

C y

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-058153- -00005-0000

Fecha: 2013-12-04 16:31:53

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 523 RESPUESTA

Folios: 79

Señor Director
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 523

Referencia : Expediente No. **12.058.153**
Asunto : Solicitud de patente para: **NUEVAS COMBINACIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN ADYUVANTES QUE CONTIENEN SAPONINA**
Solicitante : **MERIAL LIMITED**
Fecha de solicitud : 10 de abril de 2012.

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. **16691** notificado por fijación en lista el 10 de septiembre de 2013.

2. Mediante oficio No. **16691** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio se refieren a la excepción a la patentabilidad de las reivindicaciones 17-20, a la claridad del pliego reivindicatorio y al nivel inventivo de las reivindicaciones 1-16 en vista de los documentos D1: WO2005009462 y D2: WO9633739.

3. **Respuesta a las objeciones**

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desea presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax In U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

3.1 Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones, junto con un nuevo capítulo descriptivo.

3.1.1 Se han introducido las siguientes modificaciones al capítulo reivindicatorio:

- Se eliminaron las reivindicaciones 17-20.
- Se modificaron las reivindicaciones 1-9, 15 y 16.
- Se reenumeraron las reivindicaciones.

Se modificó el capítulo reivindicatorio para eliminar los términos “alto”, “bajo”, “opcional” y “aproximadamente” que fueron objetados por el Examinador como imprecisos, de manera tal que ahora el pliego reivindicatorio es claro. También se eliminaron las referencias a los parámetros de HBL y a la temperatura de inversión de fase, por lo que la composición de la presente invención quedo exclusivamente definida por sus ingredientes y proporciones. Por último, también se limitaron los términos “surfactante iónico hidrofílico”, “surfactante lipofílico no iónico y “surfactante hidrofílico no iónico” por la lista específica de sus componentes, de manera tal que ya no están definidos por su funcionalidad.

Con respecto a la objeción de falta de concisión del capítulo reivindicatorio por falta de soporte en la descripción, deseamos poner en presente que teniendo en cuenta las limitaciones realizadas al pliego reivindicatorio, la presente invención como se encuentra actualmente reclamada se encuentra definida de forma clara y precisa en la descripción de la presente solicitud y por lo tanto, el alcance del pliego reivindicatorio también se encuentra claramente definido. Lo anterior, si se tiene en cuenta que de conformidad con lo señalado en el artículo 51 de la Decisión 486 la descripción de una solicitud sirve para interpretar las reivindicaciones: *“El alcance de la protección conferida*

por la patente estará determinado por el tenor de las reivindicaciones. La descripción y los dibujos, o en su caso, el material biológico depositado, servirán para interpretarlas". Adicionalmente, el "INSTRUCTIVO EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD" de su Despacho también establece que "Las reivindicaciones son usualmente generalizaciones del contenido divulgado en la descripción. La generalización no puede ir más allá del alcance de ese contenido divulgado en la descripción. Una generalización es permitida siempre y cuando cubra todas las variantes, o modos específicos divulgados en la descripción (...) y si uno o más términos específicos u opciones incluidos en los términos genéricos no resuelven el problema técnico con la solución propuesta ni logra los mismos efectos técnicos, entonces el examinador debe concluir que no está soportada por la descripción". Se desea resaltar que los componentes que se divulgan en la presente solicitud están debidamente soportados en la descripción ya que son similares en su estructura y en su actividad a los ejemplos ensayados, que han sido mencionados y considerados en la descripción y que logran el mismo efecto técnico de aquellos ensayados. De esta manera, la presente solicitud como se ha limitado cumple con lo anterior, de modo que, el capítulo reivindicatorio si tiene concisión.

Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio y las anteriores aclaraciones, todas las objeciones formuladas por el Examinador en cuanto a la claridad y concisión del pliego reivindicatorio se ven superadas. En consecuencia, teniendo en cuenta que se han superado las objeciones formuladas por su Despacho, respetuosamente se solicita aceptar este nuevo pliego reivindicatorio y considerar en el próximo análisis de patentabilidad.

3.1.2 Se ha corregido la Tabla 13 en el nuevo capítulo descriptivo debido a un error obvio e involuntario en la tabla 13 como se presentó en la solicitud inicial. Una persona versada en la materia reconocería inmediatamente el error y la corrección obvia del mismo, en parte porque la cantidad de saponina es reclamada como 2.48 mL para cada vacuna B, C y D y también porque no habría alguna comparación significativa si las vacunas B y C de hecho tuvieran "0" mg/dosis de saponina (como se había escrito en la tabla 13 presentada originalmente). Actualmente se corrigieron estas cantidades para citar

que la cantidad de saponina de las vacuna B y C es de "0.7" mg/dosis. Amablemente, solicitamos aceptar este nuevo capítulo descriptivo, así, un técnico versado en la materia entenderá la descripción de forma inequívoca y podrá reproducir la invención adecuadamente.

3.2 Argumentos a favor del nivel inventivo de la presente solicitud

El artículo 18 de la Decisión 486 señala lo siguiente:

Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.

Consecuentemente, una invención se considerará inventiva si la misma no hubiese resultado obvia a partir del arte previo, para una persona del oficio normalmente versada en la materia. Esto a su vez implica que el Examinador a cargo de esta evaluación debe colocarse en el momento exacto en el que el inventor buscaba resolver el problema técnico contemplado en la solicitud y para el cual poseía la literatura y el conocimiento disponibles en dicho momento.

Siguiendo entonces los lineamientos de la Jurisprudencia aplicable al análisis del nivel inventivo de una solicitud de patente, se considera que una anterioridad o una combinación de dos anterioridades puede afectar dicho requerimiento de patentabilidad, si una persona medianamente versada en la materia encuentra enseñanzas o sugerencias claras que, a partir de un conocimiento medio en dicho campo, le permitan llegar de manera obvia a la invención reivindicada. Adicionalmente se considera que una mejora sustancial, un efecto inesperado o una ventaja con respecto al arte previo es un indicio de nivel inventivo, por cuanto aporta un salto tecnológico en la regla técnica.

La presente solicitud si tiene nivel inventivo

En vista de las modificaciones presentadas al pliego reivindicatorio, el solicitante respetuosamente rechaza la objeción del Examinador de nivel inventivo, basado en que el

documento D1 no enseña formulaciones que comprenden todos los elementos que se reclaman actualmente. Específicamente, el documento D1 no enseña:

- 1). 0.7 mg/dosis a 2.7 mg/dosis de saponina;
- 2). 0.065% p/v a 0.42% p/v de hidróxido de aluminio;
- 3). una composición inmunológica que es estable por al menos 24 meses.

Dirigimos la atención del Examinador a la copia de la respuesta sometida ante la oficina de patentes Europea en enero 10 del 2010, como apoyo de la solicitud de la patente Europea con respecto al documento D1 (correspondiente al documento D1 de la acción oficial no. 16691). "TS6" en la emulsión inventiva del documento D1 (Ejemplo 1) y su estabilidad vs. tiempo se reproduce en la Tabla 1 presentada a continuación. Los datos indican que las formulaciones de D1 comienzan a descomponerse (es decir, se deteriora) entre los 14 y 16 meses. Estos datos están en total acuerdo con el documento D1, el cual menciona en la página 21 "como se prepara en la presente, las vacunas de TS6 son estables por al menos un año a 5°C". Ni el documento D1 ni los datos presentados aquí enseñan o sugieren una formulación que es estable por "al menos 24 meses".

De esta manera en contraste con la composición de la presente invención, las formulaciones de D1 no divulgan que contengan saponina o hidróxido de aluminio y tampoco son explícitamente o inherentemente estables por "al menos 24 meses".

Tabla 1. Estabilidad de almacenamiento de virus inactivado formulado en la emulsión "TS6" de D1.

Tiempo en meses	Apariencia	PIT en °C	Tamaño de granulometría en μm
0	B/H	38.5	0.152 – monomodal
1	B/H	37.5	0.152 – monomodal
3	B/H	36.5	0.159 – monomodal
6	B/H	34	0.155 – monomodal
9	B/H	32	0.159 – monomodal
14	B/H	30.5	0.159 – monomodal
16	Múltiples capas	26	1.75 - poblaciones múltiples

Por ende, se solicita amablemente al Examinador tener en cuenta el requisito de la estabilidad de 24 meses, el cual está completamente soportado por las divulgaciones presentes (Tabla 2, de la descripción de la presente solicitud) y de esta manera reconocer el efecto mejorado de la presente invención y consecuentemente su nivel inventivo.

Adicionalmente, el documento D1 no anticipa la presente invención como se reclama actualmente porque la saponina no se interpreta correctamente como un componente opcional de las formulaciones divulgadas. Aunque que el documento D1 divulga hidróxido de aluminio y saponina [en su descripción de “adyuvante”, último párrafo, pág. 6), la referencia no enseña o sugiere que ninguno de estos dos componentes deben ser incluidos en las formulaciones de las vacunas. De hecho, se establece respetuosamente que el documento D1 excluye específicamente de sus formulaciones, surfactantes iónicos como saponina (D1: último párrafo, pág. 10, cita “en una modalidad particular de la presente invención, emulsiones como se describe en la presente no contienen ningún surfactante iónico o cualquier compuesto que se sepa que tenga propiedades surfactantes iónicas, como lecitina o saponina.”). En vista de todas las enseñanzas de D1, la mención de saponina no se puede interpretar correctamente como un elemento opcional. Si el documento D1 hubiera querido instruir a la persona versada en la materia a incluir opcionalmente surfactantes iónicos, como saponina, hubiera podido hacerlo fácilmente. Por el contrario, el documento D1 recomienda en contra de dicha inclusión y por ende las formulaciones de D1 no se pueden interpretar como que opcionalmente contienen saponina.

El documento D1 falla en habilitar una persona versada en la materia realizar la materia reivindicada sin experimentación excesiva. Por ejemplo, el documento D1 no divulga formulaciones que tengan una estabilidad de al menos 24 meses. D1 tampoco divulga la presencia opcional de saponina porque D1 indica expresivamente que saponina no debe ser un componente de sus formulaciones. Finalmente el documento D1 no divulga los rangos reivindicados de las cantidades de hidróxido de aluminio y saponina. Una persona versada en la materia enfrentada a por lo menos una de estas deficiencias se vería obligada de emplear experimentación no rutinaria para lograr y utilizar la formulación reivindicada en la presente solicitud. Sin embargo, el documento D1 falla en

divulgar todos tres elementos, de esta manera se asegura que una persona versada en la materia hubiera tenido que emplear trabajo no rutinario para lograr y utilizar las formulaciones reclamadas.

Como se indica en la descripción de la presente solicitud (pág. 53, Tabla 12; pág. 46, Tabla 6; y pág. 54, Tabla 13) ciertos rangos de saponina e hidróxido de aluminio son esenciales para la mezcla única de la formulación de eficacia y estabilidad. Para hacer y utilizar la presente formulación como se reivindica actualmente, una persona versada en la materia que lea el documento D1 primero tendría que ignorar las enseñanzas de D1 de evitar saponina. Luego, la persona versada en la materia tendría que seleccionar el componente adicional, hidróxido de aluminio. Luego, la persona versada tendría que hacer un rango de formulaciones, cada uno teniendo cantidades variadas de hidróxido de aluminio y saponina, y someter estas formulaciones a estudios de estabilidad. Finalmente, la persona versada tendría que llevar a cabo ensayos clínicos de eficacia laboriosos y extremadamente consumidores de tiempo.

