

PCT

Q F



Industria
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160889-00000-0000

Fecha: 2010-12-22 13:09:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 143

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

10-160889



SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: COMPOSICIONES ADYUVANTES NOVEDOSAS

SOLICITANTE: PFIZER INC

DIRECCIÓN: 236 East 42nd Street, New York, NY 10017, E. U. A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 15 de Diciembre de 2010

P2010/000169

Con
27-01-2011
No Excm

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160889-00000-0000

Fecha: 2010-12-22 13:09:28
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 143

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000169

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER INC.

Dirección: 236 East 42nd Street, New York,
New York 10017

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2009/052724

Fecha Junio 24, 2009

Publicación Internacional No. WO 2009/156960

Fecha Diciembre 30, 2009

6

Título (54) COMPOSICIONES ADYUVANTES NOVEDOSAS

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Junio 27, 2008

Abril 24, 2009

(31) Número de Solicitud

61/076.232

61/214.5557

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha Diciembre de 2010



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 09-081.255



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

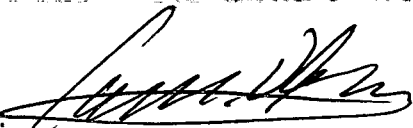


FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2009/052724

B

1. Cedo Martin BAGI, ✓
Pfizer Global Research
And Development,
Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

2. Tedd Alan CHILDERS, ✓
Pfizer Global Research
And Development, 7000
Portage Road, Kalamazoo,
Michigan 49001
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

3. Paul Joseph DOMINOWSKI, ✓
Pfizer Global Research
And Development, 7000
Portage Road, Kalamazoo,
Michigan 49001
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

4. Richard Lee KREBS, ✓
Pfizer Inc. 601 West
Cornhusker Highway,
Lincoln, Nebraska 68521
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

5. Ramasamy Mannar MANNAN, ✓
550 Liberty Street #2403 Braintree,
Massachusetts 02184
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

6. Mary Kathryn OLSEN, ✓
Pfizer Global Research
And Development, 7000
Portage Road, Kalamazoo,
Michigan 49001
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

7. James Richard THOMPSON,

Pfizer Global Research
And Development, 7000
Portage Road, Kalamazoo,
Michigan 49001
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

8. Risini Dhammika WEERATNA,

Pfizer Vaccines Research Ottawa,
Laboratories 340 Terry Fox
Drive, Suite 200, Ottawa,
Canada, Ontario K2K 3A2
Canada
Nacionalidad: Canadiense

9. Robert John, Jr. YANCEY,

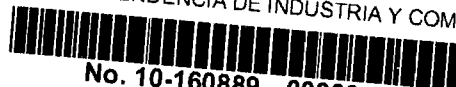
Pfizer Global Research
And Development, 7000
Portage Road, Kalamazoo,
Michigan 49001
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

10. Shucheng ZHANG,

Pfizer Global Research
And Development, 7000
Portage Road, Kalamazoo,
Michigan 49001
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-160889- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 13:09:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 143

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 109,367
FECHA : DICIEMBRE 22 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
DLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	042754397	387590405	22/12/2010	4,985,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
PFIZER INC.

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejercía funciones de Asistente General Consejero de Patentes la Compañía Pfizer Inc., con sede en Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman

Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público

CERTIFICADÓ

5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210434
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlén Neira C

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma: _____

Date/Fecha: July 14, 2003

City, Country/Ciudad, País: New York, USA

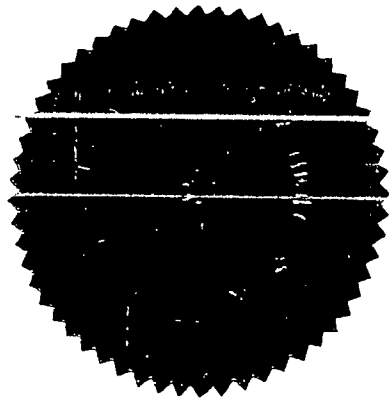
Poder

El suscrito,

Pfizer Inc.

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That *J. Trevor Lumb*
of legal age and domiciled in *New York, USA*
signed the foregoing document.
2. That the grantor has executed the foregoing
document as Assistant General Patent Counsel
of Pfizer Inc.
3. That Pfizer Inc.,
having its principal place of business located in
New York, New York, U.S.A.
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.
4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.
5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Certificación Notarial

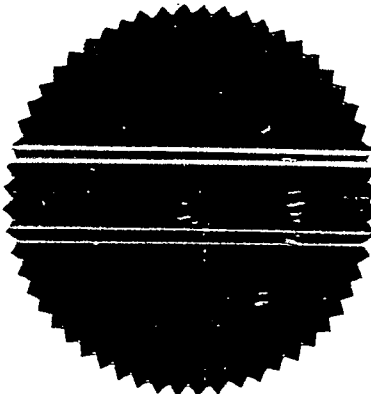
En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscrió el documento que antecede.
2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de
4. Que
con sede principal ubicada en
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.
4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.
5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of *Exbury* in Surrey
This *14th* Day Of *July* 2003
KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN



9

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **K Greenwood**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté
6. the/le **17 July 2003**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No

G210434

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **R. Bawden**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

19

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 December 2009 (30.12.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/156960 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2009/052724

(22) International Filing Date:
24 June 2009 (24.06.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/076,232 27 June 2008 (27.06.2008) US
61/214,557 24 April 2009 (24.04.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BAGI, Cedo Martin** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 (US). **CHILDERS, Tedd Alan** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **DOMINOWSKI, Paul Joseph** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **KREBS, Richard Lee** [US/US]; Pfizer Inc. 601 West Cornhusker Highway, Lincoln, Nebraska 68521 (US). **MANNAN, Ramasamy Mannar** [US/US]; 550 Liberty Street #2403, Braintree, Massachusetts 02184 (US). **OLSEN, Mary Kathryn** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **THOMPSON, James Richard** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **WEERATNA, Risini Dhammika** [CA/CA]; Pfizer Vaccines Research Ottawa, Laboratories 340 Terry Fox Drive, Suite 200, Ottawa, Canada, Ontario K2K 3A2

(CA). **YANCEY, Robert John, Jr.** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **ZHANG, Shucheng** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US).

(74) Agents: **RICHARDSON, Peter C.** et al.; Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: NOVEL ADJUVANT COMPOSITIONS

(57) Abstract: This invention relates to adjuvant formulations comprising various combinations of thterpenoids, sterols, immunomodulators, polymers, and Th2 stimulators; methods for making the adjuvant compositions; and the use of the adjuvant formulations in immunogenic and vaccine compositions with different antigens. This invention further relates to the use of the formulations in the treatment of animals.

WO 2009/156960 A2

NOVEL ADJUVANT COMPOSITIONS

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of Invention

This invention relates generally to novel adjuvant formulations for enhancing the immune response to antigens for use in immunogenic and vaccine compositions, without producing toxic or undesirable side effects in the subject. This invention also relates to methods of preparation and use of the adjuvant, immunogenic, and vaccine compositions.

History and Description of Related Art

Bacterial, viral, and parasitic infections are wide spread in humans and animals. Diseases caused by these infectious agents are often resistant to antimicrobial pharmaceutical therapy, leaving no effective means of treatment. Consequently, a vaccinology approach is increasingly used to control infectious disease. A whole infectious pathogen can be made suitable for use in a vaccine formulation after chemical inactivation or appropriate genetic manipulation. Alternatively, a protein subunit of the pathogen can be expressed in a recombinant expression system and purified for use in a vaccine formulation. Vaccines can be made more efficacious by including an appropriate adjuvant in the composition.

There is also an increased interest in using a vaccinology approach for treating cancer in animals and humans. This therapeutic approach to the treatment of cancer involves vaccinating cancer patients with a vaccine comprising a tumor-specific antigen and an adjuvant. However, none of the many cancer vaccines of this nature in development has been approved by regulatory authorities. Vaccines have not been shown to shrink tumors, a standard measure of a cancer drug's effectiveness.

The term 'adjuvant' generally refers to any material that increases the humoral or cellular immune response to an antigen. Adjuvants are used to accomplish two objectives: They slow the release of antigens from the injection site, and they stimulate the immune system. Traditional vaccines are generally composed of a crude preparation of inactivated or killed or modified live pathogenic microorganisms. The impurities associated with these cultures of pathological microorganisms may act as an adjuvant to enhance the immune response. However, the immunity invoked by vaccines that use homogeneous



preparations of pathological microorganisms or purified protein subunits as antigens is often poor. The addition of certain exogenous materials such as an adjuvant therefore becomes necessary. Further, synthetic and subunit vaccines are expensive to produce. The addition of an adjuvant may permit the use of a smaller dose of antigen to stimulate a similar immune response, thereby reducing the production cost of the vaccine. Thus, the effectiveness of some injectable medicinal agents may be significantly increased when the agent is combined with an adjuvant.

Many factors must be taken into consideration in the selection of an adjuvant. An adjuvant should cause a relatively slow rate of release and absorption of the antigen in an efficient manner with minimum toxic, allergenic, irritating, and other undesirable effects to the host. To be desirable, an adjuvant should be non-viricidal, biodegradable, capable of consistently creating a high level of immunity, capable of stimulating cross protection, compatible with multiple antigens, efficacious in multiple species, non-toxic, and safe for the host (eg, no injection site reactions). Other desirable characteristics of an adjuvant are that it is capable of micro-dosing, is dose sparing, has excellent shelf stability, is amenable to drying, can be made oil-free, can exist as either a solid or a liquid, is isotonic, is easily manufactured, and is inexpensive to produce. Finally, it is highly desirable for an adjuvant to be configurable so as to induce either a humoral or cellular immune response or both, depending on the requirements of the vaccination scenario. However, the number of adjuvants that can meet the above requirements is limited.

The choice of an adjuvant depends upon the needs for the vaccine, whether it be an increase in the magnitude or function of the antibody response, an increase in cell mediated immune response, an induction of mucosal immunity, or a reduction in antigen dose. A number of adjuvants have been proposed, however, none has been shown to be ideally suited for all vaccines. The first adjuvant reported in the literature was Freund's Complete Adjuvant (FCA) which contains a water-in-oil emulsion and extracts of mycobacterium. Unfortunately, FCA is poorly tolerated and it can cause uncontrolled inflammation. Since the discovery of FCA over 80 years ago efforts have been made to reduce the unwanted side effects of adjuvants.

Some other materials that have been used as adjuvants include metallic oxides (e.g., aluminum hydroxide), alum, inorganic chelates of salts, gelatins, various paraffin-type oils, synthesized resins, alginates, mucoid and polysaccharide compounds, caseinates, and blood-derived substances such as fibrin clots. While these materials are generally efficacious at stimulating the immune system, none has been found to be entirely satisfactory due to adverse effects in the host (e.g., production of sterile abscesses, organ damage, carcinogenicity, or allergenic responses) or undesirable pharmaceutical properties (e.g., rapid dispersion or poor control of dispersion from the injection site, or swelling of the material).

Synthesized oils and petroleum derivatives have been used as adjuvants because they exhibit relatively slow dispersion in the body, but they may be undesirable as they frequently are broken down into aromatic hydrocarbons, which may be carcinogenic. Furthermore, some of these substances have been found to be capable of producing sterile abscesses and may never be completely eliminated by the body. Oils when appropriately selected and formulated at proper concentrations can be relatively safe and nontoxic.

Saponins obtained from bark of the South American tree *Quillaja saponaria* have been used as adjuvants for some time. See Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386. 1996). Many of the veterinary vaccines in use today contain Quil A, which is the saponin fraction from the bark of the South American tree *Quillaja saponaria molina*. Further fractionation of Quil A has yielded sub-fractions, including QS-7, QS-17, QS-18, and QS-21. (See U.S. Pat. No. 5,057,540)

The use of saponins as adjuvants is associated with a number of disadvantages. Saponins are soluble and thus stimulate a non-specific immune response. The goal of vaccinology, however, is to stimulate a targeted response to a specific antigen or antigens. Saponins have a strong affinity for cholesterol. They form a complex with the cholesterol found in cell membranes causing hemolysis of the cell. They have also been shown to cause necrosis at the injection site and to be difficult to formulate into particulate structures. When used in vaccines containing modified live enveloped viruses, saponins disrupt the viral envelope and thereby inactivate the viral antigens.

To overcome the hemolytic and viricidal properties of Quil A, it has been combined with cholesterol and phospholipids, which form a specific structure known as an immunostimulatory complex (ISCOM) or ISCOM matrix (ISCOMATRIX). See Ozel M., et.al.; J. Ultrastruc. and Molec. Struc. Re 102, 240-248 (1989). ISCOMs, when combined with an antigen, generally induce a Th1 cytotoxic T-cell response. However, while greatly reducing the hemolytic properties of Quil A, combining Quil A with cholesterol does not completely eliminate them. Another limitation of ISCOMs is that a protein antigen must have hydrophobic domains large enough to interact with the ISCOM in order to be incorporated into an ISCOM. A protein which is highly hydrophilic cannot be incorporated into an ISCOM. Finally, ISCOMs can stimulate an undesirable autoimmune reaction in the subject.

Immunomodulators have been used as adjuvants, with examples including dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (hereinafter, "DDA"), and avirdine. DDA is a lipophilic quaternary ammonium compound (amine) with two 18 carbon alkyl chains and two methyl groups bound to a positively charged quaternary ammonium molecule with a molecular weight of 631. Its use as an adjuvant was discovered by Gall, (Immunol. V. 11, p. 369, 1966). DDA is reported to stimulate strong cell mediated immune responses, and has also been shown to induce humoral immune responses. Many papers have been published showing efficacy of DDA as an adjuvant for protein antigens, haptens, tumors, viruses, protozoa and bacteria. (See Korsholm, K S., et al., Immunology, vol. 121, pp. 216-226, 2007.) Most studies have been performed in laboratory animals, while only a few have been carried out in larger animals such as chickens (See Katz, D., et al. FEMS Immunol Med Microbiol. Vol 7(4):303-313, 1993.), pigs, and cattle. DDA is effective in inducing a delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction in both laboratory animals and large animals. However, it is poorly soluble in water.

Polymers have also been used as adjuvants, with examples including diethyl-aminoethyl (DEAE)-dextran, polyethylene glycol, and polyacrylic acid (e.g., CARBOPOL®). The polysaccharide DEAE-dextran is known in the art as a very strong adjuvant. However, it has been associated with unacceptable reactogenicity. CARBOPOL® polymers are polymers of acrylic acid cross-linked with polyalkenyl ethers or divinyl glycol. CARBOPOL® has been used in a number of vaccines, but its use as an adjuvant has not been proven.

Some adjuvants have been shown to stimulate a Th2 response, with examples including N-(2-Deoxy-2-L-leucylamino-b-D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanoylamide hydroacetate, also known by the trade name Bay R1005® when in its acetate form, and aluminum. Bay R1005® in combination with purified virus vaccines or subunit vaccines led to increased production of antibody in virus-challenged mice. Preclinical trials in other animal species (pig, sheep, horse) gave comparable results with respect to antibody production. The increase in antibody synthesis induced by Bay R1005® is specifically dependent on the antigen and is not the result of polyclonal stimulation.

Prior to this invention, no adjuvant formulation possessed the broad range of desirable characteristics an ideal adjuvant should have. There has been an effort to find new adjuvants for vaccines that would overcome the deficiencies of conventional ones. In particular, an adjuvant formulation which elicits potent cell-mediated and humoral immune responses to a wide range of antigens in humans and animals, yet lacks the side effects and formulation difficulties of conventional adjuvants, is highly desirable.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention relates to novel adjuvant, immunogenic, and vaccine compositions. In particular, this invention relates to adjuvant formulations comprising Th1 stimulators, immunomodulators, polymers, and Th2 stimulators. This invention also relates to immunogenic and vaccine compositions comprising such adjuvant formulations and one or more antigens, as well as methods of preparing the adjuvant and vaccine compositions.

In one embodiment, the adjuvant compositions comprise a combination of a saponin, a sterol, and a quaternary ammonium compound. In one embodiment, the adjuvant combination comprises Quil A, cholesterol, and DDA.

In another embodiment, the adjuvant compositions comprise a combination of a saponin, a sterol, a quaternary ammonium compound, and a polymer. In one embodiment, the adjuvant combination is Quil A, cholesterol, DDA, and polyacrylic acid.

In another embodiment, the adjuvant compositions comprise a combination of a saponin, a sterol, a quaternary ammonium compound, a polymer, and glycolipid. In one embodiment, the adjuvant combination is Quil A, cholesterol, DDA, polyacrylic acid, and Bay R1005®.

13

In one embodiment, an immunogenic composition comprising an adjuvant formulation and an immunologically effective amount of an antigen, wherein the adjuvant formulation comprises a saponin, a sterol, a quaternary ammonium compound, and a polymer, is prepared by the process comprising

- a) preparing a composition of the antigen in a buffer,
- b) adding the saponin to the composition of step a;
- c) adding the sterol to the composition of step b;
- d) adding the quaternary ammonium compound to the composition of step c,
- e) adding the polymer to the composition of step d.

In one embodiment of this process, the saponin is Quil A, the sterol is cholesterol, the quaternary ammonium compound is DDA, and the polymer is polyacrylic acid.

In one embodiment, a vaccine comprising an adjuvant formulation and an immunologically effective amount of an antigen, wherein the adjuvant formulation comprises a saponin, a sterol, a quaternary ammonium compound, a polymer, and a glycolipid is prepared by the process comprising

- a) preparing a composition of the antigen in a buffer,
- b) adding the saponin to the composition of step a;
- c) adding the sterol to the composition of step b;
- d) adding the quaternary ammonium compound to the composition of step c,
- e) adding the polymer to the composition of step d, and
- f) adding the glycolipid to the composition of step e.

In one embodiment of this process, the saponin is Quil A, the sterol is cholesterol, the quaternary ammonium compound is DDA, the polymer is polyacrylic acid, and the glycolipid is Bay R1005®.

It has been found that the adjuvant compositions reported herein have surprising and unexpected properties beyond what one would expect from such a combination. It has been surprisingly found that the viricidal property of Quil A/cholesterol is eliminated in these adjuvant compositions. They are suitable as a diluent for lyophilized modified live viral antigens. The adjuvant compositions described herein are configurable to elicit an extremely potent immune response directed either to a cell-mediated immune response, a humoral immune response,

or both. Additionally, injection site reactions can be largely avoided by use of these adjuvant formulations. The reactogenicity is lower than that of several of the individual components that comprise the combination adjuvants. In addition, these adjuvant formulations provide long-term storage capability.

Applicants have discovered that these novel adjuvant compositions are highly immunogenic when combined with one or more of a number of different antigens across a wide range of species. They can be used with one or more viral, bacterial, parasitic, recombinant protein, and synthetic peptide antigens, and combinations thereof. The novel vaccine adjuvant compositions can be used in therapeutic vaccines to treat cancer.

The present invention therefore provides adjuvant, immunogenic, and vaccine compositions. Additionally provided are methods for the manufacture of the compositions. Also provided is their use in treating disease. Also provided is their use in preparing a medicament for treating a subject against disease, particularly against diseases described below. Also provided is their use in preparing a medicament for preventing or reducing disease in a subject.

Further provided is their use in preparing a medicament for treating a feline against infection caused by feline leukemia virus, for treating an avian against avian coccidiosis, for treating a bovine against diseases caused by *Escherichia coli*, for treating a bovine against diseases caused by bovine viral diarrhea virus, for treating a swine against diseases caused by *Mycoplasma hyopneumonia*, for treating a feline against diseases caused by feline influenza virus, a subject against cancer, for treating a canine against diseases caused by canine coronavirus, for treating a bovine against diseases caused by bovine rotavirus, and for treating a canine for diseases caused by canine influenza virus. Also provided is the use of adjuvants as a marker vaccine to aid in the identification of animals that have been vaccinated. Also provided is the use of CpG to enhance the effects of the adjuvants.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURE

Figure 1 depicts a gel run by radioimmunoprecipitation assay showing the antibody profile differences between NS2/3 proteins and E2 proteins of the BVD Virus. The PreZent A treated group shows an antibody response to both the NS2/3 proteins and the E2 proteins while the QCDC and QCDCR treated groups demonstrated an antibody response to only E2 protein and not the NS2/3 proteins.

NK

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

"About" or "approximately," when used in connection with a measurable numerical variable, refers to the indicated value of the variable and to all values of the variable that are within the experimental error of the indicated value (e.g., within the 95% confidence interval for the mean) or within 10 percent of the indicated value, whichever is greater, unless about is used in reference to time intervals in weeks where "about 3 weeks," is 17 to 25 days, and about 2 to about 4 weeks is 10 to 40 days.

"Adjuvant" means any substance that increases the humoral or cellular immune response to an antigen. Adjuvants are generally used to accomplish two objectives: The slow the release of antigens from the injection site, and the stimulation of the immune system.

"Alkyl" refers to both straight and branched saturated hydrocarbon moieties.

"Amine" refers to a chemical compound containing nitrogen. Amines are a group of compounds derived from ammonia by substituting hydrocarbon groups for the hydrogen atoms. "Quaternary amine" refers to an ammonium based compound with four hydrocarbon groups.

"Antibody" refers to an immunoglobulin molecule that can bind to a specific antigen as the result of an immune response to that antigen. Immunoglobulins are serum proteins composed of "light" and "heavy" polypeptide chains having "constant" and "variable" regions and are divided into classes (e.g., IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM) based on the composition of the constant regions.

"Antigen" or "immunogen" refers to any substance that stimulates an immune response. The term includes killed, inactivated, attenuated, or modified live bacteria, viruses, or parasites. The term antigen also includes polynucleotides, polypeptides, recombinant proteins, synthetic peptides, protein extract, cells (including tumor cells), tissues, polysaccharides, or lipids, or fragments thereof, individually or in any combination thereof. The term antigen also includes antibodies, such as anti-idiotypic antibodies or fragments thereof, and to synthetic peptide mimotopes that can mimic an antigen or antigenic determinant (epitope).

"Bacterin" means a suspension of one or more killed bacteria which may be used as a component of a vaccine or immunogenic composition.

"Buffer" means a chemical system that prevents change in the concentration of another chemical substance, e.g., proton donor and acceptor systems serve as buffers preventing marked changes in hydrogen ion concentration (pH). A further example of a buffer is a solution containing a mixture of a weak acid and its salt (conjugate base) or a weak base and its salt (conjugate acid).

"Cellular immune response" or "cell mediated immune response" is one mediated by T-lymphocytes or other white blood cells or both, and includes the production of cytokines, chemokines and similar molecules produced by activated T-cells, white blood cells, or both.

"Cholesterol" refers to a white crystalline substance with a chemical formula of $C_{27}H_{45}OH$. It is a cyclic hydrocarbon alcohol, which is classified as a lipid. It is insoluble in water but soluble in a number of organic solvents.

"Delayed type hypersensitivity (DTH)" refers to an inflammatory response that develops 24 to 72 hours after exposure to an antigen that the immune system recognizes as foreign. This type of immune response involves mainly T cells rather than antibodies (which are made by B cells).

"Dose" refers to a vaccine or immunogenic composition given to a subject. A "first dose" or "priming vaccine" refers to the dose of such a composition given on Day 0. A "second dose" or a "third dose" or an "annual dose" refers to an amount of such composition given subsequent to the first dose, which may or may not be the same vaccine or immunogenic composition as the first dose.

"Emulsifier" means a substance used to make an emulsion more stable.

"Emulsion" means a composition of two immiscible liquids in which small droplets of one liquid are suspended in a continuous phase of the other liquid.

"Esters" refers to any of a class of organic compounds corresponding to the inorganic salts, which are formed from a condensation reaction in which a molecule of an organic acid unites with a molecule of alcohol with elimination of a molecule of water.

"Excipient" refers to any component of a vaccine that is not an antigen.

"Homogenization" refers to a process of mixing one or more components, either similar or dissimilar, into a uniform mixture.

"Humoral immune response" refers to one that is mediated by antibodies.

"Hydrophobic" means insoluble in water, not readily absorbing moisture, or being adversely affected by water; either incompatible with water or having little affinity for it.

"Immune response" in a subject refers to the development of a humoral immune response, a cellular immune response, or a humoral and a cellular immune response to an antigen. Immune responses can usually be determined using standard immunoassays and neutralization assays, which are known in the art.

"Immunologically protective amount" or "immunologically effective amount" or "effective amount to produce an immune response" of an antigen is an amount effective to induce an immunogenic response in the recipient. The immunogenic response may be sufficient for diagnostic purposes or other testing, or may be adequate to prevent signs or symptoms of disease, including adverse health effects or complications thereof, caused by infection with a disease agent. Either humoral immunity or cell-mediated immunity or both may be induced. The immunogenic response of an animal to an immunogenic composition may be evaluated, e.g., indirectly through measurement of antibody titers, lymphocyte proliferation assays, or directly through monitoring signs and symptoms after challenge with wild type strain, whereas the protective immunity conferred by a vaccine can be evaluated by measuring, e.g., reduction in clinical signs such as mortality, morbidity, temperature number, overall physical condition, and overall health and performance of the subject. The immune response may comprise, without limitation, induction of cellular and/or humoral immunity.

"Immunogenic" means evoking an immune or antigenic response. Thus an immunogenic composition would be any composition that induces an immune response.

"Immunostimulating complex" or ISCOM refers to a specific structure that is formed when Quil A is combined with cholesterol and phospholipids.

"Immunostimulatory molecule" refers to a molecule that generates an immune response.

"Lipids" refers to any of a group of organic compounds, including the fats, oils, waxes, sterols, and triglycerides, that are insoluble in water but soluble in nonpolar organic solvents, are oily to the touch, and together with carbohydrates and proteins constitute the principal structural material of living cells.

“Lipophilic” means showing a marked attraction to, or solubility in, lipids.

“Liposome” refers to a microscopic spherical particle formed by a lipid bilayer enclosing an aqueous compartment, used medicinally to carry a drug, antigen, vaccine, enzyme, or another substance to targeted cells in the body

“Medicinal agent” refers to any agent which is useful in the prevention, cure, or improvement of disease, or the prevention of some physiological condition or occurrence.

“Parenteral administration” refers to the introduction of a substance, such as a vaccine, into a subject’s body through or by way of a route that does not include the digestive tract. Parenteral administration includes subcutaneous, intramuscular, transcutaneous, intradermal, intraperitoneal, intraocular, and intravenous administration.

“Pharmaceutically acceptable” refers to substances, which are within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of subjects without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit-to-risk ratio, and effective for their intended use.

“Reactogenicity” refers to the side effects elicited in a subject in response to the administration of an adjuvant, an immunogenic, or a vaccine composition. It can occur at the site of administration, and is usually assessed in terms of the development of a number of symptoms. These symptoms can include inflammation, redness, and abscess. It is also assessed in terms of occurrence, duration, and severity. A “low” reaction would, for example, involve swelling that is only detectable by palpitation and not by the eye, or would be of short duration. A more severe reaction would be, for example, one that is visible to the eye or is of longer duration.

“Room Temperature” means a temperature from 18 to 25 °C.

“Saponin” refers to a group of surface-active glycosides of plant origin composed of a hydrophilic region (usually several sugar chains) in association with a hydrophobic region of either steroid or triterpenoid structure.

“Steroids” refers to any of a group of organic compounds belonging to biochemical class of lipids, which are easily soluble in organic solvents and slightly soluble in water. Steroids comprise a four-fused ring system of three fused cyclohexane (six-carbon) rings plus a fourth cyclopentane (five-carbon) ring.

16

"Sterols" refers to compounds in animals which are biologically produced from terpenoid precursors. They comprise a steroid ring structure, having a hydroxyl (OH) group, usually attached to carbon-3. The hydrocarbon chain of the fatty-acid substituent varies in length, usually from 16 to 20 carbon atoms, and can be saturated or unsaturated. Sterols commonly contain one or more double bonds in the ring structure and also a variety of substituents attached to the rings. Sterols and their fatty-acid esters are essentially water insoluble.

"Subject" refers to any animal for which the administration of an adjuvant composition is desired. It includes mammals and non-mammals, including primates, livestock, companion animals, laboratory test animals, captive wild animals, aves (including in ova), reptiles, and fish. Thus, this term includes but is not limited to monkeys, humans, swine; cattle, sheep, goats, equines, mice, rats, guinea pigs, hamsters, rabbits, felines, canines, chickens, turkeys, ducks, other poultry, frogs, and lizards.

"TCID₅₀" refers to "tissue culture infective dose" and is defined as that dilution of a virus required to infect 50% of a given batch of inoculated cell cultures. Various methods may be used to calculate TCID₅₀, including the Spearman-Kärber method which is utilized throughout this specification. For a description of the Spearman-Kärber method, see B.W. Mahy & H.O. Kangro, *Virology Methods Manual*, p. 25-46 (1996).

"Therapeutically effective amount" refers to an amount of an antigen or vaccine that would induce an immune response in a subject receiving the antigen or vaccine which is adequate to prevent or reduce signs or symptoms of disease, including adverse health effects or complications thereof, caused by infection with a pathogen, such as a virus or a bacterium. Humoral immunity or cell-mediated immunity or both humoral and cell-mediated immunity may be induced. The immunogenic response of an animal to a vaccine may be evaluated, e.g., indirectly through measurement of antibody titers, lymphocyte proliferation assays, or directly through monitoring signs and symptoms after challenge with wild type strain. The protective immunity conferred by a vaccine can be evaluated by measuring, e.g., reduction in clinical signs such as mortality, morbidity, temperature number, overall physical condition, and overall health and performance of the subject. The amount of a vaccine that is therapeutically effective may vary depending on the particular adjuvant used, the particular

antigen used, or the condition of the subject, and can be determined by one skilled in the art.

“Treating” refers to preventing a disorder, condition, or disease to which such term applies, or to preventing or reducing one or more symptoms of such disorder, condition, or disease.

“Treatment” refers to the act of “treating” as defined above.

“Triterpenoids” refers to a large and diverse class of naturally occurring organic molecules, derived from six five-carbon isoprene (2-methyl-1,3-butadiene) units, which can be assembled and modified in thousands of ways. Most are multicyclic structures which differ from one another in functional groups and in their basic carbon skeletons. These molecules can be found in all classes of living things.

“Vaccine” refers to a composition that includes an antigen, as defined herein. Administration of the vaccine to a subject results in an immune response, generally against one or more specific diseases. The amount of a vaccine that is therapeutically effective may vary depending on the particular antigen used, or the condition of the subject, and can be determined by one skilled in the art.

COMPONENTS OF THE COMPOSITIONS

Triterpenoids and CpGs

Triterpenoids suitable for use in the adjuvant compositions can come from many sources, either plant derived or synthetic equivalents, including but not limited to, *Quillaja saponaria*, tomatine, ginseng extracts, mushrooms, and an alkaloid glycoside structurally similar to steroidal saponins. Thus, triterpenoids suitable for use in the adjuvant compositions include saponins, squalene, and lanosterol. The amount of triterpenoids suitable for use in the adjuvant compositions depends upon the nature of the triterpenoid used. However, they are generally used in an amount of about 1 μg to about 5,000 μg per dose. They also are used in an amount of about 1 μg to about 4,000 μg per dose, about 1 μg to about 3,000 μg per dose, about 1 μg to about 2,000 μg per dose, and about 1 μg to about 1,000 μg per dose. They are also used in an amount of about 5 μg to about 750 μg per dose, about 5 μg to about 500 μg per dose, about 5 μg to about 200 μg per dose, about 5 μg to about 100 μg per dose, about 15 μg to about 100 μg per dose, and in an amount of about 30 μg to about 75 μg per dose.

If a saponin is used, the adjuvant compositions generally contain an immunologically active saponin fraction from the bark of *Quillaja saponaria*. The saponin may be, for example, Quil A or another purified or partially purified saponin preparation, which can be obtained commercially. Thus, saponin extracts can be used as mixtures or purified individual components such as QS-7, QS-17, QS-18, and QS-21. In one embodiment the Quil A is at least 85% pure. In other embodiments, the Quil A is at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% pure.

CpG ODNs are a recently described class of pharmacotherapeutic agents that are characterized by the presence of an unmethylated CG dinucleotide in specific base-sequence contexts (CpG motif). (Hansel TT, Barnes PJ (eds): New Drugs for Asthma, Allergy and COPD. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2001, vol 31, pp 229-232, which is incorporated herein by reference) These CpG motifs are not seen in eukaryotic DNA, in which CG dinucleotides are suppressed and, when present, usually methylated, but are present in bacterial DNA to which they confer immunostimulatory properties. These immunostimulatory properties include induction of a Th1-type response with prominent release of IFN- γ , IL-12, and IL-18. CpG ODNs (18-24 bp in length) possess immunomodulatory properties similar to bacterial DNA. The cell surface proteins can take up these molecules with variable results. However, with a carrier such as QCDC, QCDCR and other combinations cited within this patent the immunomodulation properties and uptake of the CpG are significantly enhanced.

The amount of CpG for use in the adjuvant compositions depends upon the nature of the CpG used and the intended species. However, they are generally used in an amount of about 1 μ g to about 20 mg per dose. They also are used in an amount of about 1 μ g to about 10 mg per dose, about 1 μ g to about 5 mg per dose, about 1 μ g to about 4 mg per dose, about 1 μ g to about 3 mg per dose, about 1 μ g to about 2 mg per dose, and about 1 μ g to about 1 mg per dose. They are also used in an amount of about 5 μ g to about 750 μ g per dose, about 5 μ g to about 500 μ g per dose, about 5 μ g to about 200 μ g per dose, about 5 μ g to about 100 μ g per dose, 10 μ g to about 100 μ g per dose, about 15 μ g to about 100 μ g per dose, and in an amount of about 30 μ g to about 75 μ g per dose.

Sterols

Sterols suitable for use in the adjuvant compositions include β -sitosterol, stigmasterol, ergosterol, ergocalciferol, and cholesterol. These sterols are well known in the art and can be purchased commercially. For example cholesterol is disclosed in the Merck Index, 12th Ed., p. 369. The amount of sterols suitable for use in the adjuvant compositions depends upon the nature of the sterol used. However, they are generally used in an amount of about 1 μ g to about 5,000 μ g per dose. They also are used in an amount of about 1 μ g to about 4,000 μ g per dose, about 1 μ g to about 3,000 μ g per dose, about 1 μ g to about 2,000 μ g per dose, and about 1 μ g to about 1,000 μ g per dose. They are also used in an amount of about 5 μ g to about 750 μ g per dose, about 5 μ g to about 500 μ g per dose, about 5 μ g to about 200 μ g per dose, about 5 μ g to about 100 μ g per dose, about 15 μ g to about 100 μ g per dose, and about 30 μ g to about 75 μ g per dose.

Immunomodulators

The adjuvant compositions can further include one or more immunomodulatory agents such as, e.g., quaternary ammonium compounds (e.g., DDA), and interleukins, interferons, or other cytokines. These materials can be purchased commercially. The amount of an immunomodulator suitable for use in the adjuvant compositions depends upon the nature of the immunomodulator used and the subject. However, they are generally used in an amount of about 1 μ g to about 5,000 μ g per dose. They also are used in an amount of about 1 μ g to about 4,000 μ g per dose, about 1 μ g to about 3,000 μ g per dose, about 1 μ g to about 2,000 μ g per dose, and about 1 μ g to about 1,000 μ g per dose. They are also used in an amount of about 5 μ g to about 750 μ g per dose, about 5 μ g to about 500 μ g per dose, about 5 μ g to about 200 μ g per dose, about 5 μ g to about 100 μ g per dose, about 15 μ g to about 100 μ g per dose, and in an amount of about 30 μ g to about 75 μ g per dose. For a specific example, adjuvant compositions containing DDA can be prepared by simply mixing an antigen solution with a freshly prepared solution of DDA.

Polymers

The adjuvant compositions can further include one or more polymers such as, for example, DEAE Dextran, polyethylene glycol, and polyacrylic acid and polymethacrylic acid (eg, CARBOPOL®). Such material can be purchased commercially. The amount of polymers suitable for use in the adjuvant

18

compositions depends upon the nature of the polymers used. However, they are generally used in an amount of about 0.0001% volume to volume (v/v) to about 75% v/v. In other embodiments, they are used in an amount of about 0.001% v/v to about 50% v/v, of about 0.005% v/v to about 25% v/v, of about 0.01% v/v to about 10% v/v, of about 0.05% v/v to about 2% v/v, and of about 0.1% v/v to about 0.75% v/v. In another embodiment, they are used in an amount of about 0.02 v/v to about 0.4% v/v. DEAE-dextran can have a molecular size in the range of 50,000 Da to 5,000,000 Da, or it can be in the range of 500,000 Da to 2,000,000 Da. Such material may be purchased commercially or prepared from dextran.

Another specific example is polyacrylic acid (e.g., the CARBOPOL® polymers), which has an average equivalent weight of 76. They are produced from primary polymer particles of about 0.2 to 6.0 microns in average diameter. The CARBOPOL® polymers swell in water up to 1000 times their original volume and ten times their original diameter to form a gel when exposed to a pH environment greater than the pKa of the carboxylate group. At a pH greater than the pKa of carboxylate group, the carboxylate groups ionize resulting in repulsion between the negative charges, which adds to the swelling of the polymer.

Th2 Stimulants

The adjuvant compositions can further include one or more Th2 stimulants such as, for example, Bay R1005® and aluminum. The amount of Th2 stimulants suitable for use in the adjuvant compositions depends upon the nature of the Th2 stimulant used. However, they are generally used in an amount of about 0.01 mg to about 10 mg per dose. In other embodiments, they are used in an amount of about 0.05 mg to about 7.5 mg per dose, of about 0.1 mg to about 5 mg per dose, of about 0.5 mg to about 2.5 mg per dose, and of 1 mg to about 2 mg per dose. A specific example is Bay R1005®, a glycolipid with the chemical name "N- (2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate." It can be synthesized according to the procedure found in Lockhoff, O. (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1611-1620; 1991). It is recommended that it is stored at 2-8° C in an airtight container. Its chemical or physical properties are that it is slightly hygroscopic, does not form polymorphs, is chemically stable in air and light at temperatures up to 50° C and in aqueous solvents at pH 2-12 at ambient

temperature. It is an amphiphilic molecule which forms micelles in aqueous solution.

Antigens and Diseases

The adjuvant compositions can contain one or more antigens. The antigen can be any of a wide variety of substances capable of producing a desired immune response in a subject. Although Quil A alone is virucidal, Quil A is detoxified with the addition of cholesterol when forming helical micelles (see US Patent Number 7,122,191). The adjuvant compositions described herein have been found to be non-viricidal, and non-hemolytic or membranolytic. Thus, the antigens used with these adjuvant compositions can be one or more of viruses (inactivated, attenuated, and modified live), bacteria, parasites, nucleotides, polynucleotides, peptides, polypeptides, recombinant proteins, synthetic peptides, protein extract, cells (including tumor cells), tissues, polysaccharides, carbohydrates, fatty acids, teichoic acid, peptidoglycans, lipids, or glycolipids, individually or in any combination thereof.

