de la emulsión; sin embargo, la reducción puede entonces dar lugar a una disminución en la estabilidad de la composición de la vacuna. Por lo tanto, existe la necesidad de adyuvantes novedosos y composiciones de vacuna que contengan dichos adyuvantes con una mayor seguridad y estabilidad.

FR 1 562 758 describe un preparado de vacuna antigénica inyectable que comprende material antigénico derivado de una especie de clostridium, un aceite mineral, un emulsionante lipofílico, y un emulsionante hidrofílico.

Lee *et al.* (2002; *J of Pharmacy and Pharmacology* 54: 43-49) describen una microemulsión que comprende ácido cloníxico, aceite de ricino, Tween 20 y Tween 85.

**60 Descripción resumida de la invención**

En una primera realización, la presente invención proporciona una emulsión de aceite en agua (O/W) novedosa con una mayor estabilidad en presencia de suspensiones bacterianas o virales, especialmente aquellas concentradas y no purificadas o ligeramente purificadas.

Otra realización de la presente invención proporciona una emulsión O/W estable, segura y fácilmente administrable, en particular inyectable, que actúa como vehículo para la liberación de una composición farmacéutica que comprende por lo menos un principio activo que puede ser, más particularmente, un inmunógeno.

## ES 2 307 053 T3

En otra realización de la presente invención se proporciona una emulsión O/W estable, segura y fácilmente inyectable que actúa como adyuvante para aumentar la respuesta inmune inducida por un inmunógeno. En particular, la presente invención proporciona un adyuvante novedoso que, cuando se utiliza en una composición de vacuna que contiene un inmunógeno, aumenta la respuesta inmune celular del vacunado, la respuesta inmune humoral del vacunado o, preferiblemente, ambas respuestas a inmunógeno.

En otra realización de la presente invención se proporciona una composición o vacuna estable, segura e inmunogénica que comprende una emulsión O/W.

Una realización adicional de la presente invención proporciona un procedimiento de fabricación de una composición de vacuna que utiliza el adyuvante de la presente invención; la composición de vacuna obtenida de esta manera; y procedimientos de utilización de la misma.

Otra realización adicional de la presente invención proporciona un kit que comprende un inmunógeno u otro producto farmacéutico en un primer vial, y un adyuvante fabricado según la presente invención en un segundo vial, con el adyuvante diseñado para mezclarse con el inmunógeno u otro producto de la vacuna antes de su uso.

En la presente invención se describe una emulsión de aceite en agua (O/W) inyectable que comprende:

(1) una solución acuosa que contiene un inmunógeno;

(2) un aceite mineral;

(3) un tensoactivo lipofílico no iónico;

(4) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo que comprende diésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado (en general tienen un valor de HLB entre 11 y 13).

En otra realización preferida, la presente invención proporciona una emulsión de aceite en agua (O/W) inyectable que comprende:

(1) una solución acuosa que contiene un inmunógeno;

(2) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) elevado superior a 13 e inferior a 40, en particular un  $HLB \geq 13,5$ , y preferiblemente  $HLB \geq 14$ ;

(3) un aceite mineral;

(4) un tensoactivo lipofílico no iónico;

(5) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo (valor de HLB de aproximadamente 9 a aproximadamente 13).

En otra realización preferida, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una emulsión novedosa que contiene por lo menos un inmunógeno adecuado para obtener una respuesta inmunológica en un vacunado. La presente invención proporciona además dichas composiciones en las que la emulsión actúa como adyuvante para aumentar la respuesta inmune inducida por el inmunógeno, en particular, para aumentar la respuesta celular, la respuesta humoral o preferiblemente ambas.

En otra realización preferida de la presente invención se proporciona un procedimiento de fabricación de una composición de vacuna en el que un inmunógeno, especialmente un inmunógeno en forma liofilizada o en una solución acuosa, se mezcla con el adyuvante según la presente invención. El inmunógeno se puede seleccionar del grupo que consiste en: patógenos inactivados, patógenos atenuados, antígenos en subunidades, vectores de expresión recombinantes que incluyen plásmidos, y similares. El patógeno puede ser bacteriano, viral, de protozoo o fúngico según el origen o el inmunógeno puede constituir una antitoxina.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento de inducción de una respuesta inmune en una vacuna contra un patógeno que comprende la administración de la composición de vacuna de la presente invención al vacunado.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona kits que comprenden por lo menos dos viales, en un primer vial un inmunógeno, especialmente un inmunógeno en forma liofilizada o en solución en un medio acuoso, y en un segundo vial un adyuvante o emulsión según la presente invención.

## ES 2 307 053 T3

Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones, los términos tales como “comprende”, “comprendido/a”, “que comprende” y similares pueden tener el significado atribuido a dichos términos en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar “incluye”, “incluido/a”, “que incluye”, y similares; y aquellos términos tales como “que consiste esencialmente en” y “consiste esencialmente en” tienen el significado descrito para ellos por la ley de Patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en los antecedentes o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras realizaciones se describen o son obvias a partir de la descripción detallada y están comprendidas por la misma.

### Breve descripción de los dibujos

Tal como se indica a continuación, más particularmente en el resto del documento, se realiza una descripción completa y práctica de la presente invención, incluyendo el modo óptimo de realización de la misma, para un experto en la materia, incluyendo las referencias a las figuras que se acompaña, en las que:

La figura 1 muestra las valoraciones de la lesión de pulmón en lechones estimulados 28 días después de la vacunación según el ejemplo 3. El valor promedio se muestra mediante una cruz, el cuartel inferior y el cuartel superior mediante un rectángulo, la mediana estadística mediante una línea horizontal en el rectángulo y del valor mínimo al máximo mediante una línea vertical.

La figura 2 muestra las valoraciones de la lesión de pulmón en lechones estimulados 20 semanas después de la vacunación según el ejemplo 4. El valor promedio se muestra mediante una cruz, el cuartel inferior y el cuartel superior mediante un rectángulo, la mediana estadística mediante una línea horizontal en el rectángulo y del valor mínimo al máximo mediante una línea vertical.

La figura 3 muestra un gráfico que representa la progresión de la enfermedad clínica tal como se ejemplifica mediante la valoración clínica después de la estimulación según el ejemplo 6.

La figura 4 representa los resultados de una prueba de eficacia en el campo en la que los lechones (n = 889 lechones) nacidos de puerkas vacunadas una vez antes de parir con una composición de vacuna de PCV-2 fabricada según la presente invención, mostró una reducción significativa en la mortalidad (descenso del 75%) debido al síndrome del desgaste multisistémico postdestete (PMWS) en comparación con los lechones de control (n = 713) nacidos de puerkas no vacunadas.

### Descripción detallada de la invención

Otros objetivos, características y aspectos de la presente invención se describen o son obvios a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse por un experto en la materia que la presente discusión es una descripción de únicamente realizaciones de ejemplo y no pretende limitar los aspectos más amplios de la presente invención, los cuales están comprendidos en la construcción de ejemplo. De hecho, será evidente para los expertos en la materia que se pueden realizar varias modificaciones y variaciones en la presente invención sin escapar del alcance o espíritu de la invención. Por ejemplo, las características mostradas o descritas como parte de una realización se pueden utilizar en otra realización para producir una realización adicional. Se pretende que la presente invención cubra dichas modificaciones y variaciones tal como se indican en el alcance de las reivindicaciones que se acompañan y sus equivalentes.

Por conveniencia, ciertos términos empleados en la descripción, ejemplos y reivindicaciones que se adjuntan se recogen a continuación.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “animal” incluye todos los animales vertebrados, incluyendo humanos. También incluye un animal individual en todas sus etapas de desarrollo, incluyendo las etapas embrionarias y fetales. En particular, el término “animal vertebrado” incluye, pero no se limita a, humanos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos); equinos (por ejemplo, caballos), bovinos (por ejemplo, ternero), porcino (por ejemplo, cerdos), así como aves. El término “ave”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier especie o subespecie de la clase taxonómica *ava*, tales como, pero sin limitarse a, pollos (de crianza, jóvenes y ponedores), pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y ratites que incluyen avestruz, emú y cassowary.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “cerdo” o “lechón” significa un animal de origen porcino, mientras que “puerca” se refiere a una hembra de edad y capacidad reproductora.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “virulento” significa un aislado que mantiene su capacidad de ser infeccioso en un animal huésped.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “vacuna inactivada” significa una composición de vacuna que contiene un organismo infeccioso o patógeno que ya no es capaz de replicarse o crecer. El patógeno puede ser en su origen bacteriano, viral, de protozoo o fúngico. La inactivación se puede realizar mediante una serie de procedimientos

## ES 2 307 053 T3

que incluyen congelación-descongelación, tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con timerosal o formalina), sonicación, radiación, calor o cualquier otro medio de convección suficiente para evitar la replicación o crecimiento del organismo a la vez que se mantiene su inmunogenicidad.

5 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “inmunogenicidad” significa que es capaz de producir una respuesta inmune en un animal huésped contra un antígeno o antígenos. Esta respuesta inmune forma la base de la inmunidad protectora obtenida por una vacuna contra un organismo infeccioso específico.

10 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “respuesta inmune” se refiere a una respuesta obtenida en un animal. Una respuesta inmune se puede referir a inmunidad celular (CMI); inmunidad humoral o puede implicar a ambas. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmune. Por ejemplo, una composición de vacuna de la presente invención puede inducir específicamente a un incremento en la respuesta de interferón gamma.

15 Tal como se utiliza en la presente invención el término “antígeno” o “inmunógeno” significa una sustancia que induce a una respuesta inmune específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una parte o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmune tras la introducción en un animal huésped; una proteína, un polipéptido, un péptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

20 Tal como se utiliza la presente invención, el término “muy equivalente” significa una vacuna que contiene más de un antígeno aunque sea de la misma especie (es decir, diferentes aislados de *Mycoplasma hyopneumonia*), de una especie diferente (es decir, aislados de *Pasteurella hemolytica* y *Pasteurella multocida*), una vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* y *Clostridium*).

25 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “adyuvante” significa una sustancia añadida a una vacuna para aumentar la inmunogenicidad de la vacuna. El mecanismo de cómo un adyuvante actúa no es completamente conocido. Se cree que algunos adyuvantes aumentan la respuesta inmune mediante la liberación lenta del antígeno, mientras que otros adyuvantes son fuertemente inmunogénicos por sí solos y se cree que actúan de manera sinérgica. Entre los adyuvantes de vacuna conocidos se incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de aceite y agua (por ejemplo, adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund), *Corynebacterium parvum*, Bacillus Calmette Gue-  
30 rin, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato sódico, Bacto-Adyuvante, ciertos polímeros sintéticos tales como poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, “REGRESSIN” (Vetrep-  
35 harm, Atenas, Ga.), “AVRIDINE” (N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina), aceite de parafina, di-  
péptido de muramilo y similares.

40 Tal como se utilizan en la presente invención, los términos “portador farmacéuticamente aceptable” y “vehículo farmacéuticamente aceptable” son intercambiables y se refieren a un vehículo fluido para contener antígenos de vacuna que se pueden inyectar en un huésped sin efectos adversos. Entre los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la técnica se incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa o soluciones tampón. Los portadores pueden incluir agentes auxiliares que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes  
45 tamponadores del pH, aditivos potenciadores de la viscosidad, colorantes y similares.

50 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “composición de vacuna” incluye por lo menos un antígeno o inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inducir una respuesta inmune en un huésped. Las composiciones de vacuna se pueden administrar en dosis y mediante técnicas conocidas por los expertos en medicina o veterinaria, teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, la especie y la condición del animal receptor, y la vía de administración. La vía de administración puede ser percutánea, a través de las mucosas (por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal) o a través de una vía parenteral (intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). Las composiciones de vacuna se pueden administrar solas o se pueden coadministrar o administrar de manera secuencial con otros tratamientos o terapias. Entre las formas de administración se pueden incluir suspen-  
55 siones, jarabes o elixires, y preparados para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), tales como suspensiones o emulsiones estériles. Las composiciones de vacuna se pueden administrar como un pulverizador o mezcladas en alimentos y/o agua o liberadas en una mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuados, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, adyuvantes, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes, y similares, dependiendo de la vía de administración y del preparado deseado. Para preparar preparados adecuados sin una gran experimentación se pueden consultar textos farmacéuticos estándar tales como “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 1990.

65 La presente invención proporciona un adyuvante o emulsión de aceite en agua (O/W) novedoso que comprende:

(1) una solución acuosa que contiene un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmune en un huésped;

## ES 2 307 053 T3

(2) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) superior a 13 e inferior a 40 ( $HLB > 13$ , en particular un  $HLB \geq 13,5$ , y preferiblemente  $HLB \geq 14$ );

(3) un aceite mineral;

(4) un tensoactivo lipofílico no iónico; y

(5) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo (valor de HLB entre 9 y 13).