En vista de lo anterior, el solicitante respetuosamente somete que el documento D1 falla en proporcionar una divulgación habilitante con respecto al objeto reclamado. Dicho de otra manera, el documento D1 no habilita una persona versada en la materia a hacer el objeto reivindicado sin experimentación excesiva.

Adicionalmente, las personas versadas en la materia saben bien que es altamente deseable un rápido inicio de niveles protectores de anticuerpos neutralizantes del virus (VNA), particularmente cuando el virus objetivo causa reducción de peso y aptitud en animales de producción/alimento. Ambos PCV2 y FMDV son cargas significativas para la industria de animales de producción, y es por esta razón que el solicitante buscó mejorar la eficacia y la seguridad de las formulaciones de vacunas de PCV2/FMDV disponibles.

Como se mencionó anteriormente, el solicitante ha determinado a través de experimentación no rutinaria que el rápido inicio de inmunidad se puede obtener al utilizar un rango crítico de saponina e hidróxido de aluminio (Tabla 12, de la descripción de la

presente solicitud que se presenta a continuación). Se han modificados las reivindicaciones 1 y 2 para incluir este rango crítico.

Tabla 12

Grupo de Animales	Formulación de Vacuna	Antígeno (µg/dosis)	Saponina (mg/dosis)	Algel	Datos del Título del Anticuerpo		
					Promedio		
G1	A	0	0	0	Estadística	D21	D44
					Media	0.75	0.67
					Dsv. Estándar	0.26	0.26
G2	B	10	0	0	Media	1.45	3.17
					Dsv. Estándar	0.50	0.48
					Media	1.40	2.92
G3	C	10	0	0.37	Dsv. Estándar	0.18	0.31
					Media	1.60	3.12
					Dsv. Estándar	0.31	0.42
G4	D	10	0.7	0	Media	1.87	3.20
					Dsv. Estándar	0.69	0.45
					Media	1.40	3.41
G5	E	10	0.7	0.37	Dsv. Estándar	0.37	0.27
					Media	1.80	3.37
					Dsv. Estándar	0.22	0.43
G6	F	10	1.3	0	Media	1.72	3.47
					Dsv. Estándar	0.66	0.30
					Media	1.47	2.97
G7	G	10	1.3	0.37	Dsv. Estándar	0.18	0.57
					Media	0.67	0.67
					Dsv. Estándar	0.17	0.09
G8	H	10	2.7	0	Media	0.67	0.67
					Dsv. Estándar	0.17	0.09
					Media	0.67	0.67
G9	1	10	2.7	0.37	Dsv. Estándar	0.17	0.09
					Media	0.67	0.67
					Dsv. Estándar	0.17	0.09
G10	No Vacunado	-	-	-	Media	0.67	0.67
					Dsv. Estándar	0.17	0.09
					Media	0.67	0.67

Por otro lado, el documento D2 no contiene los elementos que no son enseñados ni sugeridos en el documento D1, por lo que la combinación de estos dos documentos tampoco destruye el nivel inventivo de la presente invención. Específicamente en el

documento D2 no existe ninguna indicación de combinar la solución del documento D2 con la invención del documento D1 y de esa manera lograr la presente invención reclamada. Al respecto el "INSTRUCTIVO EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD" de su Despacho indica que "La invención no tiene nivel inventivo cuando la combinación de los elementos que proveen la solución está revelada en el estado de la técnica, es decir, no basta con la existencia de los elementos de manera aislada o individualmente considerados para concluir la falta de nivel inventivo, sino que ellos en su totalidad e integridad enseñen de manera evidente la manera de llegar a la solución al problema técnico". Por esta razón, el documento D2 no sugiere la combinación de sus enseñanzas y de su solución con D1 para lograr la materia de la presente invención.

Como apoyo adicional de la patentabilidad de la presente invención sobre el estado de la técnica y como se mencionó previamente, el solicitante llevó a cabo una experimentación no rutinaria para revelar lo crítico de los componentes saponina e hidróxido de aluminio. El solicitante respetuosamente establece que aunque la persona versada en la materia observara los resultados de los estudios de estabilidad del solicitante (que se divulgan por primera vez en la presente solicitud), una persona versada conduciría razonablemente un experimento simple efectivo que contenga solo dos grupos experimentales y dos grupos controles:

- 1). Control sin vacunación;
- 2). Control de TS6+ sin antígeno;
- 3). Emulsión de TS6;
- 4). Nueva emulsión más estable (es decir, "mejor" concentración de saponina y AlOH_3)

En el presente caso, el solicitante decidió incurrir en una cantidad significativa de tiempo y carga financiera al conducir un ensayo clínico en donde no solamente variaba un componente, sino se variaron dos componentes, resultando en un gran número de grupos experimentales (diez en vez de solo cuatro). El resultado de esta experimentación no

rutinaria (es decir, la determinación del rango crítico de concentración de saponina e hidróxido de aluminio) no era predecible; no era obvio.

Finalmente, es importante resaltar que de acuerdo con el “INSTRUCTIVO EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD” de su Despacho, entre los indicios de nivel inventivo de una solicitud se encuentra un efecto técnico inesperado. Como se demostró anteriormente la presente solicitud muestra un efecto técnico inesperado y mejorado que le otorga el nivel inventivo a la presente solicitud para que sea considerada para patentabilidad. Por todo lo anterior, los documentos D1 y D2 no resultan anterioridades válidas capaces de afectar la novedad y/o el nivel inventivo de la invención de la presente solicitud.

3.3 Conclusiones

De acuerdo a todos los argumentos presentados, la presente solicitud cumple a cabalidad con los requerimientos exigidos en la Decisión 486 y las objeciones formuladas por el Examinador se ven superadas. Con respecto al nivel inventivo, consideramos que el Examinador está excluyendo el hecho de que el inventor en el momento de solucionar el problema técnico de la solicitud tuvo que emplear habilidad inventiva, pues la presente invención no resulta de la mera extrapolación de las enseñanzas del arte previo, como se afirma, adicionalmente teniendo en cuenta que el arte previo no divulga lo que el Examinador reclama. Se está desconociendo el mérito investigativo empleado y que está aportando una ventaja al arte previo.

4. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador, se solicita atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente. En este sentido, respetuosamente recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. 16691, toda vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada

contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad.

Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

5. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones.
- Nuevo capítulo descriptivo.
- Anexo copia traducida de respuesta ante la oficina de patentes Europea con Anexos.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-14306-0841-021-4
FBJ\FBJ\ID-256196\WPC14306
No. M-2013-256196\FBJ

**NUEVAS FORMULACIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN ADYUVANTES QUE
CONTIENEN SAPONINA**

CAMPO DE LA INVENCION

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

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

Esta solicitud reclama la prioridad de la solicitud de patente provisional norteamericana No. 61/241,171, presentada el 10 de Septiembre del 2009, y además hace referencia a las siguientes solicitudes de patente: solicitud de patente norteamericana No. 12/027,776, presentada el 7 de Febrero del 2008, solicitud de patente norteamericana No. 10/899,181, presentada el 26 de Julio del 2004, ahora otorgada como patente norteamericana 7,371,395, y la solicitud de patente provisional norteamericana No. 60/490,345, presentada el 24 de Julio del 2003. Las solicitudes anteriores, y todos los documentos citados en las mismas o durante su proseguimiento ("documentos citados del solicitante") y todos los documentos citados o referenciados en los documentos citados del solicitante, y todos los documentos citados o referenciados en la presente ("documentos citados en la presente") y todos los documentos citados o referenciados en los documentos citados en la presente, junto con cualquiera de las instrucciones, descripciones, especificaciones de producto y hojas de producto del fabricante para cualquiera de los productos mencionados en la presente o en cualquier documento incorporado por referencia en la presente, se incorporan en la presente por referencia, y se pueden emplear en la práctica de la invención.

ANTECEDENTES

El uso de adyuvantes en vacunas es bien conocido. Un adyuvante es un compuesto que, cuando se combina con un antígeno de vacuna, incrementa la respuesta inmune al antígeno de vacuna como se compara con la respuesta inducida por el antígeno de vacuna solo. Entre las estrategias que promueven la inmunogenicidad de antígeno están aquellas que vuelven los antígenos de vacuna particulados, aquellas que polimerizan o emulsifican antígenos de vacuna, métodos para encapsular antígenos de vacuna, maneras para incrementar las respuestas de citoquina innatas del hospedero, y métodos que dirigen los antígenos de vacuna a las células que presentan antígeno (Nossal, 1999, En: *Fundamental Immunology*. Paul (Ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.; Vogel y Powell, 1995, En: *Vaccine Design*. The Subunit and Adjuvant Approach. Powell y Newman (Eds.), Plenum Press, NY, N.Y. p. 141). Debido a la función esencial que los adyuvantes desempeñan en mejorar la inmunogenicidad de antígenos de vacuna, el uso de adyuvantes en la formulación de vacunas ha sido virtualmente ubicuo (Nossal, 1999, *supra*; Vogel y Powell, 1995, *supra*; ver también la publicación de PCT WO 97/18837, las enseñanzas de las cuales se incorporan en la presente por referencia). Los adyuvantes convencionales, bien conocidos en la técnica, son diversos en naturaleza. Ellos pueden consistir, por ejemplo, de sales inorgánicas insolubles en agua, liposomas, micelas o emulsiones, es decir, adyuvante de Freund. Otros adyuvantes se pueden encontrar en Vogel y Powell, 1995, mencionada *supra*. Aunque no hay un solo mecanismo de acción del adyuvante, una característica esencial es su habilidad para incrementar significativamente la respuesta inmune a un antígeno de vacuna como se compara con la respuesta inducida por el antígeno de vacuna solo (Nossal, 1999, *supra*; Vogel y Powell, 1995, *supra*). A este respecto, algunos adyuvantes son más efectivos en aumentar las respuestas inmunes humorales; otros adyuvantes son más efectivos en incrementar las respuestas

inmunes mediadas por células (Vogel y Powell, 1995, supra); y todavía otro grupo de adyuvantes incrementan las respuestas inmunes tanto humorales como mediadas por células contra antígenos de vacuna (Vogel y Powell, 1995, supra).

Generalmente, las emulsiones utilizadas en la formulación de vacuna comprenden una mezcla de aceite, solución acuosa y surfactantes. Algunas emulsiones incorporan un surfactante lipofílico tal como SPAN 80® y un surfactante hidrofílico tal como TWEEN 80®.

Sin embargo, los problemas de estabilidad se pueden observar con emulsiones utilizadas como adyuvantes de vacuna, en particular durante el almacenamiento o transporte. Esto es particularmente real cuando estas composiciones contienen inmunógenos concentrados, especialmente inmunógenos concentrados no purificados. Típicamente, este es el caso con adyuvantes utilizados en vacunas inactivadas (exterminadas). Este problema es aún más significativo con composiciones de vacuna multivalentes debido a que los inmunógenos son más concentrados en el mismo volumen del diluyente.

Otro problema con el uso del adyuvante está ligado a un riesgo de eventos adversos tal como toxicidad o inflamación local en el sitio de inyección. Por ejemplo, una respuesta inflamatoria local y/o granulomas puede resultar después de la inyección. Con el fin de limitar tal reacción adversa, se pueden reducir los surfactantes y otros componentes en la emulsión; sin embargo, la reducción luego puede dar por resultado una disminución en la estabilidad de la composición de vacuna. Hay, por lo tanto, una necesidad por adyuvantes novedosos y composiciones de vacuna que contienen tales adyuvantes con seguridad y estabilidad incrementadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

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

Todavía otra modalidad de la presente invención proporciona una emulsión O/W estable, segura e inyectable que actúa como un adyuvante para incrementar la respuesta inmune inducida por un inmunógeno. En particular, la presente invención proporciona un adyuvante novedoso que, cuando se utiliza en una composición de vacuna que contiene un inmunógeno, incrementa la respuesta inmune celular del vacunado, respuesta inmune humoral, o de preferencia ambos al inmunógeno.