The antigens used with the adjuvants of the invention also include immunogenic fragments of nucleotides, polynucleotides, peptides, polypeptides, that can be isolated from the organisms referred to herein.

Live, modified-live, and attenuated viral strains that do not cause disease in a subject have been isolated in non-virulent form or have been attenuated using methods well known in the art, including serial passage in a suitable cell line or exposure to ultraviolet light or a chemical mutagen. Inactivated or killed viral strains are those which have been inactivated by methods known to those skilled in the art, including treatment with formalin, betapropiolactone (BPL), binary ethyleneimine (BEI), sterilizing radiation, heat, or other such methods.

Two or more antigens can be combined to produce a polyvalent composition that can protect a subject against a wide variety of diseases caused by the pathogens. Currently, commercial manufacturers of vaccines, as well as end users, prefer polyvalent vaccine products. While conventional adjuvants are often limited in the variety of antigens with which they can be effectively used (either monovalently or polyvalently), the adjuvants described herein can be used effectively with a wide range of antigens, both monovalently and polyvalently. Thus, the antigens described herein can be combined in a single composition comprising the adjuvants described herein.

19

Some examples of bacteria which can be used as antigens with the adjuvant compositions include, but are not limited to, *Aceinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila spp.*, *Chromobacterium viscosum*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Ehrlichia canis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Helicobacter suis*, *Lawsonia intracellularis*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella sp.*, *Mycobacterium bovis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC*, *Clostridium perfringens*, *Odoribacter denticanis*, *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Photobacterium luminescens*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas salivosa*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens C9*, *Pseudomonas fluorescens SIKW1*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas sp B11-1*, *Alcaligenes eutrophus*, *Psychrobacter immobilis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsia*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica*, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella newport*, *Serratia marcescens*, *Spirillum platensis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptococcus suis*, *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Syechocystis sp.*, *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*, *Treponema vincentii*, *Treponema palladium*, and *Leptospira* species, such as the known pathogens *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis*, *Leptospira borgpetersenii hardjo-prajitno*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, and *Leptospira bratislava*, and combinations thereof.

Both inactivated viruses and attenuated live viruses may be used in the adjuvant compositions. Some examples of viruses which can be used as antigens include, but are not limited to, Avian herpesvirus, Bovine herpesviruses, Canine herpesviruses, Equine herpesviruses, Feline viral rhinotracheitis virus, Marek's disease virus, Ovine herpesviruses, Porcine herpesviruses, Pseudorabies virus, Avian paramyxoviruses, Bovine respiratory syncytial virus, Canine distemper virus, Canine parainfluenza virus, canine adenovirus, canine parvovirus, Bovine Parainfluenza virus 3, Ovine parainfluenza 3, Rinderpest virus, Border disease virus, Bovine viral diarrhea virus (BVDV), BVDV Type I, BVDV Type II, Classical swine fever virus, Avian Leukosis virus, Bovine immunodeficiency virus, Bovine leukemia virus, Bovine tuberculosis, Equine infectious anemia virus, Feline immunodeficiency virus, Feline leukemia virus (FeLV), Newcastle Disease virus, Ovine progressive pneumonia virus, Ovine pulmonary adenocarcinoma virus, Canine coronavirus (CCV), pantropic CCV, Canine respiratory coronavirus, Bovine coronavirus, Feline Calicivirus, Feline enteric coronavirus, Feline infectious peritonitis virus, Porcine epidemic diarrhea virus, Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, Porcine parvovirus, Porcine Circovirus (PCV) Type I, PCV Type II, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS)Virus, Transmissible gastroenteritis virus, Turkey coronavirus, Bovine ephemeral fever virus, Rabies, Rotavirus, Vesicular stomatitis virus, lentivirus, Avian influenza, Rhinoviruses, Equine influenza virus, Swine influenza virus, Canine influenza virus, Feline influenza virus, Human influenza virus, Eastern Equine encephalitis virus (EEE), Venezuelan equine encephalitis virus, West Nile virus, Western equine encephalitis virus, human immunodeficiency virus, human papilloma virus, varicella zoster virus, hepatitis B virus, rhinovirus, and measles virus, and combinations thereof.

Examples of peptide antigens include *Bordetella bronchiseptica* p68, GnRH, IgE peptides, Fel d1, and cancer antigens, and combinations thereof. Examples of other antigens include nucleotides, carbohydrates, lipids, glycolipids, peptides, fatty acids, and teichoic acid, and peptidoglycans, and combinations thereof.

Some examples of parasites which can be used as antigens with the adjuvant compositions include, but are not limited to, Anaplasma, Fasciola hepatica (liver fluke), Coccidia, Eimeria spp., Neospora caninum, Toxoplasma gondii, Giardia, Dirofilaria (heartworms), Ancylostoma (hookworms), Trypanosoma



spp., *Leishmania* spp., *Trichomonas* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Babesia*, *Schistosoma*, *Taenia*, *Strongyloides*, *Ascaris*, *Trichinella*, *Sarcocystis*, *Hammondia*, and *Isopora*, and combinations thereof. Also contemplated are external parasites including, but not limited to, ticks, including *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Boophilus*, *Hyalomma*, and *Haemaphysalis* species, and combinations thereof.

The amount of antigen used to induce an immune response will vary considerably depending on the antigen used, the subject, and the level of response desired, and can be determined by one skilled in the art. For vaccines containing modified live viruses or attenuated viruses, a therapeutically effective amount of the antigen generally ranges from about 10^2 Tissue Culture Infective Dose (TCID)₅₀ to about 10^{10} TCID₅₀, inclusive. For many such viruses, a therapeutically effective dose is generally in the range of about 10^2 TCID₅₀ to about 10^8 TCID₅₀, inclusive. In some embodiments, the ranges of therapeutically effective doses are about 10^3 TCID₅₀ to about 10^6 TCID₅₀, inclusive. In some other embodiments, the ranges of therapeutically effective doses are about 10^4 TCID₅₀ to about 10^5 TCID₅₀, inclusive.

For vaccines containing inactivated viruses, a therapeutically effective amount of the antigen is generally at least about 100 relative units per dose, and often in the range from about 1,000 to about 4,500 relative units per dose, inclusive. In other embodiments, the therapeutically effective amount of the antigen is in a range from about 250 to about 4,000 relative units per dose, inclusive, from about 500 to about 3,000 relative units per dose, inclusive, from about 750 to about 2,000 relative units per dose, inclusive, or from about 1,000 to about 1,500 relative units per dose, inclusive.

A therapeutically effective amount of antigen in vaccines containing inactivated viruses can also be measured in terms of Relative Potency (RP) per mL. A therapeutically effective amount is often in the range from about 0.1 to about 50 RP per mL, inclusive. In other embodiments, the therapeutically effective amount of the antigen is in a range from about 0.5 to about 30 RP per mL, inclusive, from about 1 to about 25 RP per mL, inclusive, from about 2 to about 20 RP per mL, inclusive, from about 3 to about 15 RP per mL, inclusive, or from about 5 to about 10 RP per mL, inclusive.

In one embodiment a FeLV antigen was produced from the FL74-UCD-1 cell line (ATCC Number CRL-8012) which is persistently infected with the KT-FeLV-UCD-1 feline leukemia virus strain. The amount of FeLV antigen in a vaccine can be measured as the amount of gp70 viral protein per mL. A therapeutically effective amount of FeLV antigen, when measured by the amount of gp70 viral protein per mL, generally is in the range from about 100 to about 350,000 ng/ml, inclusive. In another embodiment the range is from about 1,000 to about 300,000 ng/ml, inclusive, or from about 2,500 to about 250,000 ng/ml, inclusive, or from about 4,000 to about 220,000 ng/ml, inclusive, or from about 5,000 to about 150,000 ng/ml, inclusive, or from about 10,000 ng/ml to about 100,000 ng/ml, inclusive.

The number of cells for a bacterial antigen administered in a vaccine ranges from about 1×10^6 to about 5×10^{10} colony forming units (CFU) per dose, inclusive. In other embodiments, the number of cells ranges from about 1×10^7 to 5×10^{10} CFU/dose, inclusive, or from about 1×10^8 to 5×10^{10} CFU/dose, inclusive. In still other embodiments, the number of cells ranges from about 1×10^2 to 5×10^{10} CFU/dose, inclusive, or from about 1×10^4 to 5×10^9 CFU/dose, inclusive, or from about 1×10^5 to 5×10^9 CFU/dose, inclusive, or from about 1×10^6 to 5×10^9 CFU/dose, inclusive, or from about 1×10^6 to 5×10^8 CFU/dose, inclusive, or from about 1×10^7 to 5×10^9 CFU/dose, inclusive.

The number of cells for a parasite antigen administered in a vaccine ranges from about 1×10^2 to about 1×10^{10} per dose, inclusive. In other embodiments, the number of cells ranges from about 1×10^3 to about 1×10^9 per dose, inclusive, or from about 1×10^4 to about 1×10^8 per dose, inclusive, or from about 1×10^5 to about 1×10^7 per dose, inclusive, or from about 1×10^6 to about 1×10^8 per dose, inclusive.

It is well known in the art that with conventional adjuvants, a substantially greater amount of inactivated viruses than modified live or attenuated viruses is needed to stimulate a comparable level of serological response. However, it has been surprisingly found that with the adjuvant compositions described herein, approximately the same amounts of inactivated virus and modified live virus stimulate similar levels of serological response. In addition, smaller amounts of modified live, attenuated, and inactivated virus are needed with the adjuvants described herein when compared with conventional adjuvants to achieve the same level of serological response. These unexpected findings demonstrate

21

conservation of resources and reduction of cost during preparation of immunogenic and vaccine compositions. For vaccines with wide utility, the manufacture of millions of doses per year is required, so these savings can be substantial.

Excipients

Aqueous adjuvants provide certain advantages. They are generally easy to formulate and administer, and can induce few or less serious injection site reactions. However, aqueous adjuvants with an antigen tend to diffuse from the injection site, are cleared by the subject's liver, and generate an undesirable non-specific immune response. It has been surprisingly found that the aqueous adjuvant compositions described herein remain at the injection site until biometabolized, which occurs over a long period of time, and provide a targeted immune response.

Oil, when added as a component of an adjuvant, generally provides a long and slow release profile. In the present invention, the oil can be metabolizable or non-metabolizable. The oil can be in the form of an oil-in-water, a water-in-oil, or a water-in-oil-in-water emulsion.

Oils suitable for use in the present invention include alkanes, alkenes, alkynes, and their corresponding acids and alcohols, the ethers and esters thereof, and mixtures thereof. The individual compounds of the oil are light hydrocarbon compounds, i.e., such components have 6 to 30 carbon atoms. The oil can be synthetically prepared or purified from petroleum products. The moiety may have a straight or branched chain structure. It may be fully saturated or have one or more double or triple bonds. Some non-metabolizable oils for use in the present invention include mineral oil, paraffin oil, and cycloparaffins, for example.

The term oil is also intended to include "light mineral oil," i.e., oil which is similarly obtained by distillation of petrolatum, but which has a slightly lower specific gravity than white mineral oil.

Metabolizable oils include metabolizable, non-toxic oils. The oil can be any vegetable oil, fish oil, animal oil or synthetically prepared oil which can be metabolized by the body of the subject to which the adjuvant will be administered and which is not toxic to the subject. Sources for vegetable oils include nuts, seeds and grains.

An oil-in-water emulsion provided by the present invention is composed of an AMPHIGEN® formulation. This formulation comprises an aqueous component, lecithin, mineral oil, and surfactants. Patents describing the components of the formulation include US 5,084,269 and US 6,572,861.

Typically, the oil component of the present invention is present in an amount from 1% to 50% by volume; or in an amount of 10% to 45%; or in an amount from 20% to 40%.

Other components of the compositions can include pharmaceutically acceptable excipients, such as carriers, solvents, and diluents, isotonic agents, buffering agents, stabilizers, preservatives, vaso-constrictive agents, antibacterial agents, antifungal agents, and the like. Typical carriers, solvents, and diluents include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, oil, and the like. Representative isotonic agents include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, lactose, and the like. Useful stabilizers include gelatin, albumin, and the like.

Surfactants are used to assist in the stabilization of the emulsion selected to act as the carrier for the adjuvant and antigen. Surfactants suitable for use in the present inventions include natural biologically compatible surfactants and non-natural synthetic surfactants. Biologically compatible surfactants include phospholipid compounds or a mixture of phospholipids. Preferred phospholipids are phosphatidylcholines (lecithin), such as soy or egg lecithin. Lecithin can be obtained as a mixture of phosphatides and triglycerides by water-washing crude vegetable oils, and separating and drying the resulting hydrated gums. A refined product can be obtained by fractionating the mixture for acetone insoluble phospholipids and glycolipids remaining after removal of the triglycerides and vegetable oil by acetone washing. Alternatively, lecithin can be obtained from various commercial sources. Other suitable phospholipids include phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, phosphatidic acid, cardiolipin, and phosphatidylethanolamine. The phospholipids may be isolated from natural sources or conventionally synthesized.

Non-natural, synthetic surfactants suitable for use in the present invention include sorbitan-based non-ionic surfactants, e.g. fatty-acid-substituted sorbitan surfactants (commercially available under the name SPAN® or ARLACEL®), fatty acid esters of polyethoxylated sorbitol (TWEEN®), polyethylene glycol esters of fatty acids from sources such as castor oil (EMULFOR®); polyethoxylated fatty

92

acid (e.g., stearic acid available under the name SIMULSOL M-53®), polyethoxylated isooctylphenol/formaldehyde polymer (TYLOXAPOL®), polyoxyethylene fatty alcohol ethers (BRIJ®); polyoxyethylene nonphenyl ethers (TRITON® N), polyoxyethylene isooctylphenyl ethers (TRITON® X).

Generally speaking, the surfactant, or the combination of surfactants, if two or more surfactants are used, is present in the emulsion in an amount of 0.01% to 10% by volume, preferably, 0.1% to 6.0%, more preferably 0.2% to 5.0%.

As used herein, "a pharmaceutically-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other components of the compositions and not deleterious to the subject. Typically, the carriers will be sterile and pyrogen-free, and selected based on the mode of administration to be used. It is well known by those skilled in the art that the preferred formulations for the pharmaceutically acceptable carrier which comprise the compositions are those pharmaceutical carriers approved in the applicable regulations promulgated by the United States (US) Department of Agriculture or US Food and Drug Administration, or equivalent government agency in a non-US country. Therefore, the pharmaceutically accepted carrier for commercial production of the compositions is a carrier that is already approved or will be approved by the appropriate government agency in the US or foreign country.

The compositions optionally can include compatible pharmaceutically acceptable (*i.e.*, sterile or non-toxic) liquid, semisolid, or solid diluents that serve as pharmaceutical vehicles, excipients, or media. Diluents can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others. Stabilizers include albumin, among others.

The compositions can also contain antibiotics or preservatives, including, for example, gentamicin, merthiolate, or chlorocresol. The various classes of antibiotics or preservatives from which to select are well known to the skilled artisan.

PREPARATION OF THE COMPOSITIONS

Preparation of Adjuvant Formulations

An ISCOM can be prepared by combining a saponin, a sterol, and a phospholipid. For example, an ISCOM can contain 5% to 10% by weight Quil A, 1% to 5% cholesterol and phospholipids, and the remainder protein. The ratio of saponin to sterol in the adjuvant formulations will typically be in the order of from 1:100 weight to weight (w/w) to 5:1 w/w. In some embodiments, excess sterol is present, wherein the ratio of saponin to sterol is at least 1:2 w/w, or 1:5 w/w. In other embodiments, the saponin is in excess in relation to the sterol, and a ratio of saponin to sterol of about 5:1 w/w is used. ISCOM and ISCOMATRIX are commercially available from Isconova AB (Sweden).

In some embodiments, CARBOPOL® is used in combination with DDA in an amount of at least 0.1 part by weight of CARBOPOL® per part by weight of DDA. In other embodiments, at least 0.5 part by weight of CARBOPOL® per part by weight of DDA is used. In still other embodiments, at least 1 part by weight of CARBOPOL® per part by weight of DDA is used. The combination of CARBOPOL® and DDA forms a complex whereby the DDA tertiary amine functional group immunofunctionalizes the carboxylic acid side groups on the polymer. This allows for specific immune cells to target the antigen and adjuvant simultaneously and co-deliver the antigen and adjuvant together at the optimal time and concentration to the said cells.

The adjuvants described herein will generally not require any specific carrier, and will be formulated in an aqueous or other pharmaceutically acceptable buffer. In some cases, the vaccines of the disclosed embodiments will be presented in a suitable vehicle, such as for example, additional liposomes, microspheres or encapsulated antigen particles. The antigen can be contained within the vesicle membrane or contained outside the vesicle membrane. Generally, soluble antigens are outside and hydrophobic or lipidated antigens are either contained inside or outside the membrane.

The adjuvant compositions can be made in various forms depending upon the route of administration, storage requirements, and the like. For example, they can be made in the form of sterile aqueous solutions or dispersions suitable for injectable use, or made in lyophilized forms using freeze-drying, vacuum-drying, or spray-drying techniques. Lyophilized compositions can be reconstituted prior to

93

use in a stabilizing solution, e.g., saline or HEPES. Thus, the adjuvant compositions can be used as a solid, semi-solid, or liquid dosage form.

The adjuvants can be manufactured using techniques known in the art. For example, the saponin and cholesterol may be admixed in a suitable detergent, followed by a solvent extraction technique to form liposomes or ISCOMs. The saponin and cholesterol may also be combined to form helical micelles as described in US Patent Number 7,122,191.

Phosphate buffered saline (PBS) may be used as the aqueous buffer medium; the pH of the buffer may be neutral or slightly alkaline or slightly acidic. Accordingly, the pH can be in a range of pH 6 to 8. A pH of about 7.0 to about 7.3 is common. The strength of the buffer can be between 10 to 50 mM PO_4 and between 10 to 150 mM PO_4 . In one example, 0.063% PBS is used. The pH can be adjusted using NaOH or HCl as needed. Typical concentrations include from 1N to 10N HCl and 1N to 10N NaOH.

The quantity of adjuvant used depends on the antigen with which it is used and the antigen dosage to be applied. It is also dependent on the intended species and the desired formulation. Usually the quantity is within the range conventionally used for adjuvants. For example, adjuvants typically comprises from about 1 μg to about 1000 μg , inclusive, of a 1-mL dose. Similarly, antibiotics typically comprise from about 1 μg to about 60 μg , inclusive, of a 1-mL dose.

The adjuvant formulations can be homogenized or microfluidized. The formulations are subjected to a primary blending process, typically by passage one or more times through one or more homogenizers. Any commercially available homogenizer can be used for this purpose, e.g., Ross emulsifier (Hauppauge, NY), Gaulin homogenizer (Everett, MA), or Microfluidics (Newton, MA). In one embodiment, the formulations are homogenized for three minutes at 10,000 rpm. Microfluidization can be achieved by use of a commercial microfluidizer, such as model number 110Y available from Microfluidics, (Newton, Mass.); Gaulin Model 30CD (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); and Rainnie Minilab Type 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, Wis.). These microfluidizers operate by forcing fluids through small apertures under high pressure, such that two fluid streams interact at high velocities in an interaction chamber to form compositions with droplets of a submicron size. In one

embodiment, the formulations are microfluidized by being passed through a 200 micron limiting dimension chamber at 10,000 +/- 500 psi.

The adjuvant compositions described herein can be both homogenized and microfluidized. In one embodiment, an antigen is added to an appropriate buffer. The solution is stirred, and a saponin is slowly added to the antigen solution. A sterol is then slowly added to the antigen/saponin solution, followed by the slow addition of a quaternary ammonium compound to the antigen/saponin/sterol solution. The resulting composition is homogenized, and then microfluidized. After microfluidization, a polymer is added to microfluidized composition. Depending on the components used, the order of these steps can be altered to optimize preparation of the compositions.

Preparation of Immunogenic and Vaccine Compositions

The adjuvant compositions described herein can be used in the manufacture of immunogenic and vaccine compositions. For vaccine or immunogenic compositions, each dose contains a therapeutically effective amount of an antigen or antigens which can vary depending on the age and general condition of the subject, the route of administration, the nature of the antigen, and other factors. The amounts and concentrations of the other components in the vaccine or immunogenic compositions may be adjusted to modify the physical and chemical properties of the composition, and can readily be determined by the skilled artisan. An advantageous feature of the adjuvant compositions is that they are entirely configurable depending on the desired characteristics of the composition. For example, if a greater Th1 response is desired, the amount of the Th1 stimulator can be increased. Likewise, if a greater Th2 response is desired, the amount of the Th2 stimulator can be increased. A balanced Th1/Th2 response can also be achieved. The immunogenic and vaccine compositions can also be homogenized or microfluidized as described above.

ADMINISTRATION AND USE OF THE COMPOSITIONS

Administration of the Compositions

Dose sizes of the compositions typically range from about 1 mL to about 5 mL, inclusive, depending on the subject and the antigen. For example, for a canine or feline, a dose of about 1 mL is typically used, while in cattle a dose of about 2-5 mL is typically used. However, these adjuvants also can be formulated in microdoses, wherein doses of about 100 μ L can be used.



The routes of administration for the adjuvant compositions include parenteral, oral, oronasal, intranasal, intratracheal, topical, and in ova. Any suitable device may be used to administer the compositions, including syringes, droppers, needleless injection devices, patches, and the like. The route and device selected for use will depend on the composition of the adjuvant, the antigen, and the subject, and such are well known to the skilled artisan.

Use of the Compositions

One of the requirements for any vaccine adjuvant preparation for commercial use is to establish the stability of the adjuvant solution for long periods of storage. Provided herein are adjuvant formulations that are easy to manufacture and stable for at least 18 months. In one embodiment, the formulations are stable for about 18 months. In another embodiment, the formulations are stable for between about 18 to about 24 months. In another embodiment the formulations are stable for about 24 months. Accelerated testing procedures also indicate that the formulations described herein are stable.

An advantageous feature of the present adjuvant compositions is that they can be safely and effectively administered to a wide range of subjects. In the art, it is expected that combinations of adjuvants will demonstrate more reactogenicity than the individual components. However, the compositions described herein show decreased reactogenicity when compared to compositions in which any one or two of the components are used, while the adjuvant effect is maintained. It has also been surprisingly found that the adjuvant compositions described herein demonstrate safety improvements when compared with other adjuvant compositions.

The adjuvant compositions described herein are useful for producing a desired immune response in a subject. They are efficacious in multiple species. A suitable subject is any animal for which the administration of an adjuvant composition is desired. It includes mammals and non-mammals, including primates, livestock, companion animals, laboratory test animals, captive wild animals, aves (including in ova), reptiles, and fish. Thus, this term includes but is not limited to monkeys, humans, swine; cattle, sheep, goats, equines, mice, rats, guinea pigs, hamsters, rabbits, felines, canines, chickens, turkeys, ducks, other poultry, frogs, and lizards.

The adjuvants described herein can be used to show serological differentiation between infected and vaccinated animals. Thus, they can be used in a marker vaccine in which the antigen in the vaccine elicits in the vaccinated animals a different antibody pattern from that of the wild-type virus. A marker vaccine is generally used in conjunction with a companion diagnostic test which measures the difference in antibody patterns and demonstrates which animals have been vaccinated and which animals are infected with the wild-type virus. Such technology is useful in the control and eradication of viruses from a subject population.

The following examples are presented as illustrative embodiments, but should not be taken as limiting the scope of the invention. Many changes, variations, modifications, and other uses and applications of this invention will be apparent to those skilled in the art.

EXAMPLES

Example 1. Quil A /Cholesterol (QC) Solutions

Quil A (Superfos) was dissolved in water and a 50mg/ml stock solution was prepared. Cholesterol, (Fabri Chem Inc.) was dissolved in ethanol and an 18mg/ml stock solution was prepared. The cholesterol stock solution then was filtered using a 0.2-micron filter.

Range of Quil A and Cholesterol concentrations in the various formulations was as low as 1/1 ug/ml of Quil A to cholesterol to as high as 1000/1000 ug/mL. To prepare a Quil A/Cholesterol stock solution of 50/50 µg/mL, the Quil A stock solution was diluted with water to a concentration of 50 µg/mL. While stirring this solution, the cholesterol stock solution was slowly added to a final concentration of 50 µg/mL.

Example 2. DDA (D) Solutions

Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA; Fluka Analytical), was dissolved in ethanol, and an 18mg/ml stock solution was prepared. The DDA stock solution was filtered using a 0.2-micron filter.

Example 3. Quil A /Cholesterol/DDA (QCD) Solutions

A Quil A/Cholesterol stock solution was prepared as in Example 1 to the desired concentrations. A DDA stock solution as prepared in Example 2 and slowly added to the Quil A/cholesterol stock solution. The solutions were mixed to achieve the desired final concentrations. The pH of the solution was adjusted with



NaOH or HCl as needed to reach the desired final pH, which generally was in a range of about 6.9 to about 7.5.

Example 4. CARBOPOL® (C) Solutions.

CARBOPOL® (Noveon, Mexico) was dissolved in deionized water and a 1.5% stock solution was prepared. In another embodiment, CARBOPOL® was dissolved in deionized water and a 0.75% stock solution was prepared.

Example 5. DDA/CARBOPOL® (DC) Solutions.

A DDA stock solution was prepared as in Example 2. A 0.75% CARBOPOL® stock solution was prepared as in Example 4. The solutions were mixed to achieve the desired final concentrations.

Example 6. Quil A/Cholesterol/DDA/CARBOPOL® (QCDC) Solutions

A Quil A/Cholesterol/DDA stock solution was prepared as in Example 3. A 0.75% CARBOPOL® stock solution was prepared as in Example 4. The CARBOPOL® stock solution was slowly added to the Quil A/Cholesterol/DDA stock solution to achieve the desired final concentration. The pH of the solution was adjusted with NaOH or HCl to reach the desired final pH, which generally was in a range of about 6.9 to about 7.5.

Example 7. Bay R1005® (R) Solutions

To prepare a Bay R1005® stock solution, the glycolipid N-(2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-gulucopyranosyl)-N-octadecyldodecanoylamide was dissolved in ethanol (60% v/v). Tween 20 and glacial acetic acid were then added. In one example, 3.49 gm of N-(2-deoxy-2-L-leucylamino-β-D-gulucopyranosyl)-N-octadecyldodecanoylamide was dissolved in 44.64 mL of ethanol/water (60% v/v). This was combined with 1.12 mL of Tween 20 and 0.68 mL of glacial acetic acid.

Example 8. Quil A/Cholesterol/DDA/CARBOPOL®/Bay R1005® (QCDCR) Solutions

A Quil A/Cholesterol/DDA/CARBOPOL® stock solution was prepared as in Example 6. A Bay R1005® stock solution was prepared as in Example 7. The Bay R1005® solution was slowly added to the Quil A/Cholesterol/DDA/CARBOPOL® solution to achieve the desired final concentration. The pH of the solution was adjusted with NaOH or HCl as needed to reach the desired final pH, which generally was in a range of about 6.9 to about 7.5.

Example 9. DEAE Dextran Solutions (X)

A DEAE Dextran (X) stock solution was prepared by dissolving 200 mg/ml of DEAE Dextran into water. The solution can be autoclaved for about 20 minutes at 120° Centigrade (C).

Example 10. Quil A/Cholesterol/DDA/DEAE Solutions (QCDX)

A Quil A/Cholesterol/DDA stock solution was prepared according to Example 3. A DEAE stock solution was prepared according to Example 9. The solutions were combined by adding them directly into a homogenizer. Mixing employs a flash blending method using a shear force of greater than 1,000 sec-1. Mixing is done by feeding the aqueous solution directly into the oil phase containing the nonpolar adjuvants and antigen components and blending until a homogeneous stable mixture is achieved. Typically this can be a minimum of several minutes or longer depending on the desired particle size.

Example 11. Oil Compositions (O)

An Oil stock solution was prepared by combining Drakeol mineral oil with Tween 85 and Span 85, heating to approximately 55° C and then cooling and sterile filtering. This mixture would thus comprise the oil phase base component for an oil based carrier. If Cholesterol and/or DDA were selected to be a collaborating immunomodulator for one of these compositions it would then also be added to this mixture prior to filtration, since they are soluble in the oil phase.

Example 12. Quil A/Cholesterol/DDA/DEAE/Oil Compositions (QCDXO)

A Quil A/Cholesterol/DDA/DEAE stock solution was prepared according to Example 10. An oil stock composition was prepared according to Example 11. The solutions were a combination of Quil-A, DEAE-Dextran and water to achieve the quantity at said concentrations. This aqueous phase was mixed by continuously stirring the reaction for several minutes or longer at room temperature or higher and then sterile filtered and stored for addition to the oil phase. The aqueous phase was slowly added into a continuously mixing oil phase.

Example 13. Preparation of Immunogenic Compositions or Vaccine Compositions

To prepare an immunogenic composition or vaccine composition comprising an antigen and one of the adjuvants described above, the desired antigen was added to an appropriate buffer. Then the components of the desired

adjuvant were added as described above. The resulting solution was brought to final volume with the buffer.

Example 13a. Antigen, Quil A, Cholesterol, DDA, CARBOPOL®

To prepare an immunogenic composition or vaccine composition comprising an antigen, Quil A, cholesterol, DDA, and CARBOPOL®, the desired antigen was added to an appropriate buffer. A Quil A stock solution was prepared as in Example 1 and slowly added to the antigen solution. A cholesterol stock solution was prepared as in Example 1 and was slowly added to the antigen/Quil A solution. A DDA stock solution was prepared as in Example 2 and slowly added to the antigen/Quil A/cholesterol solution. The antigen/Quil A/cholesterol/DDA solution was homogenized and microfluidized. A 0.75% CARBOPOL® solution was prepared as in Example 4. After microfluidization, the CARBOPOL® solution (0.05% v/v) was added to microfluidized composition and pH was adjusted with NaOH or HCl to about 6.9 to about 7.5.

Example 13b. Antigen, Quil A, Cholesterol, DDA, CARBOPOL®, Bay R1005®

To prepare an immunogenic composition or vaccine composition comprising an antigen, Quil A, cholesterol, DDA, CARBOPOL®, and Bay R1005®, the desired antigen was added to an appropriate buffer. A Quil A stock solution was prepared as in Example 1 and slowly added to the antigen solution. A cholesterol stock solution was prepared as in Example 1 and was slowly added to the antigen/Quil A solution. A DDA stock solution was prepared as in Example 2 and slowly added to the antigen/Quil A/cholesterol solution. The antigen/Quil A/cholesterol/DDA solution was homogenized and microfluidized. A 0.75% CARBOPOL® solution was prepared as in Example 4. After microfluidization, the CARBOPOL® solution (0.05% v/v) was added to microfluidized composition and pH was adjusted with NaOH or HCl to about 6.9 to about 7.5. A Bay R1005® stock solution was prepared as in Example 7. The Bay R1005® component was added to the aqueous phase after the DDA was added.

Example 13c. Antigen, Quil A, Cholesterol, DDA, DEAE Dextran

To prepare an immunogenic composition or vaccine composition comprising an antigen, Quil A, cholesterol, DDA, and DEAE dextran, the desired antigen was added to an appropriate buffer. A Quil A stock solution was prepared as in Example 1 and slowly added to the antigen solution. The composition was

homogenized. A cholesterol stock solution was prepared as in Example 1 and was slowly added to the antigen/Quil A solution during homogenization. A DDA stock solution was prepared as in Example 2 and slowly added to the antigen/Quil A/cholesterol solution during homogenization. A DEAE dextran solution was prepared as in Example 9. During homogenization, the DEAE dextran solution was added and the resulting composition was brought to final volume.

Example 13d. Antigen, Quil A, Cholesterol, DDA, DEAE Dextran, Oil

To prepare an immunogenic composition or vaccine composition comprising an antigen, Quil A, cholesterol, DDA, DEAE dextran, and Oil, the desired antigen was added to an appropriate buffer. A Quil A stock solution was prepared as in Example 1 and slowly added to the antigen solution. The composition was homogenized. A cholesterol stock solution was prepared as in Example 1 and was slowly added to the antigen/Quil A solution during homogenization. A DDA stock solution was prepared as in Example 2 and slowly added to the antigen/Quil A/cholesterol solution during homogenization. A DEAE dextran solution was prepared as in Example 9. During homogenization, the DEAE dextran solution was added. An oil composition was prepared as in Example 11. During homogenization, the oil composition was added by feeding the aqueous phase into the oil phase while homogenizing and the resulting composition was brought to final volume.

Example 14. Feline Leukemia Virus (FeLV) Vaccines

Animals were randomly assigned to treatment groups using a randomized complete block design. Table 1 shows the study design. The blocks were based on date of birth and litter. Animals were sorted by date of birth and then litter. Blocks of four were used. Within a block, animals were randomly assigned to treatment. For the vaccination phase of the study, two consecutive blocks were combined to form a group of eight animals. The groups of animals were randomly assigned to two rooms so that each room contained five groups (10 blocks) of animals. Within a group of animals, animals were randomly assigned to four cages located near each other so that each cage contained two animals with the same treatment. For the challenge phase of the study, animals from one vaccination room were randomly assigned to either one or two challenge rooms. The vaccination room selected to go into two challenge rooms, had five blocks randomized to each challenge room (2.5 groups; 20 animals). The other challenge

room contained 10 blocks (5 groups; 40 animals). Within a challenge room, animals in the same block were randomly assigned to four cages located near each other.

The vaccines for this study were prepared as in Example 13 except that a 1.5% CARBOPOL® stock solution was used. Specifically, LEUKOCELL® 2 (Pfizer, Inc.) was prepared by propagating FeLV, subgroups A, B, and C, in FeLV-transformed lymphoid cells. Viral antigens were chemically inactivated, combined with a sterile adjuvant to enhance the immune response, and packaged in liquid form. A total amount of 100 mL of Investigational Veterinary Product (IVP) containing the feline leukemia virus and 25 µg Quil A/aluminum hydroxide (ALHYDROGEL®) was prepared. A total of 94.5 mL of a 1.106×10^5 ng/mL FeLV stock solution was mixed slowly for 15 minutes. The pH was adjusted to 5.9 to 6.1 with 4N HCl or 18% NaOH, if needed. While stirring, 0.5 mL of a 5.0 mg/mL solution of Quil A was added to the antigen solution. Then, 5.0 mL of 100% v/v ALHYDROGEL® was slowly added. The composition was stirred for a minimum of 2 hours at 4° C. The pH was adjusted to between 7.0 and 7.3 with 18% NaOH or 1N HCl, as needed.

The IVP comprising the feline leukemia virus and 37.5 µg Quil A/aluminum hydroxide (ALHYDROGEL®) was prepared in the same manner as for the 25 µg Quil A IVP but 7.5 ml of the Quil A stock solution was added to the antigen solution.

A total amount of 350 mL of Investigational Veterinary Product (IVP) containing the feline leukemia virus, Quil A, Cholesterol, DDA, and CARBOPOL® was prepared. While stirring 349.3 mL of a 1.106×10^5 ng/mL FeLV stock solution, 0.14 mL of a 50.0 mg/mL solution of Quil A was slowly added to the antigen solution. Then, 0.39 mL of an 18 mg/mL cholesterol/ethanol solution was slowly added. The composition was homogenized for three minutes at 10,000 rpm. A total of 0.19 mL of an 18.0 mg/mL DDA/ethanol solution was added to the composition while stirring. A total of 5.0 mL of a 1.5% CARBOPOL® solution was slowly added to 145.0 mL of the feline leukemia virus, Quil A, Cholesterol, and DDA composition. The pH was adjusted to between 7.0 and 7.3 with 18% NaOH or 1N HCl, as needed.

Table 1: Experimental Design

Treatment Group	IVP ^a	Number of Animals	Vaccination Phase			Challenge Phase			Sample Collectio
			Vaccination Day	Dose (ml)	Route	Challenge Day	Dose (ml)	Route	Day
T01	Saline	20	0, 21	1.0	SC ^c	37, 40, 42 ^d , 44	1.0	ON ^e	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155
T02	LEUKOCELL® 2 25 µg Quil A / Al(OH) ^b	20	0, 21	1.0	SC	37, 40, 42 ^d , 44	1.0	ON	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155
T03	LEUKOCELL® 2 37.5 µg Quil A / Al(OH) ^b	20	0, 21	1.0	SC	37, 40, 42 ^d , 44	1.0	ON	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155
T04	Reformulated LEUKOCELL® 2 20 µg Quil A / Cholesterol / DDA / CARBOPOL® ^b	20	0, 21	1.0	SC	37, 40, 42 ^d , 44	1.0	ON	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155

^aInvestigational Veterinary Product

^bBlended to contain a relative potency comparable to the reference vaccine (FeLV Reference Lot No. 12) ^cSC = Subcutaneous

^dDepo-Medrol®: Day 42 (approximately 5.0 mg/kg) by the intramuscular route

^eON = Oronasal

Quil A – Cholesterol = Saponin adjuvant Quil A, incorporated into lipid particles of cholesterol

CARBOPOL® = Carbomer

DDA = Dimethyldioctadecylammonium bromide

All animals were observed daily and observations were recorded. Body temperatures were recorded from all animals by the tympanic route on Day -1 prior to the first vaccine dose administration and on Day 20 prior to the second

vaccine dose administration. A blood sample (1.0 – 2.0 mL) was collected from each animal by venipuncture of the jugular vein, on Day –2. Sedative doses of TELAZOL® (Fort Dodge Animal Health) were administered according to body weight (approximately 5.0 mg/kg) by the intramuscular route in order to minimize animal stress and to avoid injury to animal handlers during blood collection. Blood was collected in serum separation tubes (SST) and processed for serum separation. Serum was stored at –20°C or colder until tested.

Placebo or FeLV vaccines were administered to kittens by the subcutaneous route at a 1.0 mL dose. The first vaccination was performed on Day 0 and the second vaccine administration was performed on Day 21. All animals were observed for approximately one hour following the first and second vaccinations for immediate local pain reactions (sting reactions). Observations were documented. Body temperatures of all animals were measured by the tympanic route on Days 1 and 2 following the first vaccine dose administration, and on Days 22 and 23 following the second vaccine dose administration. Injection site reactions (swellings) were also determined on Day 1 after the first vaccination and on Days 22 and 23 after the second vaccination. A blood sample (1.0 – 2.0 mL) was collected from each animal by venipuncture of the jugular vein, on Day 35, processed for serum separation, and stored at –20°C or colder until tested.