Las emulsiones fabricadas según la presente invención se basan en una combinación de por lo menos tres tensoactivos elegidos entre los miembros de tres grupos diferentes de tensoactivos, y es posible utilizar uno o más tensoactivos que pertenecen a cada grupo.

En una realización preferida, la concentración de de tensoactivo hidrofílico no iónico (5) en la emulsión (en la presente descripción esto significa que la emulsión final comprende todos los ingredientes a menos que se indique lo contrario) es de un 1% a un 8%, en particular de un 1,5% a un 6%, preferiblemente de un 2% a un 5%, más preferiblemente de un 2,5% a un 4%, expresada como el porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v).

El grupo de tensoactivos comprende tensoactivos hidrofílicos no iónicos que tienen un valor de HLB bajo (valor de HLB entre 9 y 13). Este grupo incluye, pero no se limita a, monoéster de sorbitano con ácido graso etoxilado (en particular 5 grupos etoxilo) (por ejemplo, monooleato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 81<sup>®</sup>, diésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado, triésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado (en particular 20 grupos etoxilo) (por ejemplo, trioleato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 85<sup>®</sup>), triestearato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 65<sup>®</sup>, alcoholes grasos etoxilados (en particular, 5-10 grupos etoxilo) (por ejemplo, Brij 76<sup>®</sup>, Brij 56<sup>®</sup>, Brij 96<sup>®</sup>), ácidos grasos etoxilados (en particular, 5-10 grupos etoxilo) (por ejemplo, Simulsol 2599<sup>®</sup>, Myrj 45<sup>®</sup>), aceite de ricino etoxilado (en particular, 25-35 grupos etoxilo) (por ejemplo, Arlatone 650<sup>®</sup>, Arlatone G<sup>®</sup>), y combinaciones de los mismos.

Se prefieren los diésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado y los triésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado, así como combinaciones de ambos. El ácido graso se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y combinaciones de los mismos. Los triésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado comprenden trioleato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 85<sup>®</sup>, o triestearato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 65<sup>®</sup>.

En una realización preferida, la concentración de tensoactivo hidrofílico no iónico (2) es generalmente de un 0,1% a un 1,5%, en particular de un 0,2% a un 1,4%, preferiblemente de un 0,3% a un 1,3%, más preferiblemente de un 0,4% a un 1,2%, expresada como el porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v).

Este segundo grupo de tensoactivos comprende tensoactivos hidrofílicos no iónicos que tienen un valor del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) ( $HLB < 13$ , en particular un  $HLB \geq 13,5$ , y preferiblemente  $HLB \geq 14$ ). Este grupo comprende monoésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado (en particular 20 grupos etoxilo) (por ejemplo, monolaurato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 20<sup>®</sup>, monopalmitato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 40<sup>®</sup>, monoestearato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 60<sup>®</sup>, monooleato de sorbitano etoxilado, tal como Tween 80<sup>®</sup>, alcoholes grasos etoxilados (en particular, 15-30 grupos etoxilo) (por ejemplo, Brij 76<sup>®</sup>, Brij 98<sup>®</sup>, Brij 721<sup>®</sup>), ácidos grasos etoxilados (en particular, 15-30 grupos etoxilo) (por ejemplo, Myrj 49<sup>®</sup>, Myrj 51<sup>®</sup>, Myrj 52<sup>®</sup>, Myrj 53<sup>®</sup>), copolímeros en bloque no iónicos (por ejemplo, copolímero de polioxi-etileno/polioxi-propileno (POE-POP), 1 tal como Lutrol F127<sup>®</sup>, Lutrol F68<sup>®</sup>) y combinaciones de los mismos.

Para los copolímeros en bloque no iónicos, los porcentajes pueden ser inferiores y pueden ser en particular de un 0,1% a un 0,5%, más particularmente de un 0,2% a un 0,4% (peso por volumen de emulsión (p/v)).

Los tensoactivos (2) preferidos comprenden monoésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado, tales como los descritos anteriormente.

En una realización preferida, la concentración de tensoactivo lipofílico no iónico (4) es de un 0,1% a un 2,5%, en particular de un 0,2% a un 2%, preferiblemente de un 0,2% a un 1,5%, más preferiblemente de un 0,2% a un 1,2%, expresada como el porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v).

Este grupo de tensoactivos comprende ésteres de ácidos grasos de sorbitano (por ejemplo, monolaurato de sorbitano, como Span 20<sup>®</sup>, monopalmitato de sorbitano, tal como Span 40<sup>®</sup>, monoestearato de sorbitano, tal como Span 60<sup>®</sup>, triestearato de sorbitano, tal como Span 65<sup>®</sup>, monooleato de sorbitano, tal como Span 80<sup>®</sup>, trioleato de sorbitano, tal como Span 85<sup>®</sup>, monoisoestearato de sorbitano, tal como Arlacel 987<sup>®</sup>, isoestearato de sorbitano, tal como Crill 6<sup>®</sup>), ésteres de ácidos grasos de manide (por ejemplo, Montanide 80<sup>®</sup>, monooleato de manide (tal como Arlacel A<sup>®</sup>), dioleato de manide, trioleato de manide, tetraoleato de manide), ésteres de manide con ácido graso etoxilado (2, 3 ó 4 grupos etoxilo) (por ejemplo, Montanide 888<sup>®</sup>, Montanide 103<sup>®</sup>, monooleato de manide etoxilado, dioleato de manide etoxilado, trioleato de manide etoxilado, tetraoleato de manide etoxilado), y combinaciones de los mismos.

## ES 2 307 053 T3

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

5 Los tensoactivos preferidos (4) comprenden los ésteres de ácidos grasos de sorbitano, en particular los descritos anteriormente, y combinaciones de los mismos.

Los tensoactivos de la presente invención pueden tener ácidos grasos de origen animal o vegetal. El cambio de un origen a otro (por ejemplo, Tween 80<sup>®</sup> animal a Tween 80<sup>®</sup> vegetal) se podría realizar simplemente con solamente un pequeño ajuste en la formulación de la emulsión.

10 Una emulsión según la presente invención puede tener una concentración global de tensoactivos, en peso por volumen de emulsión, de un 1,2% a un 10%, en particular de un 2% a un 8%, preferiblemente de un 3% a un 7%, más preferiblemente de un 4% a un 6%.

15 En general, la emulsión según la presente invención puede tener una temperatura de inversión de fase (PIT) que es  $\geq 33^{\circ}\text{C}$ , en particular varía de  $33^{\circ}\text{C}$  a  $65^{\circ}\text{C}$ , más particularmente de  $36^{\circ}\text{C}$  a  $60^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente de  $37^{\circ}\text{C}$  a  $55^{\circ}\text{C}$  y más preferiblemente de  $38^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}$ .

20 La PIT es la temperatura a la que una emulsión de agua en aceite cambia a una emulsión de aceite en agua o “desfase” (rotura de la emulsión y separación de las 2 fases). El valor de PIT se puede medir mediante varios medios, como por ejemplo mediante apariencia visual (por ejemplo, véase el ejemplo 2) o mediante conductividad. La emulsión se coloca a una temperatura por debajo de la PIT de la emulsión, por ejemplo de aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua. La temperatura aumenta progresivamente. El cambio del aspecto visual de la emulsión se observa en comparación con una emulsión de control, en particular la fluidez, la viscosidad, la separación en dos fases, el cambio del aspecto de la superficie debido a la migración de la fase oleosa a la superficie. La temperatura a la que se observó este cambio de aspecto visual es el valor de PIT de la emulsión. Alternativamente, la PIT se determina mediante el paso rápido de un valor de conductividad de aproximadamente 5-8 miliSiemens/centímetro (mS/cm) (emulsión de aceite en agua) a un valor de aproximadamente 0 mS/cm (emulsión de agua en aceite) medida por una sonda colocada en la emulsión, cerca de su superficie. La temperatura a la que se observó la transición es el valor de PIT de la emulsión.

30 Un experto en la materia será capaz de determinar combinaciones de tensoactivos y aceite, incluyendo sus respectivas concentraciones, con el fin de producir emulsiones según la presente invención, y en particular emulsiones que tienen un valor de PIT en los intervalos definidos anteriormente sin una gran experimentación.

35 En una realización particular de la presente emulsión, una emulsión tal como se describe aquí no contiene ningún tensoactivo iónico o compuesto que se sepa que tiene propiedades tensoactivas iónicas, tales como lecitina o saponina. En general, las emulsiones según la presente invención pueden contener, en volumen por volumen de emulsión, de un 3% a un 55% de aceite, en particular de un 5% a un 50% de aceite, preferiblemente de un 10% a un 40% de aceite y, más preferiblemente, de un 20% a un 40% de aceite. Por definición, los intervalos de los valores en la presente descripción incluyen siempre el límite del intervalo, a menos que se indique lo contrario.

40 El aceite utilizado puede ser un aceite mineral que incluye, pero sin limitarse a, aceite de parafina, tal como aceite isoparafínico y/o aceite nafténico, escualano, pristano, aceite de poliisobuteno, aceite de poliisobuteno hidrogenado, aceite de polideceno, aceite de poliisopreno, aceite de poliisopropeno, y similares. Un aceite mineral ventajoso útil en la presente invención puede incluir un aceite que comprende una cadena de carbonos lineal o ramificada que tiene un número de átomos de carbono superior a 15, preferiblemente de 15 a 32, y libre de compuestos aromáticos. Dichos aceites pueden ser, por ejemplo, aquellos comercializados con el nombre de “MARCOL 52<sup>®</sup>” o “MARCOL 82<sup>®</sup>” (producido por Esso, Francia) o “DRAKEOL 6VR<sup>®</sup>” (producido por Penreco, Estados Unidos).

45 El aceite también puede ser una mezcla de aceites que comprende por lo menos 2 aceites seleccionados entre los aceites descritos en la presente invención y en cualquier proporción. La mezcla de aceites también puede comprender por lo menos un aceite seleccionado entre los aceites descritos anteriormente y por lo menos un aceite vegetal, y este aceite vegetal representa desde aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 33% de la fase oleosa, preferiblemente desde aproximadamente un 10% hasta aproximadamente un 25% v/v. Estos aceites vegetales son aceites insaturados ricos en ácido oleico que son biodegradables y preferiblemente líquidos a la temperatura de almacenamiento (aproximadamente  $+4^{\circ}\text{C}$ ) o por lo menos posibilitan la formación de emulsiones que son líquidas a esta temperatura.

55 Por ejemplo, el aceite vegetal puede ser aceite de cacahuete, aceite de nueces, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de onagro y similares.

60 En una realización preferida, los tensoactivos hidrofílicos (2) y (5) incluyen preferiblemente tensoactivos que tienen la misma parte hidrofílica de las moléculas. Por ejemplo, se utilizan ésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado para cada uno de los tensoactivos hidrofílicos (2) y (5). Por ejemplo, si se elige Tween 85<sup>®</sup> como tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo, el tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB elevado tendrá de manera ventajosa una parte hidrofílica constituida por un sorbitano etoxilado, tal como Tween 80<sup>®</sup>.

65 En general, la presente invención prevé la utilización de una solución acuosa que comprende un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptables o adecuados para veterinaria, que incluyen, pero sin limitarse a, agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, solución tampón y similares. El vehículo, excipiente o diluyente también puede incluir polioles, glúcidos o agentes tamponadores de pH. El vehículo, excipiente o diluyente también puede

## ES 2 307 053 T3

comprender, por ejemplo, aminoácidos, péptidos, antioxidantes, bactericida, compuestos bacteriostáticos. La solución acuosa se añade al aceite y los tensoactivos en una cantidad tal para obtener un 100% de volumen de la emulsión según la presente invención.

5 El equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) de una emulsión permite la estimación de la fuerza hidrofílica o lipofílica de un tensoactivo. El HLB de una molécula anfifílica se calcula generalmente tal como se indica a continuación:

$$10 \quad \text{HLB} = \frac{(20 \times \text{peso de la parte hidrofílica})}{(\text{peso de la molécula anfifílica})}$$

15 El HLB puede tener un valor que varía desde 0 (para la molécula más lipofílica) hasta 20 (para la molécula más hidrofílica). Según la composición química del tensoactivo (en particular, por ejemplo, la adición de grupos etoxilo o de óxidos de alqueno), esta estimación puede cambiar y el dominio del valor de HLB puede aumentar (por ejemplo, el Lutrol F68<sup>®</sup> tiene un HLB de 29). Con una mezcla de tensoactivos, el HLB de la mezcla es la adición del HLB de cada tensoactivo, equilibrado por su proporción en peso:

$$20 \quad \text{HLB} = \frac{(\text{HLB tensoactivo X} \times \text{peso tensoactivo X}) + (\text{HLB tensoactivo Y} \times \text{peso tensoactivo Y})}{(\text{peso tensoactivo X} + \text{peso tensoactivo Y})}$$

25 En una realización de una emulsión fabricada según la presente invención, el HLB final de la emulsión es de aproximadamente 9 a aproximadamente 12, preferiblemente de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11,5 y más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 11,5.