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

Una modalidad adicional de la presente invención proporciona un método para hacer una composición de vacuna usando el adyuvante de la presente invención; la composición de vacuna así obtenida; y métodos de uso de la misma.

Todavía otra modalidad de la presente invención proporciona un equipo que comprende uno o más frasquitos. En una modalidad, el equipo comprende un frasco que contiene el adyuvante de la presente invención y un inmunógeno u otro producto farmacéutico. En todavía otra modalidad, el equipo

comprende un inmunógeno u otro producto farmacéutico en un primer frasquito, y un adyuvante hecho de acuerdo con la presente invención en un segundo frasquito, con el adyuvante diseñado para ser mezclado con el inmunógeno u otro producto de vacuna antes del uso.

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

- (1) una solución acuosa que comprende un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende un surfactante iónico hidrofílico tal como saponina;
- (3) una solución acuosa opcional que comprende hidróxido de aluminio;
- (4) un aceite mineral;
- (5) un surfactante lipofílico no iónico;
- (6) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB que comprende diésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán (que tiene generalmente el valor HLB entre 11 y 13).

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

- (1) una solución acuosa que comprende un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende un surfactante iónico hidrofílico tal como saponina;
- (3) un aceite mineral;
- (4) un surfactante lipofílico no iónico;
- (5) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB que comprende diésteres de ácido grado etoxilados de sorbitán (que tiene generalmente un valor HLB entre 11 y 13).

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

- (1) una solución acuosa que comprende un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende un surfactante iónico hidrofílico tal como saponina;
- (3) una solución acuosa opcional que comprende hidróxido de aluminio;
- (4) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un alto valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) mayor que 13 y menor que 40, en particular $HLB \geq 13.5$, y de preferencia $HLB \geq 14$;
- (5) un aceite mineral;
- (6) un surfactante lipofílico no iónico;
- (7) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB (valor HLB de aproximadamente 9 a aproximadamente 13).

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

- (1) una solución acuosa que comprende un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende un surfactante iónico hidrofílico tal como saponina;
- (3) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un alto valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) mayor que 13 y menor que 40, en particular $HLB \geq 13.5$, y de preferencia $HLB \geq 14$;
- (4) un aceite mineral;
- (5) un surfactante lipofílico no iónico;
- (6) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene

un bajo valor HLB (valor HLB de aproximadamente 9 a aproximadamente 13).

En todavía otra modalidad, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una emulsión novedosa que contiene por lo menos un inmunógeno adecuado para inducir una respuesta inmunológica en un vacunado. La invención además proporciona tales composiciones en donde la emulsión actúa como un adyuvante para incrementar la respuesta inmune inducida por el inmunógeno, en particular, para incrementar la respuesta celular, la respuesta humoral o de preferencia ambas.

En otra modalidad la presente invención proporciona un método para hacer una composición de vacuna en donde un inmunógeno, especialmente un inmunógeno en forma seca, que se puede obtener, por ejemplo, mediante liofilización o mediante vitrificación, o en una solución acuosa, especialmente en donde la forma seca o la solución acuosa adicionalmente comprende un surfactante iónico, por ejemplo saponina, y de manera opcional adicionalmente comprende hidróxido de aluminio, se mezcla con el adyuvante de acuerdo con la presente invención. El inmunógeno se puede seleccionar del grupo que consiste de: patógenos inactivados, patógenos atenuados, antígenos sub-unitarios, antígenos purificados, antígenos no purificados o antígenos producidos recombinantemente utilizando células bacterianas, de levadura, de plantas, de insectos o de animales, vectores de expresión que incluyen plásmidos, y los similares. Los antígenos se pueden purificar por medios bien conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, ultrafiltración, ultracentrifugación, exclusión de tamaño, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y purificación PEG. El patógeno puede ser de origen bacteriano, viral, protozoario o fungal o el inmunógeno puede constituir una antitoxina.

En otra modalidad, la presente invención

proporciona un método para inducir una respuesta inmune en un vacunado contra un patógeno que comprende administrar la composición de vacuna de la presente invención al vacunado.

En otra modalidad, la presente invención proporciona equipos que comprenden un solo frasquito que contiene inmunógenos purificados y la emulsión de acuerdo con la presente invención. En tal modalidad, los inmunógenos contenidos dentro del único frasquito comprenden antígenos de virus FMD purificados.

En otra modalidad, la presente invención proporciona equipos que comprenden por lo menos dos frasquitos, en un primer frasquito un inmunógeno, especialmente un inmunógeno en forma seca o en solución húmedo acuoso, especialmente en donde la forma seca o la solución acuosa adicionalmente comprende un surfactante iónico, ventajosamente saponina, y de manera opcional adicionalmente comprende hidróxido de aluminio, y en un segundo frasquito un adyuvante o emulsión de acuerdo con la presente invención. El uso de equipos que comprenden menos dos frasquitos es particularmente efectivo en casos donde la combinación de los componentes discretos (es decir, la mezcla en un solo frasquito de los contenidos de los por lo menos dos frasquitos) daría por resultado una formulación de vacuna de estabilidad reducida.

Se observa que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y los similares pueden tener el significado atribuido a tales términos en la Ley de Patentes Norteamericana, por ejemplo, ellos pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y los similares, y aquellos términos tales como "que consiste esencialmente de" y "consiste esencialmente de" tiene el significado adscrito a estos por la Ley de Patentes Norteamericana, por ejemplo, ellos permiten elementos no

explícitamente citados, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica previa o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras modalidades se divulgan o son obvias de y abarcadas por, la siguiente Descripción Detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Una descripción completa y habilitante de la presente invención, que incluye el mejor modo de la misma, para uno de habilidad ordinaria en la técnica, se expone más particularmente en el resto de la especificación, incluyendo la referencia a las figuras acompañantes en donde:

La **FIG. 1** proporciona gráficas de la determinación de Temperatura de Inversión de Fase (PIT) (medida mediante conductividad) para las formulaciones de vacuna de los experimentos 1 y 2 en los días 7, 22, 121, y 330 (estudio de estabilidad de un año). La determinación de PIT es una medida de la estabilidad de la formulación de vacuna.

La **FIG. 2** proporciona gráficas de la determinación de PIT para las formulaciones de vacuna de los experimentos 3 y 4 en múltiples días después de la producción (estudio de estabilidad de un año).

La **FIG. 3** proporciona gráficas de la determinación de PIT para las formulaciones de vacuna de los experimentos 5 y 6 en múltiples días después de la producción (estudio de estabilidad de un año).

La **FIG. 4** proporciona gráficas de la determinación de PIT para las formulaciones de vacuna de los experimentos 7 y 8 en múltiples días después de la producción (estudio de estabilidad de un año).

La **FIG. 5** proporciona gráficas de la determinación de PIT para las formulaciones de vacuna del experimento 9 en múltiples días después de la producción (estudio de estabilidad de un año).

La **FIG. 6** proporciona gráficas de la determinación de PIT para las formulaciones de vacuna (de los experimentos 1-9) producidos de acuerdo con la presente invención, y almacenadas durante 36 meses;

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

La **FIG. 8** proporciona una gráfica que indica el cambio de temperatura máximo observado para cerdos tratados con los materiales y métodos divulgados en el Ejemplo 6;

La **FIG. 9** proporciona una gráfica que indica la potencia de vacuna (PD50) contra la carga útil (μg) para cerdos tratados de acuerdo con los materiales y métodos divulgados en el Ejemplo 7.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Otros objetivos, características y aspectos de la presente invención se divulgan en, o son obvios de, la siguiente Descripción Detallada. Se va a entender por uno de habilidad en la técnica que la presente discusión es una descripción de modalidades ejemplares solamente y no se propone como limitante de los aspectos más amplios de la presente invención, los aspectos más amplios que son incorporados en la construcción ejemplar. De hecho, será evidente para aquellos expertos en la técnica que varias modificaciones y variaciones se pueden hacer en la presente invención sin apartarse del alcance o espíritu de la

invención. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una modalidad se pueden utilizar en otra modalidad para producir una modalidad todavía adicional. Se propone que la presente invención cubra tales modificaciones y variaciones como vienen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas o equivalentes. Los contenidos de todas las referencias, patentes publicadas y patentes citadas por toda la solicitud se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Por conveniencia, ciertos términos empleados en la Especificación, Ejemplos y Reivindicaciones adjuntas se recolectan aquí.

Como se utiliza en la presente, el término "animal" incluye todos los animales vertebrados incluyendo humanos. Este también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas embriónicas y fetales. En particular, el término "animal vertebrado" incluye, pero no está limitado a, humanos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos); equinos (por ejemplo, caballos), bovinos (por ejemplo, vacas, ganado vacuno), porcino (por ejemplo, cerdos), así como en aves. Como se utiliza en la presente, el término "vaca" o "ganado vacuno" se utiliza generalmente para referirse a un animal de origen bovino de cualquier edad. Los términos intercambiables incluyen "bobino", "becerro", "novillo", "toro", "vaquilla", "vaca", y los similares. Los términos intercambiables incluyen "cerditos", "marranas", y los similares. El término "ave" como se utiliza en la presente se refiere a cualquier especie o subespecie de la clase taxonómica *ava*, tal como, pero no limitado a, pollos (reproductores, pollos tiernos y gallinas ponedoras), pavos, patos, un ganso, una codorniz, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y rátidias incluyendo avestruz, emú y casuario. El término "cerdo" o "cerdito" significa un animal de origen porcino, mientras que "marrana" se refiere a una hembra de edad y capacidad

reproductiva.

Como se utiliza en la presente, el término "virulento" significa un aislado que retiene su habilidad para ser infeccioso en un animal hospedero.

Como se utiliza en la presente, el término "vacuna inactivada" significa una composición de vacuna que contiene un organismo infeccioso o patógeno que no es por más tiempo capaz de replicación o crecimiento. El patógeno puede ser de origen bacteriano, viral, protozoario o fungal. La inactivación se puede realizar mediante una variedad de métodos incluyendo la congelación-descongelación, tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con formalina), sonicación, radiación, calor o cualquier otro medio de convención suficiente para prevenir la replicación o crecimiento del organismo mientras que mantiene su inmunogenicidad.

Como se utiliza en la presente, el término "inmunogenicidad" significa capaz de producir una respuesta inmune en un animal hospedero contra un antígeno o antígenos. La respuesta inmune forma la base de la inmunidad protectora inducida por una vacuna contra un organismo infeccioso específico.

Como se utiliza en la presente, el término "respuesta inmune" se refiere a una respuesta inducida en un animal. Una respuesta inmune puede referirse a la inmunidad celular (CMI); inmunidad humoral o puede involucrar ambas. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmune. Por ejemplo, una composición de vacuna de la presente invención puede específicamente inducir una respuesta de gama interferona incrementada.

Como se utiliza en la presente, el término "antígeno" o "inmunógeno" significa una sustancia que induce una respuesta inmune específica en un animal hospedero. El

antígeno puede comprender un organismo completo, exterminado, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene inserto con propiedades inmunogénicas; una pieza o fragmento de DNA capaz de inducir una respuesta inmune en la presentación a un animal hospedero; una proteína, un polipéptido, un péptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

Como se utiliza en la presente, el término "multivalente" significa una vacuna que contiene más de un antígeno ya sea de la misma especie (es decir, diferentes aislados de los serotipos de virus FMD), o de una diferente especie (es decir, aislados de tanto *Pasteurella hemolytica* como *Pasteurella multocida*), o una vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferentes géneros (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* y *Clostridium*).