On Day 35, animals were placed into individual isolation cages. The challenge virus was virulent Feline Leukemia Virus (FeLV), Rickard strain, titrated at approximately $10^{6.1}$ TCID₅₀/mL. The FeLV challenge material was thawed and kept on wet ice prior to administration. Animals were challenged on Days 37, 40, 42, and 44, by administering 1.0 mL by the nasal route of undiluted challenge material. A 1 mL tuberculin syringe, without the needle, was filled with the challenge material. Each kitten was administered approximately 0.5 mL per nostril. On Day 42, challenge administration was performed approximately 5 h post DEPO-MEDROL® administration. After each day of challenge, a sample of the challenge material was retained for confirmatory titration.

Post-challenge, a blood sample (1.0 – 2.0 mL) was collected from each animal by venipuncture of the jugular vein, on Days 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, and 155. Sedative doses of TELAZOL® (Fort Dodge) were administered as

described above. Blood was collected in serum separation tubes (SST), processed for serum separation, and stored at -20°C or colder until tested. Serum samples were tested for the presence of FeLV p27 antigen (marker of FeLV infection) by ELISA (IDEXX; Westbrook, ME). Final results were evaluated by intensity of color development and by spectrophotometer at an optical density of 405/490 nm. For a valid test, the positive control optical density had to fall between 0.131 and 2.999 and the negative control should have had optical density below or equal to 0.0039.

Virus isolation was performed using serum samples collected on Days -2 and 35. Serum samples from Days 127 through 155 were considered to evaluate FeLV vaccine efficacy. Serum samples from Day 127 (week 12), Day 134 (week 13), Day 141 (week 14), Day 148 (week 15) and Day 155 (week 16) were tested for the presence of FeLV p27 antigen. An animal was considered persistently infected if it had three or more positive FeLV p27 antigen test results during Days 127 (week 12) through 155 (week 16).

Temperatures were analyzed using a general linear repeated measures mixed model, and pair-wise treatment comparisons were made between treatment T01 and treatments T02, T03, and T04 at each time point if the overall treatment and/or treatment by time point effect was significant. Least squares means, 95% confidence intervals, minimums and maximums were calculated for each treatment at each time point.

Frequency distributions of the presence of sting reactions were calculated for each treatment and time point data were collected. Frequency distributions of the presence of injection site swellings were calculated for each treatment and time point data were collected. Frequency distributions of the presence of post-vaccination systemic reactions were calculated for each treatment.

Immediate reactions were not observed in any of the treatment groups during first and second vaccination. Adverse reactions were not observed in any of the treatment groups at approximately one hour post first and second vaccinations. Neither pyrexia (body temperature $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$) nor hypothermia (body temperature $< 37.0^{\circ}\text{C}$) was observed in any of the treatment groups after the first and second vaccinations. There were no significant differences in mean body temperature between treatment groups at any time point ($p > 0.08$). Injection site



swellings were not observed in any of the treatment groups after first and second vaccinations.

Final results from week 12 to week 16 post-challenge indicated that 16 out of 19 animals (84%) that received the placebo vaccine (T01 group) were persistently viremic to FeLV. 13 out of 19 animals (68%) in the T02 group were protected from FeLV virulent challenge. The level of protection was statistically significant ($p=0.0004$) compared to the placebo vaccinated kittens. 12 out of 19 animals (63%) in the T03 group were protected from FeLV virulent challenge. The level of protection was statistically significant ($p=0.0013$) compared to the placebo vaccinated kittens. 19 out of 20 animals (95%) in the T04 group were protected from FeLV virulent challenge. The level of protection was statistically significant ($p=0.0001$) compared to the placebo vaccinated kittens.

Thus, the vaccines administered to the T02, T03 and T04 groups were all demonstrated to be safe in kittens at the minimum age when administered at a two-dose regimen, three weeks apart. Additionally, the vaccines administered to these groups were also able to significantly reduce the level of FeLV persistent viremia in kittens at the minimum age when administered at a two-dose regimen, three weeks apart. There was a statistically significant reduction in the establishment of FeLV persistent viremia in kittens in the T02, T03 and T04 groups. Additionally, there was a statistically significant difference between T04 and the other vaccine groups (T02, T03). It was surprising and unexpected that vaccines containing the novel adjuvant formulation proved to be more efficacious than those containing adjuvant components commonly used in cats.

Example 15. Feline Leukemia Virus Vaccines

Kittens were acclimated for sixteen days after arrival. Animals were then randomly assigned to a room, and within a room, were randomly assigned to treatments (1 animal per treatment in each room). A blood sample (1.0 – 2.0 mL) was collected from each animal by venipuncture of the jugular vein on Study Day -1. Sedative doses of TELAZOL® (Fort Dodge Animal Health) were administered according to body weight (approximately 5.0 mg/kg) by the intramuscular route in order to minimize animal stress and to avoid injury to animal handlers during blood collection. Blood was collected in serum separation tubes and processed for serum separation. All animals were also observed daily, and observations were recorded.

Vaccines were prepared as in Example 13 except that a 1.5% CARBOPOL® Stock solution was used. LEUKOCELL® 2 was prepared by propagating FeLV, subgroups A, B, and C, in FeLV-transformed lymphoid cells. Viral antigens were chemically inactivated, combined with a sterile adjuvant to enhance the immune response, and packaged in liquid form. A total amount of 500.0 mL of IVP containing the feline leukemia virus at a relative potency (RP) of 2, Quil A, Cholesterol, and DDA was prepared in the following manner. A total of 20.7 mL of a FeLV stock solution (50.0 RP/mL where 1 RP = 3,624 ng/mL of antigen) was added to 478.2 mL 0.063% PBS buffer. While stirring, 0.21 mL of a 50.0 mg/mL solution of Quil A was slowly added to the antigen solution. Then, 0.58 mL of an 18 mg/mL cholesterol/ethanol solution was slowly added. A total of 0.29 mL of an 18.0 mg/mL DDA/ethanol solution was slowly added to the composition while stirring. The composition was homogenized for three minutes at 10,000 rpm. The composition was then microfluidized by one pass through a 200 micron limiting dimension chamber at 10,000 (+ 500) psi. While stirring, 10.0 mL of a 1.5% CARBOPOL® solution was slowly added to 290.0 mL of the feline leukemia virus, Quil A, Cholesterol, and DDA composition. The pH was adjusted to between 7.0 and 7.3 with 18% NaOH or 1N HCl, as needed.

The IVP containing the feline leukemia virus at a RP of 5 was prepared in the same manner as the IVP with a RP of 2 using 51.7 mL of the FeLV stock solution and 447.2 mL 0.063% PBS buffer, with the amounts of the other components remaining the same.

The IVP containing the feline leukemia virus at a RP of 10 was prepared in the same manner as the IVP with a RP of 2 using 93.1 mL of the FeLV stock solution, 355.9 mL 0.063% PBS buffer, 0.19 mL of the Quil A solution, 0.52 mL of the cholesterol solution, and 0.26 mL of the DDA solution (450 mL total volume). Then, 8.3 mL of a 1.5% CARBOPOL® solution was slowly added to 241.7 mL of the feline leukemia virus, Quil A, Cholesterol, and DDA composition.

The IVP containing the feline leukemia virus at a RP of 15 was prepared in the same manner as the IVP with a RP of 10 using 139.7 mL of the FeLV stock solution and 309.4 mL 0.063% PBS buffer, with the amounts of the other components remaining the same.

The IVP containing the feline leukemia virus at a RP of 20 was prepared in the same manner as the IVP with a RP of 2 using 206.9 mL of the FeLV stock

30

solution and 292.0 mL 0.063% PBS buffer, with the amounts of the other components remaining the same.

For administering a 0.5 mL dose, 300.0 mL of IVP containing the feline leukemia virus at a RP of 5, Quil A, Cholesterol, DDA, and CARBOPOL® was prepared in the following manner. A total of 21.7 mL of a FeLV stock solution (35.8 RP/mL where 1 RP = 1,864 µg/mL of antigen) was added to 277.7 mL 0.063% PBS buffer. While stirring, 0.12 mL of a 50.0 mg/mL solution of Quil A was slowly added to the antigen solution. Then, 0.35 mL of an 18 mg/mL cholesterol/ethanol solution was slowly added. A total of 0.17 mL of an 18.0 mg/mL DDA/ethanol solution was slowly added to the composition while stirring. The composition was homogenized for three minutes at 10,000 rpm. The composition was then microfluidized by one pass through a 200 micron limiting dimension chamber at 10,000 (+ 500) psi. While stirring, 3.3 mL of a 1.5% CARBOPOL® solution was slowly added to 96.7 mL of the feline leukemia virus, Quil A, Cholesterol, and DDA composition. The pH was adjusted to between 7.0 and 7.3 with 18% NaOH or 1N HCl, as needed.

The IVP for administering a 1.0 mL dose of the feline leukemia virus at a RP of 5, Quil A, Cholesterol, DDA, and CARBOPOL® was prepared in the same manner as for the 0.5 mL dose with the amounts adjusted appropriately.

A total amount of 300.0 mL of IVP containing the feline leukemia virus at a RP of 10 and CARBOPOL® was prepared. A total of 62.1 mL of a FeLV stock solution (50.0 RP/mL where 1 RP = 3,624 µg/mL of antigen) was added to 237.9 mL 0.063% PBS buffer. The composition was homogenized for three minutes at 10,000 rpm. The composition was then microfluidized by one pass through a 200 micron limiting dimension chamber at 10,000 (+ 500) psi. While stirring, 3.3 mL of a 1.5% CARBOPOL® solution was slowly added to 96.7 mL of the feline leukemia virus composition. The pH was adjusted to between 7.0 and 7.3 with 18% NaOH or 1N HCl, as needed.

Placebo and FeLV vaccines (Table 2) were administered to kittens by the subcutaneous route using a 22 gauge x 3/4" needle and 3 cc syringe on Study Day 0 and Study Day 20. Treatment group T01 was administered the placebo vaccine at a 1.0 mL dose. Treatment groups T02, T04, T05, T06, T07, T08 and T09 were administered the FeLV vaccines at a 1.0 mL dose. Treatment group T03 was administered the FeLV vaccine at a 0.5 mL dose. Treatment group T10 was

administered the FeLV canarypox vaccine (Merial) by the intradermal route using an intradermal gun injector.

Table 2: Experimental Design

Treatment Group	Number Animals	Target Relative Potency	Route of Vaccination	Vaccine	Adjuvant	Cell Culture Media (Harvest Bulk)
T01	10	N.A.	SC	PBS	No Adjuvant	Normal Saline
T02	10	5 RP	SC	Inactivated FeLV	Quil A – Cholesterol DDA – CARBOPOL®	RPMI
T03	10	5 RP	SC / 0.5 mL	Inactivated FeLV	Quil A – Cholesterol DDA – CARBOPOL®	RPMI
T04	10	20 RP	SC	Inactivated FeLV	Quil A – Cholesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T05	10	15 RP	SC	Inactivated FeLV	Quil A – Cholesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T06	10	10 RP	SC	Inactivated FeLV	Quil A – Cholesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T07	10	5 RP	SC	Inactivated FeLV	Quil A – Cholesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T08	10	2 RP	SC	Inactivated FeLV	Quil A – Cholesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T09	10	10 RP	SC	Inactivated FeLV	CARBOPOL®	Cellgro
T10	10	Live rFeLV (Merial)	ID	Live rFeLV (Merial)	No Adjuvant	Proprietary (Merial)

All animals were observed following first vaccination (Study Day 0) and second vaccination (Study Day 20) for signs of pain upon test vaccine administration including vocalization, scratching/biting and aggressive or escape

attempt. Post-vaccination attitude (normal or abnormal) was also documented. All animals were observed for approximately one hour after vaccine administration on Study Day 0 and Study Day 20 for the development of adverse systemic reactions. Observations were documented. The vaccination sites were palpated, and pain at injection site, redness at injection site, injection site swelling and size of swelling were recorded. Observations were performed on Study Days 2, 5 and 9 after the first vaccination, and on Study Days 25, 28 and 32 after the second vaccination. Observations were documented.

A blood sample (1.0 – 2.0 mL) was collected from each animal by venipuncture of the jugular vein on Study Day 32 (pre-challenge). Animals were challenged on Study Days 34, 36, 39, and 41 by administering 1.0 mL by the nasal route of undiluted challenge material. A 1 mL tuberculin syringe, without the needle, was filled with the challenge material. Each kitten was given approximately 0.5 mL per nostril. The FeLV challenge material had an average titer of $10^{6.1}$ TCID₅₀/mL. A blood sample (1.0 – 2.0 mL) was then collected from each animal by venipuncture of the jugular vein on Study Days 61, 83, 106, 126, 133, 138, 146, and 152.

Results - Safety

During the first (Study Day 0) vaccination, three animals in treatment group T09 demonstrated immediate sting-type reactions. During the second vaccination (Study Day 20), one animal from treatment group T05, four from treatment group T08, and two from treatment group T09 demonstrated immediate sting-type reactions.

During the first vaccination, three animals from treatment group T09 demonstrated minor vocalization. The animals presenting pain at first vaccination also presented minor vocalization at that time. During the second vaccination, one animal from treatment group T05, four from treatment group T08, and two from treatment group T09 demonstrated minor vocalization. The animals presenting pain at second vaccination also presented minor vocalization at that time.

During the first vaccination, three animals in treatment group T09 demonstrated aggressive behavior/attempt to escape. During the second vaccination, one animal from treatment group T05, four from treatment group T08,

and two from treatment group T09 demonstrated aggressive behavior/attempt to escape.

None of the treatment groups presented scratching/biting at injection site upon first or second vaccination. Injection site reactions were not observed in any of the treatment groups post first or second vaccination. Adverse reactions were also not observed in any of the treatment groups.

Results - Efficacy

All animals tested negative prior to vaccination for FeLV p27 antigen from serum samples collected on Day -1. All animals also tested negative prior to challenge for FeLV p27 antigen from serum samples collected on Day 32.

Final results from week 12 to week 16 post-challenge (Table 3) indicated that 9 out of 10 animals (90%) in treatment group T01 (placebo) were persistently viremic to FeLV. Results from the same period indicated that 6 out of 10 animals (60%) in treatment group T02 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was not statistically significant ($p=0.0573$) compared to the placebo vaccinated kittens. Nine out of 10 animals (90%) in treatment group T03 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was statistically significant ($p=0.0011$) compared to the placebo vaccinated kittens. 10 out of 10 animals (100%) in treatment group T04 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was statistically significant ($p=0.0001$) compared to the placebo vaccinated kittens. 10 out of 10 animals (100%) in treatment group T05 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was statistically significant ($p=0.0001$) compared to the placebo vaccinated kittens. 7 out of 10 animals (70%) in treatment group T06 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was statistically significant ($p=0.0198$) compared to the placebo vaccinated kittens. 10 out of 10 animals (100%) in treatment group T07 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was statistically significant ($p=0.0001$) compared to the placebo vaccinated kittens. 8 out of 10 animals (80%) in treatment group T08 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was statistically significant ($p=0.0055$) compared to the placebo vaccinated kittens. 5 out of 10 animals (50%) in treatment group T09 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was not statistically significant ($p=0.1409$) compared to the placebo vaccinated kittens. Finally, 6 out

32

of 10 animals (60%) in treatment group T10 were protected from FeLV virulent challenge; this level of protection was not statistically significant ($p= 0.0573$) compared to the placebo vaccinated kittens.

Table 3. Summary of Level of Protection

Treatment Group	Vaccine Relative Potency	Level of Protection	Preventive Fraction
T01	NA	10%	
T02	4.58	60%	55.6%
T03	4.58	90%	88.9%
T04	26.32	100%	100%
T05	18.58	100%	100%
T06	11.16	70%	66.7%
T07	4.77	100%	100%
T08	1.64	80%	77.8%
T09	11.12	50%	44.4%

Discussion

The vaccines used in treatment groups T02, T03, T04, T06 and T07 demonstrated a satisfactory safety profile during the first vaccination, as no reactions were observed at that time. A single animal in treatment group T05 demonstrated an immediate reaction (pain at administration, minor vocalization and aggressive/escape attempt) at the second vaccination. This event might be associated with an exacerbated response to vaccination for the particular animal rather than to a vaccine formulation problem. All vaccines demonstrated a satisfactory safety profile post-vaccination, since neither local reactions nor adverse events related to vaccination were observed.

FeLV vaccines administered to treatment groups T03, T04, T05, T07 and T08 demonstrated satisfactory efficacy, since $\geq 80\%$ protection ($\geq 75\%$ preventive fraction) was achieved after challenge with virulent FeLV. That the vaccine given to group T07 provided 100% protection is surprising and unexpected, as animals in that group received 25% and 33% of the antigen dose of animals in groups T04 and T05, respectively. A clear advantage of the adjuvants disclosed and tested herein is that they allow for a smaller dose of antigen to be used, while still inducing a fully protective immune response. Vaccines administered to treatment groups T02, T06 and T09 demonstrated a somewhat decreased efficacy ($< 80\%$ protection; preventive fraction $< 75\%$) following challenge with virulent FeLV. The

decreased efficacy of the vaccine administered to treatment group T02 was possibly do to the presence of low responder animals in that group.

Example 16. In Ovo Vaccination against *Eimeria* in Chickens

Avian coccidiosis is an intestinal disease generally caused by protozoa of the genus *Eimeria*, and represents a serious worldwide problem for the poultry industry. Parasites ingested during feeding localize to the intestinal tract where they cause serious damage to intestinal and underlying tissues. Resultant economic losses to the poultry industry are very significant, since feed conversion and weight gain of both broiler and egg-laying birds are impaired. A general summation of the state of the art, including attempts to vaccinate against *Eimeria* using, for example, recombinant *Eimeria* proteins as antigen and a variety of adjuvant systems, are described in the following publications, all of which are incorporated by reference herein, as if fully set forth, (1) H.S. Lillehoj et al., *J. Parasitol*, 91(3), 2005, pp. 666-673; (2) H.S. Lillehoj et al., *Avian Diseases*, 49 2005, 112-117; and (3) R. A. Dalloul et al., *Expert Rev. Vaccines*, 5(1), 2006, pp.143-163. The present Example is directed to the use of novel vaccine compositions that employ adjuvant components that provide superior performance in the context of coccidiosis.

The highly effective adjuvants of the present invention may be used in combination with antigenic material from all *Eimeria* species, including purified or partially purified protein extracts thereof, or by way of one or more recombinantly expressed proteins thereof, or fragments of any and all such proteins, thus to include antigenic materials provided from *Eimeria acervulina*, *Eimeria ahsata*, *Eimeria bovis*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria fraterculae*, *Eimeria maxima*, *Eimeria meleagridis*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, *Eimeria stiedae*, *Eimeria tenella*, and *Eimeria zurnii*, among others.

The adjuvated vaccine of the invention may be provided against any protein or macromolecule that is produced at one or more points in the life cycle of the protozoan, including, without limitation, oocyst (whether sporulated or unsporulated), sporocyst, sporozoite, schizont, merozoite, male or female gamete cells. In a preferred example, proteins that are shed into the feces in significant amounts in the oocyst stage are the preferred materials to act as the source of recombinant protein antigen, or partially or wholly purified samples of such protein as purified by conventional means.

Additional examples of *Eimeria* proteins useful as sources of antigen in the formulation of the present vaccines include those as described by Karkhanis et al. *Infection and Immunity*, 1991, pp. 983-989, including protective antigens, as described therein, having a mass range of about 20 to about 30kDA. Additional example include the *Eimeria* 23kDA 3-1E protein, and the Etp100 protein, for example as recovered from *E. tenella*.

The highly effective adjuvants of the present invention may be used in combination with antigenic material from *Neurospora caninum*.

Additionally, the highly effective adjuvants of the present invention may be used in combination with any of the following protozoan pathogens, *Cryptosporidium parvum* (cryptosporidiosis), *Cyclospora cayetanensis* (cyclosporiasis), *Isospora belli* (isosporiasis), *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis), *Plasmodium* (malaria), and *Babesia spp.* (babesiosis), and related protozoans, generally of the Apicomplexen group causing these or related diseases.

The effectiveness of *in ovo* delivery of vaccines that contain particular adjuvant systems was evaluated as follows.

Materials and Methods:

1. Materials:

Recombinant *E. maxima* protein (of protein 3-1E) was expressed in *E. coli* and affinity-column purified. Crude preparation of whole cell *E. maxima* macromolecules (solubilized with detergent from disrupted cells) were also used as antigen, with this crude antigen being referred to as "EM". In a preferred example, the adjuvant was as described in Example 8 above, and is prepared as provided according to that Example protocol (see Page 41). Therefore, in a typical example, each embryo would receive an injection into the amnion (i.e. to include the amnionic fluid and space) of about 50 to about 100 microliters of vaccine solution, which, for each 1 ML thereof comprises: about 50 or 100 micrograms of recombinant 3-1E protein or other protein species, or alternatively, about 50 or 100 micrograms of crude cell "EM" extract; about 20 micrograms Quil A; about 20 micrograms cholesterol; CARBOPOL at about 0.075% (v/v); about 10 micrograms of DDA; and about 250 micrograms R1005, all provided in, for example, 20 mM PBS.

In connection with selection of the saponin for use herein, the following additional information is instructive. The defined term saponin refers to the plant derived glycosides, a number of which have been studied extensively for their biological properties (The Plant Glycosides, McIlroy, R. J., Edward Arnold and co., London, 1951). The saponins used most predominantly in the art for the production of vaccines are those derived from the plants *Quillaja saponaria molina*, *Aesculus hippocastanum* or *Gyophilla struthium*. Extracts of the bark of *Quillaja saponaria molina* which are known to have adjuvant activity are known, for example Quil A. Also pure fractions of Quil A have been described which retain adjuvant activity whilst being less toxic than Quil A, for example QS21. QS21 is also described in Kensil et al. (1991. *J. Immunology* vol 146, 431-437). When mixed with the further adjuvant ingredients of the present invention, as heretofore and hereinafter described, such saponin-containing materials become highly effective materials. Additional effective formulations include those that use Escin, which has been described in the Merck index (12th ed: entry 3737) as a mixture of saponins occurring in the seed of the horse chestnut tree. In the preferred embodiment of the present invention, saponin refers to "Quil-A" sold in the USA by E.M Sergeant company.

It should further understood that saponin extracts can be used as mixtures or purified individual components therefrom such fractions/products including QS-7, QS-17, QS-18, and QS-21 from Antigenics Company, Massachusetts, USA or similar crude, fractioned or refined saponin products, and mixtures thereof offered by Isconova Company of Sweden. In one embodiment the Quil A is at least 85% pure. In other embodiments, the Quil A is at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% pure.

2. Embryo Vaccination:

Eggs were purchased from the Moyers Hatchery, Quakertown, PA. For in ovo immunization, broiler eggs were then incubated for 18 days, and candled to select (at 18 days of embryonation) fertile eggs, and then injected with 20 mM PBS and either adjuvant alone, or adjuvant formulated with either recombinant 3-1E protein or an "EM" preparation. Injections were made on an "Intelliject" in ovo injector (Avitech, Hebron, MD) according to the manufacturer's instructions. Each egg received 100 microliter samples into the amnionic cavity using a 17.5cm-long

18-gauge needle provided by Avitech (Hebron, MD). 50 microliter doses are also among those operable in the practice of the present invention.

3. Chickens:

As soon as broiler chickens were hatched (at about day 21-22), they were transported to the laboratory using disposable chicken transporting cartons (Frederick Packaging, Inc., Milwaukee, WI) and the chicks were then housed in the Petersime units and provided with feed and water ad libitum.

Birds were kept in brooder pens in an *Eimeria*-free facility and transferred into large hanging cages in separate locations where they were infected with live oocysts of *Eimeria maxima* and kept there until the end of experimental period.

4. Parasites:

USDA BARC strain of *Eimeria maxima* #41, which has been maintained in the Animal Parasitic Diseases Laboratory-BARC and propagated according to the established procedure in Dr. Lillehoj's laboratory, was used. The freshly produced oocysts from the strain of *E. maxima* (Beltsville #41) were cleaned by floatation on 5% sodium hypochlorite, washed three times with PBS, and viability was enumerated by trypan blue using a hemocytometer.

5. *Eimeria* challenge infection:

Seven day-old birds were wing-tagged and the birds of all experimental groups except uninfected control groups were inoculated esophageally with *E. maxima* using an inoculation needle, and were then placed into oocysts collection cages.

6. Body weight gain determination:

Body weights of individual birds were determined at days 0 (uninfected), 6 and 10 days post infection with *E. maxima*.

7. Assessment of fecal oocyst production:

Animal caretakers were instructed not to clean the cages, and fecal droppings were collected. Collecting pans were placed under each cage for 5 days starting from the 6th day post infection, and fecal materials were collected into large plastic jars (2L). Fecal droppings soaked with tap water in each jar were ground in a blender with more water (total volume is 3L), and two 40 ml random samples were taken from each sample and stored in refrigerator until they were counted. In order to count coccidia oocysts, various dilutions were made initially to determine the optimum dilutions for the enumeration of oocysts for each sample.

Oocysts were counted microscopically using a McMaster counting chamber using a sucrose floatation method which has been established in Dr Lillehoj's laboratory. The total number of oocysts shed per chicken was calculated using the formula: total oocysts/bird = (oocyst count x dilution factor x fecal sample volume/counting chamber volume)/number of birds per cage.

8. Sample collection:

Blood was collected on the 6th day following the date of infection, and serum antibody response was determined. Blood samples were obtained from individual birds (N=4-5/group), allowed to clot 4 hr at 4°C, and the sera collected. Serum samples were tested for anti-Eimeria antibodies using ELISA. Briefly, microtiter plates were coated overnight with 10µg/well of the recombinant coccidial antigens Ea3-1E, EtMIF or EtMIC2, washed with PBS-0.05% Tween, and blocked with PBS-1% BSA. Serum dilutions (1:20, 1:40, 1:80, 1:160; 100µl/well) were added, incubated with continuous gentle shaking, washed, and bound Ab detected with peroxidase-conjugated rabbit anti-chicken IgG (Sigma) and peroxidase-specific substrate. Optical density (OD) was determined at 450nm with a microplate reader (Bio-Rad, Richmond, CA).

Intestine tissues were collected at hatch, and at 6 and 10 days thereafter, and tested for cytokine (IFN-γ, IL-2) production by using Real-time RT-PCR, as a measure of Th1 stimulation.

9. cDNA synthesis

Total RNA was extracted from intestinal IELs using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Five micrograms of RNA were treated with 1.0 U of DNase I and 1.0 µl of 10X reaction buffer (Sigma), incubated for 15 min at room temperature, 1.0 µl of stop solution was added to inactivate DNase I, and the mixture was heated at 70°C for 10 minutes. RNA was reverse-transcribed using the StrataScript first-strand synthesis system (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's recommendations.

10. Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR oligonucleotide primers for chicken interferon-γ (IFN-γ) and GAPDH control are listed in Table 4. Amplification and detection were carried out using equivalent amounts of total RNA from intestinal IELs using the Mx3000P system and Brilliant SYBR Green QPCR master mix (Stratagene). Standard

23

curves were generated using log₁₀ diluted standard RNA and levels of individual transcripts were normalized to those of GAPDH analyzed by the Q-gene program. Each analysis was performed in triplicate. To normalize RNA levels between samples within an experiment, the mean threshold cycle (C_t) values for the amplification products were calculated by pooling values from all samples in that experiment.

Table 4. Oligonucleotide primers used for quantitative RT-PCR of chicken IFN-γ and GAPDH.

RNA target	Primer sequences	PCR product size (bp)
GAPDH	Accession no. K01458	264
Forward	5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3'	SEQ ID NO:1
Reverse	5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'	SEQ ID NO:2
IFN-γ	Accession No. Y07922	259
Forward	5'-GCTGACGGTGGACCTATTATT-3'	SEQ ID NO:3
Reverse	5'-GGCTTTGCGCTGGATTC-3'	SEQ ID NO:4
IL-1β	Accession No. Y15006	244
Forward	5'-TGGGCATCAAGGGCTACA-3'	SEQ ID NO:5
Reverse	5'-TCGGGTTGGTTGGTGATG-3'	SEQ ID NO:6
IL-15	Accession No. AF139097	243
Forward	5'-TCTGTTCTTCTGTTCTGAGTGATG-3'	SEQ ID NO:7
Reverse	5'-AGTGATTGCTTCTGTCTTTGGTA-3'	SEQ ID NO:8

Spleen was collected before inoculation with *E. maxima* and at 10th DPI (date post infection) for splenocyte proliferation assay. Spleens were placed in a Petri dish with 10 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin (Sigma, St. Louis, MO). Single cell suspensions of spleen lymphocytes were prepared and lymphocyte proliferation was carried out. In brief, splenocytes were adjusted to 5x10⁶ or 1x10⁷ cells/ml in IMDM medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin (Sigma), which will be called 10% complete IMDM medium. Splenocytes (100 μl/well) were incubated in 96-well flat bottom plates at 41°C in a humidified incubator (Forma,

Marietta, OH) with 5% CO₂ and 95% air for 48 hr. Cell proliferation was determined with 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-8, Cell-Counting Kit-8®, Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD). Optical density (OD) was measured at 450 nm using a microplate spectrophotometer (BioRad, Richmond, CA).

Results

Results showed that the broiler birds vaccinated with 100 microliters of adjuvant formulation (i.e. 100 microliters including recombinant 3-1E protein according to the previously defined doses) gained about an additional 45 to 85 grams of body weight compared to the birds unvaccinated but infected with *E. maxima*.

The vaccines of the invention also showed clear effects on cell-mediated immunity as measured by mitogenic lymphocyte proliferation assays: The results of spleen lymphocyte proliferation at 1×10^7 cells/ml incubated with Con A for 48 hours showed that the splenocytes from *E. maxima*-infected chickens immunized with Pfizer adjuvant with or without antigen in general show higher levels of lymphocyte proliferation, especially when a 50 ug dose was used. Significant enhancement of IL-1B production, IFN- γ production, and IL-15 production, most particularly in the spleen was seen following administration of the adjuvanted vaccine compositions of the invention. In summary, these results clearly indicate the effect of present adjuvant on cytokine response and support its effect on enhancing cell-mediated rather than humoral immune response.

The vaccines of the invention also showed clear effects on fecal oocyst output. Uninfected control birds did not shed any oocysts. Following *E. maxima* infection, there were significant reductions of fecal oocysts output in groups which were treated with Pfizer adjuvants alone. Birds vaccinated in ovo with crude *Eimeria maxima* and adjuvant demonstrated much less fecal oocysts output compared to groups inoculated with crude *Eimeria maxima* preparation alone. EM groups.

It should be noted that although purified recombinant *E. maxima* protein 3-1E has been used in the practice of the aforementioned experiments, use of recombinant Ea3-1E, EaMIF, and EtMIC2 antigens, either singularly or in



combination with 3-1E, or each other, or as any combination of any thereof, is also a preferred embodiment of the invention, and generally all *Eimeria* protein antigens are operable in the practice of the present invention, as long as when mixed with the adjuvants of the present invention.

Example 17. Evaluation of *Escherichia coli* J5 strain Bacterin in Cattle

The objective of the study is to evaluate immunologic response in cattle to *Escherichia coli* (J-5 strain) antigen when administered in various novel formulations. The commercial J5 bacterin is sold as a preventative vaccine for coliform mastitis in dairy cattle and is moderately effective in its current formulation. Prior to vaccination, animals were determined to be of low titer for antibodies to *E. coli* J5, based respectively on serum blood sample analysis taken prior to vaccination.

Beef Cattle

Experimental vaccines were formulated using inactivated *E. coli* J5 bacterin as the antigen, and were made according to Example 13 above. Each treatment group initially contained seven animals (Table 5). One treatment group received saline (T01) and another group received a commercial J5 vaccine (T02 - Enviracor™ Pfizer J-5 *Escherichia coli* bacterin). The other treatment groups received various formulations containing the adjuvants specified in Table 5. All vaccinations were administered by subcutaneous injection on study days 0 and 21. The dosing volume was 5 mL.

Table 5. Vaccine Groups – Beef Cattle

Tmt Group	# of Animals	Treatment	Day	Dose (ml)	Route
T01	7	Saline	0, 21	5.0	SC
T02	7	Escherichia coli Bacterin, J-5 strain	0, 21	5.0	SC
T03	7	QCDCR	0, 21	5.0	SC
T04	7	QCDO	0, 21	5.0	SC
T05	7	QCDX	0, 21	5.0	SC
T06	7	QCDXO	0, 21	5.0	SC

In Table 5, QC is the abbreviation for QuilA/cholesterol, D for DDA, C for carbopol, R for R1005, X for DEAE-dextran and O for oil.

Stock solutions were prepared as in Examples 1 to 13 above for the following: *E. coli* was given as about 4-5 X 10⁹ organisms per dose as determined

by direct count by light microscopy. Quil A in water at 50 mg/ml, Cholesterol in ethanol at 17 mg/ml, DDA in ethanol at 17 mg/ml, R1005 in 20 mM phosphate buffer at 5 mg/ml, DEAE-dextran in water at 200 mg/ml, TLR agonist in TE buffer at 20 mg/ml and Iscomatrix in water at 5.4 mg/ml. The individual components were added v/v in the order of letter symbols from left to right. For example, QCDC the appropriate volume of Quil A was added followed by addition of cholesterol, DDA and finally carbopol. When the formulations contained oil, the separate components were add mixed then emulsified into a mixture of Drakeol® 5 LT mineral oil with either Span 80 and Tween 80 (QCDO) or Span 85 and Tween 85 (QCDXO). Drakeol® is a commercially available light mineral oil

Blood samples were collected on study days 0, 21 and 49 for serological testing. Antibody titers to *E. coli* J5 in serum samples were determined by means of J5-specific, indirect ELISA assay. IgG antibody isotypes were determined with sheep-anti-bovine antibody conjugates (Bethyl Labs). Titers were determined and expressed as their geometric means.

Results

The serological results of the study are shown in Tables 6 - 8. Higher antibody titers generally are associated with better protection of vaccines. The total J5-specific IgG titer is shown in Table 6. Several of the formulations of the present invention produced much higher titers than the commercial product, even though these formulations had a similar amount of J5 antigen added. The QCDO, QCDX, and QCDXO formulations were especially effective in inducing a good immune response in these cattle.

Table 6. IgG antibody titers.

Tmt Group	Treatment	Geometric mean IgG Titer to J5 at day		
		0	21	48
T01	Saline	1573	3135	2795
T02	Escherichia coli Bacterin	1402	7011	55524
T03	QCDCR	1573	13975	49494
T04	QCDO	1764	62289	391951
T05	QCDX	993	22135	110672
T06	QCDXO	2221	69877	620779

The J5-specific IgG1 antibody isotypes were determined. These results are shown in Table 7. Again, QCDO, QCDX, and QCDXO formulations were

especially effective in inducing a good immune response in these cattle. These formulations gave much higher titers with even a single vaccination than the commercial vaccine did with two injections.

Table 7. IgG1 antibody titers.

Tmt Group	Treatment	Geometric mean IgG1 Titer to J5 at day		
		0	21	48
T01	Saline	1250	1250	627
T02	Escherichia coli Bacterin	1114	11105	22135
T03	QCDCR	1250	12458	22135
T04	QCDO	1980	31250	139281
T05	QCDX	789	35057	62289
T06	QCDXO	1573	247472	439702

The IgG2 antibody titers are shown in Table 8. This antibody isotype is often associated with better phagocytosis by neutrophils in the milk and protection for the animal. The QCDO, QCDX, and QCDXO formulations were especially effective in inducing a good immune response in these cattle.

Table 8. IgG2 antibody titers.

Tmt Group	Treatment	Geometric mean IgG2 Titer to J5 at day		
		0	21	48
T01	Saline	199	396	396
T02	Escherichia coli Bacterin	280	855	3136
T03	QCDCR	1114	1402	4966
T04	QCDO	558	1573	6250
T05	QCDX	176	3947	9899
T06	QCDXO	559	8824	87940

Dairy Cattle

Experimental vaccines were formulated using inactivated *E. coli* J5 bacterin as the antigen, and were made according to Example 13 above. Each treatment group initially contained seven animals (Table 9). One treatment group received saline (T01) and another group received a commercial J5 vaccine (T02 - Enviracor™ Pfizer J-5 *Escherichia coli* bacterin). The other treatment groups received various formulations containing the adjuvants specified in Table 9. All vaccinations were administered by subcutaneous injection on study days 0 and 21. The dosing volume was 5 mL.

Table 9: Vaccine Groups – Dairy Cattle

Tmt Group	# of Animals	Treatment	Day	Dose (ml)	Route
T01	7	Saline	0, 21	5.0	SC
T02	7	Escherichia coli Bacterin, J-5 strain	0, 21	5.0	SC
T03	7	QCDCR	0, 21	5.0	SC
T04	7	QCDO	0, 21	5.0	SC
T05	7	TXO	0, 21	5.0	SC

In Table 9, QC is the abbreviation for QuilA/cholesterol, D for DDA, C for carbopol, R for R1005, X for DEAE-dextran, T for TLR agonist (CpG-ODN), and O for oil. Stock solutions were prepared for the following; *E. coli* was given as about $4\text{-}5 \times 10^9$ organisms per dose as determined by direct count by light microscopy. Quil A in water at 50 mg/ml, Cholesterol in ethanol at 17 mg/ml, DDA in ethanol at 17 mg/ml, R1005 in 20 mM phosphate buffer at 5 mg/ml, DEAE-dextran in water at 200 mg/ml, TLR agonist in TE buffer at 20 mg/ml. The individual components were added v/v in the order of letter symbols from left to right. For example, QCDCR the appropriate volume of Quil A was added followed by addition of cholesterol, DDA and finally carbopol. When the formulations contained oil, the separate components were add mixed then emulsified into a mixture of Drakeol 5 LT mineral oil with either Span 80 and Tween 80 (TXO, QCDO) or Span 85 and Tween 85.

Blood Collection

Blood samples were collected on study days 0, 21 and 49 for serological testing. Antibody titers to *E. coli* J5 in serum samples were determined by means of J5-specific, indirect ELISA assay. IgG antibody isotypes were determined with sheep-anti-bovine antibody conjugates (Bethyl Labs). Titers were determined and expressed as their geometric means.

Results

The serological results of the study are shown in the Table 10. Higher antibody titers generally are associated with better protection of vaccines. The total J5-specific IgG titer is shown in Table 10. Several of the formulations of the

invention produced much higher titers than the commercial product, even though these formulations had a similar amount of J5 antigen added. The QCDO, TXO and QCDXO formulations were especially effective in inducing a good immune response in these cattle.

Table 10. IgG antibody titers.

Tmt Group	Treatment	Geometric mean IgG Titer to J5 at day		
		0	21	48
T01	Saline	50	60	110
T02	Escherichia coli Bacterin	175.2	275	245
T03	QCDCR	106.5	202.7	209
T04	QCDO	55.9	328.3	245
T05	TXO	90.6	328.3	889

The J5-specific IgG1 antibody isotypes were determined. These results are shown in Table 10. Again, QCDO, TXO and QCDXO formulations were especially effective in inducing a good immune response in these cattle. These formulations gave much higher titers with even a single vaccination than the commercial vaccine did with two injections.