30 La presente invención contempla una emulsión que comprende aceite de parafina (en particular, a una concentración desde aproximadamente un 10% hasta aproximadamente un 40% y preferiblemente desde aproximadamente un 20% hasta aproximadamente un 40%, expresada como un volumen por volumen de emulsión (v/v)); un monoéster de ácido graso de sorbitano (como tensoactivo lipofílico no iónico), un triéster de sorbitano con ácido graso etoxilado (como tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo); y un monoéster de sorbitano con ácido graso etoxilado (como tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB elevado). En particular, el monoéster de ácido graso de sorbitano es un monooleato de sorbitano (en particular, a la concentración desde un 0,2% a un 1,5%, preferiblemente desde un 0,2% hasta un 1,2%, expresada como el peso por volumen de emulsión (p/v)), el triéster de sorbitano con ácido graso etoxilado es un trioleato de sorbitano etoxilado (en particular, a la concentración desde un 2% a un 5%, preferiblemente desde un 2,5% hasta un 4% p/v) y el monoéster de sorbitano con ácido graso etoxilado es un monooleato de sorbitano etoxilado (en particular, a la concentración desde un 0,3% a un 1,3%, preferiblemente desde un 0,4% hasta un 1,2% p/v). Por ejemplo, la emulsión comprende el aceite de parafina en aproximadamente un 29,3% en volumen por volumen de emulsión, el monooleato de sorbitano en un 0,6% en peso por volumen de emulsión, el trioleato de sorbitano etoxilado en un 3,4% en peso por volumen de emulsión y el monooleato de sorbitano etoxilado en un 0,75% en peso por volumen de emulsión.

35 En una segunda realización según la presente invención, la emulsión comprende aceite de parafina (en particular, a una concentración desde un 10% hasta un 40%, preferiblemente desde un 20% hasta un 40% v/v), un monoéster de ácido graso de sorbitano (como tensoactivo lipofílico no iónico), un triéster de sorbitano con ácido graso etoxilado (como tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo); y un copolímero en bloque no iónico (como tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB elevado). En particular, el monoéster de ácido graso de sorbitano es un monooleato de sorbitano (en particular, a la concentración desde un 0,2% a un 1,5%, preferiblemente desde un 0,2% hasta un 1,2% p/v), el triéster de sorbitano con ácido graso etoxilado en un trioleato de sorbitano etoxilado (en particular, a la concentración desde un 2% a un 5%, preferiblemente desde un 2,5% hasta un 4% p/v) y el copolímero en bloque no iónico es un polímero polioxi-etileno/polioxi-propileno (POE-POP) (en particular, a la concentración desde un 0,1% a un 0,5%, preferiblemente desde un 0,2% hasta un 0,4% p/v). Por ejemplo, la emulsión comprende el aceite de parafina en aproximadamente un 29,3% v/v, el monooleato de sorbitano en un 0,6% p/v, el trioleato de sorbitano etoxilado en un 3,4% p/v y el monooleato de sorbitano etoxilado en un 0,25% p/v.

40 En la presente invención se menciona una emulsión de aceite en agua (O/W) inyectable que comprende:

45 (1) una solución acuosa que contiene un principio activo tal como un fármaco o un inmunógeno, preferiblemente un inmunógeno;

(2) un aceite mineral;

## ES 2 307 053 T3

(3) un tensoactivo lipofílico no iónico; y

(4) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo que comprende un diéster de sorbitano con ácido graso etoxilado (que puede tener un valor de HLB entre 11 y 13).

5

Una emulsión según esta realización comprende diésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado que pueden contener hasta 20 grupos epoxi. Los ácidos grasos pueden ser de origen animal o vegetal y se pueden seleccionar del grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y combinaciones de los mismos. En una realización, el ácido graso etoxilado es preferiblemente oleato. Los otros ingredientes, así como las propiedades generales de la emulsión tales como la PIT, pueden tener las mismas características que las descritas anteriormente.

10

Preferiblemente, el tensoactivo (4) comprende diésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado, tales como dioleato de sorbitano etoxilado, diestearato de sorbitano etoxilado o diisoestearato de sorbitano etoxilado, dipalmitato de sorbitano etoxilado, dilaurato de sorbitano etoxilado, y combinaciones de los mismos.

15

Opcionalmente, se pueden añadir otros compuestos como coadyuvantes a la emulsión, incluyendo, pero sin limitarse a, alumbre, oligonucleótidos CpG (ODN), en particular ODN 2006, 2007, 2059 ó 2135 (Pontarollo R.A. *et al.*, *Vet. Immunol. Immunopath.*, 2002, 84: 43-59; Wernette C.M. *et al.*, *Vet. Immunol. Immunopath.*, 2002, 84: 223-236; Mutwiri G. *et al.*, *Vet. Immunol. Immunopath.*, 2003, 91: 89-103); poliA-poliU (“Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach”, editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, *Pharmaceutical Biotechnology*, 6: 03); bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) (“Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach”, editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, *Pharmaceutical Biotechnology*, volume 6: 157), N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)propanodiamina (tal como Avridine<sup>®</sup>) (*Ibid.*, pág. 148), carbómero, quitosano (véase la Patente de Estados Unidos No. 5,980.912, por ejemplo).

20

La presente invención también proporciona un procedimiento de fabricación de una composición de vacuna o una composición inmunológica que comprende por lo menos un antígeno o inmunógeno y un adyuvante o emulsión fabricados según la presente invención. El inmunógeno se puede incorporar durante la formación de la emulsión o, en una realización alternativa, el inmunógeno se pueda añadir a la emulsión posteriormente, por ejemplo, justo antes de su uso.

30

Toda la cantidad de la solución acuosa utilizada puede estar presente en la emulsión producida en primer lugar. O puede ser que sólo una parte de esta solución acuosa se utilice para formar la emulsión y la cantidad restante de solución acuosa se añada después de la incorporación del inmunógeno. El inmunógeno o antígeno puede estar en forma liofilizada o presente en alguna otra forma sólida apropiada y, a continuación, se mezcla con la emulsión o, alternativamente, el antígeno puede estar en solución, en particular en una solución acuosa, y esta solución se mezcla con la emulsión.

35

Los tensoactivos se añaden preferiblemente al aceite o a la solución acuosa según su solubilidad. Por ejemplo, los tensoactivos lipofílicos no iónicos se añaden al aceite según la presente invención mientras que los tensoactivos hidrofílicos no iónicos que tienen un valor de HLB elevado se añaden a la solución acuosa.

40

La emulsificación se puede preparar según los métodos convencionales conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, la emulsión se puede preparar a una temperatura por debajo de la PIT de la emulsión, en particular a temperatura ambiente, por ejemplo a aproximadamente 25°C. La fase acuosa y la fase oleosa se mezclan mediante agitación mecánica, por ejemplo con una turbina equipada con un rotor-estator capaz de crear una fuerza cizalla elevada. Preferiblemente, la agitación se inicia a una velocidad de rotación baja y lentamente aumenta en relación a la adición progresiva generalmente de la solución acuosa en el aceite. Preferiblemente, la solución acuosa se añade progresivamente al aceite. La proporción de aceite/solución acuosa se puede adaptar para obtener una emulsión de agua en aceite (W/O), por ejemplo, a una concentración de aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 55% de aceite (v/v). Cuando se detiene la agitación, la emulsión cambia progresivamente a una emulsión O/W (inversión de fase). Después de la inversión y si es necesario, la emulsión se diluye mediante la adición de una solución acuosa para obtener la concentración deseada de aceite en la emulsión final. La emulsión se puede almacenar a aproximadamente 5°C.

50

55

En otra realización, la emulsión se puede preparar a una temperatura superior a la PIT de la emulsión. En una primera etapa, la fase acuosa y la fase oleosa se mezclan a una temperatura superior a la PIT de la emulsión. Preferiblemente, la solución acuosa se añade progresivamente al aceite. La proporción de aceite/solución acuosa se puede adaptar para obtener una emulsión de agua en aceite (W/O), por ejemplo, a una concentración de aproximadamente el 40% hasta aproximadamente el 55% de aceite (v/v). La emulsificación se puede realizar mediante la agitación con una fuerza de cizalla baja o nula, por ejemplo con un mezclador estático o una hélice marina o con una turbina a una velocidad de rotación muy baja. La emulsión obtenida es una emulsión de agua en aceite (W/O). En una segunda etapa, la emulsión se enfría progresivamente por debajo de la PIT. Durante esta etapa, la emulsión cambia a una emulsión O/W (inversión de fases). Después de la inversión y si es necesario, la emulsión se diluye mediante la adición de una solución acuosa para obtener la concentración deseada de aceite en la emulsión final. La emulsión se puede almacenar a aproximadamente 5°C.

60

65

El tamaño de las gotas en la emulsión puede ser de aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 500 nm. La emulsión se puede utilizar, por ejemplo, como adyuvante para formular una composición de vacuna o una composición farmacéutica. La emulsión también se puede utilizar como disolvente para disolver un producto seco, especialmente un producto liofilizado que contiene, por ejemplo, microorganismos atenuados o vectores recombinantes vivos.

En una realización particular, se produce una pre-emulsión con sólo una parte de la solución acuosa. Esta pre-emulsión se puede diluir mediante la adición de una suspensión de un principio activo, tal como un fármaco o un inmunógeno, preferiblemente un inmunógeno, para obtener la composición final. Alternativamente, la pre-emulsión se puede diluir con una solución acuosa y utilizar para disolver un producto seco, tal como un producto liofilizado.

El inmunógeno o antígeno adecuado para su uso en la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en patógenos inactivados, patógenos atenuados, subunidades inmunogénicas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos, epítomos, haptenos), o vectores de expresión recombinante, incluyendo plásmidos que tienen insertos inmunogénicos. En una realización de la presente invención, el inmunógeno es un microorganismo inactivado o muerto. En otra realización de la presente invención, la composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado del grupo de patógenos aviares que incluyen, pero no se limitan a, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), virus del síndrome de la disminución de la puesta (EDS) o virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV), virus de la gripe aviar, y similares, y combinaciones de los mismos.

Alternativamente, la composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno felino tal como, pero sin limitarse a, virus del herpes felino (FHV), calicivirus felino (FCV), virus de la leucemia felino (FeLV), virus de inmunodeficiencia felino (FIV), virus de la rabia, y similares, y combinaciones de los mismos.

En otra realización, una composición de vacuna de la presente invención comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno canino tal como, pero sin limitarse a, virus de la rabia, virus del herpes canino (CHV), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippophosa*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica*, y similares, y combinaciones de los mismos.

En otra realización de la presente invención, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno equino, tal como el virus del herpes equino (tipo 1 o tipo 4), virus de la gripe equina, tétano, virus del Oeste del Nilo, y similares o combinaciones de los mismos.

En otra realización de la presente invención, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno bovino, tal como el virus de la rabia, rotavirus bovino, virus de la paragripe bovina tipo 3 (bPIV-3), coronavirus bovino, virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), virus respiratorio sincicial bovino (BRSV), virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, y similares y combinaciones de los mismos.

En otra realización de la presente invención, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno porcino tal como, pero sin limitarse a, virus de la gripe porcina (SIV), circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), virus de la pseudorabia (PRV), parvovirus porcino (PPV), FMDV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, y similares, y combinaciones de los mismos.

Una realización preferida de la presente invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden por lo menos un inmunógeno y una emulsión en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunógenos que comprenden virus, bacterias, hongos y similares se pueden producir mediante métodos de cultivo *in vitro* utilizando medios de cultivo adecuados o líneas de células huésped adecuadas y métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el PRRS se puede cultivar en una línea celular adecuada, tal como la línea celular MA-104 (véase, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.587.164; 5.866.401; 5.840.563; 6.251.404, entre otras). De forma similar, el PCV-2 se puede cultivar utilizando la línea celular PK-15 (véase la Patente de Estados Unidos No. 6.391.314); el SIV se puede cultivar en huevos (Patente de Estados Unidos No. 6.048.537); y *Mycoplasma hyopneumoniae* se puede cultivar en un medio de cultivo adecuado (Patentes de Estados Unidos Nos. 5.968.525; US 5.338.543; Ross R.F. *et al.*, Am. J. Vet. Res., 1984, 45: 1899-1905).