Como se utiliza en la presente, el término "adyuvante" significa una sustancia adicional a una vacuna para incrementar la inmunogenicidad de una vacuna. El mecanismo de cómo un adyuvante opera no es completamente conocido. Algunos adyuvantes se cree que aumentan la respuesta inmune al liberar lentamente el antígeno, mientras que otros adyuvantes son fuertemente inmunogénicos en su propia manera y se cree que funcional sinérgicamente. Los adyuvantes de vacuna conocidos incluyen, pero no están limitados, emulsiones de aceite y agua (por ejemplo, adyuvante de Freund completo y adyuvante de Freund incompleto), *Corynebacterium parvum*, *Bacillus Calmette Guerin*, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, Bacto-Adyuvante, ciertos polímeros sintéticos tales como poli aminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina "REGRESSIN" (Vetrepharm,

Athens, Ga.), "AVRIDINA" (N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propandiamina), aceite de parafina, muramil dipéptido y los similares.

Como se utiliza en la presente, el término "emulsión" se refiere a una combinación de por lo menos dos sustancias, en donde una primera sustancia se dispersa en una segunda sustancia en la cual la primera sustancia es insoluble. Un ejemplo de una emulsión de la presente invención es una fase de aceite dispersada en una fase acuosa.

Como se utiliza en la presente, el término "emulsión incompleta" se refiere a una composición a la cual por lo menos un componente adicional se debe adicionar para hacer la "emulsión completa". Como se utiliza en la presente, el término "emulsión completa" se puede considerar equivalente a la composición inmunológica "lista para uso" de la presente invención. Un ejemplo de una emulsión completa es una composición inmunológica de acuerdo con la presente invención que está lista para ser administrada a un animal de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Como se utiliza en la presente, los términos "portador farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables y se refieren a un vehículo fluido para contener antígenos de vacuna que pueden ser inyectados en un hospedero sin efectos adversos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no están limitados a, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa o soluciones reguladas. Los portadores pueden incluir agentes auxiliares que incluyen, pero no limitados a, diluyentes, estabilizadores (es decir, azúcares y aminoácidos), conservadores, agentes humectantes, agentes emulsificantes, agentes reguladores del pH, aditivos aumentadores de viscosidad, colores y los similares.

Como se utiliza en la presente, el término "composición de vacuna" incluye por lo menos un antígeno o inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inducir una respuesta inmune en un hospedero. Las composiciones de vacuna se pueden administrar en dosificaciones y mediante técnicas bien conocidas para aquellos expertos en las técnicas médicas o veterinarias, tomando en consideración tales factores como la edad, sexo, peso, especie y condición del animal recipiente, y la ruta de administración. La ruta de administración puede ser percutánea, por la vía de la administración mucosal (por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal) o por la vía de una ruta parenteral (intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). Las composiciones de vacuna se pueden administrar solas, o se pueden co-administrar o administrar secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Las formas de administración pueden incluir suspensiones, jarabes o elixires, y preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable) tales como suspensiones estériles o emulsiones estériles. Las composiciones de vacuna se pueden administrar como un rocío o mezclar en el alimento y/o agua o suministrar la mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o los similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales agentes humectantes o emulsificantes, agentes reguladores del pH, adyuvantes, gelificantes o aditivos aumentadores de viscosidad, conservadores, agentes saborizantes, colores y los similares, dependiendo de la ruta de administración y la preparación deseada. Textos farmacéuticos estándares, tal como "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990 se pueden consultar para preparar preparaciones adecuadas sin experimentación indebida.

El término "purificado" como se utiliza en la presente no requiere pureza absoluta; más bien, se propone como un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de inmunógeno purificada, tal como proteína o virus inactivado, es una en la cual el inmunógeno es el más enriquecido que el inmunógeno en su medio ambiente natural. Una preparación de inmunógeno se refiere ampliamente en la presente como "purificada" tal que el inmunógeno representa por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 98%, del contenido de inmunógeno total de la preparación. Una "preparación cruda", que representa el grado más bajo de purificación, puede contener tan poco como 60%, menor que 20%, menor que 10%, menor que 5%, o menor que 1% de componentes inmunogénicos.

El término "altamente purificado" como se utiliza en la presente se propone para sugerir un "grado más alto de pureza" como es comparado con el término "moderadamente purificado". Este "grado más alto de pureza" puede incluir, pero no se limita de ninguna manera a, porcentajes reducidos de contaminantes, en una preparación inmunológica que ha sido "altamente purificada" contra una preparación inmunológica que ha sido "moderadamente purificada". Como se utiliza en la presente, "altamente purificado" de las preparaciones inmunológicas tendrá los porcentajes más bajos a no detectables de contaminantes que pueden causar: respuesta inmune deseada reducida, respuesta inmune indeseada incrementada (por ejemplo, reacción de hipersensibilidad) o estabilidad de formulación reducida. De manera similar, una preparación inmunológica que ha sido "moderadamente purificada" contiene porcentajes relativamente reducidos de contaminantes contra una preparación inmunológica que ha sido "mínimamente purificada", que del mismo modo, tiene porcentajes reducidos de contaminantes contra una preparación designada una "preparación cruda".

Los contaminantes en una preparación inmunológica pueden incluir, pero de ninguna manera están limitados a, sustancias que contribuyen negativamente a una composición inmunológica de acuerdo con la presente invención. Uno de varios ejemplos de un contaminante que contribuyen negativamente sería un contaminante que reduce la habilidad de una composición inmunológica de la presente invención para inducir una respuesta inmune en animales.

Niveles variantes de pureza (por ejemplo, "altamente purificado, "moderadamente purificado" y los similares) se puede lograr utilizando varios métodos. Por ejemplo, una combinación de cromatografía y filtración de gel de exclusión de tamaño puede dar por resultado preparaciones inmunológicas "altamente purificadas" o "moderadamente purificadas". Las diferencias en la fuente/tipo de inmunógenos, así como variaciones ligeras en los procedimientos de purificación pueden afectar significativamente el grado final de pureza del inmunógeno. En general, como se utiliza en la presente, las preparaciones inmunológicas que tiene el porcentaje más bajo a más alto de contaminantes serán descritas como 1) "altamente purificada", 2) "moderadamente purificado", 3) "mínimamente purificadas", 4) "preparación cruda", respectivamente. Una preparación "altamente purificada" tendrá el nivel más bajo a través de todos los tipos de contaminantes. Un preparación "moderadamente purificada" tendrá niveles relativamente bajos de la mayoría de tipos de contaminantes, pero puede tener un tipo de contaminante en abundancia más alta que sería observado para una preparación "altamente purificada" comparable. Del mismo modo, una "preparación mínimamente purificada" tendrá niveles relativamente bajos de algunos tipos de contaminantes, pero puede tener más de un tipo de contaminante en abundancia más alta que una preparación "moderadamente purificada" comparable. Como es esperado, una "preparación cruda" tiene el nivel más alto de contaminantes, a través de todos los tipos de contaminantes, como es

comparado con los otros tipos de preparaciones discutidas en la presente.

La presente invención proporciona una emulsión de aceite en agua (O/W) novedosa que comprende:

- (1) una solución acuosa que comprende un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmune a un hospedero;
- (2) una solución acuosa que comprende un surfactante iónico;
- (3) un surfactante hidrofílico no iónico;
- (4) un aceite mineral;

En una modalidad, la emulsión de aceite en agua (O/W) novedosa comprende:

- (1) una solución acuosa que comprende un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmune en un hospedero;
- (2) una solución acuosa que comprende un surfactante iónico tal como saponina;
- (3) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de mayor que 13 y menor que 40 ($HLB > 13$, en particular $HLB \geq 13.5$, y de preferencia $HLB \geq 14$);
- (4) un aceite mineral;
- (5) un surfactante lipofílico no iónico; y
- (6) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB (valor HLB entre 9 y 13).

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

- (1) una solución acuosa que comprende un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmune en un hospedero;
- (2) una solución acuosa que comprende surfactante iónico tal como saponina;

- (3) una solución acuosa opcional que comprende hidróxido de aluminio;
- (4) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de mayor que 23 y menor que 40 ($HLB > 13$, en particular $HLB \geq 13.5$, y de preferencia $HLB \geq 14$);
- (5) un aceite mineral;
- (6) un surfactante lipofílico no iónico; y
- (7) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB (valor HLB entre 9 y 13).

Algunas emulsiones hechas de acuerdo con la presente invención están basadas en una combinación de por lo menos cuatro (4) surfactantes elegidos entre los miembros de cuatro grupos diferentes de surfactantes, y es posible usar uno o más surfactantes que pertenecen a cada grupo. Tres (3) de estos grupos comprenden surfactantes no iónicos y uno (1) de estos grupos comprenden surfactantes iónicos, por ejemplo saponinas.

En una de varias modalidades, la concentración del surfactante iónico (2) en emulsión (en la presente especificación esto significa la emulsión final que comprende todos los ingredientes a menos que se indique de otra manera) es de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 10%.

En una de varias modalidades, la concentración del surfactante hidrofílico no iónico (7) en la emulsión (en la presente especificación esto significa que la emulsión final que comprende todos los ingredientes a menos que se indique de otra manera) es de 1% a 8%, en particular de 1.5% a 6%, de preferencia de 2% a 5%, más de preferencia 2.5% a 4%, expresado como un porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v).

Este grupo de surfactantes comprende surfactantes

hidrofílicos no iónicos que tienen un bajo valor HLB (valor HLB entre 9 y 13). Este grupo incluye pero no está limitado a monoéster de ácido grado etoxilado de sorbitán (en particular 5 grupos etoxilo) (por ejemplo, monooleato de sorbitán etoxilado, tal como TWEEN 81[®], diésteres de ácido grado etoxilados de sorbitán, triésteres de ácido grado etoxilado de sorbitán (en particular 20 grupos etoxilo) (por ejemplo, trioleato de sorbitán etoxilado tal como TWEEN 85[®]), triesterato de sorbitán etoxilado tal como TWEEN 65[®], alcohols grasos etoxilados (en particular 5-10 grupos etoxilo) (por ejemplo, BRIJ 76[®], BRIJ 56[®], BRIJ 96[®]), ácidos grasos etoxilados (en particular 5-10 grupos etoxilo) (por ejemplo, Simulsol 2599[®], MYRJ 45[®]), aceite de ricino etoxilado (en particular 25-35 grupos etoxilo) (por ejemplo, ARLATONE 650[®], ARLATONE G[®]), y combinaciones de los mismos.

Los diésteres de ácido grado etoxilados de sorbitán y triésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán son preferidos, así como combinaciones de ambas especies. El ácido graso de preferencia se selecciona del grupo que consiste de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de los mismos. El triéster de ácido graso etoxilado preferido de sorbitán comprende trioleato de sorbitán etoxilado tal como TWEEN 85[®]), o triestearato de sorbitán etoxilado tal como TWEEN 65[®].

En una de varias modalidades, la concentración del surfactante no iónico hidrofílico no iónico (4) es generalmente de 0.1% a 1.5%, en particular de 0.2% a 1.4%, de preferencia de 0.3% a 1.3%, más de preferencia de 0.4% a 1.2%, expresado como porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v).