This antibody isotype is often associated with better phagocytosis by neutrophils in the milk and protection for the animal. The QCDXO formulation was especially effective in inducing a good immune response in these cattle.

Example 18. Bovine Viral Diarrhea Virus Vaccine

Study Objective

This study compared the safety, efficacy and cross-protection of two killed Bovine Viral Diarrhea Virus type 1 and type 2 (BVDV-1 and BVDV-2 or BVD-1/2) vaccines and one BVDV-1 and -2 extract vaccine formulated with adjuvants of the invention with one negative (saline) and two positive controls (a modified live BVDV-2 vaccine, and a currently available killed BVDV-1/2 vaccine) against a challenge with BVDV-1 in naïve calves. Table 11 presents the Study Design.

This study also showed that the adjuvants of the invention can be used to distinguish animals vaccinated with vaccine compositions of the present invention from animals naturally exposed to BVDV.

Animals

Healthy weaned beef cattle of either sex between 7 and 15 months of age that were seronegative for BVDV-1 and BVDV-2 were used.

Table 11. Study Design

Gp	Vaccine	Adjuvant	Dose	Days	# Animals	Challenge day	Route	Dose
T01	Saline	None	2mL, SC left neck	0 & 21	10	42	IN	5 mL
T02	BVD-2 MLV	None	2mL, SC left neck	0	10	42	IN	5 mL
T03	BVD-1/2 inactive	PreZent- A	2mL, SC left neck	0 & 21	10	42	IN	5 mL
T04	BVD-1/2 inactive	QCDC	2mL, SC left neck	0 & 21	10	42	IN	5 mL
T05	BVD-1/2 inactive	QCDCR	2mL, SC left neck	0 & 21	10	42	IN	5 mL
T06	BVD-1/2 inactive extract	QCDC	2mL, SC left neck	0 & 21	10	42	IN	5 mL

QC is the abbreviation for QuilA/cholesterol, D for DDA, C for Carbopol®, R for Bay R1005®

Vaccination

On Study Days 0 and 21, animals (N = 10 / group) were vaccinated as described in Table 11. The antigen (BVDV) was given as 5,500 Relative Potency Units (RU) per dose as determined by ELISA assay. Calves in the T01 group served as the control group. They were given a 0.9% sodium chloride sterile solution. Those in the T02 through T06 groups received experimental BVDV 1/2 vaccines with the adjuvant as shown in Table 11. The T02 group received only one vaccination (Study Day 0). They received a modified live virus (MLV) BVDV-2 vaccine that contained no adjuvant. Group T03 received a killed virus BVDV-1/2 vaccine containing a 2.5% oil-in-water emulsion (Amphigen) and Quil A/cholesterol adjuvants (PreZent A®). Group T04 received a killed virus BVDV-1/2 vaccine

containing Quil A/cholesterol, DDA, and Carbopol. Group T05 received a killed virus BVDV-1/2 vaccine containing Quil A/cholesterol, DDA, Carbopol, and R1005. Group T06 received a killed virus BVDV-1/2, high-titer extract vaccine containing Quil A cholesterol, DDA, and Carbopol on Day 0, and a similar low-titer extract vaccine on Day 21. All treatments were administered subcutaneously in a single 2 mL dose on Days 0 and 21, with the exception of Group 2.

The QCDC +/- R contained 100 µg Quil A, 100 µg Cholesterol, 50 µg DDA, and 0.075% Carbopol and where included 1,000 µg R1005 all per 2 mL dose as previously described.

Challenge

On Day 42 all the animals were challenged intranasally with about 4 mL (approximately 2 mL per nostril) of noncytopathic BVDV-1 strain (Strain NY-1 ; CVB, USDA, Ames, IA) with a concentration $5.4 \log^{10}$ TCID₅₀ per 5-mL dose.

Observations

Injection site observations were recorded on Study Days 0 (pre-vaccination), 1, 2, 3, 7 and 21 for the first injection site (left neck). Observations for the second injection site (also left neck) were recorded on Study Days 21 (pre-vaccination), 22, 23, 24, 28 and 35. All palpable injection site reactions were measured (L x W x H, cm). Rectal Temperatures were recorded on Study Days -1, 0 (pre-vaccination), 1, 2 and 3 for the primary vaccination. Temperatures for the booster vaccination were recorded on Study Days 20, 21 (pre-vaccination), 22, 23 and 24.

Blood Sampling

Blood samples were collected from each available animal using serum separation tubes (SST) on Study Days -1, 20, 34 and 49. Blood samples were collected using EDTA tubes on Study Days 33 through 35 (pre-challenge) and 36 through 49. Blood samples were collected using cell preparation tubes (CPT) on Study Days 34 (pre-challenge) and 36 through 49.

Results

Table 12 shows geometric least squares mean (GLSM) serum neutralizing antibody titer to BVD virus by hemeagglutination assay on day of study. The results show the adjuvants of the invention provided an increase in titers against both BVDV-1 and BVDV-2 as the study progresses. An acceptable titer for the USDA is above a titer of 8. These data demonstrate titers above 5,000 which

indicate strong antibody production that is capable of stopping live virus when it enters the animal with the potential for infection and disease.

Table 12. serum antibody neutralizing titer

Group (vaccine, adjuvant)	BVDV-1				BVDV-2			
	Day -1 Mea ns	Day 21 GLS M	Day 41 GLSM	Day 56 GLSM	Day -1 Means	Day 21 GLSM*	Day 41 GLSM*	Day 56 GLSM*
Group T01 (saline, none)	1.00 (1-1)	1.00 (1-1)	1.00 (1-1)	21.38 (11-54)	1.00 (1-1)	1.01 (1-1)	1.01 (1-1)	371.98 (128- 861)
Group T02 (BVDV-2 MLV, none)	1.00 (1-1)	1.00 (1-1)	2.75 (1-27)	13.27 (1-45)	1.00 (1-1)	2.14 (1-10)	45.21 (1- 1024)	454.09 (91- 1218)
Group T03 (BVDV- 1/2, PreZent- A)	1.00 (1-1)	1.60 (1-6)	35.59 (1-181)	486.49 (91- 2048)	1.00 (1-1)	6.40 (1-38)	877.75 (38- 3444)	8950.83 (1024- 77936)
Group T04 (BVDV- 1/2, QCDC)	1.00 (1-1)	1.20 (1-3)	12.66 (5-91)	1772.1 7 (512- 16384)	1.00 (1-1)	8.71 (5-16)	329.56 (54- 861)	11611.44 (4096- 16384)
Group T05 (BVDV- 1/2, QCDCR)	1.00 (1-1)	1.12 (1-3)	18.92 (5-91)	2477.8 7 (861- 6889)	1.00 (1-1)	5.30 (2-13)	692.34 (152- 2048)	10517.89 (3444- 46341)
Group T06 (BVDV- 1/2 extract, QCDC)	1.00 (1-1)	1.07 (1-2)	4.60 (1-23)	922.95 (256- 4096)	1.00 (1-1)	2.43 (1-7)	239.87 (64- 1448)	9956.50 (4096- 55109)

Table 13 presents leucopenia data for study days 43-56. The leukopenia results on day of study demonstrate that the MLV vaccine (T02) prevented infection by that specific virus of the challenge. A measure of leukopenia is a



criteria for licensing a MLV product by the USDA. However, for an inactivated virus leucopenia is not a criteria by the USDA but as the data suggests the adjuvants of the invention had leucopenia in up to only 20% of the animals where as most inactivated virus vaccines have 100% leucopenia. This indicates that the adjuvants of the invention were able to drive a strong Th1 response with an inactivated antigen. This is difficult to do and is seldom seen in inactivated products.

Table 13. Leukopenia by Day of Study.

Day of study	T01 Saline	T02 Modified Live	T03 PreZent A	T04 QCDC	T05 QCDCR	T06 QCDC Extract
Day 43	0	0	0	0	0	0
Day 44	0	0	0	0	0	0
Day 45	0	0	0	0	0	0
Day 46	2	0	0	0	0	0
Day 47	5	0	1	1	1	3
Day 48	5	0	1	2	2	3
Day 49	8	0	1	2	2	6
Day 50	8	0	1	0	1	3
Day 51	6	0	0	0	0	0
Day 52	2	0	0	0	0	0
Day 53	2	0	0	0	0	0
Day 54	2	0	0	0	0	0
Day 55	2	0	0	0	0	0
Day 56	2	0	0	0	0	0

Table 14 presents the Serum Neutralization Titers on Day 41 (20 Days after Second Vaccination, Pre- Challenge). Modified live virus is capable of only developing antibody responses to the exact virus in the vaccine. This is seen in that Group T02 shows protection against only BVDV-2. However, the T03 (PreZent-A), T04 (QCDC), and T05 (QCDCR) adjuvanted inactivated vaccines generated a strong antibody response early on in the onset of immunity and throughout the in life phase of the animal study toward a serologically diverse panel of BVDVs. This shows that these adjuvants have the ability to provide safety and efficacy in a challenge model to protect cattle in not only a homologous but a heterologous challenge.

Table 14. Serum Neutralization Titers on Day 41.

Cross Protection by Serological TiterTreatment group, Antibody Titer Log 2						
	T01 Saline	T02 Modified Live	T03 PreZent A	T04 QCDC	T05 QCDCR	TC QC/ Extr
Average BVDV1a	<1	0.8	4.0	2.5	2.9	1.
Average BVDV1b	<1	0.7	3.9	2.4	2.9	1.
Average BVDV2	<1	4.5	8.8	8.1	8.0	6.

Marker Activity. Presented herein are data which show that the adjuvants of the invention can be used to distinguish animals vaccinated with vaccine compositions of the present invention from animals naturally exposed to BVDV. This can be seen by determining the antibody profile differences between structural and non structural gene products of the virus. The marker activity is demonstrated by the gel run by radioimmunoprecipitation assay (Figure 1). An antibody response to the NS2/3 and E2 proteins of the BVDV is very pronounced in an animal vaccinated with a MLV vaccine or an animal naturally exposed to BVDV or PreZent-A adjuvanted inactivated vaccine. However, the adjuvants of the invention demonstrated an antibody response to only E2 protein and not the NS2/3 proteins. Thus an animal vaccinated with an inactivated BVDV vaccine comprising adjuvants of the invention can be differentiated between from either a naturally infected animal or a MLV vaccinated animal or PreZent-A vaccinated animal. This would be considered a marker-vaccine that is valuable for eradication of these types of diseases in animal populations.

Example 19. Mycoplasma hyopneumonia in Swine

Background

Mycoplasma pneumonia of swine (MPS) or enzootic pneumonia is a widespread, chronic disease characterized by coughing, growth retardation, and reduced feed efficiency. The etiologic agent is *M. hyopneumoniae*; however, the naturally occurring disease often results from a combination of bacterial and mycoplasmal infections.

MPS causes considerable economic loss in all areas where swine are raised. Surveys conducted at various locations throughout the world indicate that lesions typical of those seen with MPS occur in 30%-80% of slaughter-weight

swine. Because mycoplasmal lesions may resolve before hogs reach slaughter weight, the actual incidence may be higher. The prevalence of *M. hyopneumoniae* infection in chronic swine pneumonia has been reported to range from 25%-93%. Pigs of all ages are susceptible to MPS, but the disease is most common in growing and finishing swine. Current evidence indicates that *M. hyopneumoniae* is transmitted by aerosol or direct contact with respiratory tract secretions from infected swine. Transmission from sow to pig during lactation is possible. Once established, MPS occurs year after year in infected herds, varying in severity with such environmental factors as season, ventilation, and concentration of swine.

Study Objective

To compare the efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines formulated with novel adjuvants of the invention against the efficacy of an experimental serial of a commercially available *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin following intratracheal challenge with a virulent *M. hyopneumoniae* lung homogenate.

Animals

Sixty-six (66) clinically healthy, crossbred pigs at approximately 17 days of age without a history of disease caused by *M. hyopneumoniae* and PRRSV, or vaccination against the same organisms were used in the study. Prior to shipment to the study site, and for 2 days post-arrival, pigs were treated with Naxcel® intramuscularly in the hind leg, as per label directions, to prevent stress-related disease such as *Streptococcus suis*. Animals were allocated to treatments and pens according to a randomization plan. The study design is shown in Table 15.

Table 15. Experimental Design

Treatment Group	Treatment	No. of Animals	Vaccination	Route	Challenge
T01	Negative Control 63464-70	12	Day 0 Day 14	Intramuscular	<i>M. hyo</i> lung-homogenate
T02	DDA/Carbopol/R1005 (DCR)	12	Day 0 Day 14	Intramuscular	<i>M. hyo</i> lung-homogenate
T03	QAC/ DDA/Carbopol (QCDC)	12	Day 0 Day 14	Intramuscular	<i>M. hyo</i> lung-homogenate
T04	QAC/DDA/Carbopol/R1005 (QCDCR)	12	Day 0 Day 14	Intramuscular	<i>M. hyo</i> lung-homogenate
T05	<i>M. hyo</i> Bacterin	12	Day 0 Day 14	Intramuscular	<i>M. hyo</i> lung-homogenate
NTX	None	6	N/A	N/A	N/A

QAC is the abbreviation for QuilA/cholesterol,

Investigational Veterinary Products (IVP)

The antigens and Investigational Veterinary Products (IVP) are shown in Table 16. The vaccines for Treatment Groups T02, T03, and T04 (all except T05) were prepared according to Example 13 by using the concentrations of components shown in Table 16 below. The components were added in the order listed in the table.

A saline extender was added to a vessel and homogenization was initiated and continued throughout the preparation procedure. Inactivated *M. hyopneumoniae* was prepared from a blended volume of 75 liters of fermentate per 800 liters of final formulated product and was added to a concentration of 0.09375 ml per dose. Quil A was added to the concentration listed in Table 16. Cholesterol/Ethanol solution was then added. DDA/ethanol solution was added, followed by the addition of the Bay R1005 glycolipid solution. Carbopol was then added and the solution was brought to the final volume with the saline extender.

The vaccine for Treatment Group T05 (Amphigen Based Vaccine formulation) was the commercially available product Respisure® (Pfizer, Inc).

Table 16. Investigational Veterinary Products (IVP)

IVP	Treat- ment Group	Antigen Dose	Adjuvant per Dose	# of Doses	Volume / Dose
Negative Control Saline	T01	N/A	N/A	24	2 mL
DDA/Carbopol/ R1005	T02	M. hyo	Mhyo +DDA/R1005/Carbopol (50/1000ug/dose/0.075% w/v)	24	2 mL
QAC/ DDA/ Carbopol	T03	M. hyo	Mhyo+ QuilA/cholesterol/DDA/Carbopol (100/100/50 micrograms/dose/0.075% v/v)	24	2 mL
QAC/DDA/ Carbopol/R100 5	T04	M. hyo	Mhyo+ QuilA/cholesterol/DDA/Carbopol /R1005 adjuvant diluent (100/100/50 micrograms/dose/0.075% v/v/1000ug/dose)	24	2 mL
M. hyo Bacterin	T05	M. hyo	5% Amphigen	24	2 mL

Vaccination

Animals in the NTX treatment group were not vaccinated or challenged. At approximately 3 weeks of age (Day 0 – right neck) and 5 weeks of age (Day 14 – left neck), animals in T01, T02, T03, T04 and T05 were vaccinated intramuscularly, 2 mL per dose, by a qualified individual blinded to treatment group.

Challenge Material

Animals in T01 through T05 were challenged intratracheally 3 weeks following the second vaccination (at approximately 8 weeks of age – Study Day 35). Animals were challenged with a 5 mL dose of a 1:50 dilution in Friis medium of a 10% frozen lung homogenate of *M. hyo* strain 11 (LI36).

Blood Sampling

On Day –1 or 0 (prior to 1st vaccination), Day 13 or 14 (prior to 2nd vaccination), Day 34 or 35 (prior to challenge) and Day 63 (at necropsy), blood samples (approximately 5 to 10 mL in serum separator tubes) were collected from all pigs and tested for *M. hyopneumoniae* serology (ELISA - IDEXX).

Weight

All animals were weighed on arrival for allotment purposes, on Day 34 or 35 (prior to challenge), and on Day 62 or 63 (prior to necropsy).

Necropsy

On Day 63, all surviving animals were euthanized according to site-specific procedures. Lungs were evaluated grossly for characteristic lesions attributable to a *M. hyopneumoniae* infection and were given a score for the lesions attributed to the *M. hyopneumoniae* challenge. Lung lesions scores were recorded as the percent of lung lesions for each lung lobe. The percentage of consolidation for each lobe (left cranial, left middle, left caudal, right cranial, right middle, right caudal, and accessory) were scored as an actual value between 0-100%. The percent for each lung lobe was used in a weighted formula for calculation of the total percent lung with lesions. Six (6) NTX animals were necropsied on Day 34 or 35 prior to challenge and their lungs scored for lesions.

Lung Lesion Scores

Percentage of total lung with lesions were calculated using the following formula: Percentage of total lung with lesions = $100 \times \{(0.10 \times \text{left cranial}) + (0.10 \times \text{left middle}) + (0.25 \times \text{left caudal}) + (0.10 \times \text{right cranial}) + (0.10 \times \text{right middle}) + (0.25 \times \text{right caudal}) + (0.10 \times \text{accessory})\}$. The arcsine square root transformation was applied to the percentage of total lung with lesions prior to analysis. The transformed lung lesions were analyzed with a general linear mixed model. Linear combinations of the parameter estimates were used in a priori contrasts after testing for treatment effect. Back transformed least squares means of a significant ($P \leq 0.10$) percentage of total lung with lesions, their standard errors, and their 90% confidence intervals were calculated as well as the minimums and maximums.

Results

As indicated by the results Table 17 below, the adjuvants of the invention performed equally as well as the oil adjuvanted treatment group T05 that contained the adjuvant Amphigen®. Typically a lung lesion score of under 3 is considered to have conferred efficacy by the vaccine treatment. The combinations of the adjuvants of the invention all met this criteria and QCDCR performed the best in score and range among individual animals.

Table 17. Percent Lung with Lesions			
	Signal:Positive (S/P) Serological Ratio Day 34	LSM	Range
T01 - Placebo	0.00	8.4	0 – 25.55
T02 - DRC	0.28	2.4	0 – 20.13
T03 – QCDC	0.15	2.1	0 – 23.18
T04 QCDCR	0.23	0.5	0 – 2.7
T05 - RespiSure	0.46	0.6	0 – 2.33

N = 12 per group, with the exception of T05 where N = 11

Example 20. Feline Avian Influenza Virus (FAIV)

This study evaluated the efficacy in cats of an influenza vaccine using an adjuvant of the invention by challenge with a virulent avian influenza virus strain.

Methods and Results

Prior to vaccination, animals were determined to be negative for both influenza virus and antibodies to influenza virus, based respectively on oropharyngeal swabs and serum blood sample analysis taken prior to vaccination.

Experimental vaccines were formulated using inactivated pathogenic avian influenza and purified hemagglutinin (HA). Each treatment group initially contained six animals (Table 18). Two treatment groups received the experimental FAIV vaccines (T01 vaccine antigen was purified H5 HA protein; and T02 vaccine antigen was inactivated H5N2 strain), one treatment group received an inactivated modified H5N1 virus strain vaccine (T03), one placebo control group received an adjuvant-only vaccine (T04) and one negative control group receiving saline only (T05). All vaccinations were administered by subcutaneous injection on study days 0 and 21. The dosing volume was 1 mL. Following vaccination animals were observed constantly until they recovered and were able to sit upright to ensure there were no adverse reactions. Observations at approximately one hour post vaccination were recorded and any other complication observed following vaccination would have been recorded.

The adjuvant composition was previously described above by the example QCDC using Quil A (20 µg), Cholesterol, (20 µg), DDA (10 µg) and Carbopol (0.05%) per dose. Antigen is inactivated whole virus or purified H5 HA protein.

Animals were assessed for injection site reactions and serological response to the vaccine. Three animals (two in T02-inactivated H5N2, and one in T05-saline) were euthanized due to congenital hyperoxaluria before challenge. On study day 49, all surviving cats were challenged via the intratracheal route with strain H5N1 A/Vietnam/1194/04 to evaluate efficacy of the vaccine candidates. Animals were challenged with 5.0 mL of material containing 10⁵ TCID₅₀, which was released just above the bifurcation using a small catheter that was brought into the trachea using a tracheoscope. Animals were observed and sampled for five days after challenge. At the end of the animal phase (study day 54), all surviving animals were euthanized and a necropsy performed on each.

Table 18. Vaccine Groups

Treatment Group	Vaccine	Dose	Route of Administration	Study Day	Animals
T01	Purified recombinant haemagglutinin (HA) protein vaccine (25,600 HA units/dose)	1.0 mL	Subcutaneous	0 and 21	6
T02	Inactivated modified H5N2 virus vaccine (25,600 HA units/dose)	1.0 mL	Subcutaneous	0 and 21	6
T03	Inactivated modified H5N1 virus vaccine (25,600 HA units/dose)	1.0 mL	Subcutaneous	0 and 21	6
T04	Placebo – Adjuvant only	1.0 mL	Subcutaneous	0 and 21	6
T05	Placebo – Saline only	1.0 mL	Subcutaneous	0 and 21	6

Blood samples were collected on study days -14 pre-vaccination, 0, 21 and 49 for serological testing. On study days 49 and 54, blood samples were collected for virological testing. On study day 42, an unscheduled blood sample was taken from all surviving animals to test kidney function on sera before challenge.

Oropharyngeal swabs were collected from all the animals on study days - 14, 49 prior to challenge and 50 through to 54. Rectal swabs were collected from all the animals on study days 49 prior to challenge and days 50 through 54. The collection of the swabs was done just prior to challenge on study day 49.

During necropsy, all lung lobes were aseptically removed, weighed and evaluated grossly for characteristic lesions attributable to FAIV infection. Percentages were used to identify the extent of lung consolidation. The left lung was fixed with 10% neutral-buffered formalin for histopathology. The right lung was collected and sampled for virological testing. In addition to the lungs a kidney sample and any tissues with gross pathology were also sampled and stored in 10% neutral-buffered formalin for histopathology.

Viral titres in blood samples, oropharyngeal and rectal swabs, and in lung tissue samples were determined by means of a H5N1-specific TaqMan PCR. Briefly, RNA was isolated using a MagnaPure LC system with the MagnaPure LC Total nucleic acid isolation kit (Roche Diagnostics; Almere, The Netherlands), and influenza A virus was detected by using a real-time RT-PCR assay. Data were expressed as Control Dilution Units (CDU). CDU's were determined from a standard curve produced from a stock of virus, which was serially diluted, with each dilution undergoing nucleic acid extraction and TaqMan PCR amplification in the same manner as test samples.

RT-PCR positive oropharyngeal swabs and lung tissue samples were also analysed by virus isolation and titration on Madine Darby canine kidney (MDCK) cells. Results were expressed as $\log_{10}$ 50% tissue culture infective doses per millilitre or gram of sample ($\log_{10}$ TCID₅₀/mL or $\log_{10}$ TCID₅₀/g).

Plasma samples were analysed by virus neutralisation and by hemagglutination inhibition. For the hemagglutination inhibition (HI) assay, a virus suspension of influenza strain Vietnam 1194/04 (H5N1, clade 1) or Indonesia 05/2005 (H5N1, clade 2) was incubated with serial (2-fold) dilutions of serum sample pre-treated with cholerafiltrate (obtained from *Vibrio cholerae* cultures). Subsequently, erythrocytes were added to the dilutions and after incubation the maximum dilution of the agents showing complete inhibition of haemagglutination was defined as the titre of HI.

The virus neutralization (VN) assay was based on an endpoint titration of the sera. Briefly, a constant amount of virus was mixed with a serial (2-fold)

dilution of a serum sample. Virus neutralization was read using MDCK cells as indicator cells and was visualized by erythrocyte agglutination. VN titres were scored by taking the highest dilution of serum in which 50% of the inoculated cell cultures showed erythrocyte agglutination.

The left lung was collected at necropsy and fixed with 10% neutral-buffered formalin for histopathology. After fixation, the tissues was embedded in paraffin, tissue sections were prepared and stained with haematoxylin and eosin for histological examination. Description and degree of pathological changes observed were recorded.

Results

None of the animals in the five treatment groups showed any pain or swelling at the injection site following the first and second vaccination. Furthermore, no skin abnormalities were recorded at the injection sites. Following vaccinations and before challenge, there were no significant differences at the 0.1 significance level in body temperatures between treatments by linear mixed model analysis. One T01 animal was febrile ($\geq 40^{\circ}\text{C}$) before the first vaccination on Day 0 and for several days after. Sporadic body temperature increases in individual animals to 40°C or above were recorded after vaccinations (Days 0 and 21). No abnormal health related to vaccination was observed during the study. Three animals (two in T02- H5N2, and one in T05-saline) were euthanized due to congenital hyperoxaluria before challenge. Several animals from all treatments presented with wound complications following the implantation of the temperature recorder. No concurrent treatments were administered from day 0 until study completion.

Vaccinated T01, T02 and T03 animals showed less clinical signs and no mortality after challenge compared to control T04 and T05 animals. In T01, one animal showed depression and increased respiratory effort two days after challenge. None of the remaining five T01 animals showed any abnormal health after challenge. In T02 (n=4) and T03 (n=6), all animals remained healthy following challenge. In T04 (n=6) the first abnormal clinical signs (depression and increased respiratory effort) were seen in two animals two days after challenge. Three days after challenge, all six animals in T04 were depressed and showed an increase in respiratory effort. Consequently two animals had to be euthanized for welfare reasons. Four days after challenge (Day 53), one animal was found dead

and the remaining three T04 animals exhibited depression, increased respiratory effort, third eyelid protrusion and nasal discharge, and were euthanized for welfare reasons. In T05 (n=5), the first abnormal clinical signs of depression and increased respiratory effort were seen in one animal one day after challenge. Two days after challenge, two more animals started to show those signs. Three days after challenge, one animal was found dead and the remaining four animals exhibited depression, increased respiratory effort and third eyelid protrusion. One animal was subsequently euthanized for welfare reasons. Four days after challenge, the respiratory effort had worsened in one of the three remaining animals and another animal additionally showed nasal discharge. All three remaining animals were euthanized for welfare reasons four days after challenge (Day 53).

Following challenge, mean body temperatures remained below 40.0° C in vaccinated animals (T01, T02, and T03). Mean temperatures of control animals (T04 and T05) rose $\geq 40.0^{\circ}$ C starting one day after challenge. Differences in mean body temperatures between treatments were significant ($p=0.0001$) by linear mixed model analysis. Individual animal data showed that in a minority of T01, T02 and T03 animals, body temperatures rose to 40.0° C and above at sporadic time points on Day 53. In T01, two animals were febrile (range 40.0 to 40.1 ° C) at one time point. In T02, two animals were febrile (range 40.0 to 40.3° C) at one and three time points, respectively. In T03, one animal was febrile (range 40.0 to 40.3° C) at three time points. In T04 and T05 all animals were febrile for at least twelve hours between Days 50 to 51.

HI antibody titres to influenza strains Vietnam 1194/04 (H5N1, clade 1) and Indonesia 05/2005 (H5N1, clade 2) were determined before the first and second vaccination and before challenge. The lower limit of detection was 5. Prior to vaccination, the titers in all 5 treatment groups were below the lower limit of 5. Following vaccination all vaccinated (T01, T02, and T03) animals developed HI antibody titres above 5 and showed at least a six-fold increase in titres compared to pre-vaccination values. In T01 and T03, titres against Vietnam 1194/04 ranged from 20 to 160 following the first vaccination, and 140 to 960 following the second vaccination. In T02, titres against Vietnam 1194/04 were lower than those seen in T01 and T03, ranging from 5 to 30 following the first vaccination, and 5 to 70

following the second vaccination. HI antibody titres against Indonesia 05/2005 were similar to those against Vietnam 1194/04.

Plasma samples taken before and after challenge were tested by H5N1-specific real time RT-PCR for viral load. All animals had virus negative samples before challenge. After challenge, no virus was detected in the plasma of T01 and T03 animals. In contrast, 25% (1 of 4) of T02 animals, 67% (4 of 6) of T04 animals and 60% (3 of 5) of T05 animals were virus positive in plasma after challenge. Differences between treatments were significant ($p=0.0247$) by linear mixed model analysis.

Virus shedding after challenge was assessed in throat swab samples by real time RT-PCR and virus titration, and in rectal swab samples by real time RT-PCR. No viral shedding from the throat was detected in T01 animals after challenge. In T02, all four animals (100%) shed virus at one point after challenge. In T03, in total two of six animals (33%) shed virus after challenge. In T04, three of six animals (50%) shed virus after challenge. In T05, four of five animals (80%) shed virus after challenge. No samples were taken from T04 and T05 animals five days after challenge, since all animals were deceased by then. For the purpose of statistical analysis, however, animals that died or were euthanized before the last day of study had their last test results carried forward to the last day of study.

Throat samples with a RT-PCR positive result (≥ 1.8 CDU) were also used in virus titration assays. Virus titration confirmed that all RT-PCR positive samples contained infectious influenza virus (data not shown). Infectious virus titres were lower in vaccinated animals (T02 and T03) than control animals (T04 and T05). These differences were significant three days after challenge when comparing T02 or T03 with T04, and three, four and five days after challenge when comparing T02 or T03 with T05. Titres in T02 and T03 animals were $0.5 \log_{10}$ TCID₅₀. Titres seen in T04 ranged from 2.3 to $4.3 \log_{10}$ TCID₅₀. Titres seen in T05 ranged from 1.5 to $3.8 \log_{10}$ TCID₅₀.

Shedding in feces as assessed by rectal swabs was detected in all treatment groups except T02 three or four days post challenge. Virus quantities detected by RT-PCR were between 2.2 to $2.3 \log_{10}$ CDU in T01, $3.2 \log_{10}$ CDU in T03, 2.0 to $2.7 \log_{10}$ CDU in T04, and $2.2 \log_{10}$ CDU in T05. There were no significant differences at the 0.1 significance level between treatments on any of the days after challenge.

Lung pathology was less severe in vaccinated (T01, T02, and T03) than in control animals (T04 and T05). All vaccinated animals presented with a mild, multifocal, subacute bronchointerstitial pneumonia. Control animals showed either a moderate (two T04 animals and one T05 animal) or severe (four T04 and four T05 animals), subacute bronchointerstitial pneumonia with a multifocal distribution in all except two control animals who (one T04 and one T05 animal) showed a diffuse distribution. Whole lung was assessed for the extent of consolidation, which was expressed in percentage consolidation of total lung tissue. In agreement with the lung pathology findings, percentage consolidation was significantly lower in vaccinated animals (T01, T02, and T03) than in control animals (T04 and T05).

Viral load in lung tissue collected at the time of death or euthanasia was assessed by virus titration and H5N1 RT-PCR. Lung tissue from vaccinated animals (T01, T02 and T03) had significantly lower mean virus titres than those from controls (T04 and T05). There were no significant differences between mean titres in lung tissue from vaccinated animals (T01, T02 and T03). Analysis by RT-PCR yielded the same results.

Following challenge with a highly pathogenic H5N1 avian influenza strain, clinical signs including fever, mortalities, viraemia, viral shedding from throat and in feces, viral infection of the lung and lung pathology, including consolidation, were observed in control animals which had received either adjuvant (T04) or saline (T05).

Vaccination with purified H5 HA protein (T01) prevented viraemia, viral shedding from the throat, and mortality in six young cats following challenge with a highly pathogenic H5N1 avian influenza strain. Furthermore, vaccination with purified H5 HA protein (T01) reduced clinical signs, including fever, viral load in lung and lung pathology, including consolidation.

Vaccination with an inactivated H5N2 strain (T02) prevented clinical signs, viral shedding in feces, and mortality in four young cats following challenge with a highly pathogenic H5N1 avian influenza strain. Furthermore, vaccination with the inactivated H5N2 strain (T02) reduced viraemia, fever, viral shedding from the throat, viral load in lung and lung pathology, including consolidation.

Vaccination with an inactivated H5N1 strain (T03) prevented clinical signs, viraemia and mortality in six young cats following challenge with a highly

pathogenic H5N1 avian influenza strain. Furthermore, vaccination with the inactivated H5N1 strain (T03) reduced fever, viral shedding from the throat, viral load in lung and lung pathology, including consolidation.

Summary

No injection site reactions were observed with the vaccines formulated with either inactivated or purified HA antigen with QC/DC adjuvant. The vaccines provided a complete protection of clinical disease and mortality in vaccinated cats, significantly reduced virus load in blood and tissues, and significantly reduced virus shedding.

Example 21. Cancer

Background

This study was conducted in immunodeficient and immunocompetent rats using human and rat hepatocellular carcinoma cells to generate heterotopic and orthotopic models.

Animals

Nude (CrI: NIH-rnu) male rats 6-8 weeks old were purchased from Charles River (Wilmington MA). The rats were pair housed in polycarbonate micro-isolator cages and provided *ad libitum* reverse osmosis water and irradiated standard rat chow; all water and bedding was autoclaved. Body weights were recorded twice weekly; animals were maintained for approximately 7 weeks and euthanized by CO₂ inhalation at the end of the experiment.

The experimental design incorporated two phases. In phase I, rats were randomized to two groups based on their body weight. Rats in group 1 received no tumor cell injection, while rats in group 2 received subcutaneous injection of tumor cells. At three weeks following tumor injection, rats in group 2 were randomized (based on tumor size and take-rate – see Table 19) to two groups for Phase II, one of which included two subgroups: 1) non-tumor bearing controls which received saline (the Control Group); 2) tumor bearing controls treated with adjuvant only (the Tumor Group); and 3) tumor bearing subjects (Tumor Treated) dosed with vaccine (two subcutaneous injections two weeks apart). All animals were necropsied at 14 days post the second vaccine administration.

Vaccine

Vaccine was administered by subcutaneous injection at 0.2 ml per dose.

Table 19. Vaccine groups

Treatment Group	Description	Number of Animals	Tumor Cell Types (antigen)	Formulation	# of Vaccinations	Dose/route
Control NonTumor	Negative Control (saline)	5	NA	0.63% PBS placebo	2	0.2 ml/SC
Tumor (vehicle)	Vehicle with no antigen	5	QCDC	0.63% PBS placebo	2	0.2 ml/SC
Tumor (treated)	Homogenized liquid dose - vehicle plus HepG2	5	QCDCR and 100 ug inactivated antigen	0.63% PBS placebo	2	0.2 ml/SC

QC is the abbreviation for QuilA/cholesterol, D for DDA, C for Carbopol®, R for Bay R1005®, PBS for phosphate buffered saline

Vaccine Preparation

Vaccines were prepared using Quil-A (20 ug/dose), Cholesterol (20 ug/dose), DDA (10 ug/dose), Carbopol (0.05%) with or without glycolipid Bay R1005® (1,000 ug/dose) and antigen. The composition was blended using a homogenizer and added in the order of addition as stated above.

Antigen Preparation

HepG2 cells (clone HB-8065) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). HepG2 is a perpetual cell line which was derived from the liver tissue of a 15 year old Caucasian male with a well differentiated hepatocellular carcinoma. Cells were expanded under standard cell culture conditions, and prepared for injection at a concentration of 1 x 10⁷ cells/ml in Matrigel. Each rat was injected with 0.5 ml of cell suspension, subcutaneously at the site of the second teat.

Measurements

Tumor size was measured twice weekly throughout the study by the caliper method where volume in cm³ = {[W(mm) x W(mm)]/2 x L(mm)}/1000. Blood was collected by retro-orbital bleed for serum chemistry and biomarker measurements. Animals were lightly anesthetized during the bleed procedure with CO₂/O₂. Chemistry endpoints were analyzed using a Hitachi 917 auto analyzer (Roche, Indianapolis, IN). Terminal blood was taken under CO₂ anesthesia by cardiac puncture. Serum endpoints were evaluated using commercial ELISA assays: Alpha-Feto Protein (R & D Systems, Minneapolis MN) and Human Albumin

(Bethyl Laboratories, Montgomery TX). Animals were euthanized by CO₂ inhalation. Tumors were excised, weighed and placed in formalin for histology.

Student's unpaired T-test was used to compare various parameters between treated and control group rats. All values are expressed as mean $\pm$ SD, and a p value <0.05 was considered to be statistically significant

Results

Measurements of body weight were corrected by subtracting tumor weight (based on volume data and the assumption that 1 cm³ = 1 g). Data were analyzed two ways: by treatment group, and by tumor or non-tumor bearing animals. When comparing bodyweights in tumor bearing animals to non-tumor bearing animals, there was a significant difference between the groups at the terminal time point; there was no difference at baseline. Even though body weights were not significantly different when comparing by treatment group probably due to short study duration, there was an appreciable trend towards decreased body weight in both tumor bearing groups relative to controls and a positive trend towards recovery in animals receiving vaccine when comparing the tumor bearing animals receiving vehicle with no antigen (Table 20). Also, there was also a reasonable correlation between percent change in bodyweight over the duration of the experiment and tumor volume ($r^2 = 0.72$) or weight (excised) at termination ($r^2 = 0.73$).

Table 20. Change in body weight over time between experimental groups.
Shaded areas indicates dates when vaccine was administered.

	Body weight (g)		
Day	Control	Tumor	Tumor Treated
0	242.7 ± 11.4	260.0 ± 16.3	245.0 ± 12.1
6	263.9 ± 13.5	278.1 ± 17.5	258.6 ± 14.6
9	270.1 ± 14.0	280.6 ± 19.2	260.1 ± 15.1
13	280.6 ± 16.2	290.3 ± 20.2	262.0 ± 15.1
16	283.8 ± 15.0	289.0 ± 18.5	261.1 ± 15.3
20	292.6 ± 16.1	284.1 ± 17.3	259.2 ± 14.6
23	299.8 ± 15.6	283.2 ± 17.0	252.7 ± 14.2
27	298.7± 14.0	276.1 ± 15.5	259.4 ± 14.4
30	307.6 ± 15.9	274.2 ± 3.4	260.9 ± 14.5
34	317.8 ± 16.2	262.6 ± 14.6	267.8 ± 15.1
37	318.1 ± 16.6	263.1 ± 15.0	268.4 ± 14.8
41	323.4 ± 15.3	264.4 ± 14.7	274.9 ± 15.2
44	328.5 ± 16.6	262.5 ± 14.6	278.3 ± 15.1
48	331.2 ± 17.0	263.0 ± 14.1	281.6 ± 15.0
49	330.5 ± 17.1	262.6 ± 14.4	281.2 ± 14.3

Tumor size

Tumor size in control rats was compared to tumor size in vaccine treated rats over a four week period. Although no statistically significant differences were found between compared groups (due to large variation in tumor size), there was a strong trend toward decreasing total tumor volume (Table 21), and also decreased mean excised tumor weight (Table 22) in rats that received the vaccine.