Con el fin de obtener una composición inmunológica inactivada o composición de vacuna, el patógeno se inactiva preferiblemente después de su recogida y, opcionalmente, se somete a un aclarado mediante un tratamiento químico utilizando, por ejemplo, formalina o formaldehído, beta-propiolactona, etilenimina, etilenimina binaria (BEI), timerosal, y similares, y/o un tratamiento físico (por ejemplo, un tratamiento térmico o sonicación). Los métodos para la inactivación son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el virus PRRS se puede inactivar mediante el tratamiento con beta-propiolactona (Plana-Duran *et al.*, Ve. Microbiol., 1997, 55: 361-370) o mediante el tratamiento con BEI (Patente de Estados Unidos No. 5.587.164); la inactivación del virus PCV-2 se puede realizar utilizando el tratamiento con etilenimina o mediante el tratamiento con beta-propiolactona (Patente de Estados Unidos No. 6.391.314); el virus de la gripe porcina se puede inactivar utilizando un detergente como Triton, o con el tratamiento con formaldehído (Patente de Estados Unidos No. 6.048.537); la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* se puede inactivar mediante el tratamiento con formaldehído (Ross R. F., *supra*), mediante el tratamiento con etilenimina o BEI (véase WO 91/18627), o mediante tratamiento con timerosal (Patentes de Estados Unidos Nos. 5.968.525 y 5.338.543).

## ES 2 307 053 T3

El patógeno inactivado se puede concentrar mediante técnicas de concentración convencionales, en particular mediante ultrafiltración y/o se puede purificar mediante medios de purificación convencionales, en particular utilizando técnicas de cromatografía que incluyen, pero no se limitan a, filtración en gel, ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, o precipitaciones selectivas, en particular en presencia de polietilenglicol (PEG).

5 Los inmunógenos útiles en las composiciones de vacuna según la presente invención también incluyen vectores de expresión. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión recombinante *in vivo* tales como un vector polinucleótido o un plásmido (EP-A2-1001025; Chaudhuri P, Res. Vet. Sci. 2001, 70: 255-6), vectores de virus tales como, pero sin limitarse a, vectores de adenovirus, vectores de poxvirus tal como el virus de la viruela aviar  
10 (Patentes de Estados Unidos Nos. 5.174.993; 5.505.941 y 5.766.599) o vectores del virus de la viruela de los canarios (Patente de Estados Unidos No. 5.756.103), o vectores bacterianos (*Escherichia coli* o *Salmonella sp.*).

La presente invención también comprende la formulación de composiciones inmunológicas multivalentes o la combinación de composiciones de vacunas. Por ejemplo, entre los antígenos de la presente invención útiles en una  
15 bacterina bovina de combinación producida según la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella sp.*, particularmente *P. multocida* y *P. haemolytica*, *Haemophilus sp.*, particularmente *H. somnus*, *Clostridium sp.*, *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *E. coli*, y similares.

La presente invención proporciona además procedimientos para inducir una respuesta inmune en un huésped, por  
20 ejemplo un animal, que comprende la administración al huésped de una composición inmunológica o una composición de vacuna según la presente invención. Las respuestas inmunes obtenidas de esta manera son particularmente respuestas de anticuerpo y/o respuestas inmunes celulares, y en particular, una respuesta de gama-interferón.

En particular, la presente invención proporciona procedimientos para inmunizar contra, o evitar o reducir los síntomas  
25 causados por, la infección de un animal con un organismo patogénico (por ejemplo, la infección por un virus, bacteria, hongo o parásito protozoo). El procedimiento de la presente invención es útil en animales vertebrados que incluyen, pero sin limitarse a, humanos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos); equinos (por ejemplo, caballos), bovinos (por ejemplo, ternero) y animales porcinos (por ejemplo, cerdos), así como en aves incluyendo, pero sin limitarse, pollos, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y  
30 ratites (avestruz, emú y cassowary y similares).

En un aspecto particular de la presente invención, estos procedimientos consisten en la vacunación antes del parto  
de hembras preñadas mediante la administración de una composición de vacuna fabricada según la presente invención. Estos procedimientos incluyen además la inducción de anticuerpos protectores obtenidos mediante el protocolo de  
35 vacunación y la transferencia de estos anticuerpos protectores de las hembras preñadas vacunadas a sus vástagos. La transferencia de dichos anticuerpos maternos protege posteriormente a los vástagos de la enfermedad.

La dosificación de la composición de vacuna fabricada según la presente invención dependerá de la especie, la raza,  
40 la edad, el tamaño, el historial de vacunación, y el estado de salud del animal a vacunar. Otros factores como la concentración de antígeno, los componentes adicionales de la vacuna, y la vía de administración (es decir, administración cutánea, intradérmica, oral, intramuscular o intravenosa) también afectarán a la dosificación eficaz. La dosificación de la vacuna administrada se determina fácilmente en base a la concentración de antígeno de la vacuna, la vía de administración, y la edad y condición del animal a vacunar. Cada grupo de antígenos se puede calibrar de manera individual. Alternativamente, se pueden utilizar pruebas metódicas de inmunogenicidad de dosificaciones diferentes,  
45 así como estudios de LD<sub>50</sub> y otros procedimientos de cribado, para determinar la dosificación eficaz para una composición de vacuna según la presente invención sin una gran experimentación. A partir de los ejemplos presentados a continuación, será fácilmente evidente saber qué dosificación aproximada y qué volumen apropiado serían apropiados para utilizar en la composición de vacuna descrita en la presente invención. El factor crítico es que la dosificación proporciona por lo menos un efecto protector parcial contra la infección natural, tal como se pone de manifiesto por  
50 la reducción en la mortalidad y morbilidad asociada con la infección natural. El volumen apropiado asimismo es establecido fácilmente por un experto en la materia. Por ejemplo, en especies a biliarias el volumen de una dosis puede ser desde aproximadamente 0,1 ml hasta aproximadamente 0,5 ml y, de manera ventajosa, desde aproximadamente 0,3 ml hasta aproximadamente 0,5 ml. Para especies felinas, caninas y equinas, el volumen de una dosis puede ser desde aproximadamente 0,2 ml hasta aproximadamente 3,0 ml, de manera ventajosa desde aproximadamente 0,3 ml hasta  
55 aproximadamente 2,0 ml, y de manera más ventajosa, es de aproximadamente 0,5 ml hasta aproximadamente 1,0 ml. Para especies bovinas y porcinas, el volumen de dosis puede ser desde aproximadamente 0,2 ml hasta aproximadamente 5,0 ml, de manera ventajosa desde aproximadamente 0,3 ml hasta aproximadamente 3,0 ml, y de manera más ventajosa desde 0,5 ml hasta aproximadamente 2,0 ml.

60 Las vacunaciones repetitivas puede ser preferibles en intervalos de tiempo periódicos para aumentar la respuesta inmune inicial o cuando ha pasado un período largo de tiempo desde la última dosis. En una realización de la presente invención, la composición de vacuna se administra como una inyección parenteral (es decir, subcutáneamente, intradérmicamente o intramuscularmente). La composición se puede administrar como una dosis o, en realizaciones alternativas, se puede administrar en dosis repetitivas de desde aproximadamente dos a aproximadamente cinco dosis  
65 administradas en intervalos de aproximadamente dos a aproximadamente seis semanas, preferiblemente desde aproximadamente dos hasta aproximadamente cinco semanas. Sin embargo, un experto en la materia entenderá que el número de dosis y el intervalo de tiempo entre las vacunaciones dependen de una serie de factores que incluyen, pero no se limitan a, la edad del animal vacunado; la condición del animal; la vía de inmunización, la cantidad de antígeno

## ES 2 307 053 T3

disponible por dosis; y similares. Para la vacunación inicial, el periodo será generalmente más largo que una semana y preferiblemente estará entre aproximadamente dos y aproximadamente cinco semanas. Para animales previamente vacunados, se puede realizar una vacunación de recuerdo, antes o durante el embarazo, en aproximadamente un intervalo anual.

La presente invención también contempla la administración de una composición de vacuna que utiliza un inyector sin aguja tal como Pigjet<sup>®</sup>, Avijet<sup>®</sup>, Dermojet<sup>®</sup> o Biojector<sup>®</sup> (Bioject, Oregon, Estados Unidos). Un experto en la materia es capaz de ajustar las especificaciones del inyector según sea necesario con respecto a factores tales como la especie del animal a vacunar; la edad y el peso del animal, y similares, sin una gran experimentación.

En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende una única administración de una composición de vacuna formulada con una emulsión según la presente invención. Por ejemplo, en una realización, la composición de vacuna es una vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada, mientras que una realización alternativa proporciona una vacuna que comprende una composición del virus PCV2 inactivado. Otras composiciones o vacunas inmunológicas son adecuadas para su uso en una pauta de dosis individuales que incluyen, pero no se limitan a, PRRS y SIV inactivados. En particular, para la composición de vacuna con *Mycoplasma hyopneumoniae*, la dosis individual se puede administrar entre el nacimiento y la matanza del cerdo, en particular entre aproximadamente 3 y aproximadamente 56 días de vida, preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 35 días de vida, más preferiblemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 días de vida. La vacuna se puede administrar también en presencia de anticuerpos preexistentes.

La presente invención se refiere además a procedimientos para tratar un huésped, por ejemplo un animal, que comprende la administración al huésped de una composición farmacéutica fabricada según la presente invención y que comprende por lo menos un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste en proteínas o péptidos, anticuerpos, alérgenos, CpG ODN, factores de crecimiento, citoquinas o antibióticos, y en particular CpG ODN o citoquinas. Estas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para mejorar el rendimiento en el crecimiento en un animal tal como un pollo, un cerdo o una vaca.

La presente invención se refiere además a un kit que comprende un primer vial que contiene un ingrediente tal como un inmunógeno o una composición farmacéutica y, en un segundo vial, una emulsión fabricada según la presente invención. El inmunógeno puede estar en forma liofilizada, en forma seca o en solución acuosa tal como se describe la presente invención.

A continuación se describirá la invención con detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

#### *Procedimiento de fabricación de la emulsión*

La emulsión se produce en dos etapas tal como se describe a continuación:

##### Primera etapa

Se utilizó un emulsionador de rotor-estator Silverson de alta cizalladura (tipo L4RT con un cabezal desintegrante con un diámetro de 10 mm) para producir las formulaciones. Para producir una emulsión, se emulsionó un volumen de fase oleosa a 25°C con un volumen de fase acuosa #1. La fase acuosa se añadió a la fase oleosa bajo agitación a 5000 rpm (revoluciones por minuto) durante 1 minuto. La velocidad de rotación se aumentó progresivamente con un aumento del volumen hasta 8300 rpm durante 1 minuto. Durante esta etapa la emulsión era una emulsión de agua en aceite. Para la emulsión TS6, la composición de fase fue la siguiente:

##### Fase oleosa (120 ml):

- Monooleato de sorbitano (Span 80<sup>®</sup>): 1,8% p/v,
- Trioleato de sorbitano (20 OE) (Tween 85<sup>®</sup>): 10,2% p/v,
- Aceite de parafina (Marcol 82<sup>®</sup>): 88% v/v,

##### Fase acuosa #1 (120 ml):

- Solución al 20% (p/v) de monooleato de sorbitano (20 OE) (Tween 80<sup>®</sup>): 11,25% p/v
- Tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8): 85,75% v/v
- Mercurotiolato sódico (Tiomersal<sup>®</sup>) al 1% en agua: 1,5% v/v.

## ES 2 307 053 T3

El monooleato de sorbitano (Span 80<sup>®</sup>) y el trioleato de sorbitano (20 OE) (Tween 85<sup>®</sup>) se introdujeron en la fase oleosa. El monooleato de sorbitano (20 OE) (Tween 80<sup>®</sup>) no era miscible en aceite de parafina. Se preparó una solución al 20% (p/v) de Tween 80<sup>®</sup> en el mismo tampón que la vacuna, por ejemplo, en tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8). El mercuriotiolato de sodio actúa como conservante y no es esencial para la emulsión.

Cuando se detuvo la agitación, la emulsión cambió a una emulsión de aceite en agua. La emulsión se colocó en una cámara fría a 5°C durante por lo menos 4 horas. En esta etapa, la emulsión era una pre-emulsión que contenía un 50% de fase oleosa.

### Segunda etapa

Se preparó la fase acuosa #2 con 120 ml de tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M pH 7,8 con inmunógenos (inmunógeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* o inmunógeno de PCV-2 inactivados, tal como se describe *infra*). La pre-emulsión tal como se preparó en la primera etapa se enfrió hasta aproximadamente 5°C, se diluyó mediante la adición de la mitad del volumen de la fase acuosa #2 a la misma temperatura y se mezcló mediante rotación con un agitador magnético durante 1 minuto. La concentración final de tensoactivo en la emulsión TS6 fue de 4,75% (p/v).

Tal como se prepara aquí, las vacunas de TS6 son estables durante por lo menos un año a 5°C.