Este segundo grupo de surfactantes comprenden surfactantes hidrofílicos no iónicos que tienen un alto valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) (HLB>13, en particular HLB≥13.5, y de preferencia HLB≥14). Este grupo

comprende monoésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán (en particular 20 grupos etoxilo) (por ejemplo, monolaurato de sorbitán etoxilado tal como TWEEN 20®, monopalmitato de sorbitán etoxilado tal como TWEEN 40®, monoestearato de sorbitán etoxilado (tal como TWEEN 60®, monooleato de sorbitán etoxilado tal como TWEEN 80®, alcohols grasos etoxilados (en particular 15-30 grupos etoxilo) (por ejemplo, BRIJ 78®, BRIJ 98®, BRIJ 721®), ácidos grasos etoxilados (en particular 15-30 grupos etoxilo) (por ejemplo, MYRJ 49®, MYRJ51®, MYRJ 52®, MYRJ 53®), copolímeros de bloque no iónicos (por ejemplo, copolímero de polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP), tal como LUTROL F127®, LUTROL F68®), y combinaciones de los mismos.

Para los copolímeros de bloque no iónicos, los porcentajes pueden ser menores y ser en particular de 0.1% a 0.5%, más particularmente de 0.2% a 0.4% (en peso por volumen de emulsión (p/v)).

Los surfactantes preferidos (4) comprenden monoésteres de ácido graso etoxilado de sorbitán, tales como aquellos descritos en lo anterior.

En una de varias modalidades, la concentración del surfactante lipofílico no iónico (6) es de 0.1% a 2.5%, en particular de 0.2% a 2%, de preferencia de 0.2% a 1.5%, más de preferencia de 0.2% a 1.2%, expresado como un porcentaje en peso por volumen de emulsión (p/v).

Este grupo de surfactantes comprende ésteres de ácido graso de sorbitán (por ejemplo, monolaurato de sorbitán, similar a SPAN 20®, monopalmitato de sorbitán, tal como SPAN 40®, monoestearato de sorbitán tal como SPAN 60®, triestearato de sorbitán, tal como SPAN 65®, monooleato de sorbitán, similar a SPAN 80®, trioleato de sorbitán, similar a SPAN 85®, monoisostearato de sorbitán, tal como ARLACEL 987®, isostearato de sorbitán, tal como CRILL 6®), ésteres de

ácido graso de manuro (por ejemplo, MONTANIDE 80[®], monooleato de manuro (tal como ARLACEL A[®]), dioleato de manuro, trioleato de manuro, tetraoleato de manuro), ésteres de ácido graso etoxilado de manuro (2, 3 o 4 grupos etoxilo) (por ejemplo, MONTANIDE 888[®], MONTANIDE 103[®], monooleato de manuro etoxilado, dioleato de manuro etoxilado, trioleato de manuro etoxilado, tetraoleato de manuro etoxilado) y combinaciones de los mismos.

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

Los surfactantes preferidos (6) comprenden los ésteres de ácido graso de sorbitán, en particular aquellos descritos en lo anterior y combinaciones de los mismos.

Los surfactantes de la invención pueden tener ácidos grasos de origen animal o vegetal. El cambio de un origen para el otro (por ejemplo animal TWEEN 80[®] a vegetal TWEEN 80[®]) se podría hacer simplemente con únicamente el ajuste menor en la formulación de la emulsión.

Una emulsión de acuerdo con la invención puede tener una concentración total de surfactantes, en peso por volumen de emulsión, de 1.2% a 10%, en particular de 2% a 8%, de preferencia de 3% a 7%, más de preferencia de 4% a 6%.

Generalmente, la emulsión de acuerdo con la invención puede tener una temperatura de inversión de fase (PIT) que es $\geq 33^{\circ}\text{C}$, en particular varía de 33°C a 65°C , más particularmente de 36°C a 60°C , de preferencia de 37°C a 55°C , y más de preferencia de 38°C a 50°C .

La PIT es la temperatura en la cual la emulsión de agua en aceite cambia a una emulsión de aceite en agua o se desfasa (se rompe de la emulsión y separación de las 2

fases). El valor de PIT se puede medir por varios medios, similar por ejemplo mediante la apariencia visual (por ejemplo, ver el Ejemplo 2) o mediante conductividad. La emulsión se coloca en una temperatura abajo de la PIT de la emulsión, por ejemplo, de aproximadamente 25°C en un baño de agua. La temperatura se incrementa progresivamente. El cambio del aspecto visual de la emulsión se observa en comparación con una emulsión de control, notablemente la fluidez, la viscosidad, la separación en dos fases, el cambio del aspecto superficial debido a la migración de la fase aceitosa a la superficie. La temperatura, para la cual este cambio de aspecto visual se observó, es el valor de PIT de la emulsión. Alternativamente, la PIT se determina mediante el pasaje rápido de un valor de conductividad de aproximadamente 5-8 milliSiemens/centímetro (mS/cm) (emulsión de aceite en agua) a un valor de aproximadamente 0 mS/cm (emulsión de agua en aceite) medida mediante una sonda colocada en la emulsión, cerca de la superficie. La temperatura, para la cual se observó la transición, es el valor de PIT de la emulsión. Uno de habilidad ordinaria en la técnica será capaz de determinar las combinaciones de surfactantes y aceite, incluyendo sus concentraciones respectivas, con el fin de producir emulsiones de acuerdo con la invención, y en particular emulsiones que tienen un valor de PIT dentro de los intervalos definidos en lo anterior sin experimentación indebida.

Generalmente, las emulsiones de acuerdo con la presente invención pueden contener, en volumen por volumen de la emulsión, de 3% a 55% de aceite, en particular de 5% a 50% de aceite, de preferencia de 10% a 40% de aceite y, más de preferencia, de 20% a 40% de aceite. Por definición, los intervalos de valores en la presente especificación incluye siempre el límite del intervalo, a menos que se indique de otra manera.

El aceite utilizado puede ser un aceite mineral que

incluye, pero no limitado a, aceite de parafina tal como aceite isoparafínico y/o aceite nafténico, escualano, pristano, aceite de poliisobuteno, aceite de poliisobuteno hidrogenado, aceite de polideceno, aceite de poliisopreno, aceite de poliisopropeno y los similares. Un aceite mineral ventajoso útil en la presente invención puede incluir un aceite que comprende una cadena de carbón lineal o ramificada que tiene un número de átomos de carbono mayor que 15, de preferencia de 15 a 32, y libre de compuestos aromáticos. Tales aceites pueden ser, por ejemplo, aquellos comercializados bajo el nombre "MARCOL 52®" o "MARCOL 82®" (producido por Esso, Francia) o "DRAKEOL 6VR®" o "DRAKEOL 5®" "DRAKEOL 7®" (producido por Penreco, EUA), "CLEAROL®" (producido por Sonneborn, EUA), "Paraffin Oil Codex AAB2®" (producido por Aiglon, Francia), BLANDOL (producido por Sonneborn, EUA), ONDINA 915 (producido por Shell, UK).

El aceite también puede ser una mezcla de aceites que comprende por lo menos 2 aceites seleccionados dentro de los aceites descritos en la presente, y en cualquier proporción. La mezcla de aceites también puede comprender por lo menos un aceite seleccionado entre los aceites descritos en lo anterior y por lo menos un aceite vegetal, y este aceite vegetal representa de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 33% de la fase aceitosa, de preferencia de aproximadamente 10% a aproximadamente 25% v/v. Estos aceites vegetales son aceites insaturados ricos en ácido oleico que son biodegradables y de preferencia líquidos a la temperatura de almacenamiento (aproximadamente +4°C.) o por lo menos hacer posible dar emulsiones que son líquidos a esta temperatura. Por ejemplo, el aceite vegetal puede ser aceite de nuez molida, aceite de nuez, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de soja, aceite de onagro y los similares.

En una de varias modalidades, los surfactantes hidrofílicos (4) y (7) de preferencia incluyen surfactantes que tienen la misma parte hidrofílica de las moléculas. Por

ejemplo, el uso se hace de ésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán para cada uno de los surfactantes hidrofílicos (4) y (7). Por ejemplo si TWEEN 85[®] se selecciona como surfactantes hidrofílicos no iónicos que tienen bajo valor HLB, el surfactante hidrofílico no iónico que tiene un alto valor HLB ventajosamente tendrá una parte hidrofílica constituida con un sorbitán etoxilado, tal como TWEEN 80[®].

Generalmente, la presente invención contempla la utilización de una solución acuosa que comprende un vehículo, excipiente o diluyente veterinariamente o farmacéuticamente aceptable adecuado que incluye, pero no limitado a, agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, solución reguladora y los similares. El vehículo, excipiente o diluyente también puede incluir polioles, glúcidos o agentes reguladores del pH. El vehículo, excipiente o diluyente, por ejemplo, también puede comprender aminoácidos, péptidos, antioxidantes, bactericidas y compuestos bacteriostáticos. La solución acuosa se adiciona al aceite y los surfactantes en cantidad para obtener 100% del volumen de la emulsión de acuerdo con la invención.

El balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de una emulsión permite la estimación de la fuerza hidrofílica o lipofílica de un surfactante. El HLB de una molécula anfifílica se calcula generalmente como sigue:

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

El HLB puede tener un valor que varía de 0 (para la molécula más lipofílica) a 20 (para la molécula más hidrofílica). De acuerdo con la composición química del surfactante (notablemente por ejemplo la adición de grupos etoxilo o de óxidos de alqueno), esta estimación puede cambiar y el dominio del valor HLB puede incrementarse (por ejemplo, el LUTROL F68[®] tiene un HLB de 29). Con una mezcla de surfactantes, el HLB de la mezcla es la adición del HLB de

cada surfactante, balanceada por su relación en peso:

$$\text{HLB} = \frac{(\text{HLB de surfactante X} \times \text{peso del surfactante X}) + (\text{HLB del surfactante Y} \times \text{peso del surfactante Y})}{(\text{peso del surfactante X} + \text{peso del surfactante Y})}$$

En una modalidad de una emulsión hecha de acuerdo con la presente invención, el HLB final de la emulsión es de aproximadamente 9 a aproximadamente 12, de preferencia de aproximadamente 9.5 a aproximadamente 11.5 y más de preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 11.5.

La presente invención contempla una emulsión que comprende un aceite de parafina (en particular en una concentración de aproximadamente 10% a aproximadamente 40% y de preferencia de aproximadamente 20% a aproximadamente 40%), expresado como un volumen por volumen de emulsión (v/v)); un monoéster de ácido graso de sorbitán (como surfactante lipofílico no iónico), un triéster de ácido graso etoxilado de sorbitán (como surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB); y un monoéster de ácido graso etoxilado de sorbitán (como surfactante hidrofílico no iónico que tiene un alto valor HLB). En particular el monoéster de ácido graso de sorbitán es monooleato de sorbitán (en particular en la concentración de 0.2% a 1.5%, de preferencia de 0.2% a 1.2% expresado como un peso por volumen de emulsión (p/v)), el triéster de ácido graso etoxilado de sorbitán es un trioleato etoxilado de sorbitán (en particular en la concentración de 2% a 5%, de preferencia de 2.5% a 4% p/v)) y el monoéster de ácido graso etoxilado de sorbitán es un monooleato de sorbitán etoxilado (en particular en la concentración de 0.3% a 1.3%, de preferencia de 0.4% a 1.2% p/v). Por ejemplo, la emulsión comprende el aceite de parafina en aproximadamente 29.3% en volumen por volumen de emulsión, el monooleato de sorbitán es 0.6% en peso por volumen de emulsión, el trioleato etoxilado de sorbitán en 3.4% en peso por volumen de emulsión, y el monooleato de sorbitán etoxilado en 0.75% en peso por volumen de emulsión.