Table 21. Change in tumor size between vehicle treated group (Tumor) and group treated with vaccine (Tumor treated). Shaded areas indicates dates when vaccine was administered.

Day	Tumor Size (cm ³)	
	Tumor	Tumor Treated
6	4.6 ± 2.1	4.7 ± 2.0
9	4.9 ± 2.0	4.8 ± 1.8
13	4.6 ± 1.8	5.0 ± 2.2
16	12.2 ± 2.7	12.3 ± 2.5
20	22.6 ± 3.8	13.4 ± 2.6
23	33.3 ± 4.8	14.1 ± 2.8
27	34.5 ± 4.6	13.8 ± 2.8
30	35.6 ± 4.6	13.5 ± 3.4
34	37.7 ± 8.0	14.1 ± 2.9
37	38.6 ± 10.2	13.7 ± 2.3
41	44.5 ± 12.1	12.5 ± 2.1
44	52.9 ± 13.9	13.0 ± 2.1
48	61.7 ± 15.1	16.9 ± 2.9

Table 22. Difference in tumor weight at necropsy.

	Experimental Group	
	Tumor	Tumor Treated
Tumor weight (g)	5.14 ± 6.08	1.24 ± 2.21



Serum Assays

Human alpha-feto protein (AFP) was measured by ELISA at various time-points during the study. These data were used in conjunction with body weight and tumor size data to randomize animals to treatment groups. Data from this study and historical data indicate that AFP is only detectable in tumor bearing animals. Comparison of longitudinal AFP data in the tumor control and treated groups indicates that AFP was decreased in the treated animals following first vaccine injection, and was much lower in treated rats relative to tumor bearing controls at the end of study; 4.78 ± 3.2 ng/ml in vehicle treated relative to 0.97 ± 2.5 ng/ml in vaccine treated rats, respectively. Additionally, AFP demonstrated a correlation to both tumor volume and excised tumor weight.

Human albumin (hALB) was measured by ELISA at various time-points during the study. Data from this study and historical data indicate that hALB is only detectable in tumor bearing animals. Comparison of hALB data in the tumor control and treated groups indicates that hALB was lower in treated rats relative to tumor bearing controls at the end of study (data not shown). Additionally, hALB, similar to AFP, demonstrated a correlation to both tumor volume and excised tumor weight (data not shown).

A core serum chemistry panel was assayed at various time-points throughout the study. The panel included: AST, ALT, Cholesterol, alkaline phosphatase, GGT, BUN, glucose, creatinine, total bilirubin, total protein, albumin, globulin and minerals Ca, P, Na, K and Cl. Similar to body weight, data was analyzed two ways: by treatment group and by tumor or non-tumor bearing animals. The only endpoints where differences were observed were: AST, ALT and cholesterol. By both comparisons, there were no significant differences among groups at the baseline time-point (data not shown). When comparing the chemistry indices in tumor bearing animals to non-tumor bearing animals, there was a significant difference between the groups at the terminal time point with elevations in AST, ALT and cholesterol in the tumor bearing animals (data not shown).

Conclusion

Taken together our data demonstrate that tumor burden was reduced in animals treated with vaccine prepared against the HepG2 tumor cell line, relative to control tumor-bearing group receiving vehicle.

Example 22. CpG**Background**

The adjuvants described herein are a potent vaccine adjuvant platform that can be enhanced by using an ORN/ODN (CpG) to boost the immune response by using the adjuvants as a delivery system for the CpG.

Materials and Methods

Female C57Bl/6 mice (n=10 per group) with a body weight of about 18-20g were used in the study. They were immunized via intramuscular (IM) injection into the left tibialis anterior muscle with a total volume of 50µl on study days 0, 14 and 21.

Reagent dose

A dose of the composition comprised, in various combinations, one or more of the following components:

Buffer: NaH₂PO₄·2H₂O (229.32 mg/L), NaCl (1168.00 mg/L) and Na₂HPO₄ (1144.00 mg/L), dissolved in WFI and sterile filtered with a 0.1 µm filter.

Ovalbumin (OVA - Antigen): 10µg

CpG ODN: 10µg

Cholesterol: 1µg

Quil A: 1 µg

DDA: 0.5 µg

Carbopol: 0.0375%

R1005: 50 µg

Vaccine Preparation

Buffer was placed in a 50ml flask with stir bar and stirred at a constant speed throughout all following steps. The components were added in the following order: Antigen (OVA); CPG ODN; Quil A; cholesterol (drop wise); DDA (drop wise); Carbopol®; and Bay R1005®. The composition was stirred at room temperature (approximately 25° C) for a minimum of 30 minutes while protected from light by covering with foil. The solution was forced through a 25G needle into a syringe to break any large floating particles to obtain a uniform (cloudy) suspension and transferred to sterile glass vials for storage.

Sample collection

The following samples were collected:

Plasma: 4 weeks after the prime vaccination (1 week after second booster vaccination)

Cytotoxic T lymphocyte (CTL) (6 weeks after the prime vaccination (3 weeks after second booster vaccination)

Cytokine secretion in supernatant (4 weeks after the prime vaccination
24-hour supernatant (IL-2, IL-4, IL-10, TNF

72-hour supernatant (IFN-g

Tetramer (4 weeks after the prime vaccination

Cytokine producing T cells (6 weeks after the prime vaccination

The results are provided as a relative score that for each adjuvant showing the effect of the adjuvant. The endpoints are a relative scale based on the sum of the individual Cytotoxic T - Lymphocyte responses.

Results and Discussion

As presented in Table 23, QCDCR plus OVA gave stronger CTL responses than its subcomponents, however overall responses were low (<20%). Combining QCDCR or its subcomponents with CPG significantly improved OVA-specific CTL responses. Overall QCDCR/CPG plus OVA gave the highest CTL response, however, there was no significant difference in responses between this group and cholesterol/CPG plus OVA (at 25:1 ratio). Culture supernatants from splenocytes stimulated with OVA (1 mg/ml) were assayed for cytokines by ELISA. QCDCR alone or its subcomponents gave only very weak cytokine responses. Combining QCDCR or its subcomponents with CPG enhanced secretion of antigen specific IL-2 and IFN-g (Th1-biased cytokines). QCDCR and CpG are equal in potency for augmenting cellular immune responses. Combining the two shows synergy. When sub-components of QCDCR were analyzed with CpG, combinations with Quil A gave the best responses followed by inclusion of cholesterol with CpG.

Table 23. Relative CTL Responses

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

QC is the abbreviation for QuilA/cholesterol, Ch for cholesterol, D for DDA, C for Carbopol®, R for Bay R1005®

Example 23. Canine Coronavirus (CCV)

Scope

A murine model was employed using canine coronavirus (CCV) and novel combination adjuvants to evaluate the adjuvant performance with the given antigenic component.

Animals

Ten CF-1 mice per treatment group were administered 0.2 mL subcutaneously per animal of each treatment group.

Treatment Groups

The test formulations shown in Table 24 were prepared as 1.0 mL field dose volumes with the concentrations given below. Only 0.2 mL of the vaccine was administered to each mouse.

91

Table 24. Test Formulations.

Item #	Test Formulations	Adj. Concentration: µg / 2mL (except Carbopol)	CCV /dose
1	PBS	NA	na
2	Antigen	PBS	6,040
3	AbISCO-100	100	6,040
4	AbISCO-200	100	6,040
5	AbISCO-300	100	6,040
6	Quil-A / Cholesterol	100/100	6,040
7	R1005	1000	6,040
8	R1005 / Carbopol	1000 / 0.075%	12,079
9	DDA / R1005/ Carbopol	50 /1000/ 0.075%	12,079
10	Quil-A / Cholesterol/R1005	100/100/1000	6,040
11	Quil-A / Cholesterol/DDA Carbopol	100/100/50/0.075 %	6,040
12	Quil-A / Cholesterol / R1005 / Carbopol	100 / 100 / 1000 / 0.075%	12,079
13	Quil-A / Cholesterol / DDA / R1005 / Carbopol	100/100/50/1000/0.075%	12,079

Vaccine Preparation

Vaccine preparation for the adjuvants of the invention is described in Examples 1-13 above. The concentrations of adjuvant components are provided in Table 24. Adjuvants were added in the order listed in the Table.

A saline extender was added to a vessel and homogenization was initiated. Inactivated CCV was added to a concentration shown in Table 24. Quil A was added at the concentration listed in Table 24. The cholesterol in ethanol solution was then added with continued homogenization. The DDA/ethanol solution was then added during homogenization. The mixture was microfluidized at 10,000 psi. Carbopol was then added with mixing and the pH was adjusted to 6.8 to 7.2. Bay R1005® glycolipid was then added with mixing. Finally, the composition was brought to final volume with the saline extender.

The vaccine for the treatment groups receiving the commercially available AbISCO products (Isconova, Sweden) was prepared according to the label instructions. AbISCO products are based on quillaja saponins and ISCOM technology using highly purified saponins.

Assay Method: The beta CCV Serum neutralization

The serum was heat inactivated at 56C for 30 to 40 minutes. In a clean sterile plate, serial dilutions of each sera (undiluted, 2, 4, 8...) was performed by passing 120 µl into 120 µl diluent. At least two replicate wells / dilution were used. A dilution of 1:16 was used initially, if necessary. A working challenge stock was prepared by diluting live CCV to a level containing about 240 virus particles in 120 µl. Then, 120 µl of each serum dilution was combined with 120 µl of virus solution for a total of 240 µl. The solution was mixed and held at room temperature (approximately 25°) for 30 to 60 minutes to allow for neutralization. Then 120 µl of each serial was transferred onto waiting naked monolayers of NLFK cells planted 7 to 12 days earlier. CPE was assessed 4 to 6 days later. The back titration confirmed that 50 to 316 virus particles hit each monolayer.

Results**Table 25. Serum Neutralization**

Treatment Group	Serum Neutralizing Titers
Saline	2
Antigen only	64
AbISCO-100	256
AbISCO-200	23
AbISCO-300	11
Quil-A / Cholesterol	315
R	512
RC	11
DRC	630
QCR	1024
QCDC	630
QCRC	724
QCDRC	1448

Summary

The combined effects of the adjuvants formulated with CCV taking into account the chemical properties of each component have provided excellent properties for a vaccine adjuvant.

The serological results of the study are shown in Table 25. Higher serum neutralizing antibody titers generally are associated with better protection afforded by the vaccines. Several of the adjuvant formulations of the invention produced

52

much higher titers than the commercial adjuvanted products, even though these formulations had a similar amount of CCV antigen added. The QCDC, QCR, DRC, QCRC, and QCDRC formulations were especially effective in inducing a good immune response in the mice.

Example 24. Bovine Rotavirus Antigen

Scope

A murine model was employed using Bovine Rotavirus and combination adjuvants of the invention to evaluate the adjuvant performance with the given antigenic component.

Animals

Ten CF-1 mice per treatment group were administered 0.2 mL subcutaneously per animal for each treatment group.

Treatment Groups

The test formulations shown in Table 26 were prepared as 2.0 mL field dose volumes with the concentrations given below. Only 0.2 mL of the vaccine was administered to each animal.

Table 26. Test Formulations

Item #	Test Formulations	Adj. concentration: µg / 2mL (except Carbopol)	Rotavirus B223 /dose
1	Phosphate buffer	PBS	NA
2	Antigen	PBS	6.09 µg
3	AbISCO-100	100	6.09 µg
4	AbISCO-200	100	6.09 µg
5	AbISCO-300	100	6.09 µg
6	Quil-A / Cholesterol	100/100	6.09 µg
7	Quil-A / Cholesterol/DDA Carbopol	100/100/50 /0.075 %	6.09 µg
8	R1005	1000	6.09 µg
9	Quil-A / Cholesterol/R1005	100/100/1000	6.09 µg
10	Quil-A / Cholesterol/DDA / R1005/Carbopol	100/100/50/1000 /0.075%	6.09 µg
11	Quil-A / Cholesterol / DDA / Carbopol	100 / 100 / 50 /0.075%	12.18 µg
12	Quil-A/Cholesterol/Carbopol/R1005	100/100/0.075%/1000	12.18 µg
13	Quil-A / Cholesterol / DDA / R1005 / Carbopol	100 / 100 / 50 / 1000 / 0.075%	12.18 µg
14	DDA / R1005 / Carbopol	50/1000/0.075%	12.18 µg
15	R1005/Carbopol	1000/0.075%	12.18 µg

Vaccine preparation

Vaccine preparation for the adjuvants of the invention is described in Examples 1-13 above. The concentrations of adjuvant components are provided in Table 26. Adjuvants were added in the order listed in the Table.

A saline extender was added to a vessel and homogenization was initiated. Inactivated Bovine Rotavirus was added to a concentration shown in Table 26. Quil A was added at the concentration listed in Table 26. The cholesterol/ethanol solution was then added with continued homogenization. The DDA/ethanol solution was then added during homogenization. The mixture was microfluidized at 10,000 psi. Carbopol® was then added with mixing and the pH was adjusted to 6.8 to 7.2. Bay R1005® glycolipid was then added with mixing. Finally, the composition was brought to final volume with the saline extender.

The vaccine for the treatment groups receiving the commercially available AbISCO products (Isconova, Sweden) was prepared according to the label



instructions. AbISCO products are based on quillaja saponins and ISCOM technology using highly purified saponins.

Results

Table 27. Serum NeutralizationTiters

Test Formulations	Serum Neutralizing Titers (SN)
Saline	< 3
Antigen only	23
AbISCO-100	16
AbISCO-200	16
AbISCO-300	14
Quil-A / Cholesterol	14
QCDC	16
R	10
QCR	16
QCDCR	16
QCDC	3
QCCR	5
QCDCR	39
DRC	20
RC	3

QC is the abbreviation for QuilA/cholesterol, D for DDA, C for Carbopol®, R for Bay R1005®

The combined effects of the adjuvants formulated with Bovine Rotavirus and taking into account the chemical properties of each component have provided excellent properties for a vaccine adjuvant (see Table 27).

While several of the adjuvant formulations provided similar levels of serum neutralizing antibody titers, the QCDCR adjuvant provided the highest level.

Example 25. Canine Influenza Virus

Scope/Study Design

A canine model was employed using canine influenza virus (CIV) and novel combination adjuvants to evaluate the adjuvant performance with the given antigenic component.

This study had a randomized complete block design. (see Table 28)
Animals were sorted by date of birth to form blocks of size 5. Within a block animals were randomly assigned to treatments. Animals in the same block were

randomly assigned to pens (cages) located near each other. Animals were in good health with no history of hypersensitivity to commercially available vaccines. Animals had not received vaccines against CIV.

Table 28. Study Design

Trmt Group	# of Animals	Treatment	Day	Dose	Route
T01	8-10	Adjuvant Placebo (neg control)	0	1 mL	SQ
T02	8-10	Field Safety study formulation (pos control)	0	1 mL	SQ
T03	8-10	QCDC high dose	0	1 mL	SQ
T04	8-10	QCDC medium dose	0	1 mL	SQ
T05	8-10	QCDC low dose	0	1 mL	SQ

QC is the abbreviation for QuilA/cholesterol, D for DDA, C for Carbopol®

Table 29. Vaccine Composition

T01	Adjuvant placebo, negative control
Formulation	Quil A – cholesterol – DDA – carbopol (20/20/10/.075)
T02	
Generic Name	CIV field safety serial, positive control
Formulation	Iowa- 05 strain of influenza (H3N8) @ 760 HA, combined with 5% Rehydrigel LV
T03	
Generic Name	CIV + high dose QCDC
Formulation	Iowa- 05 strain of influenza (H3N8) @ 760 HA, combined with Quil A – cholesterol – DDA – carbopol (20/20/10/.075)
T04	
Generic Name	CIV + medium dose QCDC
Formulation	Iowa- 05 strain of influenza (H3N8) @ 760 HA, combined with Quil A – cholesterol – DDA – carbopol (10/10/10/.075)
T05	
Generic Name	CIV + low dose QCDC
Formulation	Iowa- 05 strain of influenza (H3N8) @ 760 HA, combined with Quil A – cholesterol – DDA – carbopol (5/5/10/.075)

Vaccine preparation

Vaccine preparation for the adjuvants of the invention is described in Examples 1-13 above. The concentrations of adjuvant components are provided in Table 29. Adjuvants were added in the order listed in the Table.

A saline extender was added to a vessel and homogenization was initiated. Inactivated canine influenza virus was added to a concentration shown in Table 29. Quil A was added at the concentration listed in Table 29. The

5A

cholesterol/ethanol solution was then added with continued homogenization. The DDA/ethanol solution was then added during homogenization. The mixture was microfluidized at 10,000 psi. Carbopol was then added with mixing and the pH was adjusted to 6.8 to 7.2. Finally, the composition was brought to final volume with the saline extender.

Testing

Serology was assessed by using hemeagglutination inhibition (HAI) assay by Standard Assay Method per the USDA

Results/ Summary

Presented in Table 30 are THE serological results on days 42 and 180 of the HAI Geo. mean titers.

Table 30. HAI Titers

Treatment	HAI Geo. Mean Day 42	HAI Geo. Mean Day 180
T01 (placebo)	8	8
T02 (pos ctl., alum)	172	32
T03 (low dose)	65	41
T04 (med. dose)	65	32
T05 (high dose)	216	69

The combined effects of the adjuvants formulated with influenza virus and taking into account the chemical properties of each component have provided excellent properties for a vaccine adjuvant.

Higher antibody titers generally are associated with better protection of vaccines. Generally, both the aluminum adjuvant (T02) and the adjuvants of the invention (T03, T04, and T05) caused a rise in HAI titers but the response caused by the adjuvants of the invention was superior with higher titers at day 180 in the high dose group (T05). The titers for the low-and medium-doses of the adjuvants of the invention were equivalent to those of the traditional aluminum-containing vaccine for influenza. Additionally, because the adjuvants of the invention provide a T helper 1 immune response whereas aluminum does not, the duration of immunity is expected to be longer with a faster recall mechanism.

SEQUENCE LISTING

<110> Dominowski, Paul J.
Mannan, Ramasamy M.
Krebs, Richard L.
Thompson, James R.
Childers, Tedd A.
Olsen, Mary K.
Yancey, Jr., Robert J.
Weeratna, Risini
Zhang, Shucheng
Bagi, Cedo M.

<120> NOVEL ADJUVANT COMPOSITIONS

<130> PC33245A

<150> US 61/076,232

<151> 2008-06-27

<150> US 61/214,557

<151> 2009-04-24

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> none

<400> 1

ggtggtgcta agcgtgttat

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> NONE

<400> 2

acctctgtca tctctccaca

20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> NONE



<400> 3
agctgacggt ggacctatta tt 22

<210> 4
<211> 17
<212> DNA
<213> NONE

<400> 4
ggctttgcgc tggattc 17

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> NONE

<400> 5
tgggcatcaa gggctaca 18

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> NONE

<400> 6
tcgggttggt tggatg 18

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> NONE

<400> 7
tctgtcttc tgtctgagt gatg 24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> NONE

<400> 8
agtgattgc ttctgtcttt ggta 24

CLAIMS

What is claimed is:

1. An immunogenic composition comprising an adjuvant formulation and an immunologically effective amount of an antigen component, wherein the adjuvant formulation comprises a saponin, a sterol, a quaternary ammonium compound, and a polymer.
2. The immunogenic composition of claim 1, wherein the saponin is present in an amount of about 1 μg to about 5,000 μg per dose, the sterol is present in an amount of about 1 μg to about 5,000 μg per dose, the quaternary ammonium compound is present in an amount of about 1 μg to about 5,000 μg per dose, and the polymer is present in an amount of about 0.0001% volume to volume (v/v) to about 75% v/v.
3. The immunogenic composition of claim 1, wherein the saponin is Quil A or a purified fraction thereof, the sterol is cholesterol, the quaternary ammonium compound is dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA), and the polymer is polyacrylic acid.
4. The immunogenic composition of claim 1, further comprising a Th2 stimulant.
5. The immunogenic composition of claim 4, wherein the Th2 stimulant is a glycolipid.
6. The immunogenic composition of claim 5, wherein the Th2 stimulant is N-(2-deoxy-2-L-leucylamino- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate.
7. The immunogenic composition of claim 5, wherein the glycolipid is present in an amount of about 0.01 mg to about 10 mg per dose.

8. The immunogenic composition of claim 1, wherein said antigen component comprises an inactivated virus.
9. A method of preparing an immunogenic composition of claim 1 comprising:
 - a) preparing a composition of the antigen component in a buffer;
 - b) adding the saponin to the composition of step a;
 - c) adding the sterol to the composition of step b;
 - d) adding the quaternary ammonium compound to the composition of step c;
 - e) adding the polymer to the composition of step d.
10. The method of claim 9, wherein the saponin is Quil A or a purified fraction thereof, the sterol is cholesterol, the quaternary ammonium compound is DDA, and the polymer is polyacrylic acid.
11. The method of claim 9, further comprising a step of homogenizing the composition of step a and continuing the homogenization during each of steps a to d.
12. The method of claim 11, further comprising a step comprising microfluidizing the composition of step d.
13. The method of claim 9, further comprising a step f) of adding to the composition of step e, a Th2 stimulant.
14. The method of claim 13, wherein the Th2 stimulant is a glycolipid.
15. The method of claim 14, wherein the Th2 stimulant is N- (2-deoxy-2-L-leucylamino- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate.
16. A vaccine composition comprising an adjuvant formulation and a therapeutically effective amount of an antigen component, wherein the adjuvant formulation comprises a saponin, a sterol, a quaternary ammonium compound, and a polymer.

17. The vaccine composition of claim 16, wherein the saponin is present in an amount of about 1 μ g to about 5,000 μ g per dose, the sterol is present in an amount of about 1 μ g to about 5,000 μ g per dose, the quaternary ammonium compound is present in an amount of about 1 μ g to about 5,000 μ g per dose, and the polymer is present in an amount of about 0.0001% v/v to about 75% v/v.
18. The vaccine composition of claim 16, wherein the saponin is Quil A or a purified fraction thereof, the sterol is cholesterol, the quaternary ammonium compound is DDA, and the polymer is polyacrylic acid.
19. The vaccine composition of claim 16, further comprising a Th2 stimulant.
20. The vaccine composition of claim 19, wherein the Th2 stimulant is a glycolipid.
21. The vaccine composition of claim 20, wherein the Th2 stimulant is N- (2-deoxy-2-L-leucylamino- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate.
22. The vaccine composition of claim 20, wherein the glycolipid is present in an amount of about 0.01 mg to about 10 mg per dose.
23. The vaccine composition of claim 16, wherein said antigen component comprises an inactivated virus.
24. A method of preparing a vaccine composition of claim 16 comprising:
- a) preparing a composition of the antigen component in a buffer;
 - b) adding the saponin to the composition of step a;
 - c) adding the sterol to the composition of step b;
 - d) adding the quaternary ammonium compound to the composition of step c;
 - e) adding the polymer to the composition of step d.

57

25. The method of claim 24, wherein the saponin is Quil A or a purified fraction thereof, the sterol is cholesterol, the quaternary ammonium compound is DDA, and the polymer is polyacrylic acid.
26. The method of claim 24, further comprising a step of homogenizing the composition of step a and continuing the homogenization during each of steps a to d.
27. The method of claim 26, further comprising a step comprising microfluidizing the composition of step d.
28. The method of claim 24, further comprising a step f) of adding to the composition of step e, a Th2 stimulant.
29. The method of claim 28, wherein the Th2 stimulant is a glycolipid.
30. The method of claim 28, wherein the Th2 stimulant is N- (2-deoxy-2-L-leucylamino- β -D-glucopyranosyl)-N-octadecyldodecanamide acetate.
31. The immunogenic composition of claim 1, further comprising an oil.
32. The vaccine composition of claim 16, further comprising an oil.
33. The immunogenic composition of any of claims 1 to 8 wherein the antigen component comprises feline leukemia virus.
34. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises feline leukemia virus.
35. A vaccine composition of any of claims 16 to 23, wherein the antigen component comprises feline leukemia virus.
36. The vaccine composition of claim 35, wherein the feline leukemia virus is present in an amount from about 100 ng/mL to about 350,000 ng/mL inclusive.

37. The vaccine composition of claim 1, wherein the antigen component comprises gp70 produced by a FL-74 cell line persistently infected with KT-FeLV-UCD-1 feline leukemia virus strain.

38. A method of treating a feline against infection caused by feline leukemia virus comprising administering to the feline the vaccine composition of claim 35.

39. A use of the vaccine of claim 35 in preparing a medicament for treating a feline against infection caused by feline leukemia virus.

40. An avian coccidiosis vaccine, for *in ovo* administration, which comprises:
(a) an adjuvant that comprises Quil A or a purified fraction thereof including QS21, cholesterol, CARBOPOL, DDA, and R1005; and
(b) a protozoan antigen selected from (1) one or more recombinantly expressed proteins, (2) one or more proteins or other macromolecules isolated from said protozoan by conventional means, and (3) whole cell extracts or preparations from said protozoan.

41. The immunogenic composition of any of claims 1 to 7 and 31, wherein the antigen component comprises an *Escherichia coli* J-5 strain bacterin.

42. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises an *Escherichia coli* J-5 strain bacterin.

43. A vaccine composition of any of claims 16 to 22 and 32, wherein the antigen component comprises an *Escherichia coli* J-5 strain bacterin.

44. A method of treating a bovine against infection caused by *Escherichia coli* comprising administering to the bovine the vaccine composition of claim 43.

45. A use of the vaccine composition of claim 43 in preparing a medicament for treating a bovine against infection caused by *Escherichia coli*.

46. The immunogenic composition of any of claims 1 to 8, wherein the antigen component comprises bovine viral diarrhea virus (BVDV).
47. The immunogenic composition of claim 46, wherein the antigen component comprises BVDV type 1 (BVDV-1) and BVDV type 2 (BVDV-2).
48. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises BVDV.
49. The method of claim 48, wherein the antigen component comprises BVDV-1 and BVDV-2.
50. A vaccine composition of any of claims 16 to 23, wherein the antigen component comprises BVDV.
51. The vaccine composition of claim 50, wherein the antigen component comprises BVDV-1 and BVDV-2.
52. A method of treating a bovine against infection caused by BVDV comprising administering to the bovine the vaccine composition of claim 50 or claim 51.
53. A use of the vaccine composition of claim 50 or claim 51 in preparing a medicament for treating a bovine against infection caused by BVDV.
54. The immunogenic composition of any of claims 1 to 7, wherein the antigen component comprises *Mycoplasma hyopneumonia* (*M. hyopneumonia*).
55. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises *M. hyopneumonia*.
56. A vaccine composition of any of claims 16 to 22, wherein the antigen component comprises *M. hyopneumonia*.

57. A method of treating a swine against infection caused by *M. hyopneumonia* comprising administering to the swine the vaccine composition of claim 56.
58. A use of the vaccine composition of claim 56 in preparing a medicament for treating a swine against infection caused by *M. hyopneumonia*.
59. The immunogenic composition of any of claims 1 to 8, wherein the antigen component comprises feline influenza virus (FIV).
60. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises FIV.
61. A vaccine composition of any of claims 16 to 23, wherein the antigen component comprises FIV.
62. A method of treating a feline against infection caused by FIV comprising administering to the feline the vaccine composition of claim 61.
63. A use of the vaccine composition of claim 61 in preparing a medicament for treating a feline against infection caused by FIV.
64. The immunogenic composition of any of claims 1 to 7, wherein the antigen component comprises a cancer antigen.
65. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises a cancer antigen.
66. A vaccine composition of any of claims 16 to 22, wherein the antigen component comprises a cancer antigen.
67. A method of treating a subject against cancer comprising administering to the subject the vaccine composition of claim 66.

68. A use of the vaccine composition of claim 66 in preparing a medicament for treating a subject against cancer.
69. The immunogenic composition of any of claims 1 to 8, further comprising an ORN/ODN.
70. The immunogenic composition of claim 69, wherein the ORN/ODN is CpG.
71. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, further comprising a step of adding an ORN/ODN to the composition of step a. .
72. The method of claim 71, wherein the ORN/ODN is CpG.
73. A vaccine composition of any of claims 16 to 23, further comprising an ORN/ODN.
74. The vaccine composition of claim 73, wherein the ORN/ODN is CpG.
75. The immunogenic composition of any of claims 1 to 8, wherein the antigen component comprises canine coronavirus (CCV).
76. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises CCV.
77. A vaccine composition of any of claims 16 to 23, wherein the antigen component comprises CCV.
78. A method of treating a canine against infection caused by CCV comprising administering to the canine the vaccine composition of claim 77.
79. A use of the vaccine composition of claim 77 in preparing a medicament for treating a canine against infection caused by CCV.

80. The immunogenic composition of any of claims 1 to 8, wherein the antigen comprises bovine rotavirus.

81. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises bovine rotavirus.

82. A vaccine composition of any of claims 16 to 23, wherein the antigen component comprises bovine rotavirus.

83. A method of treating a bovine against infection caused by bovine rotavirus comprising administering to the bovine the vaccine composition of claim 82.

84. A use of the vaccine composition of claim 82 in preparing a medicament for treating a bovine against infection caused by bovine rotavirus.

85. The immunogenic composition of any of claims 1 to 8, wherein the antigen component comprises canine influenza virus (CIV).

86. The method of any of claims 9 to 15 and any of claims 24 to 30, wherein the antigen component comprises CIV.

87. A vaccine composition of any of claims 16 to 23, wherein the antigen component comprises CIV.

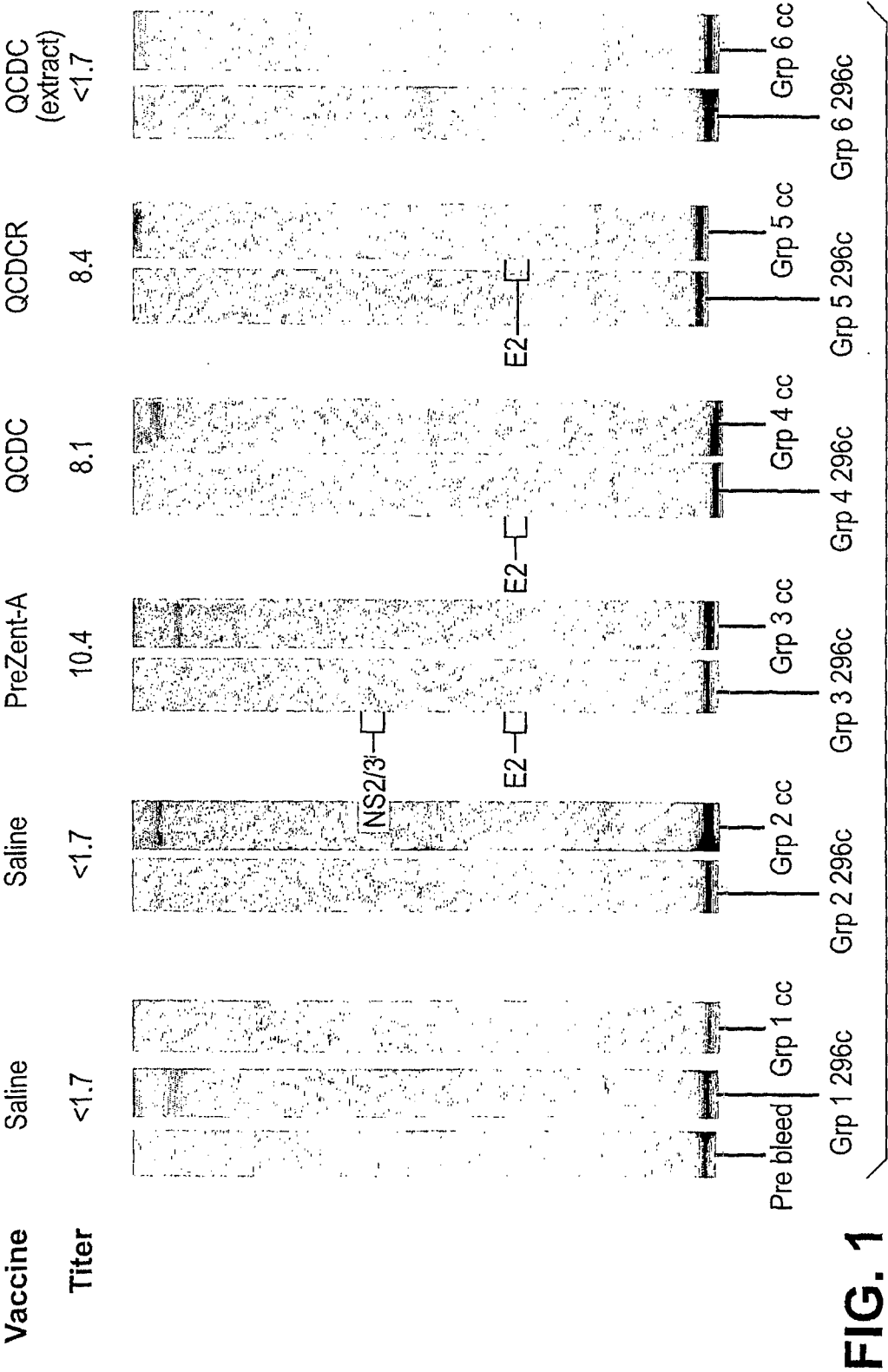
88. A method of treating a canine against infection caused by CIV comprising administering to the canine the vaccine composition of claim 87.

89. A use of the vaccine composition of claim 87 in preparing a medicament for treating a canine against infection caused by CIV.

90. A method of differentiating an animal naturally infected with BVDV from an animal vaccinated with the vaccine composition of either claim 50 or 51, said method comprising obtaining a sample from a test animal, and measuring the levels of E2 protein and NS2/3 proteins in said sample, wherein the absence of

60

NS2/3 proteins indicates that the animal was vaccinated with said vaccine composition.



61

sq1

SEQUENCE LISTING
<110> Dominowski, Paul J.
Mannan, Ramasamy M.
Krebs, Richard L.
Thompson, James R.
Childers, Tedd A.
Olsen, Mary K.
Yancey, Jr., Robert J.
Weeratna, Risini
Zhang, Shucheng
Bagi, Cedo M.
<120> NOVEL ADJUVANT COMPOSITIONS
<130> PC33245A
<150> US 61/076,232
<151> 2008-06-27
<150> US 61/214,557
<151> 2009-04-24
<160> 8
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> none
<400> 1
ggtggtgcta agcgtgttat 20
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> NONE
<400> 2
acctctgtca tctctccaca 20
<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> NONE
PC33245A
Page 90
<400> 3
agctgacggt ggacctatta tt 22
<210> 4
<211> 17
<212> DNA
<213> NONE
<400> 4
ggctttgcgc tggattc 17
<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> NONE
<400> 5
tgggcatcaa gggctaca 18
<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> NONE
<400> 6
tcgggttggt tggatgatg 18
<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> NONE
<400> 7
tctgttcttc tgttctgagt gatg 24

12

sql

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> NONE
<400> 8
agtgatttgc ttctgtcttt ggta 24

COMPOSICIONES ADYUVANTES NOVEDOSAS

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere de forma general a formulaciones adyuvantes novedosas para potenciar la respuesta inmunitaria a antígenos para usar en composiciones inmunogénicas y de vacunas, sin producir efectos secundarios tóxicos o indeseables en el sujeto. Esta invención también se refiere a procedimientos de
10 preparación y uso de las composiciones adyuvantes, inmunogénicas y de vacunas.

Antecedentes y descripción de la técnica relacionada

Las infecciones bacterianas, víricas y parasitarias están muy extendidas entre los seres humanos y los animales. Las enfermedades provocadas por estos agentes infecciosos a menudo son resistentes al tratamiento farmacéutico antimicrobiano, no
15 dejando así ningún medio eficaz de tratamiento. En consecuencia, cada vez se usa más una estrategia de vacunación para controlar la enfermedad infecciosa. Puede prepararse un patógeno infeccioso entero adecuado para usar en una formulación de vacuna después de inactivar químicamente o de una manipulación genética apropiada. De forma alternativa, puede expresarse una subunidad proteínica del patógeno en un
20 sistema de expresión recombinante y purificarse para usar en una formulación de vacuna. Puede hacerse que las vacunas sean más eficaces incluyendo un adyuvante apropiado en la composición.

También hay cada vez un mayor interés en el uso de una estrategia de vacunación para tratar el cáncer en los animales y en los seres humanos. Esta
25 estrategia terapéutica al tratamiento del cáncer supone vacunar a los pacientes de

cáncer con una vacuna que comprende un antígeno específico de tumor y un adyuvante. Sin embargo, ninguna de las muchas vacunas contra el cáncer de esta naturaleza que se están desarrollando ha sido autorizada por las autoridades reguladoras. No se ha demostrado que las vacunas reduzcan los tumores, una medida
5 estándar de la eficacia de los fármacos contra el cáncer.

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

Deben considerarse muchos factores en la selección de un adyuvante. Un adyuvante debería provocar una relativamente lenta velocidad de liberación y de absorción del antígeno de forma eficaz con efectos indeseables mínimos de toxicidad,
25 alergias, irritaciones y otros efectos indeseables en el huésped. Para que sea

GA

deseable, un adyuvante debería no ser viricida, ser biodegradable, ser capaz de crear de forma consistente un nivel de inmunidad alto, ser capaz de estimular una protección cruzada, ser compatible con antígenos múltiples, ser eficaz con múltiples especies, no ser tóxico y ser seguro para el huésped (por ejemplo, no provocar reacciones en el

5 sitio de la inyección). Otras características deseables de un adyuvante son que pueda dosificarse en microdosis, consiga ahorrar dosis, tenga una excelente estabilidad en depósito, pueda secarse, pueda prepararse sin aceite, pueda existir en forma sólida o líquida, sea isotónico, pueda fabricarse fácilmente y sea barato de producir. Finalmente, es muy deseable que un adyuvante pueda configurarse de forma que

10 induzca una respuesta inmunitaria humoral o celular o ambas, dependiendo de las necesidades de la situación de vacunación. Sin embargo, el número de adyuvantes que cumplen los requisitos anteriores es limitado.

La elección de un adyuvante depende de las necesidades de la vacuna, ya sea aumentar la magnitud o la función de la respuesta de anticuerpos, un aumento en la

15 respuesta inmunitaria mediada por células, una inducción de la inmunidad en las mucosas o una reducción de la dosis de antígeno. Se ha presentado un número de adyuvantes, sin embargo, ninguno ha demostrado ser totalmente adecuado para todas las vacunas. El primer adyuvante que se reseñó en la bibliografía fue el adyuvante completo de Freund (FCA) que contiene una emulsión de agua en aceite y extractos

20 de mycobacterium. Desafortunadamente, el FCA se tolera mal y puede provocar una inflamación incontrolada. Desde el descubrimiento del FCA hace más de 80 años, se han estado realizando tentativas de reducir los efectos secundarios indeseados de los adyuvantes.