Utilizando el mismo procedimiento de preparación se pueden obtener otras emulsiones tal como se describen a continuación:

### *Emulsión TS7*

La emulsión TS7 es una emulsión de O/W que contiene un 33% de fase oleosa. La fase oleosa (120 ml) contiene Marcol 82<sup>®</sup> en un 88% v/v, Span 80<sup>®</sup> en un 1,8% p/v y Tween 85<sup>®</sup> en un 10,2% p/v. La fase acuosa #1 (120 ml) contiene tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8) en un 97,5% v/v, Tiomersal<sup>®</sup> en un 1% en agua al 1,5% v/v y Lutrol F127<sup>®</sup> en un 0,75% p/v. La fase acuosa #2 (120 ml) está constituida por tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8), que opcionalmente contiene inmunógenos. La concentración final de tensoactivo en la emulsión TS7 es de un 4,25% p/v.

### *Emulsión TS8*

La emulsión TS8 es una emulsión de O/W que contiene un 50% de fase oleosa. La fase oleosa (160 ml) contiene Marcol 82<sup>®</sup> en un 92% v/v, Span 85<sup>®</sup> en un 1,8% p/v y Brij 96<sup>®</sup> en un 6,2% p/v. La fase acuosa #1 (160 ml) contiene tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8) en un 98,5% v/v, Tiomersal<sup>®</sup> en un 1% en agua al 1,0% v/v y Lutrol F127<sup>®</sup> en un 0,5% p/v, que opcionalmente contiene inmunógenos. La concentración final de tensoactivo en la emulsión TS8 es de un 4,25% p/v.

### *Emulsión TS9*

La emulsión TS9 es una emulsión de O/W que contiene un 10% de fase oleosa. La fase oleosa (120 ml) contiene Marcol 82<sup>®</sup> en un 60% v/v, Span 40<sup>®</sup> en un 17,2% p/v y Arlatone 650<sup>®</sup> en un 22,8% p/v. La fase acuosa #1 (120 ml) contiene tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8) en un 97,5% v/v y Tween 20<sup>®</sup> en un 2,5% p/v. La fase acuosa #2 se preparó con 400 ml de tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M pH 7,8, que opcionalmente contenía inmunógenos. 100 ml de la pre-emulsión se diluyeron con los 400 ml de la fase acuosa #2 para obtener la emulsión TS9. La concentración final de tensoactivo en la emulsión TS9 es de un 4,25% p/v.

### Ejemplo 2

#### *Determinación de la temperatura de inversión de fase (PIT) de una emulsión*

Se colocaron 10 ml de la emulsión TS6 en un tubo de vidrio en un baño de agua a una temperatura de aproximadamente 25°C. La emulsión TS6 era emulsión homogénea blanca. La temperatura del baño de agua se aumentó progresivamente. Los cambios en la emulsión se observaron visualmente (la emulsión se convirtió en dos fases separadas debido a la migración de la fase oleosa amarillenta-marronosa a la superficie). Este cambio es característico de la rotura de la emulsión. La temperatura a la que se observó este cambio es el valor de PIT de la emulsión. Para la emulsión TS6, la PIT fue de 40-45°C, mientras que la PIT para la emulsión TS7 fue de 44-49°C.

## ES 2 307 053 T3

### Ejemplo 3

#### *Composición de vacuna con Mycoplasma hyopneumoniae y estimulación heteróloga*

5 *Materiales y procedimientos:* se formuló la composición de vacuna conteniendo la emulsión TS6, preparará tal como se describe en el ejemplo 1, y *Mycoplasma hyopneumonia*, cepa BQ14 (Kobisch M. *et al.*, Ann. Inst. Pasteur Immunol., 1987, 138: 693-705) a una concentración de 8,7 log<sub>10</sub> CCU (unidad de cambio de color) por ml de vacuna. Se repartieron en dos grupos al azar veintidós (22) lechones de tres semanas de vida y que tenían anticuerpos maternas (nacidos de puercas seropositivas para *Mycoplasma hyopneumonia*). Un grupo de diez (10) lechones se vacunó en el día 0 con 2 ml de la composición de vacuna mediante inyección intramuscular, mientras que el grupo de control de doce (12) lechones no se vacunó.

15 A intervalos seleccionados durante el experimento (días 0, 27, 42 y 56) se tomaron muestras nasales de lechones de ambos grupos y se determinaron los anticuerpos excretores anti-BQ14 mediante ELISA. En el día 27, los lechones sangraron y se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMN) para determinar los niveles de IFN $\gamma$  en la sangre periférica. En el día 28, se estimularon todos los lechones intranasalmente con una solución que contenía aproximadamente 6,6 log<sub>10</sub> CCU/ml de *Mycoplasma hyopneumonia*, cepa Mp88c (cepa aislada de un cerdo enfermo en Dinamarca y cultivada tal como se describe por Kobisch y Friis en Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1996, 15: 1569-1605) aplicado aproximadamente 5 ml a cada fosa nasal. La estimulación se repitió 24 horas más tarde los cerdos se sacrificaron y se recogieron los pulmones en la necropsia. La valoración de los pulmones se determinó mediante la estimación del área superficial (expresado en porcentaje de la superficie total del lóbulo) de la lesión para cada uno de los siete lóbulos pulmonares. Las valoraciones de asignaron de la siguiente manera:

25

Superficie de la lesión pulmonar por lóbulo	Valoración
0%	0
1-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
>75%	4

40 La valoración total se calculó mediante la adición de los valores obtenidos para los lóbulos individuales de cada pulmón, dando lugar a un valor máximo por animal de 28.

45 *Resultados:* los cerdos vacunados con la formulación de vacuna TS6 mostraron una importante respuesta celular y uno quiera significativamente más elevado que el grupo de control, tal como se demuestra por el número de marcas ("spots") que secretan IFN $\gamma$  de 5x10<sup>5</sup> células mononucleares de sangre periférica (PBMN). Los cerdos del grupo de vacunados promediaron 139 marcas (desviación estándar de 25) en comparación con 11 (desviación estándar de 5) en los controles no vacunados.

50

Grupos	Número de marcas para 5x10 <sup>5</sup> PBMNCs
Composición de vacuna TS6	139 (25)
Controles no vacunados	11 (5)

55

60 Los niveles de anticuerpos secretores anti-BQ14 en vacunados y controles se resumen en la siguiente tabla, mostrando los resultados que los cerdos vacunados tenían unos niveles de anticuerpos secretores significativamente más elevados de dos a tres semanas después de la estimulación en comparación con los controles no tratados:

65

## ES 2 307 053 T3

Grupos	Anticuerpos secretores anti-BQ14 (valores de densidad óptica (DO))			
	D0 (antes de la vacunación)	D27 (antes de la prueba de estimulación)	D42 (14 días después de la prueba de estimulación)	D56 (28 días después de la prueba de estimulación)
TS6	0,026 ± 0,001	0,033 ± 0,002	0,201 ± 0,089	0,264 ± 0,043
Controles	0,030 ± 0,001	0,031 ± 0,001	0,107 ± 0,028	0,075 ± 0,011

En referencia ahora a la figura 1, los animales vacunados con la composición de vacuna TS6 muestran una valoración promedio de pulmón de  $2,1 \pm 1,9$  (media  $\pm$  desviación estándar) en comparación con los controles no tratados con una valoración promedio de pulmón de  $7,8 \pm 4,1$ . Estos resultados muestran una reducción significativa en las lesiones de pulmón para los cerdos vacunados con la composición de vacuna en comparación con los controles no vacunados.

### Ejemplo 4

#### *Duración de la protección contra una estimulación heteróloga de Mycoplasma hyopneumoniae*

**Materiales y procedimientos:** Se repartieron en tres grupos al azar treinta y ocho (38) lechones de tres semanas de vida y con anticuerpos maternos (nacidos de puerkas seropositivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*) de la siguiente manera:

Grupo 1 (12 lechones) se vacunaron a través de la vía intramuscular en el día 0 con 2 ml de la composición de vacuna tal como se describe el ejemplo 3.

Grupo 2 (12 lechones) se vacunaron a través de la vía intramuscular en el día 0 con 2 ml de vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada comercial.

Grupo 3 (14 lechones) sirvieron como controles no vacunados.

Todos los lechones se estimularon intranasalmente 20 semanas después de la vacunación con aproximadamente 5 ml/por fosa nasal de una cepa de estimulación Mp88c de *Mycoplasma hyopneumoniae* ( $6,6 \log_{10}$  CCU/ml) tal como se ha descrito anteriormente. La estimulación se repitió 24 horas después. Se recogió la sangre de todos los grupos y se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMN) para determinar los niveles de IFN $\gamma$  tal como se ha descrito anteriormente. Para cada grupo se determinaron en el día 138 los anticuerpos del suero IgG1 e IgA anti-BQ14. Tras la necropsia, se calcularon las valoraciones de pulmón (media  $\pm$  desviación estándar) tal como se describe el ejemplo 3 anterior.

**Resultados:** En referencia ahora la figura 2, los lechones del grupo 1 vacunados con la composición de vacuna TS6 mostraron una valoración promedio de pulmón de  $0,4 \pm 0,9$ , una reducción estadísticamente significativa de la valoración de pulmón de lechones vacunados con la vacuna comercial ( $4,0 \pm 5,1$ ) o los controles no vacunados ( $6,1 \pm 5,8$ ).

Los resultados promedio ( $\pm$  desviación estándar) de los anticuerpos circulantes IgA e IgG1 anti-BQ14 en suero recogidos de cada grupo en el día 138 se resumen tal como se indica a continuación:

Grupos	IgG anti-BQ14 (título)	IgA anti-BQ14
Vacuna TS6	$4,38 \pm 0,14$	$0,56 \pm 0,06$
Vacuna comercial	$3,09 \pm 0,11$	$0,09 \pm 0,01$
Controles	$2,73 \pm 0,08$	$0,09 \pm 0,01$

## ES 2 307 053 T3

La siguiente tabla resume los resultados promedio ( $\pm$  desviación estándar) en el número de marcas para  $5 \times 10^5$  células mononucleares de sangre periférica (PBMN) que secretan interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) en la sangre periférica:

Grupos	D28	D138	Día 152
Vacuna TS6	81 $\pm$ 20	9 $\pm$ 2	28 $\pm$ 7
Vacuna comercial	5 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
Controles	6 $\pm$ 3	2 $\pm$ 2	11 $\pm$ 8*
*si se excluye un lechón que expresa un número anormalmente elevado de marcas (109), la media del grupo de control es 4 $\pm$ 1.			

Tal como se esperaba, cuando se utiliza una vacuna inactivada, la frecuencia de células T secretoras de  $IFN\gamma$  anti-BQ14 detectables en el día 138 después de la vacunación era muy inferior que la del día 28. De forma destacada, la mayoría de los cerdos vacunados con TS6 aún eran positivos en el día 138 sugiriendo que la respuesta celular se mantenía en este grupo. La frecuencia de células T secretoras de  $IFN\gamma$  anti-BQ14 circulantes en el día 152 (13 días después de la estimulación) fue muy diferente entre los tres grupos. El grupo vacunado con TS6 desarrolló una respuesta celular muy elevada en oposición a los otros grupos. Estos resultados sugieren que la estimulación hace recordar de manera eficaz la memoria inmune inducida por la vacuna TS6.

### Ejemplo 5

*Resultados de serología después de la administración de una dosis de una vacuna de PCV-2 teniendo como adyuvante una emulsión TS6*

*Materiales y procedimientos:* Se repartieron en 2 grupos al azar diez lechones específicos libres de patógenos (SPF) de 2-3 meses de vida. Se vacunó un grupo de 5 lechones a través de la vía intramuscular (en el día 0) con 2 ml de una vacuna que contenía PCV-2 (cepa imp1010) a 6,8 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> por dosis (grupo vacunado). El grupo de control de 5 lechones no se vacunó. Se tomaron muestras de sangre en los días D0, D7, D14, D21 y D28 después de la vacunación para la titulación de los anticuerpos ORF2 de PCV-2 mediante ELISA.