En una segunda modalidad de acuerdo con la presente

invención, la emulsión comprende un aceite de parafina (en particular en una concentración de 10% a 40%, de preferencia de 20% a 40% v/v), un monoéster de ácido graso de sorbitán (como surfactante lipofílico no iónico, un triéster de ácido graso etoxilado de sorbitán (como surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB), y un copolímero de bloque no iónico (como surfactante hidrofílico no iónico que tiene un alto valor HLB). En particular el monoéster de ácido graso de sorbitán es un monooleato de sorbitán (en particular en la concentración de 0.2% a 1.5%, de preferencia de 0.2% a 1.2% p/v), el triéster de ácido graso de etoxilado de sorbitán es un trioleato etoxilado de sorbitán (en particular en la concentración de 2% a 5%, de preferencia de 2.5% a 4% p/v) y el copolímero de bloque no iónico es un polímero de polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP) (en particular en la concentración de 0.1% a 0.5%, de preferencia de 0.2% a 0.4% p/v). Por ejemplo la emulsión comprende el aceite de parafina en aproximadamente 29.3% v/v, el monooleato de sorbitán en 0.6% p/v, y el trioleato de sorbitán etoxilado de 3.4% p/v, y monooleato de sorbitán etoxilado de 0.25% p/v.

En una modalidad particular, la invención contempla una emulsión de aceite en agua (O/W) inyectable que comprende:

- (1) una solución acuosa que comprende un ingrediente activo tal como un fármaco o un inmunógeno, de preferencia un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende saponina;
- (3) un aceite mineral;
- (4) un surfactante lipofílico no iónico; y
- (5) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB que comprende un diéster de ácido graso etoxilado de sorbitán (que puede tener un valor HLB entre 11 y 13).

En otra modalidad particular, la invención contempla una emulsión de aceite en agua (O/W) inyectable que

comprende:

- (1) una solución acuosa que comprende un ingrediente activo tal como un fármaco un inmunógeno, de preferencia un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende saponina;
- (3) una solución acuosa que comprende hidróxido de aluminio;
- (4) un aceite mineral;
- (5) un surfactante lipofílico no iónico; y
- (6) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor HLB que comprende un diéster de ácido graso etoxilado de sorbitán (que puede tener un valor HLB entre 11 y 13).

Una emulsión de acuerdo con esta modalidad comprende diésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán que pueden ccontener hasta 20 grupos etoxi. Los ácidos grasos pueden ser de origen animal o vegetal y se pueden seleccionar del grupo que consiste de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de los mismos. En una modalidad el ácido graso etoxilado es de preferencia oleato. Los otros ingredientes, así como las propiedades generales de la emulsión tal como la PIT, pueden tener las mismas características que aquellas descritas en lo anterior.

De preferencia, el surfactante (6) comprende diésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán, tal como dioleato de sorbitán etoxilado, distearato de sorbitán etoxilado o diisostearato de sorbitán etoxilado, dipalmitato de sorbitán etoxilado, dilaurato de sorbitán etoxilado y combinaciones de los mismos.

Opcionalmente otros compuestos se pueden adicionar como co-adyuvantes a la emulsión, incluyendo, pero no limitados a, alumbre; oligonucleótidos CpG (ODN), en particular ODN 2006, 2007, 2059, o 2135 (Pontarollo R.A. y colaboradores, Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84:43-59;

Wernette CM. y colaboradores, Vet. Immunol. Immunopath, 2002, 84:223-236; Mutwiri G. y colaboradores, Vet. Immunol. Immunopath, 2003, 91: 89-103); poliA-poliU ("Vaccine Design The Subunit y Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, 6:03); bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) ("Vaccine Design: The Subunit y Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, volume 6:157), N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil) propanodiamina (tal como AVRIDINE®) (Ibid, p. 148), carbómero, quitosan (ver la patente norteamericana No. de serie 5,980.912 por ejemplo).

La presente invención también proporciona un método para hacer una composición de vacuna o composición inmunológica que comprende por lo menos un antígeno o composición de inmunógeno y un adyuvante o emulsión hecho de acuerdo con la presente invención. El antígeno o composición de inmunógeno se puede incorporar durante la formación de la emulsión o, en una modalidad alterna, el antígeno o composición de inmunógeno, de preferencia adicionalmente que comprende saponina y de manera opcional adicionalmente que comprende hidróxido de aluminio, se puede adicionar a la emulsión después, por ejemplo, justo antes del uso.

La cantidad completa de la solución acuosa utilizada se puede presentar en la emulsión primero producida. O puede ser aquella solamente parte de la solución acuosa que se utiliza para formar la emulsión, y la cantidad restante de la solución acuosa se adiciona después de la incorporación del inmunógeno. El inmunógeno o antígeno puede estar en una forma seca o presentarse en alguna otra forma sólida apropiada y luego mezclarse con la emulsión o, alternativamente, el antígeno puede estar en solución, en particular en una solución acuosa, y esta solución mezclada con la emulsión.

Los surfactantes de preferencia se adicionan a ya sea el aceite o solución acuosa de acuerdo con su solubilidad. Por ejemplo, los surfactantes lipofílicos no iónicos se adicionan al aceite de acuerdo con la invención mientras que los surfactantes hidrofílicos no iónicos que tienen un alto valor HLB se adicional a la solución acuosa.

La emulsificación se puede preparar de acuerdo con métodos convencionales conocidos para uno de habilidad ordinaria en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad de la presente invención, la emulsión se puede preparar a una temperatura debajo de la PIT de la emulsión, en particular a temperatura ambiente, por ejemplo, a aproximadamente 25°C. La fase acuosa y la fase aceitosa se mezclan conjuntamente mediante agitación mecánica, por ejemplo con una turbina equipada con un rotor-estator capaz de crear una alta fuerza cortante. De preferencia, la agitación inicia una baja velocidad de rotación y lentamente se incrementa en relación a la adición progresiva generalmente en la solución acuosa en el aceite. De preferencia la solución acuosa se adiciona progresivamente al aceite. La relación de aceite/solución acuosa se puede adaptar para obtener una emulsión de agua en aceite (W/O), por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 40% a aproximadamente 55% de aceite (v/v). Cuando se detiene la agitación, la emulsión cambia progresivamente a una emulsión O/W (inversión de fase). Después de la inversión y si es necesario, la emulsión se diluye mediante la adición de una solución acuosa para obtener la concentración deseada de aceite en la emulsión final. La emulsión se puede almacenar a aproximadamente 5°C.

En otra modalidad, la emulsión se puede preparar a una temperatura más alta que la PIT de la emulsión. En una primera etapa, la fase acuosa y la fase aceitosa se mezclan conjuntamente a una temperatura más alta que la PIT de la emulsión. De preferencia la solución acuosa se adiciona progresivamente al aceite. La relación de aceite/solución

acuosa se puede adaptar para obtener una emulsión de agua en aceite (W/O), por ejemplo en una concentración de aproximadamente 40% a aproximadamente 55% de aceite (v/v). la emulsión se puede hacer mediante una agitación con baja o nada de fuerza cortante, por ejemplo, con un mezclador estático o una hélice marina o con una turbina en muy baja velocidad de rotación. La emulsión obtenida es una emulsión de agua en aceite (W/O). En una segunda etapa, la emulsión se enfría progresivamente por abajo de la PIT. Durante esta etapa, la emulsión cambia a una emulsión O/W (inversión de fase). Después la inversión y si es necesario, la emulsión se diluye mediante la adición de una solución acuosa para obtener la concentración deseada de aceite en la emulsión final. La emulsión se puede almacenar a aproximadamente 5°C.

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

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

El inmunógeno o antígeno adecuado para el uso en la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste de patógenos inactivados, patógenos atenuados, subunidades inmunogénicas (por ejemplo, proteínas,

polipéptidos, péptidos, epítopes, haptenos), o vectores de expresión recombinantes, incluyendo plásmidos que tienen insertos inmunogénicos. En una modalidad de la presente invención, el inmunógeno es un microorganismo inactivado o exterminado. En otra modalidad de la invención, la composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado del grupo de patógenos aviares incluyendo, pero no limitados a, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, virus de Bronquitis Infecciosa (IBV), virus de Enfermedad de Newcastle (NDV), virus de síndrome de caída de huevo (EDS), o virus de Enfermedad Bursal Infecciosa (IBDV), virus de influenza aviar y los similares, y combinaciones de los mismos.

Alternativamente, la composición de vacuna comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno felino tal como, pero no limitado a, herpesvirus felino (FHV), calicivirus felino (FCV), virus de leucemia felino (FeLV), virus de inmunodeficiencia felino (FIV), virus de rabia y los similares, y combinaciones de los mismos.

En todavía otra modalidad, una composición de vacuna de la presente invención comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno canino que incluye, pero no limitado a, virus de rabia, herpesvirus canino (CHV), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica* y los similares, y combinaciones de los mismos.

En todavía otra modalidad de la invención la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno equino, tal como herpesvirus equino (tipo 1 o tipo 4), virus de influenza equino, tétano, virus del nilo del oeste, y los similares o combinaciones de los mismos.

En todavía otra modalidad de la invención, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un

patógeno bovino, tal como el virus de enfermedad de pata y boca (FMDV), virus de rabia, rotavirus bovino, virus de parainfluenza bovino tipo 3 (bPIV-3), coronavirus bovino, virus de diarrea viral bovina (BVDV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus de Rinotraqueitis Bovino Infeccioso (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* y los similares y combinaciones de los mismos.

En todavía otra modalidad de la presente invención, la composición comprende un inmunógeno seleccionado de un patógeno porcino tal como, pero no limitado a, virus de influenza de cerdo (SIV), circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), virus de síndrome respiratorio reproductor porcino (PRRS), virus de pseudorabia (PRV), parvovirus porcino (PPV), FMDV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* y los similares, y combinaciones de los mismos.

Otra modalidad de la invención proporciona composiciones de vacuna que comprenden por lo menos un inmunógeno y una emulsión en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunógenos que comprenden virus, bacterias, hongos y los similares se pueden producir mediante métodos de cultivo *in vitro* utilizando el medio de cultivo apropiado o líneas de células hospederas y métodos convencionales bien conocidos para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Por ejemplo, PRRS se puede cultivar en una línea de células apropiada, tal como la línea de célula MA-104 (ver las patentes norteamericanas Nos. de serie 5,587,164; 5,866,401; 5,840,563; 6,251,404 entre otras). De una manera similar, PCV-2 se puede cultivar utilizando la línea de células PK-15 (ver la patente norteamericana No. de serie 6,391,314); SIV se puede cultivar en huevos (patente norteamericana No. de serie 6.048.537); y *Mycoplasma hyopneumoniae* se puede cultivar en un medio de cultivo apropiado (series norteamericanas Nos. 5,968,525; US 5.338.543; Ross R. F. y

colaboradores, *Am. J. Vet. Res.*, 1984, 45:1899-1905).