Algunos otros materiales que se han usado como adyuvantes incluyen óxidos

25 metálicos (por ejemplo, hidróxido de aluminio), alumbre, quelatos inorgánicos de sales,

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

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

Las saponinas obtenidas de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* se han usado como adyuvantes durante algún tiempo. Véase Lacaille-
20 Dubois, M y Wagner H. (A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 páginas 363-386. 1996). Muchas de las vacunas veterinarias que se usan hoy en día contienen Quil A, que es la fracción de saponinas de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria molina*. La fraccionación adicional de Quil A ha proporcionado sub-fracciones, que incluyen QS-7, QS-17, QS-
25 18, y QS-21. (Véase la patente de Estados Unidos No. 5.057.540.



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

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

Se han usado inmunomoduladores como adyuvantes y los ejemplos incluyen bromuro de dimetildioctadecilamonio (en lo sucesivo denominado, "DDA"), y avirdina. El DDA es un compuesto de amonio cuaternario lipófilo (amina) con dos cadenas

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

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

Se ha demostrado que algunos adyuvantes estimulan una respuesta Th2, con ejemplos como hidroacetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida, también conocido con el nombre comercial Bay R1005®
25 cuando está en forma de acetato, y aluminio. El Bay R1005® combinado con vacunas

6

de virus purificados o vacunas de subunidades provocan una mayor producción de anticuerpos en ratones expuestos a virus. Los ensayos preclínicos en otras especies de animales (cerdos, ovejas, caballos) proporcionaron resultados comparables con respecto a la producción de anticuerpos. El aumento de la síntesis de anticuerpos que indujo el Bay R1005® depende específicamente del antígeno y no de la estimulación policlonal.

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

15

SUMARIO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a composiciones adyuvantes inmunogénicas y de vacunas novedosas. En particular, esta invención se refiere a formulaciones adyuvantes que comprenden estimuladores de Th1, inmunomoduladores, polímeros, y estimuladores de Th2. Esta invención también se refiere a composiciones inmunogénicas y de vacunas que comprenden dichas formulaciones adyuvantes y uno o más antígenos, así como a procedimientos de preparar las composiciones adyuvantes y de vacunas.

En una realización, las composiciones adyuvantes comprenden una combinación de una saponina, un esteroide, y un compuesto de amonio cuaternario. En

25

una realización, la combinación adyuvante comprende Quil A, colesterol, y DDA.

En otra realización, las composiciones adyuvantes comprenden una combinación de una saponina, un esterol, un compuesto de amonio cuaternario, y un polímero. En una realización, la combinación adyuvante es Quil A, colesterol, DDA, y
5 poli(ácido acrílico).

En otra realización, las composiciones adyuvantes comprenden una combinación de una saponina, un esterol, un compuesto de amonio cuaternario, un polímero, y glicolípido. En una realización, la combinación adyuvante es Quil A, colesterol, DDA, poli(ácido acrílico), y Bay R1005®.

10 En una realización, se prepara una composición inmunogénica que comprende una formulación de adyuvante y una cantidad inmunológicamente eficaz de un antígeno, en la que la formulación de adyuvante comprende una saponina, un esterol, un compuesto de amonio cuaternario, y un polímero mediante el procedimiento que comprende

- 15 a) preparar una composición del antígeno en un tampón,
b) añadir la saponina a la composición de la etapa a;
c) añadir el esterol a la composición de la etapa b;
d) añadir el compuesto de amonio cuaternario a la composición de la etapa
c,
20 e) añadir el polímero a la composición de la etapa d.

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

En una realización, se prepara una vacuna que comprende una formulación de
25 adyuvante y una cantidad inmunológicamente eficaz de un antígeno, en la que la

formulación de adyuvante comprende una saponina, un estero, un compuesto de amonio cuaternario, un polímero, y un glucolípido mediante el procedimiento que comprende

- a) preparar una composición del antígeno en un tampón,
- 5 b) añadir la saponina a la composición de la etapa a;
- c) añadir el estero a la composición de la etapa b;
- d) añadir el compuesto de amonio cuaternario a la composición de la etapa c,
- e) añadir el polímero a la composición de la etapa d, y
- 10 f) añadir el glucolípido a la composición de la etapa e.

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

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

15

20

25

formulaciones adyuvantes proporcionan una capacidad de almacenamiento a largo plazo.

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

La presente invención por lo tanto proporciona composiciones adyuvantes,
10 inmunogénicas, y de vacunas. También se proporcionan procedimientos para la fabricación de las composiciones. También se proporciona su uso para tratar una enfermedad. También se proporciona su uso para preparar un medicamento para tratar a un sujeto contra una enfermedad, en particular contra enfermedades que se describen a continuación. También se proporciona su uso para preparar un
15 medicamento para prevenir o reducir una enfermedad en un sujeto

Además se proporciona su uso para preparar un medicamento para tratar a un felino contra la infección provocada por el virus de leucemia felina, para tratar un ave contra coccidiosis aviar, para tratar a un bóvido contra enfermedades provocadas por *Escherichia coli*, para tratar un bóvido contra enfermedades provocadas por el virus de
20 la diarrea vírica bovina, para tratar un cerdo contra enfermedades provocadas por *Mycoplasma hyopneumonia*, para tratar un felino contra enfermedades provocadas por el virus influenza felino, a un sujeto contra cáncer, para tratar un cánido contra enfermedades provocadas por coronavirus canino, para tratar un bóvido contra enfermedades provocadas por rotavirus bovino, y para tratar un cánido contra
25 enfermedades provocadas por el virus influenza canino. También se proporciona el

uso de adyuvantes como vacuna marcadora para ayudar a la identificación de animales que han sido vacunados. También se proporciona el uso de CpG para potenciar los efectos de los adyuvantes.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

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

“Adyuvante” quiere decir cualquier sustancia que aumente la respuesta inmunitaria humoral o celular contra un antígeno. Los adyuvantes se usan
25 generalmente para lograr dos objetivos: ralentizar la liberación de los antígenos a partir

del sitio de inyección, y estimular el sistema inmunitario.

“Alquilo” se refiere a restos hidrocarburo saturados tanto lineales como ramificados.

“Amina” se refiere a un compuesto químico que contiene nitrógeno. Las aminas
5 son un grupo de compuestos que se derivan de amoniaco sustituyendo los grupos hidrocarburo por los átomos de hidrógeno. “Amina cuaternaria” se refiere a un compuesto con base de amonio con cuatro grupos hidrocarburo.

“Anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse a un antígeno específico como resultado de una respuesta inmunitaria contra ese
10 antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas serosas compuestas por cadenas polipeptídicas “ligera” y “pesada” que tienen regiones “constantes” y “variables” y se dividen en dos clases (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM) basándose en la composición de las regiones constantes.

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

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

25 “Tampón” quiere decir un sistema químico que previene el cambio en la

69

concentración de otra sustancia química, por ejemplo, los sistemas donantes y receptores de protones sirven de tampones que previenen cambios marcados en la concentración de iones de hidrógeno (pH). Un ejemplo adicional de un tampón es una solución que contiene una mezcla de un ácido débil y su sal (base conjugada) o una base libre y su sal (ácido conjugado).

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

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

15 “Hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)” se refiere a una respuesta inflamatoria que se desarrolla de 24 a 72 horas después de la exposición a un antígeno que el sistema inmunitario reconoce como exógeno. Este tipo de respuesta inmunitaria implica principalmente a los linfocitos T y no a los anticuerpos (que son producidos por los linfocitos B).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Una “cantidad inmunológicamente protectora” o “cantidad inmunológicamente eficaz” o “cantidad eficaz para producir una respuesta inmunitaria” de un antígeno es una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor. La respuesta inmunogénica puede ser suficiente para fines de diagnóstico u otras pruebas, o puede ser adecuada para prevenir signos o síntomas de enfermedad, que

incluyen efectos adversos o sus complicaciones, provocados por la infección con un agente de enfermedad. Puede inducirse o una inmunidad humoral o una inmunidad mediada por células o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal a una composición inmunogénica puede evaluarse, por ejemplo, de forma indirecta midiendo las valoraciones de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través de los signos y síntomas de control después de la exposición a una cepa de tipo silvestre, mientras que la inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción de los signos clínicos, como por ejemplo mortalidad, morbilidad, número de temperatura, estado físico global y salud global y respuesta del sujeto. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, inducción de inmunidad celular y/o humoral.

“Inmunogénico” quiere decir que provoca una respuesta inmunitaria o antigénica. Así, una composición inmunogénica sería cualquier composición que induce una respuesta inmunitaria.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

91

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

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

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

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

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

25 “DOCT₅₀” se refiere a “dosis de infección de cultivo tisular” y se define como

aquella dilución de un virus necesaria para infectar el 50% de un lote dado de cultivos celulares inoculados. Pueden usarse diversos procedimientos para calcular la $DOCT_{50}$, que incluye el procedimiento de Spearman-Kärber que se utiliza en toda esta memoria descriptiva. Para una descripción del procedimiento de Spearman-Kärber, Véase B.W.

5 Mahy & H.O. Kangro, *Virology Methods Manual*, páginas 25-46 (1996).

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

10
15
20

"Tratar" se refiere a prevenir un trastorno, afección o enfermedad al que se aplique dicho término, o prevenir o reducir uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

25

"Tratamiento" se refiere al acto de "tratar" como se define anteriormente.

"Triterpenoides" se refiere a una clase grande y diversa de moléculas orgánicas naturales, derivadas de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) de cinco carbonos, que pueden ensamblarse y modificarse de miles de formas. La mayoría son

5 estructuras multicíclicas que difieren entre sí por los grupos funcionales y en sus esqueletos de carbonos básicos. Estas moléculas pueden encontrarse en todas las clases de organismos vivos.

"Vacuna" se refiere a una composición que incluye un antígeno, como se define en el presente documento. La administración de la vacuna a un sujeto provoca una

10 respuesta inmunitaria, generalmente contra una o más enfermedades específicas. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del antígeno particular que se use, o del estado del sujeto, y puede ser determinado por un experto en la técnica.

15 **COMPONENTES DE LAS COMPOSICIONES**

Triterpenoides y CpG

Los triterpenoides adecuados para usar en las composiciones adyuvantes pueden provenir de muchas fuentes, ya sean derivados vegetales o equivalentes sintéticos, que incluyen pero sin limitación, *Quillaja saponaria*, tomatina, extractos de

20 ginseng, champiñones y un glucósido de alcaloide estructuralmente similar a las saponinas esteroideas. Así, los triterpenoides adecuados para usar en las composiciones adyuvantes incluyen saponinas, escualeno y lanosterol. La cantidad de triterpenoides adecuada para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza del triterpenoide que se use. Sin embargo, generalmente se usan en una

25 cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5.000 µg por dosis. También

se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 4.000 µg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3.000 µg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2.000 µg por dosis, y de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1.000 µg por dosis. También se usan en una cantidad de
5 aproximadamente 5 µg a aproximadamente 750 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 200 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, y en una cantidad de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 75 µg por dosis.

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

Los ODN con CpG son una clase de agentes farmacoterapéuticos recientemente descritos que se caracterizan por la presencia de un dinucleótido CG no
20 metilado en contextos específicos de secuencias de bases (motivo CpG). (Hansel TT, Barnes PJ (editores): New Drugs for Asthma, Allergy y COPD. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2001, vol 31, páginas 229-232, que se incorpora al presente documento por referencia). Estos motivos CpG no se observan en el ADN eucariota, en los que los dinucleótidos CG están suprimidos y, cuando están presentes, habitualmente están

metilados, pero están presentes en el ADN bacteriano al que confieren propiedades inmunoestimuladoras. Estas propiedades inmunoestimuladoras incluyen inducción de una respuesta de tipo Th1 con liberación prominente de IFN-Á, IL-12, e IL-18. Los ODN con CpG (18-24 pb de longitud) poseen propiedades inmunomoduladoras
5 similares al ADN bacteriano. Las proteínas de la superficie celular pueden captar estas moléculas con resultados variables. Sin embargo, con un vehículo como por ejemplo QCDC, QCDCR y otras combinaciones que se citan en esta patente, se potencian significativamente las propiedades de inmunomodulación y de captación de CpG.

La cantidad de CpG para usar en las composiciones adyuvantes depende de la
10 naturaleza de los CpG que se usen y de las especies que se pretendan. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 20 mg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 4 mg por dosis, de
15 aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3 mg por dosis, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg por dosis, y de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 750 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg por dosis, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 200 µg por dosis, de
20 aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, de 10 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 100 µg por dosis, y en una cantidad de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 75 µg por dosis.

Esteroles

Los esteroides adecuados para usar en las composiciones adyuvantes incluyen β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol, y colesterol. Estos esteroides son notorios en la técnica y pueden comprarse comercialmente. Por ejemplo, el colesterol se describe en The Merck Index, 12^a Ed., página 369. La cantidad de esteroides

5 adecuada para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza del esteroide que se use. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 5.000 μg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 4.000 μg por dosis, de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 3.000 μg por dosis, de aproximadamente

10 1 μg a aproximadamente 2.000 μg por dosis, y de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 1.000 μg por dosis. También se usan en una cantidad de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 750 μg por dosis, de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 500 μg por dosis, de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 200 μg por dosis, de aproximadamente 5 μg a aproximadamente

15 100 μg por dosis, de aproximadamente 15 μg a aproximadamente 100 μg por dosis, y de aproximadamente 30 μg a aproximadamente 75 μg por dosis.

Inmunomoduladores

Las composiciones adyuvantes además pueden incluir uno o más agentes inmunomoduladores como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario (por

20 ejemplo, DDA), e interleucinas, interferones, u otras citocinas. Estos materiales pueden comprarse comercialmente. La cantidad de inmunomodulador adecuado para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza del inmunomodulador que se use y del sujeto. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 5.000 μg por dosis. También se usan en



- una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 4.000 μg por dosis, de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 3.000 μg por dosis, de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 2.000 μg por dosis, y de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 1.000 μg por dosis. También se usan en una cantidad de
- 5 aproximadamente 5 μg a aproximadamente 750 μg por dosis, de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 500 μg por dosis, de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 200 μg por dosis, de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 100 μg por dosis, de aproximadamente 15 μg a aproximadamente 100 μg por dosis, y en una cantidad de aproximadamente 30 μg a aproximadamente 75 μg por dosis.
- 10 Como ejemplo específico, las composiciones adyuvantes que contienen DDA pueden prepararse simplemente mezclando una solución antigénica con una solución preparada recientemente de DDA.

Polímeros

- Las composiciones adyuvantes además pueden incluir uno o más polímeros
- 15 como por ejemplo, DEAE Dextrano, polietilenglicol, y poli(ácido acrílico) y poli(ácido metacrílico) (por ejemplo, CARBOPOL®). Dicho material puede comprarse comercialmente. La cantidad de polímeros adecuada para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza de los polímeros que se usen. Sin embargo,
- 20 generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 0,0001% en volumen por volumen (v/v) a aproximadamente 75% v/v. En otras realizaciones, se usan en una cantidad de aproximadamente 0,001% v/v a aproximadamente 50% v/v, de aproximadamente 0,005% v/v a aproximadamente 25% v/v, de aproximadamente 0,01% v/v a aproximadamente 10% v/v, de aproximadamente 0,05% v/v a aproximadamente 2% v/v, y de aproximadamente 0,1% v/v a aproximadamente 0,75%

v/v. En otra realización, se usan en una cantidad de aproximadamente 0,02 v/v a aproximadamente 0,4% v/v. Los DEAE-dextranos pueden tener un tamaño molecular en el intervalo de 50.000 Da a 5.000.000 Da, o puede estar en el intervalo de 500.000 Da a 2.000.000 Da. Dicho material puede comprarse comercialmente o prepararse a partir de dextrano.

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

Estimulantes de Th2

Las composiciones adyuvantes pueden incluir además uno o más estimulantes de Th2 como por ejemplo, por ejemplo, Bay R1005® y aluminio. La cantidad de estimulantes de Th2 adecuada para usar en las composiciones adyuvantes depende de la naturaleza del estimulante de Th2 que se use. Sin embargo, generalmente se usan en una cantidad de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 10 mg por dosis. En otras realizaciones, se usan en una cantidad de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 7.5 mg por dosis, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg por dosis, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 2,5 mg por dosis, y de 1 mg a aproximadamente 2 mg por dosis. Un ejemplo específico es Bay R1005®, un glucolípido con el nombre químico "acetato de N- (2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanamida." Puede sintetizarse de acuerdo con el

procedimiento que se encuentra en Lockhoff, O. (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1611-1620; 1991). Se recomienda almacenarlo a 2-8° C en un envase hermético. Sus propiedades químicas o físicas son que es ligeramente higroscópico, no forma polimorfos, es químicamente estable en aire y luz a temperaturas de hasta 50° C y en
5 disolventes acuosos a pH 2-12 a temperatura ambiente. Es una molécula anfífila que forma micelas en solución acuosa.

Antígenos y enfermedades

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

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

25 Las cepas vivas, vivas modificadas y atenuadas que no provocan enfermedad

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

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

Algunos ejemplos de bacterias que pueden usarse como antígenos con las
20 composiciones adyuvantes incluyen, pero sin limitación, *Aceinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Campylobacter coli*,
25 *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Chlamydia*



psittaci, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila* spp., *Chromobacterium viscosum*,
Erysipelothrix rhusiopathiae, *Listeria monocytogenes*, *Ehrlichia canis*, *Escherichia*
coli, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Helicobacter suis*, *Lawsonia*
intracellularis, *Legionella pneumophila*, *Moraxella* sp., *Mycobacterium bovis*,
5 *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Clostridium*
perfringens, *Odoribacter denticanis*, *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica*,
Pasteurella multocida, *Photobacterium luminescens*, *Porphyromonas gulae*,
Porphyromonas gingivalis, *Porphyromonas salivosa*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus*
vulgaris, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas*
10 *fluorescens* C9, *Pseudomonas fluorescens* SIKW1, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas*
luteola, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas* sp B11-1, *Alcaligenes eutrophus*,
Psychrobacter immobilis, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsia*, *Salmonella*
typhimurium, *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica*, *Salmonella dublin*, *Salmonella*
typhimurium, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella newport*, *Serratia marcescens*,
15 *Spirillum platensis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,
Staphylococcus hyicus, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*,
Streptococcus suis, *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus*
acidocaldarius, *Syechocystis* sp., *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema*
denticola, *Treponema minutum*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*,
20 *Treponema vincentii*, *Treponema palladium*, and *Leptospira* species, such as the
known pathogens *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*,
Leptospira borgpetersenii hardjo-bovis, *Leptospira borgpetersenii hardjo*-
prajitno, *Leptospira interrogans*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, y
Leptospira bratislava, y sus combinaciones.

25 En las composiciones adyuvantes pueden usarse tanto virus inactivados como

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

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

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

La cantidad de antígeno que se usa para inducir una respuesta inmunitaria variarán considerablemente dependiendo del antígeno que se use, del sujeto, y del nivel de respuesta que se desee y puede ser determinado por una persona de experiencia en la técnica. Para las vacunas que contienen virus vivos modificados o virus atenuados, una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno generalmente varía desde aproximadamente 10^2 de dosis infecciosa de cultivo tisular (DOCT)₅₀ a aproximadamente 10^{10} DOCT₅₀, inclusive. Para muchos de estos virus, una dosis terapéuticamente eficaz está generalmente en el intervalo desde aproximadamente 10^2 DOCT₅₀ a aproximadamente 10^8 DOCT₅₀, inclusive. En algunas realizaciones, los intervalos de dosis terapéuticamente eficaces son de aproximadamente 10^3 DOCT₅₀ a aproximadamente 10^6 DOCT₅₀, inclusive. En algunas otras realizaciones, los intervalos

de dosis terapéuticamente eficaces son de aproximadamente 10^4 DOCT₅₀ a aproximadamente 10^5 DOCT₅₀, inclusive.

Para las vacunas que contienen virus inactivados, una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno es generalmente al menos aproximadamente 5 100 unidades relativas por dosis, y a menudo están en el intervalo desde aproximadamente 1.000 a aproximadamente 4.500 unidades relativas por dosis, inclusive. En otras realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno están en un intervalo de aproximadamente 250 a aproximadamente 4.000 unidades relativas por dosis, inclusive, de aproximadamente 500 a aproximadamente 3.000 10 unidades relativas por dosis, inclusive, de aproximadamente 750 a aproximadamente 2.000 unidades relativas por dosis, inclusive, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 1.500 unidades relativas por dosis, inclusive.

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

En una realización se produjo un antígeno FeLV de la línea celular FL74-UCD-1 (número de ATCC CRL-8012) que está infectada persistentemente con la cepa KT- 25 FeLV-UCD-1 del virus de leucemia felina. La cantidad de antígeno FeLV en una

vacuna puede medirse como la cantidad de proteína vírica gp70 por ml. Una cantidad terapéuticamente eficaz de antígeno FeLV, cuando se mide por la cantidad de proteína vírica gp70 por ml, generalmente está en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 350.000 ng/ml, inclusive. En otra realización el intervalo es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 300.000 ng/ml, inclusive, o de aproximadamente 2.500 a aproximadamente 250.000 ng/ml, inclusive, o de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 220.000 ng/ml, inclusive, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 150.000 ng/ml, inclusive, o de aproximadamente 10.000 ng/ml a aproximadamente 100.000 ng/ml, inclusive.

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

El número de células para un antígeno parasitario administrado en una vacuna varía en el intervalo de aproximadamente 1×10^2 a aproximadamente 1×10^{10} por dosis, inclusive. En otras realizaciones, el número de células varía en el intervalo de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^9 por dosis, inclusive, o de
25 aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^8 por dosis, inclusive, o de

aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^7 por dosis, inclusive, o de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^8 por dosis, inclusive.

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

Excipientes

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

proporcionan una respuesta inmunitaria dirigida.

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

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

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

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

Una emulsión de aceite en agua proporcionada por la presente invención está compuesto por una formulación de AMPHIGEN®. Esta formulación comprende un componente acuoso, lecitina, aceite mineral y tensioactivos. Las patentes que

describen los componentes de la formulación incluyen US 5.084.269 y US 6.572.861.

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

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

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

fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina, y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse convencionalmente.

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

Hablando de forma general, el tensioactivo, o la combinación de tensioactivos, si se usan dos o más tensioactivos, está presente en la emulsión en una cantidad de
15 0,01% a 10% en volumen, preferiblemente de 0,1% a 6,0%, más preferiblemente de 0,2% a 5,0%.

Tal como se usa en el presente documento, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes
20 antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasan la adsorción y similares. El/los vehículo(s) deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de las composiciones y no ser perjudiciales para el sujeto. Habitualmente, los vehículos serán estériles y apirógenos y se seleccionaran basándose en el modo de administración a emplear. Es bien conocido por los expertos
25 en la técnica que las formulaciones preferidas para el vehículo farmacéuticamente

aceptable que comprenden las composiciones son los vehículos farmacéuticos aprobados en las regulaciones aplicables promulgadas por el Departamento de agricultura estadounidense (United States (US) Department of Agriculture) o la Agencia del medicamento estadounidense (US Food and Drug Administration), o
5 agencia gubernamental equivalente en un país diferentes de los Estados Unidos. Por lo tanto, el vehículo farmacéuticamente aceptado para la producción comercial de las composiciones es un vehículo que ya está aprobado o que será aprobado por la agencia gubernamental apropiada en los Estados Unidos o país extranjero.

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

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

20 **PREPARACIÓN DE LAS COMPOSICIONES**

Preparación de formulaciones adyuvantes

Un ISCOM puede prepararse combinando una saponina, un esterol y un fosfolípido. Por ejemplo, un ISCOM puede contener de 5% a 10% en peso de Quil A, 1% a 5% de colesterol y fosfolípidos, y el resto de proteína. La proporción entre
25 saponina y esterol en las formulaciones adyuvantes habitualmente será del orden

desde 1:100 peso por peso (p/p) a 5:1 p/p. En algunas realizaciones, hay presente un exceso de esterol, en el que la proporción entre saponina y esterol es de al menos 1:2 p/p, o 1:5 p/p. En otras realizaciones, la saponina está en exceso relativa al esterol, y se usa una proporción entre saponina y esterol de aproximadamente 5:1 p/p. ISCOM e

5 ISCOMATRIX están disponibles comercialmente de Isconova AB (Suecia).

En algunas realizaciones, se usa CARBOPOL® combinado con DDA en una cantidad de al menos 0,1 parte en peso de CARBOPOL® por parte en peso de DDA. En otras realizaciones, se usa al menos 0,5 partes en peso de CARBOPOL® por parte en peso de DDA. Todavía en otras realizaciones, se usa al menos 1 parte en peso de

10 CARBOPOL® por parte en peso de DDA. La combinación de CARBOPOL® y DDA forma un complejo por el que el grupo funcional de amina terciaria del DDA inmunofuncionaliza los grupos laterales de ácido carboxílico del polímero. Esto permite que las células inmunitarias específicas se dirijan al antígeno y al adyuvante de forma simultánea y coadministren el antígeno y adyuvante juntos en el momento y

15 concentración óptimos a dichas células.

Los adyuvantes que se describen en el presente documento generalmente no requerirán ningún vehículo específico y se formularán en un tampón acuoso u otro farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, las vacunas de las realizaciones descritas se presentarán en un vehículo adecuado, como por ejemplo, liposomas,

20 microesferas o partículas antigénicas encapsuladas adicionales. El antígeno puede estar contenido en la membrana de las vesículas o estar contenido en el exterior de la membrana de las vesículas. Generalmente, los antígenos solubles están fuera y los antígenos hidrófobos o lipidados están o bien contenidos en el interior o fuera de la membrana.

25 Las composiciones adyuvantes pueden prepararse en diversas formas

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

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

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

La cantidad de adyuvante que se usa depende del antígeno con el que se usa y la dosis antigénica a aplicar. También depende de las especies a la que se dirija y de la formulación deseada. Habitualmente, la cantidad están incluida en un intervalo convencional que se usa para los adyuvantes. Por ejemplo, los adyuvantes habitualmente comprenden de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 1000 μg ,

inclusive, de una dosis de 1 ml. De forma similar, los antibióticos habitualmente comprenden de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 60 μ g, inclusive, de una dosis de 1 ml.

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

Las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento pueden estar tanto homogeneizadas como microfluidificadas. En una realización, se añade un antígeno a un tampón apropiado. La solución se agita, y se añade lentamente una saponina a la solución antigénica. Después se añade lentamente un estero1 a la solución de antígeno y saponina, seguido de la adición lenta de un

compuesto de amonio cuaternario a la solución de antígeno, saponina y esterol. La composición resultante se homogeniza y después se microfluidifica. Después de la microfluidificación, se añade un polímero a la composición microfluidificada. Dependiendo de los componentes que se usen, puede alterarse el orden de estas etapas para optimizar la preparación de las composiciones.

Preparación de composiciones inmunogénicas y de vacunas

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

ADMINISTRACIÓN Y USO DE LAS COMPOSICIONES

Administración de las composiciones

Los tamaños de las dosis de las composiciones habitualmente varían desde

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

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

Uso de las composiciones

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

Una característica ventajosa de las presentes composiciones adyuvantes es que pueden administrarse de forma segura y eficaz a una amplia variedad de sujetos.

En la técnica, se espera que las combinaciones de adyuvantes demuestren mayor capacidad reactógena que los componentes individuales. Sin embargo, las composiciones que se describen en el presente documento muestran una menor capacidad reactógena cuando se comparan con composiciones en las que se usan uno o dos cualesquiera de los componentes, aunque se mantiene el efecto adyuvante. También se ha encontrado sorprendentemente que las composiciones adyuvantes que se describen en el presente documento demuestran mejoras en la seguridad comparadas con otras composiciones adyuvantes.

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

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

erradicación del virus de una población sujeto.

Los siguientes ejemplos se presentan como realizaciones ilustrativas, pero no deberían tomarse como limitantes del alcance de la invención. Para los expertos en la técnica serán obvios muchos cambios, variaciones, modificaciones y otros usos y aplicaciones de esta invención.

EJEMPLOS

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

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

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

Ejemplo 2. Soluciones de DDA (D)

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

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

Se preparó una solución madre de A Quil A/Colesterol como en el ejemplo 1 a las concentraciones deseadas. Se preparó una solución madre de DDA como en el

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

Ejemplo 4. Soluciones de CARBOPOL® (C).

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

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

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

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

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

Ejemplo 7. Soluciones de Bay R1005® (R)

Para preparar una solución madre de Bay R1005®, el glicolípido N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida se disolvió en etanol (al 60% v/v). Se añadieron después Tween 20 y ácido acético glacial. En un ejemplo, se
25 disolvieron 3,49 gm de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-β-D-glucopiranosil)-N-

octadecildodecanoilamida en 44,64 ml de etanol/agua (al 60% v/v). Esto se combinó con 1,12 ml de Tween 20 y 0,68 ml de ácido acético glacial.

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

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

Ejemplo 9. Soluciones de DEAE Dextrano (X)

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

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

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

Ejemplo 11. Composiciones de Aceite (O)

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

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

Se preparó una solución madre de Quil A/colesterol/DDA/DEAE de acuerdo con el ejemplo 10. Se preparó una composición madre de aceite de acuerdo con el ejemplo 11. Las soluciones fueron una combinación de Quil-A, DEAE-dextrano y agua logrando la cantidad a dichas concentraciones. Se mezcló esta fase acuosa agitando continuamente la reacción durante varios minutos o más a temperatura ambiente o más alta y después se filtró de forma estéril y se almacenó para adición a la fase oleosa. La fase acuosa se añadió lentamente dentro de una fase aceitosa que se mezcla de forma continua.

Ejemplo 13. Preparación de Composiciones Inmunogénicas o Composiciones de Vacunas

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

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

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

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

Para preparar una composición inmunogénica o una composición de vacuna que comprenda un antígeno, Quil A, colesterol, DDA, CARBOPOL®, y Bay R1005®, se añadió el antígeno deseado a un tampón apropiado. Se preparó una solución madre de Quil A como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno. Se preparó una solución madre de colesterol como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A. Se preparó una solución madre de DDA como en el ejemplo 2 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A/colesterol. La solución de antígeno/Quil A/colesterol/DDA se homogeneizó y microfluidificó. Se preparó una solución de CARBOPOL® al 0,75% se preparó como en el ejemplo 4. Después de microfluidificación, se añadió la solución de CARBOPOL® (al 0,05% v/v) a composición microfluidificada y se ajustó el pH con

NaOH o HCl a aproximadamente 6,9 hasta aproximadamente 7,5. Se preparó una solución madre de Bay R1005® como en el ejemplo 7. Se añadió el componente de Bay R1005® a la fase acuosa después de que se añadió el DDA.

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

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

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

 Para preparar una composición inmunogénica o una composición de vacuna que comprenda un antígeno, Quil A, colesterol, DDA, DEAE dextrano, y aceite, se añadió el antígeno deseado a un tampón apropiado. Se preparó una solución madre
20 de Quil A como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno. La composición se homogeneizó. Se preparó una solución madre de colesterol como en el ejemplo 1 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A durante la homogeneización. Se preparó una solución madre de DDA como en el ejemplo 2 y se añadió lentamente a la solución de antígeno/Quil A/colesterol durante la
25 homogeneización. Se preparó una solución de DEAE dextrano como en el ejemplo 9.

Durante la homogeneización, se añadió la solución de DEAE dextrano. Se preparó una composición de aceite como en el ejemplo 11. Durante la homogeneización, se añadió la composición de aceite suministrando la fase acuosa dentro de la fase oleosa homogeneizando mientras y se llevó la solución resultante a volumen final.

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

Los animales se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento usando un diseño de bloques completo distribuido de forma aleatoria. La tabla 1 muestra el diseño del estudio. Los bloques se basaron en fecha de nacimiento y camada. Los animales se clasificaron por fecha de nacimiento y después por camada. Se usaron

10 bloques de cuatro. Dentro de un bloque, los animales se asignaron aleatoriamente al tratamiento. Para la fase de vacunación del estudio, se combinaron dos bloques consecutivos formando un grupo de ocho animales. Los grupos de animales se asignaron aleatoriamente a dos habitaciones de tal forma que cada habitación contenía cinco grupos (10 bloques) de animales. Dentro de un grupo de animales, los

15 animales se asignaron aleatoriamente a cuatro jaulas localizadas cerca unas de otras de tal manera que cada jaula contenía dos animales con el mismo tratamiento. Para la fase de prueba del estudio, los animales de una habitación de vacunación se asignaron aleatoriamente a bien una o bien dos habitaciones de prueba. La habitación de vacunación seleccionada para ir en dos habitaciones de prueba, tenía cinco

20 bloques distribuidos aleatoriamente para cada habitación de prueba (2,5 grupos; 20 animales). La otra habitación de prueba contiene 10 bloques (5 grupos; 40 animales). Dentro de una habitación de prueba, los animales en el mismo bloque se asignaron aleatoriamente a cuatro jaulas localizadas una cerca de la otra.

Se prepararon las vacunas para este estudio como en el ejemplo 13 excepto

25 en que se usó una solución madre de CARBOPOL® al 1,5%. Específicamente, se

preparó LEUKOCELL[®] 2 (Pfizer, Inc.) propagando FeLV, subgrupos A, B, y C, en células linfoides transformadas con FeLV. Los antígenos virales se inactivaron químicamente, se combinaron con un adyuvante estéril para lograr la respuesta inmune, y se envasaron en forma líquida. Se preparó una cantidad total de 100 ml de

5 Producto Veterinario de Investigación (IVP) conteniendo el virus de la leucemia felina y 25 µg de Quil A/hidróxido de aluminio (ALHYDROGEL[®]). Se mezcló un total de 94,5 ml de una solución madre de FeLV de $1,106 \times 10^5$ ng/ml lentamente durante 15 minutos. El pH se ajustó a 5,9 a 6,1 con HCl 4 N o NaOH al 18%, si fue necesario. Se añadieron, agitando mientras, 0,5 ml de una solución de 5,0 mg/ml de Quil A a la

10 solución de antígeno. Después, se añadieron lentamente 5,0 ml de ALHYDROGEL[®] al 100% v/v. La composición se agitó durante un mínimo de 2 horas a 4°C. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18% o HCl 1 N, según se necesitase.

Se prepararon el IVP que comprende el virus de la leucemia felina y 37,5 µg de Quil A/hidróxido de aluminio (ALHYDROGEL[®]) de la misma manera que para los 25

15 µg de Quil A IVP pero se añadieron 7,5 ml de la solución madre de Quil A a la solución de antígeno.

Se preparó una cantidad total de 350 ml de Producto Veterinario de Investigación (IVP) conteniendo el virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol, DDA, y CARBOPOL[®]. Mientras que se agitaban 349,3 ml de una solución madre de FeLV a

20 $1,106 \times 10^5$ ng/ml, se añadieron lentamente 0,14 ml de una solución de 50,0 mg/ml de Quil A a la solución de antígeno. Después, se añadieron lentamente 0,39 ml de una solución de colesterol/etanol de 18 mg/ml. La composición se homogeneizó durante tres minutos a 10.000 rpm. Se añadió un total de 0,19 ml de una solución de DDA/etanol de 18,0 mg/ml a la composición mientras que se agitaba. Se añadió

25 lentamente un total de 5,0 ml de una solución de CARBOPOL[®] al 1,5% a 145,0 ml de

la composición de virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol, y DDA. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18% o HCl 1 N, según se necesitase.

Tabla 1: Diseño Experimental

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

	LEUKOCELL® 2 Quil A/ Al(OH) ^b					40, 42 ^d , 44			64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155
T04	20 µg de LEUKOCELL® 2 Reformulada Quil A/ colesterol/ DDA/ CARBOPOL® ^b	20	0, 21	1,0	SC	37, 40, 42 ^d , 44	1,0	ON	-2, 35, 64, 85, 106, 127, 134, 141, 148, 155

^aProducto Veterinario de Investigación

^bMezclado para contener una potencia relativa comparable con la vacuna de referencia
(Lote de Referencia de FeLV nº 12) ^cSC = Subcutáneo

5 ^dDepo-Medrol®: Día 42 (aproximadamente 5,0 mg/kg) por la vía intramuscular

^eON = Oronasal

Quil A – colesterol = Adyuvante de saponina Quil A, incorporado en partículas lipídicas de colesterol

CARBOPOL® = Carbómero

10 DDA = Bromuro de dimetildiocetadecilamonio

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

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

En el día 35, se situaron animales dentro de jaulas de aislamiento individual. El

virus de prueba fue Virus de la Leucemia Felina (FeLV) virulento, cepa de Rickard, valorado a aproximadamente $10^{6,1}$ TCID₅₀/ml. El material de prueba de FeLV se descongeló y se mantuvo en hielo húmedo de forma previa a su administración. Los animales se pusieron a prueba en los días 37, 40, 42, y 44, administrando 1,0 ml por la vía nasal de material de prueba no diluido. Se cargó una jeringuilla de tuberculina de 1 ml, sin la aguja, con el material de prueba. Cada gatito se administró con 0,5 ml por fosa nasal. En el día 42, se llevó a cabo la administración de prueba aproximadamente 5 h tras la administración de DEPO-MEDROL®. Después de cada día de prueba, se retuvo una muestra del material de prueba para valoración confirmatoria.

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

Se llevó a cabo el aislamiento del virus usando muestras de suero recogidas en días –2 y 35. Se consideraron las muestras de suero de días 127 a 155 para evaluar la eficacia de la vacuna de FeLV. Las muestras de suero del día 127 (semana 12), del día 134 (semana 13), del día 141 (semana 14), del día 148 (semana 15) y del día 155 (semana 16) se sometieron a ensayo para la presencia de antígeno p27 de FeLV. Un

animal se consideró infectado persistentemente si tuvo tres o más resultados de prueba de antígeno p27 de FeLV positivos durante los días 127 (semana 12) a 155 (semana 16).

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

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

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

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

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

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

Se aclimataron los gatitos durante dieciséis días después de su llegada. Se

al

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

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

micrómetros a 68950000 (+ 3447380) pascales (10.000 (+ 500) psi). Agitando mientras, se añadieron lentamente 10,0 ml de una solución de CARBOPOL® al 1,5% a 290,0 ml del virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol, y composición de DDA. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18% o HCl 1 N, según se necesitase.