*Resultados:* tal como se demuestra la siguiente tabla, todos los vacunados mostraron una respuesta del anticuerpo ORF2 anti-PCV-2 significativa desde siete a 40 días después de la vacunación:

Grupos	ELISA (log <sub>10</sub> )	D0	D7	D14	D21	D28
Vacunados	Media	1,00	2,53	3,50	3,45	3,88
	Desviación estándar	0,00	0,89	0,79	0,84	0,37
Controles	Media	1,00	1,00	1,00	1,00	1,27
	Desviación estándar	0,00	0,00	0,00	0,00	1,24

### Ejemplo 6

*Protección contra la estimulación obtenida mediante una vacuna de PCV-2 teniendo como adyuvante una emulsión TS6*

*Materiales y procedimientos:* Se repartieron en 2 grupos al azar dieciséis (16) lechones SPF de 4-5 días de vida: un grupo de 8 lechones se vacunó dos veces mediante inyección intramuscular en los días 0 y 21 con 2 ml de la vacuna que contenía PCV-2 (cepa imp1010) a 7,55 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> por dosis (grupo vacunado), mientras que el grupo de control de 8 lechones no se vacunó. Todos los lechones se estimularon intranasalmente en el día 35 con la cepa Imp1011-48285 de PCV-2 (depositada en la ECACC, bajo el número de acceso V98011608) que contenía aproxima-

## ES 2 307 053 T3

damente  $5,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}$  por ml aplicando aproximadamente 5 ml a cada fosa nasal. Se realizaron los estudios de ELISA y seuroneutralización (SN) y se determinaron las valoraciones clínicas para cada lechón tal como se indica a continuación:

5

10

15

20

25

30

35

Valoración	0	1	2
Postración	no	moderada	alta
Disnea	no	moderada	alta
Anemia (color de la piel del lechón)	rosa	blanca	amarilla
Tos	no	sí	
Anorexia	no	sí	
Vómitos	no	sí	
Temperatura rectal	$t < 40^{\circ}\text{C}$	$39,9^{\circ}\text{C} < t < 41^{\circ}\text{C}$	$t > 40,9^{\circ}\text{C}$
ganancia de peso durante la semana n es superior a la ganancia de peso durante la semana n-1	sí	no, pero $> 100 \text{ g/día}$	no, pero $< 101 \text{ g/día}$
Muerte	no	sí*	
* En caso de muerte, la valoración utilizada es el valor correspondiente al día anterior a la muerte			

Después de la necropsia se calculó la valoración de la lesión tal como se indica a continuación:

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 307 053 T3

Valoración	0	1	2	3
Corpulencia	normal	flaco	muy flaco	raqúitico
Aspecto del animal muerto	normal	blanco	amarillo	
Mucosa	normal	blanco	amarillo	
Tejido conectivo subcutáneo	normal	brillante	amarillo	
Ganglios linfáticos superficiales	normal	1 gordo y/o blanco y/o congestivo	1 gordo y/o > blanco y/o congestivo	> 1 muy gordo y/o blanco y/o congestivo
Descarga torácica	no	Cavidad torácica brillante	Presencia visible	
Corazón	sin lesión	lesión		
Pulmón	sin lesión	lesión		
Pleura	sin lesión	Lesiones pequeñas	Lesiones grandes	
Ganglios linfáticos mediastinales	normal	1 gordo y/o blanco y/o congestivo	> 1 gordo y/o > blanco y/o congestivo	1 muy gordo y/o blanco y/o congestivo
Cavidad abdominal	normal	Brillante	Ascitis líquida visible	
Peritoneo	sin lesión	lesión		
Estómago	sin lesión	lesión	Úlcera	
Intestino delgado	sin lesión	lesión		
Intestino grueso	sin lesión	lesión		
Ganglios linfáticos mesentéricos	normal	1 gordo y/o blanco y/o congestivo	> 1 gordo y/o > blanco y/o congestivo	1 muy gordo y/o blanco y/o congestivo

## ES 2 307 053 T3

5	Placas de Peyer	No visible	Visible sólo en un segmento intestinal	Visible en varios segmentos intestinales	Visible en varios segmentos intestinales y muy importantes
10	Hígado	sin lesión	lesión		
	Riñones	sin lesión	lesión		
15	Vejiga	sin lesión	lesión		

**Resultados:** Los resultados de la serología realizada mediante ELISA y titulaciones de anticuerpos neutralizantes de suero en los días 30 y 63 muestran lechones vacunados con niveles más elevados que los observados en los controles no tratados. La tabla siguiente resume los resultados del aislamiento del virus PCV-2 de muestras fecales y tejido gangliónico, así como las valoraciones promedio clínicas y de lesión de los grupos vacunados y de control. Los resultados muestran niveles más elevados de tanto los anticuerpos circulantes como los títulos de SN en vacunados en comparación con los controles. Las valoraciones clínicas y las lesiones de pulmón también se reducen significativamente en los lechones vacunados. La evolución de la valoración clínica después de la estimulación se muestra en la figura 3.

Grupos	vacunados	controles
Serología ELISA en el D30 (log10)	4,1 +/- 0,70	2,8 +/- 0,50
Serología ELISA en el D63 (log10)	5,2 +/- 0,28	3,4 +/- 0,67
Serología SN en el D30 (log10)	3,4 +/- 0,25	1,6 +/- 0,23
Serología SN en el D63 (log10)	3,7 +/- 0,31	2,2 +/- 0,53
PCV-2 en heces (% de positivos)	40	61
PCV-2 en ganglios mediastinales (% de positivos)	25	100
Valoración clínica	14	31
Valoración de la lesión	9,8	18,8

### Ejemplo 7

**Resultados de la eficacia en el campo después de la vacunación de una dosis de una vacuna de PCV-2 inactivado con TS6 como adyuvante**

**Composición de vacuna:** El adyuvante TS6 se preparó tal como se describe en el Ejemplo 1. El virus PCV-2 se desarrolló en células PK/15 y la multiplicación viral se llevó a cabo tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6.517.843 (Ellis *et al.*). Brevemente, al final del cultivo viral, se recogieron las células infectadas, se lisaron y se inactivaron las células virales recogidas mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, la inactivación se puede realizar con etilenimina al 0,1% durante 18 horas a +37°C; con beta-propiolactona al 0,5% durante 24 horas a +28°C; o con beta-propiolactona al 0,2% y 0,1% durante 24 horas a +4°C. Si la titulación de virus antes de la inactivación era inadecuada, se concentraba la suspensión viral mediante ultrafiltración utilizando una membrana con un corte de 150-300 kDa. La suspensión viral inactivada se almacenó a +5°C antes de formular la vacuna. El contenido de antígeno de la vacuna se fijó en 2,1 log 10 unidades de antígeno por dosis. En base a este contenido, la actividad de la vacuna determinada a través de la cuantificación del principio activo en el producto final mediante un procedimiento ELISA se fijó de forma arbitraria en un mínimo de 100 unidades ELISA por dosis.

**Protocolo de vacunación:** Para probar la eficacia de la composición de vacuna en las condiciones de campo, se escogió una granja que normalmente brotes endémicos del síndrome del desgaste multisistémico postdestete (PMWS) causado por la infección con PCV-2 en lechones. Las puercas se dividieron en dos grupos con las vacunadas

## ES 2 307 053 T3

recibiendo una inyección intramuscular (dosis de 2 ml) de la vacuna con PCV-2 inactivado con TS6 como adyuvante dos a tres semanas antes del parto. El segundo grupo no se vacunó y sirvió como control. Se dejaron parir a las puercas y se controló la mortalidad hasta la edad del sacrificio de los lechones de las puercas vacunadas (n = 889) y las puercas de control (n = 713).

*Resultados:* La figura 4 muestra un gráfico que representa los porcentajes de casos de PMWS en lechones hasta el momento del sacrificio. Tal como se puede observar a partir del gráfico, hubo una reducción del 75% en el número de casos de PMWS en lechones nacidos de puercas vacunadas en comparación con el número de casos de lechones de controles no vacunados. Estos resultados muestran un descenso significativo en la enfermedad clínica asociada con la infección por PCV-2 y demuestran la viabilidad de la vacunación de puercas poco antes del parto con una vacuna de PCV-2 inactivado con TS6 como adyuvante para evitar la mortalidad y la morbilidad asociada con las infecciones por PCV-2 en lechones. Estos resultados demuestran además que se puede conseguir una reducción significativa de PMWS entre lechones en las condiciones reales en el campo utilizando sólo una dosis de una composición de vacuna según la presente invención.

### Ejemplo 8

#### *Emulsión LF2*

Utilizando el procedimientos descrito en el ejemplo 1 anterior, se preparó una emulsión de aceite en agua (O/W) que contenía un 10% de fase oleosa y se designó como LF2. La fase oleosa (100 ml) contenía Marcol 82<sup>®</sup> en un 88% v/v, Span 80<sup>®</sup> en un 1,8% p/v y Tween 85<sup>®</sup> en un 10,2% p/v. La fase acuosa #1 (100 ml) contenía tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8) en un 88,5% v/v y un 20% (p/v) de solución Tween 80<sup>®</sup> al 11,5% p/v. La fase acuosa #2 (400 ml) estaba constituida de tampón isotónico de fosfato disódico y monopotásico 0,02 M (pH 7,8), opcionalmente conteniendo inmunógenos. Se diluyeron 100 ml de la pre-emulsión con 400 ml de la fase acuosa #2 para obtener la emulsión LF2. La concentración final de tensoactivo en la emulsión LF2 fue de 1,43% p/v. La PIT de la emulsión LF2 fue superior a 45°C, tal como se determinó por conductividad.

### Ejemplo 9

#### *Análisis de serología después de la administración de una vacuna con gripe porcina teniendo como adyuvante la emulsión LF2*

*Materiales y procedimientos:* Se repartieron en 3 grupos al azar quince (15) lechones de aproximadamente 10 semanas de vida. El grupo uno (vacunados) tenía 5 lechones vacunados dos veces (en el día 0 y el día 28) con 2 ml de una vacuna recombinante de gripe porcina a 7,7 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> por dosis mediante inyección intramuscular. Esta vacuna de vector de expresión recombinante contenía un vector del virus de la viruela de los canarios que codificaba y expresaba nucleoproteína (NP) y hemaglutinina (HA) de un virus de gripe porcina H1N1. El segundo grupo de 5 lechones se vacunó dos veces (mediante inyección intramuscular en el día 0 y el día 28) con 2 ml de la vacuna recombinante de gripe porcina (a 7,7 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub> por dosis) con la emulsión LF2 como adyuvante (grupo vacunado con LF2). Cinco lechones se dejaron sin vacunar (grupo de control). Se tomaron muestras de sangre en los días D0, D14, D28, D42 y D56 posteriores a la vacunación para determinar las titulaciones de inhibición de hemaglutinina (HI).

*Resultados:* Tal como se resume en la siguiente tabla, todas las vacunas mostraron una respuesta de anticuerpo anti-gripe de cerdo significativa desde 42 a 56 días después de la vacunación (ANOVA, p<0,0001), en comparación con los controles no tratados. Sin embargo, los cerdos vacunados con la vacuna con LF2 como adyuvante mostraron un aumento significativo en la respuesta de anticuerpo en los días 42 a 56 después de la vacunación en comparación con los cerdos que recibieron la vacuna recombinante sin adyuvante (ANOVA, p<0,0001).

Grupos	HI (log <sub>10</sub> )	D0	D14	D28	D42	D56
Vacunados	Media	0,9	0,9	0,9	1,2	1,2
	Desviación estándar	0,00	0,00	0,00	0,37	0,21
Vacunados con LF2	Media	0,9	0,9	0,9	2,04	1,92
	Desviación estándar	0,00	0,00	0,00	0,33	0,16
Controles	Media	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
	Desviación estándar	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

## ES 2 307 053 T3

Tal como se demuestra mediante estos resultados, el efecto del adyuvante de la emulsión LF2 permite que la vacuna induzca a una mayor respuesta del anticuerpo contra el virus de la gripe porcina, en comparación con la vacuna sin adyuvante.

5

### Ejemplo 10

#### *Protección inducida por una vacuna con Mannheimia haemolytica teniendo como adyuvante la emulsión LF2*

10 *Materiales y procedimientos:* Se repartieron al azar en 2 grupos de 10 terneros cada uno, veinte (20) terneros de cinco meses de vida con titulaciones negativas o bajas de anticuerpo de leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*. Se preparó una emulsión LF2 tal como se ha descrito en el ejemplo 8 anterior y se formuló una vacuna que contenía *Mannheimia haemolytica* inactivada (cepa A1) en aproximadamente 60 a 70 unidades ELISA (correspondiente a aproximadamente 0,34 ml a 1,1 ml de cultivo bruto bacteriano no concentrado) por dosis de vacuna y teniendo como adyuvante la emulsión LF2. Un grupo de 10 terneros se vacunó en el día 0 con 2 ml de la composición de vacuna con LF2 mediante inyección subcutánea, mientras que el grupo de control de 10 terneros no se vacunó. Desde el día de la vacunación (D0) hasta el día de la estimulación (D20), todos los terneros vacunados fueron examinados de manera regular por las reacciones generales y locales a la vacunación. El examen clínico comprendía una valoración de las reacciones sistémicas (tales como apatía, anorexia, polipnea, salivación, temblores), temperatura rectal de registro y medición de la reacción local en los puntos de inyección. Ninguno de los terneros presentó alguna reacción sistémica a la vacunación. Las temperaturas rectales (en °C, media +/- desviación estándar) resumidas en la siguiente tabla mostraron que se observaba una fase transitoria y leve de hipertermia en el grupo vacunado con un máximo a las 24 horas después de la vacunación.