Con el fin de obtener una composición inmunológica inactivada o de vacuna, el patógeno de preferencia se inactiva después de la recolección y, opcionalmente, se somete a clarificación por medio de un tratamiento químico utilizando, por ejemplo, formalina o formaldehído, beta-propiolactona, etilenimina, etilenimina binaria (BEI), y/o un tratamiento físico (por ejemplo, un tratamiento término o sonicación). Los métodos para la inactivación son bien conocidos para aquellos de habilidad en la técnica. Por ejemplo, el virus FMD se puede inactivar mediante etilenimina (Cunliffe, HR, *Applied Microbiology*, 1973, p. 747-750) o mediante alta presión (Ishimaru y colaboradores, *Vaccine* 22 (2004) 2334-2339), el virus PRRS se puede inactivar mediante el tratamiento con beta-propiolactona (Plana-Duran y colaboradores, *Vet. Microbiol*, 1997, 55: 361-370) o mediante el tratamiento con BEI (patente norteamericana No. de serie 5,587,164); la inactivación del virus PCV-2 se puede realizar utilizando el tratamiento con etilenimina o mediante el tratamiento con beta-propiolactona (patente norteamericana No. de serie 6,391,314); el virus de influenza de cerdo se puede inactivar utilizando un detergente similar a Triton, o con el tratamiento con formaldehído (patente norteamericana No. de serie 6,048,537); la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* se puede inactivar mediante el tratamiento con formaldehído (Ross R. F. supra), mediante etilenimina o el tratamiento con VEI (ver WO 91/18627).

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

Los inmunógenos útiles en composiciones de vacuna de acuerdo con la presente invención también puede incluir el vector de expresión. Tales vectores incluyen, pero no están limitados a, vectores de expresión recombinantes *in vivo* tal como un vector de polinucleótido o un plásmido (EP-A2-1001025; Chaudhuri P, Res. Vet. Sci. 2001, 70:255-6), vectores de virus tales como, pero no limitados a, vectores de adenovirus, vectores de poxvirus tal como fowlpox (patentes norteamericanas Nos. de serie 5,174,993; 5,505,941; y 5,766,599) o vectores de canaripox (patente norteamericana No. de serie 5,756,103) o vectores bacterianos (*Escherichia coli* o *Salmonella* sp.)/

La presente invención también abarca la formulación de composiciones inmunológicas multivalentes o composiciones de vacuna de combinación. Por ejemplo, los antígenos útiles en una bacteria bovina de combinación hecha de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no están limitados a, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella* sp., particularmente *P. multocida* y *P. haemolytica*, *Haemophilus* sp., particularmente *H. somnus*, *Clostridium* sp., *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *E. coli* y los similares.

La presente invención además proporciona métodos para inducir una respuesta inmune en un hospedero, por ejemplo, un animal, que comprende administrar al hospedero una composición inmunológica o una composición de vacuna de acuerdo con la invención. Las respuestas inmunes inducidas de esta manera son notablemente respuestas inmunes de anticuerpo y/o celulares, y en particular una respuesta de gamma-interferona.

En particular, la presente invención proporciona métodos para inmunizar contra, o para prevenir o para reducir los síntomas causados por, la infección de un animal con un

organismo patogénico (por ejemplo, infección por un virus, bacteria, hongos o parásitos protozoarios). El método de la presente invención es útil en animales vertebrados que incluyen, pero no limitados a, humanos, caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos); equinos (por ejemplo, caballos), bovinos (por ejemplo, ganado vacuno) y animales porcinos (por ejemplo, cerdos), así como en aves que incluyen, pero no limitados a, pollos, pavos, patos, gansos, codorniz, faisán, loros, pinzones, halcones, cuervos y rátidas (avestruz, emú, casuario y los similares).

En un aspecto particular de la invención, estos métodos consisten de la vacunación de las hembras preñadas antes del parto al administrar una composición de vacuna hecha de acuerdo con la invención. Estos métodos además incluyen la inducción de anticuerpos protectores inducidos por el protocolo de vacunación y la transferencia de estos anticuerpos protectores de las hembras preñadas vacunadas a su descendencia. La transferencia de tales anticuerpos maternos subsecuentemente protege la descendencia de la enfermedad.

La dosificación de la composición de vacuna hecha de acuerdo con la presente invención dependerá de la especie, raza, edad, tamaño, historia de vacunación, y estado de salud del animal que es vacunado. Otros factores similares a la concentración de antígeno, componentes de vacuna adicionales y ruta de administración (es decir, subcutánea, intradérmica, oral, intramuscular o administración intravenosa) también impactará la dosificación efectiva. La dosificación de vacuna para administrar es fácilmente determinar basado en la concentración de antígeno de la vacuna, la ruta de administración, y la edad y la condición del animal que es vacunado. Cada lote de antígeno puede ser individualmente calibrado. Alternativamente, los experimentos de inmunogenicidad metódico de diferentes dosificaciones, así como estudios de LD₅₀ y otros procedimientos de clasificación

se pueden utilizar para determinar la dosificación efectiva para una composición de vacuna de acuerdo con la presente invención sin experimentación indebida. A partir de los ejemplos presentados enseguida, será fácilmente evidente que la dosificación aproximada de que el volumen aproximado será apropiado para utilizar la composición de vacuna descrita en la presente. El factor crítico es que la dosificación proporciona por lo menos un efecto protector parcial contra la infección natural, como es evidenciado por una reducción en la mortalidad y morbilidad asociado con la infección natural. El volumen apropiado es del mismo modo fácilmente averiguado por uno de habilidad ordinario en la técnica. Por ejemplo, en especies de aves, el volumen de una dosis puede ser de aproximadamente 0.1 ml a aproximadamente 0.5 ml y, ventajosamente, de aproximadamente 0.3 ml a aproximadamente 0.5 ml. Para especies felinas, caninas y equinas, el volumen de una dosis puede ser de aproximadamente 0.2 ml a aproximadamente 3.0 ml, ventajosamente de aproximadamente 0.3 ml a aproximadamente 2.0 ml, y más ventajosamente de aproximadamente 0.5 ml a aproximadamente 1.0 ml. Las especies bovinas y porcinas, el volumen de dosis puede ser de aproximadamente 0.2 ml a aproximadamente 5.0 ml, ventajosamente de aproximadamente 0.3 ml a aproximadamente 3.0 ml, y más ventajosamente de 0.5 ml a aproximadamente 2.0 ml.

Las vacunaciones repetidas pueden ser preferibles en intervalos de tiempo periódicos para aumentar la respuesta inmune inicialmente o cuando un período largo de tiempo ha transcurrido desde la última dosis. En una modalidad de la presente invención, la composición de vacuna se administra como una inyección parenteral (es decir, subcutáneamente, intradérmicamente o intramuscularmente). La composición se puede administrar como una dosis o, en modalidades alternas, administrada en dosis repetidas de aproximadamente dos a aproximadamente cinco dosis dadas en intervalos de aproximadamente dos a aproximadamente seis semanas, de

preferencia de aproximadamente dos a aproximadamente cinco semanas. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que el número de dosis y el intervalo de tiempo entre las vacunaciones depende de un número de factores incluyendo, pero no limitados a, la edad del animal vacunado; la condición del animal; la ruta de inmunización; la cantidad de antígeno disponible por dosis; y los similares. Para vacunación inicial, el período generalmente será más largo que una semana y de preferencia será entre aproximadamente dos a aproximadamente cinco semanas. Para animales previamente vacunados, una vacunación de refuerzo, antes o durante la preñez, en aproximadamente un intervalo anual se puede realizar.

La presente invención también contempla la administración de una composición de vacuna utilizando un inyector sin aguja tal como PIGJET®, AVIJET®, DERMOJET® o BIOJECTOR® (Bioject, Oregon, USA). Una persona de habilidad ordinaria en la técnica es capaz de ajustar las especificaciones del inyector como sea requerido con respecto a los factores tal como las especies del animal que es vacunado; la edad y peso del animal, y los similares sin experimentación indebida.

En una modalidad de la presente invención, el método comprende una sola administración de una composición de vacuna formulada con una emulsión de acuerdo con la invención. Por ejemplo, en una modalidad, la composición de vacuna es una composición de virus FMD inactivado, mientras que una modalidad alterna proporciona una vacuna que comprende una composición de virus PCV2 inactivado. Otras composiciones inmunológicas o vacunas son adecuadas para el uso en un régimen de una sola dosis que incluyen, pero no limitados a, *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado, PRRS y SIV.

La invención además se relaciona a métodos para tratar un hospedero, por ejemplo, un animal, que comprende

50

administrar al hospedero una composición farmacéutica hecha de acuerdo con la invención y que comprende por lo menos un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste de proteínas o péptidos, virus inactivados o atenuados, anticuerpos, alérgenos, CpG ODN, factores de crecimiento, citoquinas o antibióticos y en particular CpG ODN o citoquinas. Estas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para mejorar los desempeños de crecimiento en un animal tal como un pollo, un cerdo, una vaca o ganado vacuno.

La presente invención además se relaciona a un equipo que comprende un solo frasquito que contiene un ingrediente tal como un inmunógeno purificado combinado con una emulsión hecha de acuerdo con la presente invención. El equipo alternativamente puede comprender un primer frasquito que contiene un ingrediente tal como un inmunógeno o composición farmacéutica, combinado con saponina e hidróxido de aluminio, y un segundo frasquito que contiene una emulsión hecha de acuerdo con la presente invención. El inmunógeno puede estar en una forma seca, una forma deshidratada o en solución acuosa como es descrito en la presente.

La invención ahora será descrita adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Método de Manufactura de la Emulsión

La emulsión se preparó mediante el método de Inversión. En una primera etapa, la fase acuosa y la fase aceitosa se mezclaron conjuntamente a +40°C. En una segunda etapa, la emulsión se enfrió progresivamente abajo de la PIT a +5°C con el fin de obtener una emulsión O/W. Después de la inversión, la emulsión final (es decir, formulación de vacuna) se mezcló y subsecuentemente se almacenó a +5°C (resumido en la Tabla 1).

Tabla 1

	Por ciento para	Por ciento Total (v/v)
--	-----------------	------------------------

	Cada Fase	
<u>Emulsión Incompleta-Fase aceitosa (120 mL):</u>		33
• Monooleato de sorbitán (SPAN 80®)	1.8% p/v	
• Trioleato de sorbitán (20 OE) (TWEEN 85®)	10.2% p/v	
• Aceite de parafina (MARCOL 82®)	88% v/v	
<u>Emulsión Incompleta-Fase acuosa #1 (120 mL):</u>		33
• 20% (p/v) de solución de monooleato de sorbitán (20 OE) (TWEEN 80®)	11.25% p/v	
• Solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02 M (pH 7.8)	85.75% v/v	
<u>Emulsión Incompleta= Aceitosa+Acuosa #1</u>		66
<u>Relación de Emulsión Incompleta / Emulsión Final (es decir, Formulación de Vacuna)</u>	2/3	
<u>Adicionar la fase Acuosa #2 (120 mL)</u>		33
• [Solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02 M pH 7.8, saponina, hidróxido de aluminio, antígenos, M102]*		
<u>Emulsión Incompleta (Aceitosa+Acuosa1) + Acuosa2 = Emulsión Final (es decir, Formulación de Vacuna)</u>		100

* Intervalos de Concentración/Cantidad

- o Hidróxido de aluminio - de aproximadamente 0.0% a aproximadamente 1.0% (p/v), con respecto al volumen de formulación de vacuna
- o Saponina - de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 2 mg por mL de formulación de vacuna
- o Antígenos - de aproximadamente 0.1 µg a aproximadamente 200 µg por mL de formulación de vacuna
- o M102 y Fosfato al volumen

Monooleato de sorbitán (SPAN 80®) y trioleato de sorbitán (20 OE) (TWEEN 85®) se introdujeron en la fase aceitosa. El monooleato de sorbitán (20 OE) (TWEEN 80®) no fue miscible en el aceite de parafina. Una solución de 20% (p/v) de TWEEN 80® se preparó en la misma solución reguladora como la vacuna, por ejemplo, en la solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02 M (pH 7.8).