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

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

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

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

- Para administrar una dosis de 0,5 ml, se prepararon 300,0 ml de IVP que
25 contiene el virus de la leucemia felina a una RP de 5, Quil A, colesterol, DDA, y

92

CARBOPOL® de la siguiente manera. Se añadió un total de 21,7 ml de una solución madre de FeLV (35,8 RP/ml donde 1 RP = 1,864 ng/ml de antígeno) a 277,7 ml de tampón de PBS al 0,063%. Agitando mientras, se añadieron lentamente 0,12 ml de una solución de 50,0 mg/ml de Quil A a la solución de antígeno. Después, se añadieron lentamente 0,35 ml de una solución de colesterol/etanol de 18 mg/ml. Se añadió lentamente un total de 0,17 ml de una solución de DDA/etanol de 18,0 mg/ml a la composición agitando mientras. La composición se homogeneizó durante tres minutos a 10.000 rpm. La composición se microfluidificó después mediante un paso a través de una cámara de dimensión limitante de 200 micrómetros a 68950000 (+ 3447380) pascales (10.000 (+ 500) psi). Agitando mientras, se añadieron lentamente 3,3 ml de una solución de CARBOPOL® al 1,5% a 96,7 ml del virus de la leucemia felina, Quil A, colesterol, y composición de DDA. El pH se ajustó a entre 7,0 y 7,3 con NaOH al 18% o HCl 1 N, según se necesitare.

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

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

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

10 **Tabla 2: Diseño Experimental**

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

93

					CARBOPOL®	
T04	10	20 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T05	10	15 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T06	10	10 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T07	10	5 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T08	10	2 RP	SC	FeLV Inactivado	Quil A – Colesterol DDA – CARBOPOL®	Cellgro
T09	10	10 RP	SC	FeLV Inactivado	CARBOPOL®	Cellgro
T10	10	rFeLV Vivo (Merial)	ID	rFeLV Vivo (Merial)	Sin Adyuvante	Registrado (Merial)

at

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

Se recogió una muestra de sangre (1,0 - 2,0 ml) de cada animal mediante la
15 punción en la vena yugular el Día de estudio 32 (antes de la exposición). Los animales se expusieron los días de estudio 34, 36, 39, y 41 mediante la administración de 1,0 ml por la vía nasal de material de exposición no diluido. Se llenó una jeringa de 1 ml de tuberculina, sin la aguja, con el material de exposición. A cada gatito se le administró aproximadamente 0,5 ml por orificio nasal. El material de exposición FeLV tenía un
20 título promedio de $10^{6.1}$ TCID₅₀/ml. Después se recogió una muestra de sangre (1,0 - 2,0 ml) de cada animal mediante punción en la vena yugular los Días de Estudio 61, 83, 106, 126, 133, 138, 146, y 152.

Resultados - Seguridad

25 Durante la primera vacunación (Día de estudio 0), tres animales en el grupo de

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

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

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

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

Resultados - Eficacia

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

as

probó que todos los animales eran negativos antes de la exposición para el antígeno FeLV p27 a partir de muestras de suero recogidas el Día 32.

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

placebo. 5 de 10 animales (50%) en el grupo de tratamiento T09 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección no era estadísticamente significativo ($p = 0.1409$) comparado con los gatitos vacunados con placebo. Finalmente, 6 de 10 animales (60%) en el grupo de tratamiento T10 estaban protegidos de la exposición virulenta de FeLV; este nivel de protección no era estadísticamente significativo ($p = 0,0573$) comparado con los gatitos vacunados con placebo.

Tabla 3. Sumario del nivel de protección

10

Grupo de tratamiento	Potencia relativa de vacuna	Nivel de Protección	Fracción preventiva
T01	ND	10%	
T02	4,58	60%	55,6% 15
T03	4,58	90%	88,9%
T04	26,32	100%	100%
T05	18,58	100%	100%
T06	11,16	70%	66,7%
T07	4,77	100%	100% 20
T08	1,64	80%	77,8%
T09	11,12	50%	44,4%

Discusión

25 Las vacunas usadas en los grupos de tratamiento T02, T03, T04, T06 y T07

gb

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

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

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

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

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

92

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

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

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

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

25 La eficacia de la distribución *in ovo* de vacunas que contienen sistemas

adyuvantes particulares se evalúan como sigue.

Materiales y Procedimientos:

1. Materiales:

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

20 En relación a la selección de la saponina para uso en el presente documento, es instructiva la siguiente información adicional. El término definido de saponina se refiere a los glicósidos derivados de plantas, numerosas de las cuales se han estudiado de manera extensiva para evaluar sus propiedades biológicas (The Plant Glycosides, McIlroy, R. J., Edward Arnold y co., Londres, 1951). Las saponinas usadas
25 más predominantemente en la técnica para la producción de vacunas son las

as

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

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

2. Vacunación de embriones:

Se compraron los huevos de Moyers Hatchery, Quakertown, PA. Para inmunización in ovo, después se incubaron huevos de pollos jóvenes durante 18 días,

y se observaron a la luz de una vela para seleccionar los huevos fértiles(después de los 18 días formación del embrión), y después se inyectaron con 20 mM PBS y cualquier adyuvante solo, o adyuvante formulado con proteína 3-1E recombinante o una preparación de "EM". Se realizaron las inyecciones sobre un inyector in ovo

5 "Intelliject" (Avitech, Hebron, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada huevo recibió muestras de 100 microlitros en la cavidad amniótica usando una aguja de 17,5cm de longitud y calibre 18 proporcionada por Avitech (Hebron, MD). Las dosis de 50 microlitros también estaban entre las que pueden funcionar en la práctica de la presente invención.

10 **3. Pollos:**

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

15 voluntad.

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

20 **4. Parásitos:**

Se usó la cepa USDA BARC de *Eimeria maxima* nº 41, que se hasbía mantenido en el Laboratorio de Enfermedades de Parásitos de Animales - BARC y se propagaron de acuerdo con el procedimiento establecido en el Laboratorio del Dr. Lillehoj. Los oocistos recientemente producidos a partir de la cepa de *E. maxima*

25 (Beltsville nº 41) se limpiaron mediante flotación sobre hipoclorito de sodio al 5%, se

lavarón tres veces con PBS, y se enumeró la viabilidad mediante azul de triptano usando un hemocitómetro.

5. Infección de exposición de *Eimeria*:

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

6. Determinación de la ganancia de peso corporal:

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

7. Determinación de la producción de oocistos fecales:

Se instruyeron a los cuidadores de animales para limpiar las jaulas, y se recogieron las deposiciones fecales. Una vez recogidas las bandejas se colocaron cada jaula durante 5 días a partir del día 6 después de la infección, y se recogieron los materiales fecales en grandes tarros de plástico (2 l). Las deposiciones fecales empapadas con agua corriente en cada tarro se molieron en un mezclador con más agua (el volumen total es 3 l), y se recogieron dos muestras al azar de 40 ml de cada muestra y se almacenaron en el frigorífico hasta que se contaron. Con el fin de contar los oocistos de coccidia, inicialmente se realizaron diversas diluciones para determinar las diluciones óptimas para determinar la enumeración de oocistos para cada muestra. Se contaron los oocistos de manera microscópica usando una cámara de recuento de McMaster usando un procedimiento de flotación de sacarosa sucrose que se ha establecido en el Laboratorio del Dr Lillehoj. Se calculó el número total de oocistos desprendidos por pollo usando la fórmula: oocistos totales /ave = (recuento de oocistos x factor de dilución x volumen de muestra fecal / volumen de la cámara de

recuento)/número de aves por jaula.

8. Recogida de muestras:

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

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

9. Síntesis de cDNA

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

100

10. RT-PCR Cuantitativa

Los cebadores de oligonucleótidos de la RT-PCR cuantitativa para el interferón y de pollo (IFN-γ) y control GAPDH se enumeran en la Tabla 4. Se llevaron a cabo la amplificación y detección usando cantidades equivalentes de ARN total de IELs intestinal usando el sistema Mx3000P y mezcla maestra Brilliant SYBR Green QPCR (Stratagene). Se generaron curvas patrones usando ARN patrón diluido log₁₀ y se normalizaron los niveles de transcripciones individuales con los de GAPDH analizados mediante el programa Q-gene. Se realizó cada análisis por triplicado. Para normalizar los niveles de ARN entre las muestras dentro de un experimento, se calcularon los valores de ciclo de umbral medio (C_t) para los productos de amplificación mediante la combinación de los valores de todas las muestras en ese experimento.

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

Diana de ARN	Secuencias de cebador	Tamaño del producto de PCR (bp)
GAPDH	Nº de acceso K01458	264
Directo	5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3'	SEQ ID NO:1
Inverso	5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'	SEQ ID NO:2
IFN-γ	Nº de acceso Y07922	259
Directo	5'-GCTGACGGTGGACCTATTATT-3'	SEQ ID NO:3
Inverso	5'-GGCTTTGCGCTGGATTC-3'	SEQ ID NO:4
IL-1β	Nº de acceso Y15006	244

Directo	5'-TGGGCATCAAGGGCTACA-3'	SEQ ID NO:5
Inverso	5'-TCGGGTTGGTTGGTGATG-3'	SEQ ID NO:6
IL-15	Nº de acceso AF139097	243
Directo	5'-TCTGTTCTTCTGTTCTGAGTGATG-3'	SEQ ID NO:7
Inverso	5'-AGTGATTTGCTTCTGTCTTTGGTA-3'	SEQ ID NO:8

Se recogió el bazo antes de la inoculación con *E. maxima* y a 10th DPI (fecha después de la infección) para el ensayo de proliferación de esplenocitos. Se colocaron los bazos en una placa Petri con 10 ml de solución de sal equilibrada de Hank (HBSS) suplementada con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO). Se prepararon suspensiones de células individuales de linfocitos de bazo y se llevó a cabo la proliferación de linfocitos. En resumen, se ajustaron los esplenocitos a 5x10⁶ ó 1x10⁷ células/ml en medio IMDM (Sigma) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml estreptomicina (Sigma), que se llamará 10% de medio completo IMDM. Se incubaron los esplenocitos (100 µl/pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos a 41°C en un incubador humidificado (Forma, Marietta, OH) con 5% de CO₂ y 95% de aire durante 48 hr. Se determinó la proliferación de células con 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica (WST-8, Cell- Counting Kit-8®, Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD). La Densidad Óptica (DO) se midió a 450 nm usando un espectrofotómetro de microplacas (BioRad, Richmond, CA).

Resultados

Los resultados mostraban que las aves de engorde vacunadas con 100

101

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

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

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

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

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

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

Ganado Bovino

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

102

Tabla 5. Grupos de Vacunas – Ganado Bovino

Grupo	de	Nº	de Tratamiento	Día	Dosis	Vía
Trat.		Animales			(ml)	
T01		7	Solución salina	0, 21	5,0	SC
T02		7	Bacterina de <i>Escherichia coli</i> , cepa J-5	0, 21	5,0	SC
T03		7	QCDCR	0, 21	5,0	SC
T04		7	QCDO	0, 21	5,0	SC
T05		7	QCDX	0, 21	5,0	SC
T06		7	QCDXO	0, 21	5,0	SC

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

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

disponible en el mercado.

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

Resultados

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

Tabla 6. Títulos de anticuerpo IgG.

Grupo de Trat.	Tratamiento	Media geométrica del título de IgG contra J5 a día		
		0	21	48
T01	Solución salina	1573	3135	2795
T02	Bacterina de <i>Escherichia coli</i>	1402	7011	55524
T03	QCDCR	1573	13975	49494
T04	QCDO	1764	62289	391951

103

Grupo de Trat.	Tratamiento	Media geométrica del título de IgG contra J5 a día		
T05	QCDX	993	22135	110672
T06	QCDXO	2221	69877	620779

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

Tabla 7. Títulos de anticuerpo IgG1.

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

Los títulos de anticuerpo IgG2 se muestran en la Tabla 8, Este isotipo de

anticuerpo se asocia con frecuencia con mejor fagocitosis por neutrófilos en la leche y protección para el animal. Las formulaciones QCDO, QCDX y QCDXO eran especialmente eficaces en la inducción de una buena respuesta inmune en este ganado.

5 **Tabla 8. Títulos de anticuerpo IgG2.**

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

Ganado de leche

Se formularon vacunas experimentales usando bacterina J5 de *E. coli* inactivada como antígeno y se realizaron de acuerdo con el Ejemplo 13 anterior. Cada

10 grupo de tratamiento contenía inicialmente siete animales (Tabla 9). Un grupo de tratamiento recibía solución salina (T01) y otro grupo recibía una vacuna de J5 comercial (T02 - Bacterina de *Escherichia coli* J-5 Enviracor™ Pfizer). Los otros grupos de tratamiento recibieron diversas formulaciones que contenían los adyuvantes especificados en la Tabla 9. Todas las vacunaciones se administraron por inyección

104

subcutánea los días de estudio 0 y 21. El volumen de dosificación era de 5 ml.

Tabla 9: Grupos de vacunas – Ganado de leche

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

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

Recogida de sangre

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

Resultados

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

Tabla 10. Títulos de anticuerpo IgG.

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

105

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

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

Ejemplo 18. Vacuna del virus de la diarrea viral bovina

10 Objetivo de estudio

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

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

Animales

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

Tabla 11. Diseño de estudio

Grupo	Vacuna	Adyuvante	Dosis	Días	Nº Animales	Día de exposición	Vía	Dosis
T01	Solución salina	Ninguno	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml
T02	BVD-2 MLV	Ninguno	2ml, SC cuello izquierdo	0	10	42	IN	5 ml
T03	BVD-1/2 inactivo	PreZent-A	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml
T04	BVD-1/2 inactivo	QCDC	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml
T05	BVD-1/2 inactivo	QCDCR	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml
T06	Extracto inactivo de BVD- 1/2	QCDC	2ml, SC cuello izquierdo	0 y 21	10	42	IN	5 ml

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

Vacunación

Los días de estudio 0 y 21, se vacunaron animales (N = 10/grupo) como se

106

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

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

20 **Exposición**

El día 42 todos los animales se expusieron por vía intranasal a aproximadamente 4 ml (aproximadamente 2 ml por orificio nasal) de una cepa de BVDV-1 no citopática (Cepa NY-1; CVB, USDA, Ames, IA) con una concentración de $5,4 \log^{10}$ DICT₅₀ por dosis de 5 ml.

25 **Observaciones**

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

Recogida de Muestras de Sangre

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

Resultados

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

Tabla 12. Título neutralizante de anticuerpos en suero

102

Grupo		BVDV-1				BVDV-2			
(vacuna, adyuvante)		Día -1	Día 21	Día 41	Día 56	Día -1	Día 21	Día 41	Día 56
		Media MMCG	MMCG	MMCG	MMCG	Media MMCG*	MMCG*	MMCG*	MMCG*
Grupo T01		1,00	1,00	1,00	21,38	1,00	1,01	1,01	371,98
(solución salina, ninguno)		(1-1)	(1-1)	(1-1)	(11-54)	(1-1)	(1-1)	(1-1)	(128-861)
Grupo T02		1,00	1,00	2,75	13,27	1,00	2,14	45,21	454,09
(BVDV-2 MLV, ninguno)		(1-1)	(1-1)	(1-27)	(1-45)	(1-1)	(1-10)	(1-1024)	(91-1218)
Grupo T03		1,00	1,60	35,59	486,49	1,00	6,40	877,75	8950,83
(BVDV-1/2, PreZent-A)		(1-1)	(1-6)	(1-181)	(91-2048)	(1-1)	(1-38)	(38-3444)	(1024-77936)
Grupo T04		1,00	1,20	12,66	1772,17	1,00	8,71	329,56	11611,44
(BVDV-1/2, QCDC)		(1-1)	(1-3)	(5-91)	(512-16384)	(1-1)	(5-16)	(54-861)	(4096-16384)
Grupo T05		1,00	1,12	18,92	2477,87	1,00	5,30	692,34	10517,89
(BVDV-1/2, QCDCR)		(1-1)	(1-3)	(5-91)	(861-6889)	(1-1)	(2-13)	(152-2048)	(3444-46341)
Grupo T06		1,00	1,07	4,60	922,95	1,00	2,43	239,87	9956,50
(extracto de BVDV-1/2, QCDC)		(1-1)	(1-2)	(1-23)	(256-4096)	(1-1)	(1-7)	(64-1448)	(4096-55109)

La Tabla 13 presenta los datos de leucopenia para los días de estudio 43-56. Los resultados de leucopenia el día de estudio demuestran que la vacuna de MLV (T02) prevenia la infección por ese virus específico de la exposición. Una medida de leucopenia es un criterio para autorizar la comercialización de un producto de MLV por la USDA. Sin embargo, para un virus inactivado la leucopenia no es un criterio para la USDA pero como sugieren los datos los adyuvantes de la invención producian una leucopenia de hasta sólo el 20% de los animales mientras que la mayoría de las vacunas de virus inactivados presentan una leucopenia del 100%. Esto indica que los adyuvantes de la invención eran capaces de dirigir una respuesta Th1 fuerte con un antígeno inactivado. Esto es difícil de realizar y rara vez se observa en productos inactivados.

Tabla 13. Leucopenia por Día de Estudio.

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

108

Día de estudio	T01 Solución salina	T02 Vivo Modificado	T03 PreZent A	T04 QCDC	T05 QCDCR	T06 QCDC Extracto
Día 52	2	0	0	0	0	0
Día 53	2	0	0	0	0	0
Día 54	2	0	0	0	0	0
Día 55	2	0	0	0	0	0
Día 56	2	0	0	0	0	0

La Tabla 14 presenta los títulos de neutralización en suero el Día 41 (20 Días después de la segunda vacunación, preexposición). El virus vivo modificado es capaz de desarrollar respuestas de anticuerpo solamente contra el virus exacto en la vacuna.

- 5
- Esto se observa en que el Grupo T02 muestra protección sólo contra BVDV-2. Sin embargo, las vacunas inactivadas con adyuvante de T03 (PreZent-A), T04 (QCDC) y T05 (QCDCR) generaban una fuerte respuesta de anticuerpos pronto al comienzo de la inmunidad y por toda la fase de vida del estudio animal contra un panel serológicamente diverso de BVDV. Esto muestra que estos adyuvantes tenían la
- 10
- capacidad de proporcionar seguridad y eficacia en un modelo de exposición para proteger al ganado no sólo en una exposición homóloga sino heteróloga.

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

Protección Cruzada por Título Serológico de Grupo de Tratamiento, Log 2 de Título de Anticuerpo						
	T01 Solución Salina	T02 Vivo Modificado	T03 PreZent A	T04 QCDC	T05 QCDCR	T06 QCDC Extracto
BVDV1a Promedio	<1	0,8	4,0	2,5	2,9	1,9
BVDV1b Promedio	<1	0,7	3,9	2,4	2,9	1,5
BVDV2 Promedio	<1	4,5	8,8	8,1	8,0	6,5

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

109

se consideraría una vacuna marcadora que es valiosa para la erradicación de estos tipos de enfermedades en poblaciones animales.

Ejemplo 19. *Mycoplasma hyopneumonia* en Suidos

Antecedentes

- 5 El *Mycoplasmal pneumonia* de suidos (MPS) o la neumonía enzoótica es una enfermedad crónica muy extendida caracterizada por tos, retraso del crecimiento y eficacia de la alimentación reducida. El agente etiológico es *M. hyopneumoniae*; sin embargo, la enfermedad de origen natural es el resultado con frecuencia de una combinación de infecciones bacterianas y micoplásmicas.
- 10 El MPS causa pérdidas económicas considerables en todas las áreas en las que se crían cerdos. Encuestas realizadas en diversas localizaciones por todo el mundo indica que las lesiones típicas de los que se observan con MPS aparecen en el 30%-80% de los cerdos al peso de sacrificio. Debido a que las lesiones micoplásmicas pueden resolverse antes de que los cerdos alcancen el peso de sacrificio, la incidencia
- 15 real puede ser mayor. Se ha descrito que la prevalencia de la infección por *M. hyopneumoniae* en la neumonía crónica de suidos oscila del 25%-93%. Cerdos de todas las edades son susceptibles a MPS, pero la enfermedad es más común en cerdos en crecimiento y en terminación. Pruebas actuales indican que *M. hyopneumoniae* se transmite por aerosol o contacto directo con secreciones del tracto
- 20 respiratorio de cerdos infectados. Es posible la transmisión de cerdas a lechones durante la lactación. Una vez establecido, el MPS aparece año tras año en piaras infectadas, variando en gravedad con factores ambientales como la estación, ventilación y concentración de cerdos.

Objetivo de Estudio

- 25 Para comparar la eficacia de vacunas de *Mycoplasma hyopneumoniae*

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

5 Animales

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

15 Tabla 15. Diseño Experimental

Grupo de Tratamiento	Tratamiento	Nº de Animales	Vacunación	Vía	Exposición
T01	Control Negativo 63464-70	12	Día 0 Día 14	Intramuscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M. hyo</i>
T02	DDA/Carbopol/R1005 (DCR)	12	Día 0 Día 14	Intramuscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M. hyo</i>
T03	QAC/ DDA/Carbopol (QCDC)	12	Día 0 Día 14	Intramuscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M.</i>

110

Grupo de Tratamiento	Tratamiento	Nº de Animales	Vacunación	Vía	Exposición
					hyo
T04	QAC/DDA/Carbopol/R1005 (QCDCR)	12	Día 0 Día 14	Intramuscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M. hyo</i>
T05	Bacterina de <i>M. hyo</i>	12	Día 0 Día 14	Intramuscular	Homogeneizado pulmonar de <i>M.</i>
NTX	Ninguno	6	N/A	N/A	N/A

QAC es la abreviatura para QuilA/colesterol.

Productos Veterinarios de Investigación (IVP)

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

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

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

Tabla 16. Productos Veterinarios de Investigación (IVP)

IVP	Grupo de Tratamiento	Dosis de Antígeno	Adyuvante por Dosis	Nº de Dosis	Volumen/Dosis
Control Negativo Solución Salina	T01	N/A	N/A	24	2 ml
DDA/Carbopol/ R1005	T02	<i>M. hyo</i>	Mhyo +DDA/R1005/Carbopol (50/1000µg/dosis/0,075% p/v)	24	2 ml
QAC/ DDA/ Carbopol	T03	<i>M. hyo</i>	Mhyo+ QuilA/colesterol/DDA/Carbopol (100/100/50 microgramos/dosis/0,075% v/v)	24	2 ml
QAC/DDA/ Carbopol/R1005	T04	<i>M. hyo</i>	Mhyo+ QuilA/colesterol/DDA/Carbopol /R1005 diluyente adyuvante (100/100/50 microgramos/dosis/0,075% v/v/1000µg/dosis)	24	2 ml
Bacterina de <i>M. hyo</i>	T05	<i>M. hyo</i>	Amphigen al 5%	24	2 ml

5 Vacunación

Los animales en el grupo de tratamiento NTX no se vacunaron ni se

111

expusieron. A aproximadamente 3 semanas de edad (Día 0 – cuello derecho) y 5 semanas de edad (Día 14 – cuello izquierdo) los animales de T01, T02, T03, T04 y T05 se vacunaron por vía intramuscular, 2 ml por dosis, por un individuo cualificado, a ciegas para el grupo de tratamiento.

5 Material de Exposición

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

10 *hyo* (LI36).

Recogida de Muestras de Sangre

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

15

Peso

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

20 Necropsia

El Día 63, todos los animales supervivientes se eutanasiaron de acuerdo con procedimientos específicos de sitio. Se evaluaron macroscópicamente los pulmones para lesiones características atribuibles a una infección por *M. hyopneumoniae* y se les asignó una puntuación para las lesiones atribuidas a la exposición con *M.*

25 *hyopneumoniae*. Se registraron las puntuaciones de lesiones pulmonares como el

porcentaje de lesiones pulmonares por cada lóbulo pulmonar. El porcentaje de consolidación para cada lóbulo (craneal izquierdo, medio izquierdo, caudal izquierdo, craneal derecho, medio derecho, caudal derecho y accesorio) se puntuaron como un valor real entre 0-100%. El porcentaje para cada lóbulo pulmonar se usó en una
5 fórmula ponderada para el cálculo del porcentaje total de pulmón con lesiones. Se realizó una necropsia de seis (6) animales NTX el Día 34 ó 35 antes de la exposición y se puntuaron sus pulmones para lesiones.

Puntuaciones de Lesión Pulmonar

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

Resultados

Como se indica por los resultados de la Tabla 17 a continuación, los adyuvantes de la invención se comportaban igual de bien que el grupo de tratamiento con adyuvante de aceite T05 que contenía el adyuvante Amphigen®. Típicamente, con
25 una puntuación de lesión pulmonar por debajo de 3 se considera que se ha conferido

112

eficacia por el tratamiento de vacuna. Las combinaciones de los adyuvantes de la invención cumplen estos criterios y QCDCR se comportaba el mejor en puntuación e intervalo entre animales individuales.

Tabla 17. Porcentaje de Pulmón con Lesiones			
	Proporción Señal: Serológica Positiva (S/P) Día 34	MMC	Intervalo
T01 - Placebo	0,00	8,4	0-25,55
T02 - DRC	0,28	2,4	0-20,13
T03 - QCDC	0,15	2,1	0-23,18
T04 QCDCR	0,23	0,5	0-2,7
T05 - RespiSure	0,46	0,6	0-2,33

N = 12 por grupo con la excepción de T05 donde N = 11

5 Ejemplo 20. Virus de la Influenza Aviar Felina (FAIV)

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

Procedimientos y Resultados

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

Se formularon vacunas experimentales usando influenza aviar patógena

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

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

Se evaluaron los animales para reacciones en el sitio de inyección y respuesta serológica a la vacuna. Se eutanasiaron tres animales (dos en T02-H5N2 inactivado y
20 uno en T05-solución salina) debido a hiperoxaluria congénita antes de la exposición. El día de estudio 49, todos los gatos supervivientes se expusieron por la vía intratraqueal a la cepa H5N1 A/Vietnam/1194/04 para evaluar la eficacia de los candidatos a vacunas. Los animales se expusieron a 5,0 ml de material que contenía 10^5 DICT₅₀ que se liberaba justo encima de la bifurcación usando un pequeño catéter que se
25 introdujo en la traquea usando un traqueoscopio. Los animales se observaron y se

113

tomaron muestras durante cinco días después de la exposición. Al final de la fase animal (día de estudio 54) todos los animales supervivientes se eutanasiaron y se realizó una necropsia en cada uno.

Tabla 18. Grupos de Vacuna

Grupo de Tratamiento	Vacuna	Dosis	Vía de Administración	Día de Estudio	Animales
T01	Vacuna de proteína hemaglutinina (HA) recombinante purificada (25.600 unidades de HA/dosis)	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6
T02	Vacuna de virus H5N2 modificado inactivado (25.600 unidades de HA/dosis)	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6
T03	Vacuna de virus H5N1 modificado inactivado (25.600 unidades de HA/dosis)	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6
T04	Placebo – Solo adyuvante	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6

T05	Placebo – Solo solución salina	1,0 ml	Subcutánea	0 y 21	6
-----	-----------------------------------	--------	------------	--------	---

Se recogieron muestras de sangre los días de estudio -14 prevacunación, 0, 21 y 49 para ensayo serológico. Los días de estudio 49 y 54 se recogieron muestras de sangre para ensayo virológico. El día de estudio 42, se tomó una muestra de sangre no programada de todos los animales supervivientes para ensayar la función renal en suero antes de la exposición.

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

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

Se determinaron los títulos virales en muestras de sangre, hisopos orofaríngeos y rectales y en muestras de tejido pulmonar por medio de una PCR TaqMan específica de H5N1. En resumen, se aisló ARN usando un sistema MagnaPure LC con el kit de aislamiento de ácido nucleico total MagnaPure LC (Roche Diagnostics; Almere, Países Bajos), y se detectó el virus influenza A mediante el uso

1/11

de un ensayo de RT-PCR a tiempo real. Los datos se expresaron como unidades de dilución de control (UDC). Se determinaron las UDC a partir de una curva patrón producida a partir de una reserva de virus que se diluyó de forma seriada, sometiéndose cada dilución a una extracción de ácido nucleico y amplificación por PCR TaqMan de la misma forma que las muestras de ensayo.

También se analizaron hisopos orofaríngeos y muestras de tejido pulmonar positivas por RT-PCR por aislamiento de virus y titulación en células de riñón canino Madine Darby (MDCK). Los resultados se expresaron como $\log_{10}$ 50% de la dosis infecciosa en cultivo de tejidos por mililitro o gramo de muestra ($\log_{10}$ DICT₅₀/ml o $\log_{10}$ DICT₅₀/g).

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

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

Se extirpó el pulmón izquierdo en la necropsia y se fijó con formalina

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

5 Resultados

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

Los animales vacunados de T01, T02 y T03 mostraban menos signos clínicos y no mostraron mortalidad después de la exposición en comparación con los animales de control de T04 y T05. En T01, un animal mostraba depresión y esfuerzo respiratorio aumentado dos días después de la exposición. Ninguno de los cinco animales de T01 restantes mostraron ninguna salud anormal después de la exposición. En T02 ($n = 4$) y T03 ($n = 6$), todos los animales permanecieron sanos después de la exposición. En

115

T04 (n = 6) los primeros signos clínicos anormales (depresión y esfuerzo respiratorio aumentado) se observaron en dos animales dos días después de la exposición. Tres días después de la exposición, los seis animales en T04 estaban deprimidos y mostraban un aumento en el esfuerzo respiratorio. Por consiguiente, se tuvieron que eutanasiar dos animales por razones de bienestar. Cuatro días después de la exposición (Día 53), se encontró un animal muerto y los tres animales restantes de T04 presentaban depresión, esfuerzo respiratorio aumentado, protrusión del tercer párpado y descarga nasal y se eutanasiaron por razones de bienestar. En T05 (n = 5), los primeros signos clínicos anormales de depresión y esfuerzo respiratorio aumentado se observaron en un animal un día después de la exposición. Dos días después de la exposición, dos animales más empezaron a mostrar esos signos. Tres días después de la exposición, se encontró un animal muerto y los cuatro animales restantes presentaban depresión, esfuerzo respiratorio aumentado y protrusión del tercer párpado. Un animal se eutanasió posteriormente por razones de bienestar. Cuatro días después de la exposición, el esfuerzo respiratorio había empeorado en uno de los tres animales restantes y otro animal mostraba adicionalmente descarga nasal. Los tres animales restantes se eutanasiaron por razones de bienestar cuatro días después de la exposición (Día 53).

Después de la exposición, las temperaturas medias corporales permanecieron por debajo de 40,0°C en los animales vacunados (T01, T02 y T03). Las temperaturas medias de los animales de control (T04 y T05) se elevaron hasta $\geq 40,0^{\circ}\text{C}$, comenzando un día después de la exposición. Las diferencias en las temperaturas medias corporales entre tratamientos eran significativas ($p = 0,0001$) por análisis de modelo mixto lineal. Los datos de animales individuales mostraban que en una minoría de los animales de T01, T02 y T03, las temperaturas corporales se elevaron hasta

40,0°C y por encima en puntos de tiempo esporádicos el Día 53. En T01, dos animales estaban febriles (intervalo de 40,0 a 40,1°C) en un punto de tiempo. En T02, dos animales estaban febriles (intervalo de 40,0 a 40,3°C) en uno de los tres puntos de tiempo, respectivamente. En T03, unos de los animales estaba febril (intervalo de 40,0 a 40,3°C) en tres puntos de tiempo. En T04 y T05 todos los animales estaban febriles durante al menos doce horas entre los Días 50 y 51.

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

Se ensayaron muestras de plasma tomadas antes y después de la exposición mediante RT-PCR a tiempo real específica de H5N1 para determinar la carga viral. Todos los animales tenían muestras negativas a virus antes de la exposición. Después de la exposición, no se detectó virus en el plasma de animales de T01 y T03. Por el contrario, el 25% (1 de 4) de los animales de T02, 67% (4 de 6) de los animales de T04 y 60% (3 de 5) de animales T05 eran positivos a virus en plasma después de la

116

exposición. Eran significativas diferencias entre tratamientos ($p = 0,0247$) por análisis de modelo mixto lineal.

Se evaluó la eliminación de virus después de la exposición en muestras de hisopos de garganta mediante RT-PCR a tiempo real y titulación de virus y en
5 muestras de hisopos rectales mediante RT-PCR a tiempo real. No se detectó eliminación de virus a partir de la garganta en animales de T01 después de la exposición. En T02, los cuatro animales (100%) eliminaron virus en un punto de tiempo después de la exposición. En T03, en total dos de seis animales (33%) eliminaron virus después de la exposición. En T04, tres de seis animales (50%)
10 eliminaron virus después de la exposición. En T05, cuatro de cinco animales (80%) eliminaron virus después de la exposición. No se tomaron muestras de animales de T04 y T05 cinco días después de la exposición, puesto que todos los animales habían muerto para entonces. Con el fin de un análisis estadístico, sin embargo, los resultados del último ensayo de los animales que murieron o se eutanasiaron antes del
15 final del estudio se pasaron al último día del estudio.

También se usaron muestras de garganta con un resultado positivo por RT-PCR ($\geq 1,8$ UDC) en ensayos de titulación de virus. La titulación de virus confirmó que todas las muestras positivas por RT-PCR contenían virus influenza infecciosa (no se muestran los datos). Los títulos de virus infeccioso eran inferiores en animales
20 vacunados (T02 y T03) que en animales de control (T04 y T05). Estas diferencias eran significativas tres días después de la exposición cuando se comparaban con T02 o T03 con T04 y tres, cuatro y cinco días después de la exposición cuando se comparaban T02 o T03 con T05. Los títulos en animales de T02 y T03 eran de $0,5 \log_{10}$ DICT₅₀. Los títulos observados en T04 oscilaban de 2,3 a $4,3 \log_{10}$ DICT₅₀. Los
25 títulos observados en T05 oscilaban de 1,5 a $3,8 \log_{10}$ DICT₅₀.

Se detectó la eliminación en heces según se evaluó por hisopos rectales en todos los grupos de tratamiento excepto T02 tres o cuatro después de la exposición. Las cantidades de virus detectadas por RT-PCR estaban entre 2,2 a 2,3 log₁₀ UDC en T01, 3,2 log₁₀ UDC en T03, 2,0 a 2,7 log₁₀ UDC en T04 y 2,2 log₁₀ UDC en T05. No
5 había diferencias significativas en el nivel de significación de 0,1 entre tratamientos ninguno de los días después de la exposición.

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

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

Después de la exposición con una cepa de influenza aviar H5N1 altamente
25 patógena, se observaron signos clínicos incluyendo fiebre, mortalidad, viremia,

117

eliminación viral de garganta y en heces, infección vírica del pulmón y patología pulmonar, incluyendo consolidación, en animales de control que habían recibido adyuvante (T04) o solución salina (T05).

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

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

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

Resumen

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

una eliminación de virus significativamente reducida.

Ejemplo 21. Cáncer

Antecedentes

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

Animales

Se adquirieron ratas macho atímicas (Crl: NIH-rnu) de 6-8 semanas de edad de Charles River (Wilmington MA). Las ratas se alojaron en parejas en jaulas
10 microaislantes de policarbonato y se les proporcionó agua *ad libitum* por ósmosis inversa y pienso de rata convencional irradiado; todo el agua y el material de cama estaban autoclavados. Se registraron los pesos corporales dos veces por semana; los animales se mantuvieron durante aproximadamente 7 semanas y se eutanasiaron por inhalación de CO₂ al final del experimento.

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

118

necropsia de todos los animales a los 14 días después de la segunda administración de vacuna.

Vacuna

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

Tabla 19. Grupos de vacuna

Grupo de Tratamiento	Descripción	Número de Animales	Tipos de Células Tumorales (Antígeno)	Formulación	Nº de Vacunaciones	Dosis/Vía
Control Sin Tumor	Control Negativo (solución salina)	5	NA	Placebo de PBS al 0,63%	2	0,2 ml/SC
Tumor (vehículo)	Vehículo sin antígeno	5	QCDC	Placebo de PBS al 0,63%	2	0,2 ml/SC
Tumor (Tratado)	Dosis líquida homogeneizada-vehículo más HepG2	5	QCDCR y 100 µg de antígeno inactivado	Placebo de PBS al 0,63%	2	0,2 ml/SC

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

Preparación de Vacuna

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

10

Preparación de Antígeno

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

Mediciones

Se midió el tamaño tumoral dos veces por semana durante todo el estudio mediante el procedimiento de calibrador, donde el volumen en $\text{cm}^3 = \{[(A \text{ (mm)} \times A \text{ (mm)})/2 \times L \text{ (mm)}]/1000$. Se recogió sangre por sangrado retroorbitario para mediciones de química sérica y biomarcadores. Los animales se anestesiaron ligeramente durante el procedimiento de sangrado con CO_2/O_2 . Se analizaron los criterios de valoración químicos usando un auto-analizador Hitachi 917 (Roche, Indianápolis, IN). Se obtuvo sangre terminal bajo anestesia con CO_2 por punción cardíaca. Se evaluaron los criterios de valoración séricos usando ensayos de ELISA comerciales: Alfa-fetoproteína (R & D Systems, Minneapolis MN) y Albúmina Humana (Bethyl Laboratories, Montgomery TX). Los animales se eutanasiaron mediante inhalación de CO_2 . Los tumores se extirparon, se pesaron y se colocaron en formalina para histología.

Se usó una prueba T de Student para datos independientes para comparar diversos parámetros entre ratas de grupos tratados y de control. Todos los valores se expresaron como media $\pm$ DT y un valor de $p < 0,05$ se consideraba que era estadísticamente significativo.

119

Resultados

Se corrigieron mediciones de peso corporal restando el peso tumoral (basado en los datos de volumen y en la suposición de que 1 cm³ = 1 g). Los datos se analizaron de dos formas: por grupo de tratamiento y por animales que llevan o no

5 llevan tumor. Cuando se comparaban los pesos corporales en animales que llevaban tumor respecto a animales que no llevaban tumor, había una diferencia significativa entre los grupos en el punto de tiempo terminal; no había diferencia en el nivel basal. Aun cuando los pesos corporales no eran significativamente diferentes cuando se comparaban por grupo de tratamiento, probablemente debido a la corta duración del

10 estudio, había una tendencia apreciable hacia un peso corporal disminuido en ambos grupos que llevaban tumor respecto a los controles y una tendencia positiva hacia la recuperación en animales que recibían vacuna cuando se comparaban con los animales que llevaban tumor que recibían vehículo sin antígeno (Tabla 20). Además, también había una correlación razonable entre el porcentaje de cambio en peso

15 corporal a lo largo de la duración del experimento y el volumen de tumor ($r^2 = 0,72$) o peso (extirpado) a la finalización ($r^2 = 0,73$).