25

	D0	D0+4h	D1	D2	D3	D7	D14	D20
Vacunados	39,3 +/- 0,3	39,6 +/- 0,4	39,5 +/- 0,3	39,2 +/- 0,3	39,0 +/- 0,2	39,0 +/- 0,2	39,1 +/- 0,3	38,7 +/- 0,3
Controles	39,3 +/- 0,3	39,3 +/- 0,2	39,1 +/- 0,2	39,1 +/- 0,2	38,9 +/- 0,2	39,0 +/- 0,2	38,9 +/- 0,1	38,7 +/- 0,3

30

35

40 Las reacciones locales en terneros vacunados (medidas como el área superficial en cm<sup>2</sup>, media +/- desviación estándar) mostraron una fuerte reacción local que apareció aproximadamente 24 a 48 horas después de la vacunación en todos los animales vacunados y, a continuación, disminuyó rápidamente hasta un tamaño de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> por antes del D14. Estas reacciones habían casi desaparecido antes del D20. Las reacciones se resumen de la siguiente manera:

45

	D0	D0+4h	D1	D2	D3	D7	D14	D20
Vacunados	0,9 +/- 0,4	9,2 +/- 12,4	71,3 +/- 25,8	72,5 +/- 29,3	56,9 +/- 18,0	15,9 +/- 8,0	2,6 +/- 2,6	2,0 +/- 1,2

50

55 Se obtuvieron muestras de sangre de todos los animales en diversos intervalos (D0, D7, D14, D20 y D28) y se obtuvieron los niveles de anticuerpos contra leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* A1 realizando un ELISA (titulación en log<sub>10</sub> OD<sub>50</sub>). Los resultados mostraron que todos los terneros presentaban resultados negativos antes de la vacunación. Antes del día D20, después de la vacunación individual, ocho de los diez vacunados se habían seroconvertido mientras que todos los terneros de control permanecieron con resultado negativo desde el D0 a D20. Los resultados de ELISA se resumen a continuación.

60

65

## ES 2 307 053 T3

Grupos	ELISA (log10)	D0	D7	D14	D21	D28
Vacunados	Media	<0,78	1,11	1,70	1,86	4,00
	Desviación estándar	0,00	0,65	0,90	0,84	0,26
Controles	Media	<0,78	<0,78	<0,78	<0,78	1,39
	Desviación estándar	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00

*Protocolo de estimulación:* Se estimularon todos los terneros en el día 20 mediante administración intratraqueal de una estimulación de 30 ml que contenía 9,2 log 20 CFU/ml (unidad formadora de colonias por mililitro) de la cepa A1 de *Mannheimia haemolytica*. La estimulación se repitió 24 horas después. Desde el día de la estimulación hasta el final del estudio, se examinaron diariamente en todos los terneros las señales clínicas generales incluyendo la dificultad respiratoria. Las señales controladas incluían la condición general, anorexia, temperatura rectal, descarga nasal, tos, velocidad respiratoria y dispnea. Las valoraciones clínicas globales se calcularon según la siguiente fórmula y las valoraciones parciales se indican en la tabla:

$$\text{Valoración clínica global} = \Sigma (\text{valoración parcial} \times \text{coeficiente})/14$$

	0	1	2	Coeficiente
Condición general	Normal	Depresión	postración	X2
Alimento	Normal	Reducción	Anorexia	X3
Tos	No	Intensa, ocasional	Débil, frecuente	X1
Descarga nasal	No	serosa	Mucopurulenta	X2
Velocidad respiratoria	< 35/min	35-50/min	> 50/min	X3
Temperatura rectal	< 39,5°C	39,5°C-40,5°C	> 40,5°C	X3

Para los animales muertos, se aplicó la máxima valoración clínica individual diaria de 2.

Las valoraciones de las lesiones del pulmón (expresadas en porcentajes) también se determinaron para cada ternero utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Valoración de lesión de pulmón} = \Sigma (\text{superficie de la lesión en un lóbulo/superficie de todo el lóbulo} \times 100 \times \text{LRM})$$

Donde LRM es la masa relativa del pulmón, con un valor de:

0,11 para el lóbulo craneal derecho y el lóbulo craneal medio derecho

0,07 para el lóbulo caudal medio derecho

0,35 para el lóbulo caudal derecho

0,05 para el lóbulo craneal izquierdo

## ES 2 307 053 T3

0,06 para el lóbulo medio izquierdo

0,32 para el lóbulo caudal izquierdo, y

5 0,04 para el lóbulo de la ácidos.

10 *Resultados de la estimulación:* Las valoraciones clínicas globales para cada grupo, presentadas en la siguiente tabla, mostraron que el grupo vacunado mostró una reducción significativa en las valoraciones clínicas globales en comparación con los controles no tratados ( $p = 0,046$ , ANOVA).

		D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	Valoración cumulada
15 20	Vacunados									
	Media	0,0	0,7	0,7	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	4,0
	Desviación Estándar	0,1	0,4	0,5	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	4,5
25	Control									
	Media	0,1	0,9	1,1	1,0	1,1	1,2	1,2	1,3	8,0
	Desviación Estándar	0,1	0,5	0,6	0,8	0,9	0,8	0,8	0,7	4,5

30 Todos los animales que sucumbieron a la estimulación se presentaron con un 60% o más de sus pulmones afectados. Hubo una tendencia estadística ( $p = 0,08$ ) de los animales vacunados de tener menos lesiones de pulmón que los del grupo de control. El número de animales por grupo que tenían más de un tercio de sus pulmones afectados fue significativamente inferior ( $p = 0,03$ , Test Exacto de Fischer, una cola) en el grupo vacunado. Los resultados de las valoraciones de las lesiones de pulmón se resumen en la siguiente tabla:

35 40 45 50	Porcentaje individual de lesiones de pulmón en los vacunados	74,8*	Porcentaje individual de lesiones de pulmón en los controles	64,5*
		10,6		7,0
		10,1		78,6*
		10,5		63,1*
		66,4*		44,7
		6,2		60,9
		6,9		48,2
		32,9		0,8
		25,4		59,5*
55	Media +/-	25,2 +/- 25,5	Media +/-	46,0 +/- 25,5
60	desviación estándar		desviación estándar	
* animales que sucumbieron a la estimulación				

65 Hubo una correlación significativamente elevada ( $p < 0,001$ ) e importante ( $R^2 = 0,86$ ) entre las valoraciones clínicas globales y el porcentaje de lesiones de pulmón. Aunque todos los animales vacunados mostraron una ligera hipertermia después de la vacunación, no se observó ninguna otra reacción general a la vacunación. Después de la vacunación se observaron fuertes reacciones locales, pero rápidamente se redujeron hasta un tamaño muy aceptable y se observaron lesiones significativas en la necropsia. Estos resultados demuestran la seguridad de la vacuna teniendo la emulsión LF2 como adyuvante.

## ES 2 307 053 T3

Los resultados de este experimento, que muestran que tanto las valoraciones clínicas promedio como las valoraciones de las lesiones de pulmón se redujeron significativamente en los vacunados en comparación con los controles, demuestran que una inyección individual de la vacuna de *Mannheimia haemolytica* con la emulsión TF2 como adyuvante protege a los terneros no tratados anteriormente contra una estimulación de *Mannheimia haemolytica*.

5

### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

10

### Documentos de patentes citados en la descripción

15

- WO 9718837 A [0002]

- FR 1562758 [0007]

20

- US 5980912 A [0067]

- US 5587164 A [0081] [0082]

25

- US 5866401 A [0081]

- US 5840563 A [0081]

- US 6251404 B [0081]

30

- US 6391314 B [0081] [0082]

- US 6048537 A [0081] [0082]

- US 5968525 A [0081] [0082]

35

- US 5338543 A [0081] [0082]

- WO 9118627 A [0082]

40

- EP 1001025 A2 [0084]

- US 5174993 A [0084]

- US 5505941 A [0084]

45

- US 5766599 A [0084]

- US 5756103 A [0084]

50

- US 6517843 B [0117]

### Documentos que no son patentes citados en la descripción

55

- NOSSAL. Fundamental Immunology. Lippincott-Raven Publishers, 1999 [0002]

- Vaccine Design. VOGEL; POWELL. The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press, 1995, 141 [0002]

- LEE *et al.* *J of Pharmacy and Pharmacology*, 2002, vol. 54, 43-49 [0008]

60

- PONTAROLLO R.A. *et al.* *Vet. Immunol. Immunopath*, 2002, vol. 84, 43-59 [0067]

- WERNETTE C.M. *et al.* *Vet. Immunol. Immunopath*, 2002, vol. 84, 223-236 [0067]

65

- MUTWIRI G. *et al.* *Vet. Immunol. Immunopath*, 2003, vol. 91, 89-103 [0067]

- Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach. *Pharmaceutical Biotechnology*. vol. 6, 03 [0067]

- Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. *Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 6 [0067]

## ES 2 307 053 T3

- **ROSS R. F.** *Am. J. Vet. Res.*, 1984, vol. 45, 1899-1905 [0081]
- **PLANA-DURAN et al.** *Vet. Microbiol.*, 1997, vol. 55, 361-370 [0082]
- 5 • **CHAUDHURI P.** *Res. Vet. Sci.*, 2001, vol. 70, 255-6 [0084]
- **KOBISCH M. et al.** *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, 1987, vol. 138, 693-705 [0103]
- 10 • **KOBISCH; FRIIS.** *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1996, vol. 15, 1569-1605 [0104]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 307 053 T3

### REIVINDICACIONES

1. Composición de vacuna que comprende una emulsión de aceite en agua (O/W) inyectable, que comprende:

(i) una solución acuosa que contiene por lo menos un inmunógeno;

(ii) un aceite mineral;

(iii) un tensoactivo lipofílico no iónico;

(iv) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) elevado superior a 13 e inferior a 40; y

(v) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) bajo entre 9 y 13.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que el tensoactivo hidrofílico no iónico con un HLB elevado está presente en una concentración de 0,1 a 1,5% expresada como el peso por volumen de emulsión (p/v).

3. Composición según la reivindicación 2, en la que el porcentaje de los tensoactivos es de 4% a 6% peso/volumen.

4. Composición según la reivindicación 1, en la que el tensoactivo hidrofílico no iónico con un HLB bajo está presente en una concentración de 1% a 8% expresada como el peso por volumen de emulsión (p/v).

5. Composición según la reivindicación 1, en la que el tensoactivo lipofílico no iónico está presente en una concentración de 0,1 a 2,5% expresada como el peso por volumen de emulsión (p/v).

6. Composición según la reivindicación 1, en la que el aceite mineral está presente en una concentración de 20% a 40% (v/v).

7. Composición según la reivindicación 1, en la que la emulsión tiene una temperatura de inversión de fase (PIT) entre 33 y 66°C.

8. Composición según la reivindicación 1, en la que el tensoactivo hidrofílico no iónico con HLB bajo se selecciona del grupo que consiste en triésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado, diésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado, monoésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, aceite de ricino etoxilado, y combinaciones de los mismos.

9. Composición según la reivindicación 8, en la que el éster de dicho ácido graso etoxilado se selecciona del grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y combinaciones de los mismos.

10. Composición según la reivindicación 1, en la que el tensoactivo lipofílico no iónico se selecciona del grupo que consiste en ésteres de ácido graso de sorbitano, ésteres de ácido graso de manide, ésteres de manide con ácido graso dietoxilado, ésteres de manide con ácido graso trietoxilado, ésteres de manide con ácido graso tetraetoxilado y combinaciones de los mismos.

11. Composición según la reivindicación 10, en la que el éster de los ésteres de ácido graso se selecciona del grupo que consiste en oleato, palmitato, estearato, isoestearato, laurato y combinaciones de los mismos.

12. Composición según la reivindicación 1, en la que el tensoactivo hidrofílico no iónico con HLB elevado se selecciona del grupo que consiste en monoésteres de sorbitano con ácido graso etoxilado, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, copolímeros en bloque no iónicos, y combinaciones de los mismos.

13. Composición según la reivindicación 12, en la que el monoéster de sorbitano etoxilado se selecciona del grupo que consiste en monolaurato de sorbitano etoxilado, monopalmitato de sorbitano etoxilado, monoestearato de sorbitano etoxilado, monooleato de sorbitano etoxilado, y combinaciones de los mismos.

14. Composición según la reivindicación 1, en la que el aceite mineral se selecciona del grupo que consiste en aceite de parafina, escualano, pristano, aceite de poliisobuteno, aceite de poliisobuteno hidrogenado, aceite de polideceno, aceite de poliisopreno, aceite de poliisopropeno, y combinaciones de los mismos.

15. Composición según la reivindicación 1, que comprende un aceite de parafina, un monoéster de ácido graso de sorbitano como tensoactivo lipofílico no iónico, un triéster de sorbitano con ácido graso etoxilado como tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo y un copolímero en bloque no iónico como tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB elevado.