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

Peso Corporal (g)			
Día	Control	Tumor	Tumor Tratado
0	242,7 ± 11,4	260,0 ± 16,3	245,0 ± 12,1
6	263,9 ± 13,5	278,1 ± 17,5	258,6 ± 14,6
9	270,1 ± 14,0	280,6 ± 19,2	260,1 ± 15,1
13	280,6 ± 16,2	290,3 ± 20,2	262,0 ± 15,1

16	283,8 ± 15,0	289,0 ± 18,5	261,1 ± 15,3
20	292,6 ± 16,1	284,1 ± 17,3	259,2 ± 14,6
23	299,8 ± 15,6	283,2 ± 17,0	252,7 ± 14,2
27	298,7 ± 14,0	276,1 ± 15,5	259,4 ± 14,4
30	307,6 ± 15,9	274,2 ± 3,4	260,9 ± 14,5
34	317,8 ± 16,2	262,6 ± 14,6	267,8 ± 15,1
37	318,1 ± 16,6	263,1 ± 15,0	268,4 ± 14,8
41	323,4 ± 15,3	264,4 ± 14,7	274,9 ± 15,2
44	328,5 ± 16,6	262,5 ± 14,6	278,3 ± 15,1
48	331,2 ± 17,0	263,0 ± 14,1	281,6 ± 15,0
49	330,5 ± 17,1	262,6 ± 14,4	281,2 ± 14,3

Tamaño Tumoral

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

Tabla 21. Cambio en el tamaño tumoral entre el grupo tratado con vehículo (Tumor) y el grupo tratado con vacuna (Tumor tratado). Las áreas sombreadas indican los datos de cuando se administró vacuna.

120

Tamaño Tumoral (cm³)		
Día	Tumor	Tumor Tratado
6	4,6 ± 2,1	4,7 ± 2,0
9	4,9 ± 2,0	4,8 ± 1,8
13	4,6 ± 1,8	5,0 ± 2,2
16	12,2 ± 2,7	12,3 ± 2,5
20	22,6 ± 3,8	13,4 ± 2,6
23	33,3 ± 4,8	14,1 ± 2,8
27	34,5 ± 4,6	13,8 ± 2,8
30	35,6 ± 4,6	13,5 ± 3,4
34	37,7 ± 8,0	14,1 ± 2,9
37	38,6 ± 10,2	13,7 ± 2,3
41	44,5 ± 12,1	12,5 ± 2,1
44	52,9 ± 13,9	13,0 ± 2,1
48	61,7 ± 15,1	16,9 ± 2,9

Tabla 22. Diferencia en peso tumoral en la necropsia.

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

Ensayos de Suero

5 Se midió la alfa-fetoproteína humana (AFP) por ELISA a diversos puntos de tiempo durante el estudio. Estos datos se usaron junto con los datos de peso corporal

y tamaño tumoral para distribuir aleatoriamente los animales en grupos de tratamiento. Los datos de este estudio y los datos históricos indican que la AFP solo es detectable en animales que llevan tumor. La comparación de los datos longitudinales de AFP en los grupos con tumor de control y tratados indica que la AFP disminuía en los animales
5 tratados después de la primera inyección de vacuna y era mucho menor en ratas tratadas respecto a controles que llevan tumor al final del estudio; $4,78 \pm 3,2$ ng/ml en tratadas con vehículo respecto a $0,97 \pm 2,5$ ng/ml en ratas tratadas con vacuna, respectivamente. Además, la AFP demostraba una correlación tanto con el volumen tumoral como con el peso de tumor extirpado.

10 Se midió la albúmina humana (hALB) por ELISA a diversos puntos de tiempo durante el estudio. Los datos de este estudio y los datos históricos indican que la hALB solo es detectable en animales que llevan tumor. La comparación de los datos de hALB en los grupos con tumor de control y tratados indica que la hALB era inferior en ratas tratadas respecto a controles que llevan tumor al final del estudio (no se
15 muestran los datos). Además, la hALB, de forma similar a la AFP, demostró una correlación tanto con el volumen tumoral como con el peso de tumor extirpado (no se muestran los datos).

Se ensayó un panel químico de suero central a diversos puntos de tiempo durante todo el estudio. El panel incluía: AST, ALT, colesterol, fosfatasa alcalina, GGT,
20 BUN, glucosa, creatinina, bilirrubina total, proteína total, albúmina, globulina y minerales Ca, P, Na, K y Cl. De forma similar al peso corporal, los datos se analizaron de dos formas: por grupo de tratamiento y por animales que llevan o no llevan tumor. Los únicos criterios de valoración en los que se observaron diferencias eran: AST, ALT y colesterol. Para ambas comparaciones, no había diferencias significativas entre
25 grupos en el punto de tiempo basal (no se muestran los datos). Cuando se

121

comparaban los índices químicos en animales que llevaban tumor con animales que no llevaban tumor, había una diferencia significativa entre los grupos en el punto de tiempo terminal con elevaciones en AST, ALT y colesterol en los animales que llevaban tumor (no se muestran los datos).

5 **Conclusión**

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

Ejemplo 22. CpG

10 **Antecedentes**

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

15 **Materiales y Procedimientos**

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

20 **Dosis de Reactivo**

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

Tampón: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (229,32 mg/l), NaCl (1168,00 mg/l) y Na_2HPO_4 (1144,00 mg/l), disuelto en WFI y esterilizado por filtración con un filtro de 0,1 µm.

25 Ovoalbúmina (OVA-Antígeno): 10 µg

CpG ODN: 10 μ g

Colesterol: 1 μ g

Quil A: 1 μ g

DDA: 0,5 μ g

5 Carbopol: 0,0375%

R1005: 50 μ g

Preparación de Vacuna

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

Recogida de Muestras

Se recogieron las siguientes muestras:

Plasma: 4 semanas después de la vacunación de sensibilización (1 semana
20 después de la segunda vacunación de refuerzo)

Linfocitos T Citotóxicos (CTL) (6 semanas después de la vacunación de sensibilización (3 semanas después de la segunda vacunación de refuerzo)

Secreción de citoquinas en sobrenadante (4 semanas después de la vacunación de sensibilización)

122

Sobrenadante de 24 horas (IL-2, IL-4, IL-10, TNF)

Sobrenadante de 72 horas (IFN-g)

Tetrámero (4 semanas después de la vacunación de sensibilización)

5 Células T productoras de citoquinas (6 semanas después de la vacunación de sensibilización)

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

10 **Resultados y Discusión**

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

15 QCDCR/CPG más OVA en conjunto dieron la respuesta de CTL más elevada, sin embargo, no había una diferencia significativa en las respuestas entre este grupo y el colesterol/CPG más OVA (a una proporción 25:1). Se ensayaron sobrenadantes de cultivo de esplenocitos estimulados con OVA (1 mg/ml) para determinar las citoquinas por ELISA. QCDCR en solitario o sus subcomponentes dieron solamente respuestas

20 muy débiles de citoquinas. La combinación de QCDCR o sus subcomponentes con CPG aumentaba la secreción de IL-2 e IFN-g específico de antígeno (citoquinas predispuestas a Th1). QCDCR y CpG eran iguales en potencia para aumentar las respuestas inmunes celulares. La combinación de las dos muestra sinergia. Cuando se analizaron subcomponentes de QCDCR con CpG, las combinaciones con Quil A

25 dieron las mejores respuestas seguido de inclusión de colesterol con CpG.

Tabla 23. Respuestas Relativas de CTL

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

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

5 Ejemplo 23. Coronavirus Canino (CCV)

Ámbito

123

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

Animales

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

Grupos de Tratamiento

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

Tabla 24. Formulaciones de Ensayo.

Artículo		Concentración de Adj.:	
Nº	Formulaciones de Ensayo	µg/2ml (excepto Carbopol)	CCV/dosis
1	PBS	NA	na
2	Antígeno	PBS	6.040
3	AbISCO-100	100	6.040
4	AbISCO-200	100	6.040
5	AbISCO-300	100	6.040
6	Quil-A/Colesterol	100/100	6.040
7	R1005	1000	6.040
8	R1005/Carbopol	1000/0,075%	12.079
9	DDA/R1005/Carbopol	50/1000/0,075%	12.079
10	Quil-A/Colesterol/R1005	100/100/1000	6.040

Artículo		Concentración de Adj.:	
Nº	Formulaciones de Ensayo	µg/2ml (excepto Carbopol)	CCV/dosis
11	Quil-A/ Colesterol/DDA/Carbopol	100/100/50/0,075%	6.040
12	Quil-A/ Colesterol/R1005/Carbopol	100/100/1000/0,075%	12.079
13	Quil- A/Colesterol/DDA/R1005/Carbo pol	100/100/50/1000/0,075%	12.079

Preparación de Vacuna

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

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

La vacuna para los grupos de tratamiento que recibían los productos de

124

AbISCO disponibles en el mercado (Isconova, Suecia) se prepararon de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta. Los productos de AbISCO están basados en saponinas del Quillay y la tecnología de ISCOM usando saponinas altamente purificadas.

5 **Procedimiento de Ensayo: La neutralización sérica de CCV beta**

El suero se inactivó por calor a 56°C durante 30 a 40 minutos. En una placa estéril limpia se realizaron diluciones seriadas de cada suero (sin diluir, 2, 4, 8...) pasando 120 µl a 120 µl de diluyente. Se usaron al menos dos repeticiones de pocillos/dilución. Se usó inicialmente una dilución de 1:16 si era necesario. Se preparó

10 una reserva de exposición de trabajo diluyendo CCV vivo a un nivel que contenía aproximadamente 240 partículas virales en 120 µl. Después, se combinaron 120 µl de cada dilución de suero con 120 µl de solución de virus para un total de 240 µl. La solución se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante 30 a 60 minutos para permitir la neutralización. Después se transfirieron 120 µl

15 de cada serie a monocapas desnudas en espera de células NLFK sembradas de 7 a 12 días antes. Se evaluó la CPE de 4 a 6 días después. La retrotitulación confirmó que de 50 a 316 partículas de virus afectaban a cada monocapa.

Resultados

Tabla 25. Neutralización Sérica

Grupo de Tratamiento	Títulos Neutralizantes en Suero
Solución salina	2
Antígeno solo	64
AbISCO-100	256

Grupo de Tratamiento	Títulos Neutralizantes en Suero
AbISCO-200	23
AbISCO-300	11
Quil-A/Colesterol	315
R	512
RC	11
DRC	630
QCR	1024
QCDC	630
QCRC	724
QCDRC	1448

Resumen

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

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

MS

ratones.

Ejemplo 24. Antígeno de Rotavirus Bovino

Ámbito

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

Animales

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

10 Grupos de Tratamiento

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

15 Tabla 26. Formulaciones de Ensayo

Artículo o N°	Formulaciones de Ensayo	Concentración de Adj.: µg/2ml (excepto Carbopol)	Rotavirus B223/dosis
1	Tampón fosfato	PBS	NA
2	Antígeno	PBS	6,09 µg
3	AbISCO-100	100	6,09 µg
4	AbISCO-200	100	6,09 µg
5	AbISCO-300	100	6,09 µg
6	Quil-A/Colesterol	100/100	6,09 µg

Artículo o N°	Formulaciones de Ensayo	Concentración de Adj.: µg/2ml (excepto Carbopol)	Rotavirus B223/dosis
7	Quil-A/Colesterol/DDA/Carbopol	100/100/50/0,075 %	6,09 µg
8	R1005	1000	6,09 µg
9	Quil-A/Colesterol/R1005	100/100/1000	6,09 µg
10	Quil-A/Colesterol/DDA/R1005/Carbopol	100/100/50/1000 /0,075%	6,09 µg
11	Quil-A/Colesterol/DDA/Carbopol	100/100/50 /0,075%	12,18 µg
12	Quil-A/Colesterol/Carbopol/R1005	100/100/0,075%/1000	12,18 µg
13	Quil-A/Colesterol/DDA/R1005/Carbopol	100/100/50/1000/0,075 %	12,18 µg
14	DDA/R1005/Carbopol	50/1000/0,075%	12,18 µg
15	R1005/Carbopol	1000/0,075%	12,18 µg

Preparación de Vacuna

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

Se añadió un expansor plasmático de solución salina a un recipiente y se inició la homogeneización. Se añadió Rotavirus Bovino inactivado a una concentración que

126

se muestra en la Tabla 26. Se añadió Quil A a la concentración enumerada en la Tabla 26. Después se añadió la solución de colesterol/etanol con homogeneización continua. La solución de DDA/etanol se añadió después durante la homogeneización. La mezcla se microfluidificó a 68950000 pascales (10.000 psi). Después se añadió Carbopol® con mezcla y el pH se ajustó a 6,8 a 7,2. Se añadió después glicolípido Bay R1005® con mezcla. Por último, la composición se llevó a un volumen final con el expansor plasmático de solución salina.

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

Resultados

Tabla 27. Títulos de Neutralización en Suero

Formulaciones de Ensayo	Títulos Neutralizantes en Suero (SN)
Solución salina	≤3
Antígeno solamente	23
AbISCO-100	16
AbISCO-200	16
AbISCO-300	14
Quil-A/Colesterol	14
QCDC	16
R	10

Formulaciones de Ensayo	Títulos Neutralizantes en Suero (SN)
QCR	16
QCDCR	16
QCDC	3
QCCR	5
QCDCR	39
DRC	20
RC	3

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

Los efectos combinados de los adyuvantes formulados con Rotavirus Bovino y teniendo en cuenta las propiedades químicas de cada componente han proporcionado

5 propiedades excelentes para un adyuvante de vacuna (véase la Tabla 27).

Aunque varias de las formulaciones adyuvantes proporcionaban niveles similares de títulos de anticuerpos neutralizantes en suero, el adyuvante QCDCR proporcionaba el mayor nivel.

Ejemplo 25. Virus Influenza Canino

10 **Ámbito/Diseño de Estudio**

Se empleó un modelo canino usando virus influenza canino (CIV) y nuevos adyuvantes de combinación para evaluar el rendimiento de adyuvante con el componente antigénico dado.

Este estudio tenía un diseño en bloques completamente aleatorizado (véase la

15 Tabla 28). Los animales se clasificaron por fecha de nacimiento para formar bloques de un tamaño de 5. Dentro de un bloque los animales se asignaron aleatoriamente a

127

tratamientos. Los animales en el mismo bloque se asignaron aleatoriamente a establos (jaulas) localizadas próximas entre sí. Los animales tenían buena salud sin historia de hipersensibilidad a vacunas disponibles en el mercado. Los animales no habían recibido vacunas contra CIV.

5 **Tabla 28. Diseño de Estudio**

Grupo de Trat.	Nº de Animales	Tratamiento	Día	Dosis	Vía
T01	8-10	Adyuvante Placebo (control neg.)	0	1 ml	SQ
T02	8-10	Formulación de estudio de seguridad de campo (control pos.)	0	1 ml	SQ
T03	8-10	QCDC dosis alta	0	1 ml	SQ
T04	8-10	QCDC dosis media	0	1 ml	SQ
T05	8-10	QCDC dosis baja	0	1 ml	SQ

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

Tabla 29. Composición de Vacuna

T01	Adyuvante placebo, control negativo
Formulación	Quil A-colesterol-DDA-carbopol (20/20/10/0,075)
T02	
Nombre Genérico	serie de seguridad de campo de CIV, control positivo
Formulación	Cepa IOWA-05 de influenza (H3N8) a 760 HA, combinada con Rehydragel LV al 5%
T03	
Nombre Genérico	CIV + QCDC de alta dosis

Formulación	Cepa Iowa-05 de influenza (H3N8) a 760 HA, combinada con Quil A-colesterol-DDA-carbopol (20/20/10/0,075)
T04	
Nombre Genérico	CIV + QCDC dosis media
Formulación	Cepa Iowa-05 de influenza (H3N8) a 760 HA, combinada con Quil A-colesterol-DDA-carbopol (10/10/10/0,075)
T05	
Nombre Genérico	CIV + QCDC de baja dosis
Formulación	Cepa Iowa-05 de influenza (H3N8) a 760 HA, combinada con Quil A-colesterol-DDA-carbopol (5/5/10/0,075)

Preparación de Vacuna

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

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

Ensayo

178

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

Resultados/Resumen

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

Tabla 30. Títulos de HAI

Tratamiento	Media Geo. de HAI	Media Geo. de HAI
	Día 42	Día 180
T01 (placebo)	8	8
T02 (control pos., alum.)	172	32
T03 (dosis baja)	65	41
T04 (dosis media)	65	32
T05 (dosis alta)	216	69

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

Títulos de anticuerpo mayores se asocian generalmente con mejor protección
de vacunas. Generalmente, tanto el adyuvante de aluminio (T02) como los adyuvantes
de la invención (T03, T04, y T05) causaban un aumento en los títulos de HAI pero la
respuesta causada por los adyuvantes de la invención era superior con títulos mayores
15 a día 180 en el grupo de alta dosis (T05). Los títulos para las dosis baja y media de los
adyuvantes de la invención eran equivalentes a los de la vacuna tradicional que
contiene aluminio para influenza. Además, debido a que los adyuvantes de la

invención proporcionan una respuesta inmune de T auxiliares 1 mientras que el aluminio no, se espera que la duración de la inmunidad sea mayor con un mecanismo de memoria más rápido.

LISTA DE SECUENCIAS

5	
	<110> Dominowski, Paul J.
	Mannan, Ramasamy M.
	Krebs, Richard L.
	Thompson, James R.
10	Childers, Tedd A.
	Olsen, Mary K.
	Yancey, Jr., Robert J.
	Weeratna, Risini
	Zhang, Shucheng
15	Bagi, Cedo M.

<120> NUEVAS COMPOSICIONES DE ADYUVANTES

	<130> PC33245A
20	
	<150> US 61/076.232
	<151> 27-06-2008
	<150> US 61/214.557
25	<151> 24-04-2009

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> ninguno

10

<400> 1

ggtagtgcta agcgtgttat

20

<210> 2

15

<211> 20

<212> ADN

<213> ninguno

<400> 2

20

acctctgtca tctctocaca

20

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

25

<213> ninguno

130

-136-

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1. Una composición inmunogénica que comprende una formulación de adyuvante y una cantidad inmunológicamente eficaz de un componente antigénico, en la que la formulación de adyuvante comprende una saponina, un esteroles, un compuesto de amonio cuaternario y un polímero.

10

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que la saponina está presente en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 5.000 μg por dosis, el esteroles está presente en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 5.000 μg por dosis, el compuesto de amonio cuaternario está presente en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 5.000 μg por dosis y el polímero está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,0001% en volumen respecto a volumen (v/v) a aproximadamente el 75% v/v.

15

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que la saponina es Quil A o una fracción purificada de la misma, el esteroles es colesterol, el compuesto de amonio cuaternario es bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) y el polímero es ácido poliacrílico.

20

4. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende además

131

un estimulante de Th2.

5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, en la que el estimulante de Th2 es un glicolípido.

5

6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que el estimulante de Th2 es acetato de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanamida.

10 7. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en la que el glicolípido está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10 mg por dosis.

8. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho
15 componente antigénico comprende un virus inactivado.

9. Un procedimiento para preparar una composición inmunogénica de la reivindicación 1 que comprende:

- 20
- a) preparar una composición del componente antigénico en un tampón;
 - b) añadir la saponina a la composición de la etapa a;
 - c) añadir el esteroil a la composición de la etapa b;
 - d) añadir el compuesto de amonio cuaternario a la composición de la etapa c;
 - e) añadir el polímero a la composición de la etapa d.

25 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la saponina es Quil A o una

fracción purificada de la misma, el esteroles es colesterol, el compuesto de amonio cuaternario es DDA y el polímero es ácido poliacrílico.

11. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además una etapa de
5 homogeneización de la composición de la etapa a y la continuación de la
homogeneización durante cada una de las etapas a a d.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además una etapa
que comprende microfluidificar la composición de la etapa d.
- 10 13. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además una etapa f)
de adición a la composición de la etapa e, un estimulante de Th2.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el estimulante de Th2 es un
15 glicolípido.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el estimulante de Th2 es
acetato de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanamida.
- 20 16. Una composición de vacuna que comprende una formulación de adyuvante y
una cantidad terapéuticamente eficaz de un componente antigénico, en la que la
formulación de adyuvante comprende una saponina, un esteroles, un compuesto de
amonio cuaternario y un polímero.
- 25 17. La composición de vacuna de la reivindicación 16, en la que la saponina está

132

presente en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 5.000 μg por dosis, el esteroide está presente en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 5.000 μg por dosis, el compuesto de amonio cuaternario está presente en una cantidad de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 5.000 μg por
5 dosis y el polímero está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,0001% v/v a aproximadamente el 75% v/v.

18. La composición de vacuna de la reivindicación 16, en la que la saponina es Quil A o una fracción purificada de la misma, el esteroide es colesterol, el compuesto de
10 amonio cuaternario es DDA y el polímero es ácido poliacrílico.

19. La composición de vacuna de la reivindicación 16, que comprende además un estimulante de Th2.

15 20. La composición de vacuna de la reivindicación 19, en la que el estimulante de Th2 es un glicolípido.

21. La composición de vacuna de la reivindicación 20, en la que el estimulante de Th2 es acetato de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-*N*-
20 octadecildodecanamida.

22. La composición de vacuna de la reivindicación 20, en la que el glicolípido está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10 mg por dosis.

23. La composición de vacuna de la reivindicación 16, en la que dicho componente antigénico comprende un virus inactivado.
- 5 24. Un procedimiento de preparación de una composición de vacuna de la reivindicación 16, que comprende:
- a) preparar una composición del componente antigénico en un tampón;
 - b) añadir la saponina a la composición de la etapa a;
 - c) añadir el estero1 a la composición de la etapa b;
 - 10 d) añadir el compuesto de amonio cuaternario a la composición de la etapa c;
 - e) añadir el polímero a la composición de la etapa d.
25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que la saponina es Quil A o una fracción purificada de la misma, el estero1 es colesterol, el compuesto de amonio cuaternario es DDA y el polímero es ácido poliacrílico.
- 15 26. El procedimiento de la reivindicación 24, que comprende además una etapa de homogeneización de la composición de la etapa a y la continuación de la homogeneización durante cada una de las etapas a a d.
- 20 27. El procedimiento de la reivindicación 26, que comprende además una etapa que comprende microfluidificar la composición de la etapa d.
28. El procedimiento de la reivindicación 24, que comprende además una etapa f) de adición a la composición de la etapa e, un estimulante de Th2.
- 25

133

29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que el estimulante de Th2 es un glicolípido.

5 30. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que el estimulante de Th2 es acetato de *N*-(2-desoxi-2-L-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-*N*-octadecildodecanamida.

31. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende además un aceite.

10

32. La composición de vacuna de la reivindicación 16, que comprende además un aceite.

33. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la
15 que el componente antigénico comprende el virus de la leucemia felina.

34. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el que el componente antigénico comprende el virus de la leucemia felina.

20

35. Una composición de vacuna de cualquiera de la reivindicaciones 16 a 23, en la que el componente antigénico comprende el virus de la leucemia felina.

36. La composición de vacuna de la reivindicación 35, en la que el virus de la
25 leucemia felina está presente en una cantidad de aproximadamente 100 ng/ml a

aproximadamente 350.000 ng/ml, ambos inclusive.

37. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que el componente antigénico comprende gp70 producida por una línea celular FL-74 persistentemente infectada con la cepa del virus de la leucemia felina KT-FelV-UCD-1.

38. Un procedimiento de tratamiento de un felino frente a una infección causada por el virus de la leucemia felina que comprende administrar al felino la composición de vacuna de la reivindicación 35.

10

39. Un uso de la vacuna de la reivindicación 35 en la preparación de un medicamento para tratar a un felino frente a una infección causada por el virus de la leucemia felina.

15 40. Una vacuna de coccidiosis aviar para la administración *in ovo* que comprende:
(a) un adyuvante que comprende Quil A o una fracción purificada del mismo incluyendo QS21, colesterol, CARBOPOL, DDA y R1005; y
(b) un antígeno protozoario seleccionado de (1) una o más proteínas expresadas de forma recombinante, (2) una o más proteínas u otras macromoléculas aisladas a partir
20 de dicho protozoo por medios convencionales y (3) extractos celulares completos o preparaciones de dicho protozoo.

41. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 31, en la que el componente antigénico comprende una bacterina de la cepa J-5 de
25 *Escherichia coli*.

pk

42. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el que el componente antigénico comprende una bacterina de la cepa J-5 de *Escherichia coli*.

5

43. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 y 32, en la que el componente antigénico comprende una bacterina de la cepa J-5 de *Escherichia coli*.

10 44. Un procedimiento de tratamiento de un bovino frente a una infección causada por *Escherichia coli* que comprende administrar al bovino la composición de vacuna de la reivindicación 43.

15 45. Un uso de la composición de vacuna de la reivindicación 43 en la preparación de un medicamento para tratar a un bovino frente a una infección causada por *Escherichia coli*.

46. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el componente antigénico comprende el virus de la diarrea viral bovina (BVDV).

20

47. La composición inmunogénica de la reivindicación 46, en la que el componente antigénico comprende BVDV tipo 1 (BVDV-1) y BVDV tipo 2 (BVDV-2).

25 48. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el que el componente antigénico comprende BVDV.

49. El procedimiento de la reivindicación 48, en el que el componente antigénico comprende BVDV-1 y BVDV-2.
- 5 50. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en la que el componente antigénico comprende BVDV.
51. La composición de vacuna de la reivindicación 50, en la que el componente antigénico comprende BVDV-1 y BVDV-2.
- 10
52. Un procedimiento de tratamiento de un bovino frente a una infección causada por BVDV que comprende administrar al bovino la composición de vacuna de la reivindicación 50 o de la reivindicación 51.
- 15 53. Un uso de la composición de vacuna de la reivindicación 50 o la reivindicación 51 en la preparación de un medicamento para tratar a un bovino frente a una infección causada por BVDV.
- 20 54. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el componentes antigénico comprende *Mycoplasma hyopneumonia* (*M. hyopneumonia*).
- 25 55. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el que el componente antigénico comprende *M. hyopneumonia*.

56. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en la que el componente antigénico comprende *M. hyopneumonia*.

5 57. Un procedimiento de tratamiento de un suido frente a una infección causada por *M. hyopneumonia* que comprende administrar al suido la composición de vacuna de la reivindicación 56.

58. Un uso de la composición de vacuna de la reivindicación 56 en la preparación
10 de un medicamento para tratar a un suido frente a una infección causada por *M. hyopneumonia*.

59. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el componente antigénico comprende el virus de la influenza felina (FIV).
15

60. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en la que el componente antigénico comprende FIV.

61. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en
20 la que el componente antigénico comprende FIV.

62. Un procedimiento de tratamiento de un felino frente a una infección causada por FIV que comprende administrar al felino la composición de vacuna de la reivindicación 61.

25

63. Un uso de la composición de vacuna de la reivindicación 61 en la preparación de un medicamento para tratar a un felino frente a una infección causada por FIV.
64. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la
5 que el componente antigénico comprende un antígeno de cáncer.
65. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el que el componente antigénico comprende un antígeno de cáncer.
- 10
66. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en la que el componente antigénico comprende un antígeno de cáncer.
67. Un procedimiento de tratamiento de un sujeto frente a un cáncer que
15 comprende administrar al sujeto la composición de vacuna de la reivindicación 66.
68. Un uso de la composición de vacuna de la reivindicación 66 en la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto frente a un cáncer.
- 20
69. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un ORN/ODN.
70. La composición inmunogénica de la reivindicación 69, en la que el ORN/ODN es CpG.

71. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, que comprende además una etapa de adición de un ORN/ODN a la composición de la etapa a.

5 72. El procedimiento de la reivindicación 71, en el que el ORN/ODN es CpG.

73. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, que comprende además un ORN/ODN.

10 74. La composición de vacuna de la reivindicación 73, en la que el ORN/ODN es CpG.

75. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el componente antigénico comprende un coronavirus canino (CCV).

15

76. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el que el componente antigénico comprende CCV.

20 77. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en la que el componente antigénico comprende CCV.

78. Un procedimiento de tratamiento de un cánido frente a una infección causada por CCV que comprende administrar al cánido la composición de vacuna de la reivindicación 77.

25

79. Un uso de la composición de vacuna de la reivindicación 77 en la preparación de un medicamento para tratar a un cánido frente a una infección causada por CCV.
80. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la
5 que el antígeno comprende un rotavirus bovino.
81. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, en el que el componente antigénico comprende un rotavirus bovino.
- 10
82. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en la que el componente antigénico comprende un rotavirus bovino.
83. Un procedimiento de tratamiento de un bovino frente a una infección causada
15 por un rotavirus bovino que comprende administrar al bovino la composición de vacuna de la reivindicación 82.
84. Un uso de la composición de vacuna de la reivindicación 82 en la preparación de un medicamento para tratar a un bovino frente a una infección causada por un
20 rotavirus bovino.
85. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el componente antigénico comprende un virus influenza canino (CIV).
- 25 86. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 y cualquiera de

137

las reivindicaciones 24 a 30, en el que el componente antigénico comprende CIV.

87. Una composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en la que el componente antigénico comprende CIV.

5

88. Un procedimiento de tratamiento de un cánido frente a una infección causada por CIV que comprende administrar al cánido la composición de vacuna de la reivindicación 87.

10 89. Un uso de la composición de vacuna de la reivindicación 87 en la preparación de un medicamento para tratar a un cánido frente a una infección causada por CIV.

90. Un procedimiento de diferenciación de un animal infectado de forma natural con BVDV de un animal vacunado con la composición de vacuna de la reivindicación 15 50 ó 51, comprendiendo dicho procedimiento obtener una muestra de un animal de ensayo y medir los niveles de proteína E2 y proteínas NS2/3 en dicha muestra, en el que la ausencia de proteínas NS2/3 indica que el animal se vacunó con dicha composición de vacuna.

RESUMEN

Esta invención se refiere a formulaciones de adyuvante que comprenden diversas combinaciones de triterpenoides, esteroides, inmunomoduladores, polímeros y
5 estimuladores de Th2; procedimientos para preparar las composiciones de adyuvante; y el uso de las formulaciones de adyuvante en composiciones inmunogénicas y de vacunas con diferentes antígenos. Esta invención se refiere además al uso de las formulaciones en el tratamiento de animales.

138

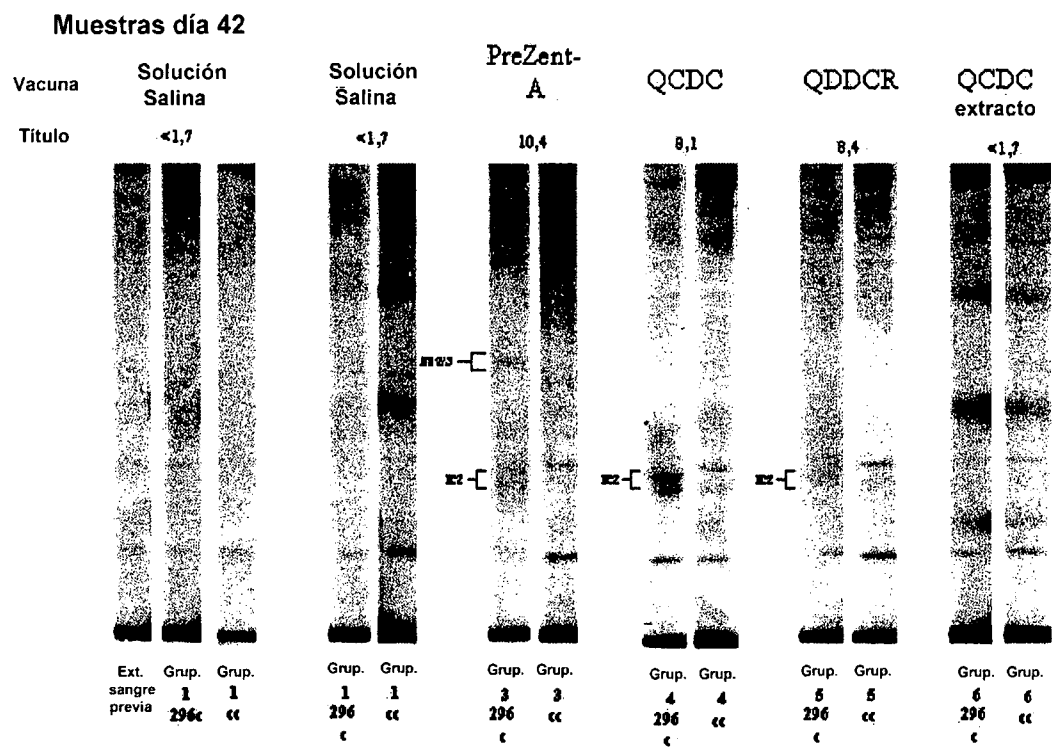


Figura 1. Respuesta contra Proteína NS2/3 de BVDV

100

sql

SEQUENCE LISTING
<110> Dominowski, Paul J.
Mannan, Ramasamy M.
Krebs, Richard L.
Thompson, James R.
Childers, Tedd A.
Olsen, Mary K.
Yancey, Jr., Robert J.
Weeratna, Risini
Zhang, Shucheng
Bagi, Cedo M.
<120> NOVEL ADJUVANT COMPOSITIONS
<130> PC33245A
<150> US 61/076,232
<151> 2008-06-27
<150> US 61/214,557
<151> 2009-04-24
<160> 8
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> none
<400> 1
ggtggtgcta agcgtgttat 20
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> NONE
<400> 2
acctctgtca tctctccaca 20
<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> NONE
PC33245A
Page 90
<400> 3
agctgacggt ggacctatta tt 22
<210> 4
<211> 17
<212> DNA
<213> NONE
<400> 4
ggctttgcgc tggattc 17
<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> NONE
<400> 5
tgggcatcaa gggctaca 18
<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> NONE
<400> 6
tcgggttggt tggtgatg 18
<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> NONE
<400> 7
tctgttcttc tgttctgagt gatg 24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> NONE
<400> 8
agtgatttgc ttctgtcttt ggta 24

sql



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
30 December 2009 (30.12.2009)



(10) International Publication Number
WO 2009/156960 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/012 (2006.01)

Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **ZHANG, Shucheng** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US).

(21) International Application Number:

PCT/IB2009/052724

(74) Agents: **RICHARDSON, Peter C.** et al.; Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(22) International Filing Date:

24 June 2009 (24.06.2009)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/076,232 27 June 2008 (27.06.2008) US
61/214,557 24 April 2009 (24.04.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BAGI, Cedo Martin** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 (US). **CHILDERS, Tedd Alan** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **DOMINOWSKI, Paul Joseph** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **KREBS, Richard Lee** [US/US]; Pfizer Inc. 601 West Cornhusker Highway, Lincoln, Nebraska 68521 (US). **MANNAN, Ramasamy Mannar** [US/US]; 550 Liberty Street #2403, Braintree, Massachusetts 02184 (US). **OLSEN, Mary Kathryn** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **THOMPSON, James Richard** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 (US). **WEERATNA, Risini Dhammika** [CA/CA]; Pfizer Vaccines Research Ottawa, Laboratories 340 Terry Fox Drive, Suite 200, Ottawa, Canada, Ontario K2K 3A2 (CA). **YANCEY, Robert John, Jr.** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road,

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:

17 June 2010

(54) Title: NOVEL ADJUVANT COMPOSITIONS

(57) Abstract: This invention relates to adjuvant formulations comprising various combinations of thterpenoids, sterols, immunomodulators, polymers, and Th2 stimulators; methods for making the adjuvant compositions; and the use of the adjuvant formulations in immunogenic and vaccine compositions with different antigens. This invention further relates to the use of the formulations in the treatment of animals.

WO 2009/156960 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/052724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/39 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/012

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/067031 A1 (PFIZER PROD INC [US]; DOMINOWSKI PAUL JOSEPH [US]; FRANTZ JOSEPH CLAUD) 12 August 2004 (2004-08-12) p. 1, 3, 4, 8, 9, examples -----	1-89
X	US 2005/220814 A1 (DOMINOWSKI PAUL J [US] ET AL DOMINOWSKI PAUL JOSEPH [US] ET AL) 6 October 2005 (2005-10-06) 0022, 0025, 0028, 0032, 0041, 0042, 0061, 0065-0067, 0092, 0095-0100, 0126, examples 11-13 -----	1-89
X	WO 03/003941 A2 (PFIZER PROD INC [US]; KEICH ROBIN LEE [US]; SABBADINI LISA GRACE [US]) 16 January 2003 (2003-01-16) p. 1, l. 4-10; p. 3, l. 25-32; p. 7, l. 20-p. 8, l. 3; examples -----	1-89

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 2010

Date of mailing of the international search report

29/04/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Renggli, John

142

International application No.
PCT/IB2009/052724

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see ANNEX

- Remark on Protest
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-89

An immunogenic composition comprising an adjuvant formulation and an immunologically effective amount of an antigen component, wherein the adjuvant formulation comprises a saponin, a sterol, a quaternary ammonium compound, and a polymer,
a method of production thereof, the use of the said composition with various antigens, optionally with additional adjuvants like glycolipid or CpG.

2. claim: 90

A method of differentiating an animal naturally infected with BVDV from an animal vaccinated with the vaccine composition of either claim 50 or 51, said method comprising obtaining a sample from a test animal, and measuring the levels of E2 protein and NS2/3 proteins in said sample, wherein the absence of NS2/3 proteins indicates that the animal was vaccinated with said vaccine composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/052724

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004067031	A1	12-08-2004	AT 395077 T 15-05-2008
		AU 2004208556 A1 12-08-2004	
		BR PI0407032 A 17-01-2006	
		CA 2513352 A1 12-08-2004	
		CN 1835767 A 20-09-2006	
		EP 1592444 A1 09-11-2005	
		ES 2303046 T3 01-08-2008	
		HR 20050660 A2 28-02-2006	
		JP 2006515024 T 18-05-2006	
		JP 2007161718 A 28-06-2007	
		KR 20050103215 A 27-10-2005	
		MX PA05008051 A 21-09-2005	
		UY 28171 A1 31-08-2004	
		ZA 200506073 A 31-05-2006	
US 2005220814	A1	06-10-2005	NONE
WO 03003941	A2	16-01-2003	AT 412426 T 15-11-2008
		BG 108546 A 28-02-2005	
		BR 0210804 A 03-05-2005	
		CA 2451626 A1 16-01-2003	
		CN 1551781 A 01-12-2004	
		CN 101524532 A 09-09-2009	
		CZ 20033466 A3 15-06-2005	
		DK 1474067 T3 08-12-2008	
		EP 1474067 A2 10-11-2004	
		EP 2027873 A1 25-02-2009	
		ES 2312580 T3 01-03-2009	
		HR 20031079 A2 31-10-2005	
		IS 7076 A 15-12-2003	
		JP 2005515162 T 26-05-2005	
		MA 27047 A1 20-12-2004	
		MX PA03011599 A 07-03-2005	
		NZ 530106 A 29-06-2007	
		OA 12638 A 15-06-2006	
		PA 8549701 A1 24-01-2003	
		PT 1474067 E 14-11-2008	
		SK 15792003 A3 08-09-2005	
		UA 78707 C2 25-04-2007	
		UY 27366 A1 30-04-2003	
		YU 102203 A 25-05-2006	



No. 10-160889- -00000-0000

Fecha: 2010-12-22 13:09:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 143

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art.33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 160889
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/052724
	Fecha inicio fase nacional	27/01/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	003901

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

04 MAR. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 160889
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/052724
	Fecha inicio fase nacional	27/01/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	03902

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

04 MAR. 2011