## ES 2 307 053 T3

16. Composición según la reivindicación 15, en la que el monoéster de ácido graso de sorbitano es un monooleato de sorbitano, el triéster de sorbitano con ácido graso etoxilado es un trioleato de sorbitano etoxilado y el copolímero en bloque no iónico es un polímero polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP).

5 17. Composición según la reivindicación 16, en la que el aceite de parafina está presente en una concentración de 10% a 40% v/v, el monooleato de sorbitano está presente en una concentración de 0,2% a 1,5% p/v, el trioleato de sorbitano etoxilado está presente en una concentración de 2% a 5% p/v y el POE-POP está presente en una concentración de 0,1% a 0,5% p/v.

10 18. Composición según la reivindicación 16, en la que el aceite de parafina está presente en una concentración de 29,3% v/v, el monooleato de sorbitano está presente en una concentración de 0,6% p/v, el trioleato de sorbitano etoxilado está presente en una concentración de 3,4% p/v y el POE-POP está presente en una concentración de 0,25% p/v.

15 19. Composición según la reivindicación 1, en la que el inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en un patógeno inactivado, un patógeno atenuado, una subunidad inmunogénica, un vector de expresión recombinante y un plásmido o combinaciones de los mismos.

20 20. Composición según la reivindicación 19, en la que el patógeno se selecciona del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un hongo, un parásito protozoo o combinaciones de los mismos.

21. Composición según la reivindicación 19, en la que el inmunógeno es un virus inactivado.

25 22. Composición según la reivindicación 21, en la que el inmunógeno es un virus circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) inactivado.

23. Composición según la reivindicación 19, en la que el inmunógeno es una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada.

30 24. Composición según la reivindicación 19 para su uso como vacuna para inducir una respuesta inmunológica en un animal contra un patógeno.

35 25. Uso de la composición según la reivindicación 19 en la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica en un animal contra un patógeno.

26. Composición según la reivindicación 24 o uso según la reivindicación 25, en las que el inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en una bacteria bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada, un virus circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) inactivado o combinaciones de los mismos.

40 27. Uso según la reivindicación 25 ó 26, en el que la composición de vacuna es para la administración con una pauta de administración de una sola vez.

45 28. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que el animal se selecciona del grupo que consiste en terneros, cerdos, caballos, perros, gatos, pollos, patos y pavos.

49 29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en el que la administración es por inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC).

50 30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, en el que la administración se realiza con un inyector sin aguja.

55 31. Composición según la reivindicación 24 o uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en las que el inmunógeno se selecciona del grupo que consiste en un virus de la gripe porcina o *Mannheimia haemolytica* inactivada.

60 32. Kit que comprende un inmunógeno en un primer vial y una emulsión en un segundo vial, en el que dicha emulsión comprende: (i) un aceite mineral; (ii) un tensoactivo lipofílico no iónico; (iii) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) elevado superior a 13 e inferior a 40; y (iv) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) bajo entre 9 y 13.

33. Kit según la reivindicación 32, en el que dicho inmunógeno está en forma liofilizada o está en solución en un medio acuoso.

65 34. Procedimiento para producir una composición de vacuna que comprende por lo menos un inmunógeno y una emulsión;

## ES 2 307 053 T3

en el que dicha emulsión comprende: (i) un aceite mineral; (ii) un tensoactivo lipofílico no iónico; (iii) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) elevado superior a 13 e inferior a 40; y (iv) un tensoactivo hidrofílico no iónico que tiene un valor de equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) bajo entre 9 y 13; y,

5

en el que dicho por lo menos un inmunógeno se incorpora durante la formación de la emulsión o se añade a la emulsión.

10

15

20

25

30

35

40

45

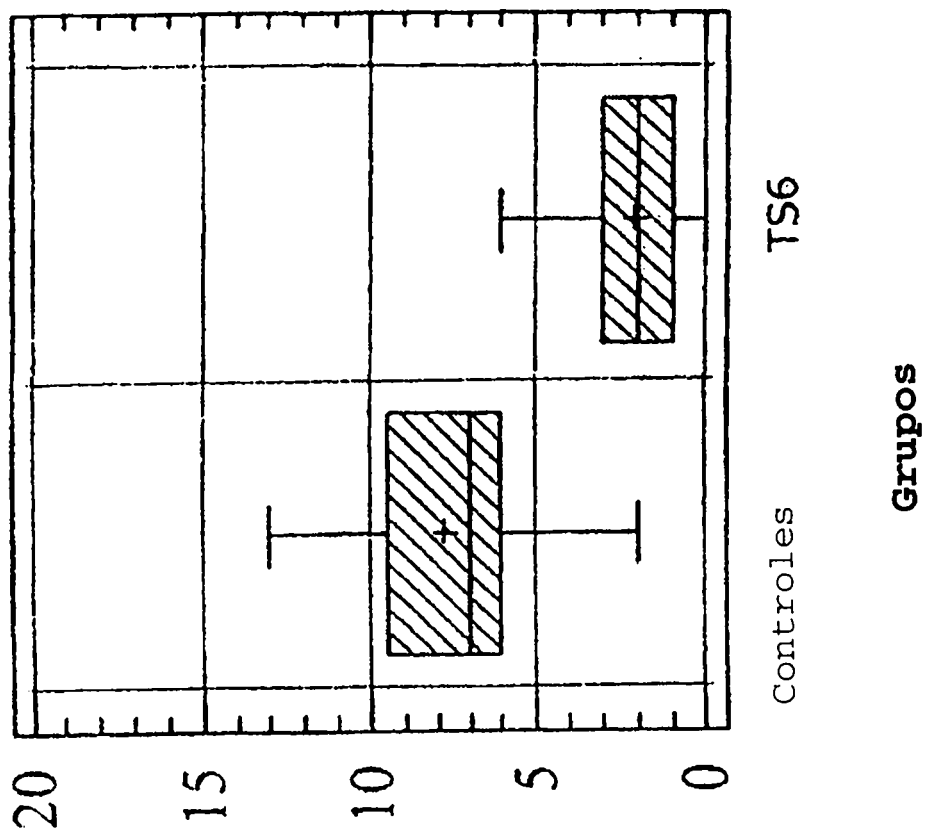
50

55

60

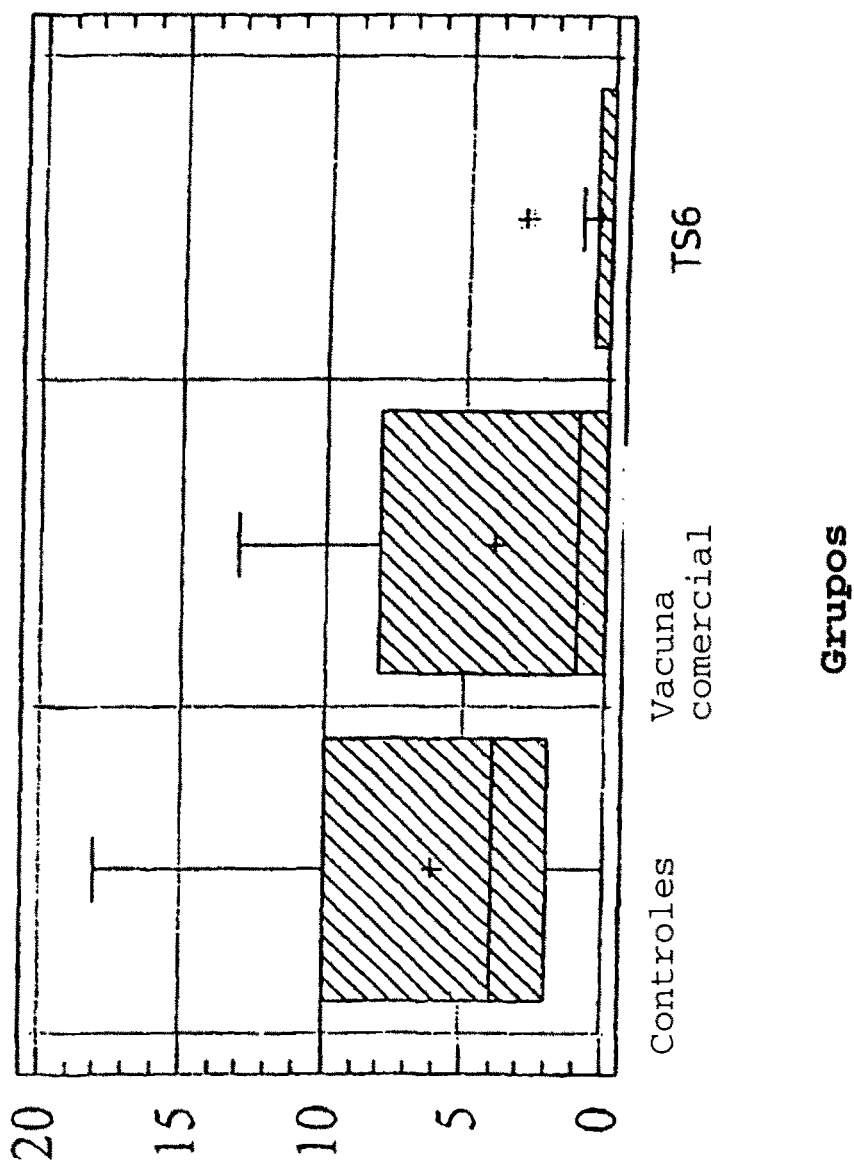
65

FIGURA 1



Valoración de la lesión de pulmón (máx 28)

FIGURA 2



Valoración de la lesión de pulmón (máx 28)

FIGURA 3

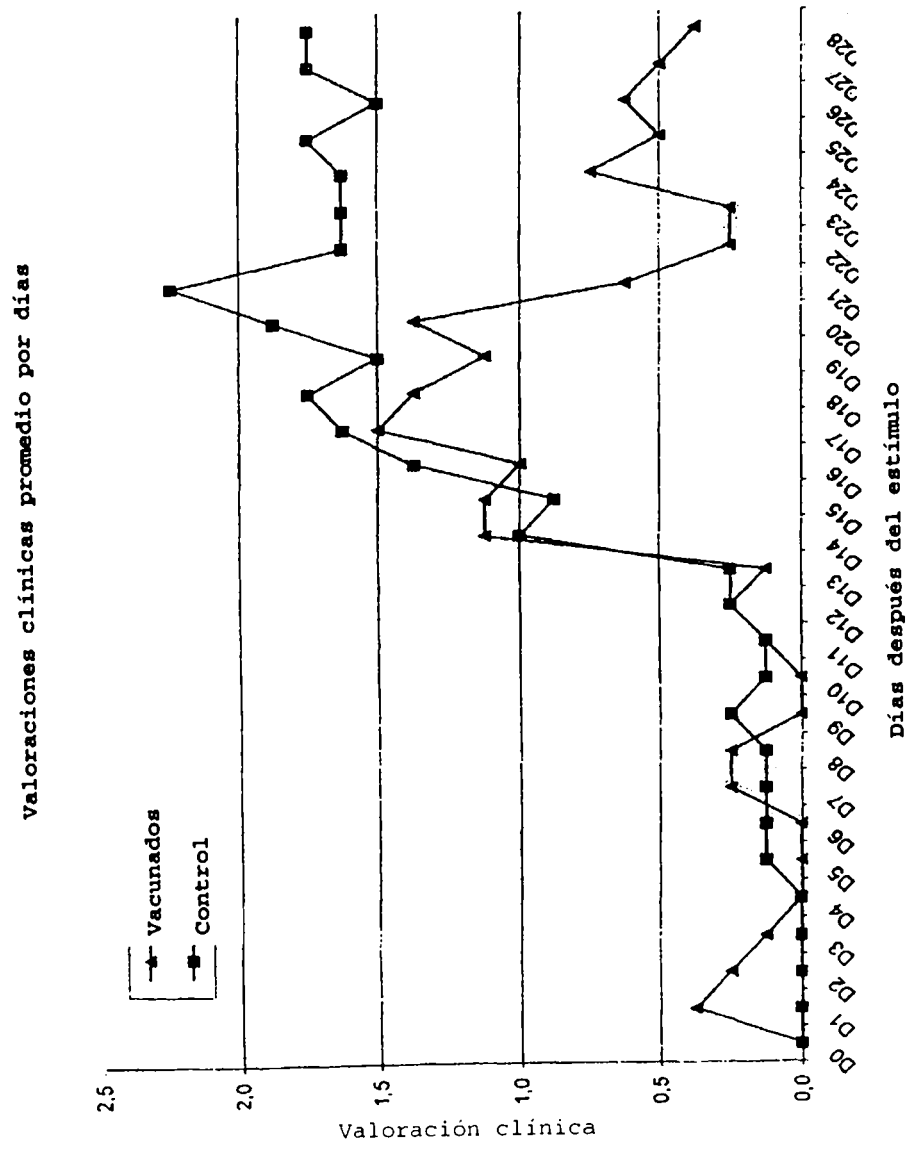


FIGURA 4