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

Segunda Etapa: La fase acuosa #2 se preparó con 120 ml de solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02 M pH 7.8 con inmunógenos (FMDV inactivado, inmunógeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*, o inmunógeno PCV-2, como es descrito *infra*), saponina e hidróxido de aluminio. La pre-emulsión se preparó en la primera etapa se enfrió a aproximadamente 5°C, se diluyó al adicionar la mitad del volumen de la fase acuosa #2 a la misma temperatura, y se mezcló mediante la rotación de una barra magnética durante 1 minuto. La concentración de surfactante final en la emulsión TSAP fue 4.75% (p/v).

En general, los componentes de las formulaciones de vacuna divulgados en la presente se adicionaron en el siguiente orden: 1) Medio 102 a 5°C, 2) Saponina, 3) Hidróxido de aluminio, 4) Antígenos, y 5) Emulsión incompleta (es decir, la combinación de la Fase Aceitosa más la Fase Acuosa #1). Como se preparó en la presente, las vacunas TSAP son estables por hasta 36 meses a 5°C.

Utilizando el mismo método de preparación, otras emulsiones se pueden obtener como es descrito en los ejemplos proféticos enseguida:

Emulsión TSAP-2

La emulsión TSAP-2 en una emulsión O/W que contiene 33% de una fase aceitosa. La fase aceitosa (120 ml) contiene MARCOL 82® 88% v/v, SPAN 80® 1.8% p/v y TWEEN 85® 10.2% p/v. La fase acuosa #1 (120 ml) contiene solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02 M (pH 7.8) 97.75% v/v, y LUTROL F127® 0.75% p/v. La fase acuosa #2 (120

ml) se constituye con la solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02 M (pH 7.8), saponina, hidróxido de aluminio, y que contiene opcionalmente inmunógenos. La concentración de surfactante final es la emulsión TSAP-2 es aproximadamente 4.25% p/v.

Emulsión TSAP-3

La emulsión TSAP-3 es una emulsión O/W que contiene 50% de una fase aceitosa. La fase aceitosa (160 ml) contiene MARCOL 82® 92% v/v, SPAN 85® 1.8% p/v y BRIJ 96® 6.2% p/v. La fase acuosa #1 (160 ml) contiene la solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02 M (pH 7.8) 98.5% v/v, y LUTROL F127® 0.5% p/v, saponina, hidróxido de aluminio, y que contiene opcionalmente inmunógenos. La concentración de surfactante final en la emulsión TSAP-3 es aproximadamente 4.25% p/v.

Emulsión TSAP-4

La emulsión TSAP-4 es una emulsión O/W que contiene 10% de una fase aceitosa. La fase aceitosa (120 ml) contiene MARCOL 82® 60% v/v, SPAN 40® 17.2% p/v y ARLATONE 650® 22.8% p/v. La fase acuosa #1 (120 ml) contiene solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8) 97.5% v/v y TWEEN 20® 2.5% p/v. La fase acuosa #2 se preparó con 400 ml de solución reguladora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M pH 7.8, saponina, hidróxido de aluminio, y que contiene opcionalmente inmunógenos. 100 ml de la pre-emulsión se diluyó con los 400 ml de la fase acuosa #2 para obtener la emulsión TSAP-3. La concentración de surfactante final de la emulsión TSAP-4 es 4.25% p/v.

Ejemplo 2

Determinación de la Temperatura de Inversión de Fase (PIT) de una emulsión

10 ml de la emulsión TSAP se colocó en un tubo de vidrio en un baño de agua a una temperatura de aproximadamente 25°C. La emulsión TSAP fue una emulsión

homogénea blanca. La temperatura en el baño de agua se incrementó progresivamente. Los cambios en la emulsión se observaron visualmente (la emulsión llegó a ser dos fases separadas debido a la migración de la fase aceitosa amarilla-café a la superficie). Este cambio es característico de la descomposición de la emulsión. La temperatura en la cual este cambio se observa es el valor de PIT de la emulsión. Para la emulsión TSAP, la PIT varía de aproximadamente 36°C-46°C. Las Figuras 1-5 proporcionan gráficas de determinación de PIT para formulaciones de vacuna hechas de acuerdo con la presente invención (estudio de estabilidad de 1 año). La Figura 6 proporciona una gráfica de terminación de PIT para formulaciones de vacuna hechas de acuerdo con la presente invención y almacenadas durante 36 meses (estudio de estabilidad de 3 años).

Ejemplo 3

Estudio #1: Estabilidad de las formulaciones de Vacuna preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1

Esta tabla indica la estabilidad (es decir, el tiempo en meses que las formulaciones permanecen como emulsiones de aceite en agua) de formulaciones de vacuna preparadas de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1. Las formulaciones están comprendidas de los ingredientes constituyentes indicados (ver las formulaciones 1-13), y los antígenos utilizados para cada una de estas formulaciones comprendieron aislados de virus FMD inactivado que se consideraron de moderadamente a altamente purificados.

Como la Tabla 2 indica, la presencia de hidróxido de Aluminio proporciona estabilidad de vacuna incrementada especialmente cuando se utiliza la concentración más alta de antígenos (comparar la estabilidad aumentada de las formulaciones 9, 11, y 13 a la estabilidad relativamente reducida en 12 meses de las formulaciones 3, 5, y 7). En promedio, la presencia de hidróxido de Aluminio en las formulaciones que contienen antígeno más alto (es decir,

formulaciones 9, 11, y 13) incrementa el tiempo de estabilidad de aceite/agua de aproximadamente 3-6 meses (es decir, la estabilidad de aceite/agua observada para las formulaciones 3, 5, y 7) a aproximadamente doce (12) meses (es decir, la estabilidad de aceite/agua observada para las formulaciones 9, 11), o aún a aproximadamente veinticuatro (24) meses (es decir, la estabilidad del aceite/agua observada para la formulación 13).

Tabla 2

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Antígeno (µg/dosis)	0	15	60	15	60	15	60	15	60	15	60	15	60
Saponina (µg/dosis)	0	0	0	0.5	0.5	1	1	0	0	0.5	0.5	1	1
Al (OH) ₃ (% final)	0	0	0	0	0	0	0	0	.3	.3	.3	.3	.3
Número de dosis	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
T0 Mos	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W
T3 Mos	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W
T6 Mos	O/W	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W
T9 Mos	O/W	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W
T12 Mos	O/W	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W	O/W
T14 Mos	O/W	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W	O/W

Ejemplo 4

Estudio #2: Estabilidad de las formulaciones de Vacuna preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1

Las formulaciones de vacuna se prepararon como es descrito en el Ejemplo 1 y de acuerdo con las cantidades del componente indicadas en la Tabla 3. Como es descrito previamente, el orden de adición de los componentes fue 1) medio 102, 2) saponina, 3) hidróxido de aluminio, 4) antígenos purificados, y 5) emulsión incompleta (referencia al Ejemplo 1 en donde la emulsión incompleta se define como la fase aceitosa más la fase acuosa #1). Los antígenos purificados fueron antígenos FMDV 01 Campos, A24 Cruzeiro, y C3 Indaial. El volumen total se ajustó utilizando el Medio 102 (M102, receta indicada enseguida).

Tabla 3

Número de Experimento ->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Emulsión incompleta (ml)	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
Fase acuosa (ml)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
saponina 4MIL1R159B (mg)	0	0	250	9570	0	250	9570	0	250	9570
O1 (ml) [aproximadamente 1500 µg]	0	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8
A24 (ml) [aproximadamente 1500 µg]	0	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7
C3 (ml) [aproximadamente 1500 µg]	0	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Hidróxido de aluminio 1.5% (ml)	0	0	0	0	25	25	25	150	150	150
Medio 102	QSP 200 ml									
Volumen total (ml)	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Volumen total (dosis)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300

Tabla 4

Descripción del Componente	Para 1L de M102	Solución de Extracto
MgCl ₂	95	170 mM
KCl	190	400 mM
CaCl ₂	238	260 mM
CHCl ₃	5 ml	puro
Alanina	276 g	
Glucosa	1880	4500 mM
Bicarbonato de Sodio	2180	2540 mM
Peptona	3000 g	-
Hidrolizado de Lactalbúmina	4000 g	-

La estabilidad de la vacuna se determinó de acuerdo con la Tabla 5.

Tabla 5

Prueba	Criterio de Aceptabilidad
Análisis del tamaño de gotita**	Modo < 0.18 µm; SPAN < 0.8

Temperatura de inversión de fase (PIT)	> = 36°C
---	----------

* Para las vacunas sin gel de alúmina
**Controles realizados al final del estudio de estabilidad

Para cada formulación de vacuna, la temperatura de inversión de fase (PIT) se determinó como es descrito en el Ejemplo 2. La cantidad de antígeno adicionada se indica por "unidades de hemaglutinina" (UH) por dosis de vacuna. La Tabla 6 resume los datos de PIT e indica que la PIT permaneció generalmente estable por hasta 36 meses. La Figura 6 proporciona gráficas para la determinación de PIT mediante la conductividad para las formulaciones de vacuna de los Experimentos 1-10 (resumidos en la Tabla 6). El incremento de la PIT se observa con las formulaciones adyuvantadas con saponina (es decir, experimentos 3, 4, 6, 7, 9, y 10) constituye por sí mismo una mejora con respecto a la estabilidad sobre las formulaciones no adyuvantadas con saponina (es decir, experimentos 2, 5, y 8).

Tabla 6

Experimentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Días	7	7	7	8	7	9	9	9	14	14
	22	22	23	23	24	24	29	38	38	41
	121	121	121	122	121	121	127	123	133	133
	330	330	330	340	340	340	340	340	340	340
	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100
Antígeno	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponina (mg/dosis)	0	0	0.8	2.5	0.	0.8	2.5	0	0.8	2.5
Gel de alúmina (%)	0	0	0	0	0.065	0.065	0.065	0.39	0.39	0.39
PIT	39	36	39	39.5	36	39	39.5	37.5	40	40
	32.5	36.5	39	40	36.5	39	39.5	37.5	39.5	40.5
	(*)		36.7	39.5	37	39	40	32	40	40.5
	35	36.5	(*)					(*)		
	36.5	37	39	39	37	39	39	38	40	39.5
	38.5	39.0	40.5	40	39	40.5	40	41	41.5	40.5

La distribución de tamaño de partícula (Tabla 7) de las emulsiones permaneció dentro del intervalo expuesto en los criterios del estudio durante el período de tiempo de 36 meses.

Tabla 7

Muestras	Fecha de manufactura	Fecha de análisis	Ag (+/-)	Saponina (mg/dosis)	Gel de Alúmina (% final)	Modo (µm)	SPAN
Emulsión incompleta	04/07/05	05	-	0	0	0.158	0.644
Experimento 1	27/09/05	04/07/05	-	0	0	0.146	0.650
Experimento 2	27/09/05	04/12/09	+	0	0	0.145	0.661
Experimento 3	27/09/05	04/12/09	+	0.8	0	0.148	0.633
Experimento 4	27/09/05	04/12/09	+	2.5	0	0.154	0.582
Experimento 5	27/09/05	04/12/09	+	0	0.065	0.144	0.670
Experimento 6	27/09/05	04/12/09	+	0.8	0.065	0.144	0.672
Experimento 7	27/09/05	04/12/09	+	2.5	0.065	0.144	0.672
Experimento 8	27/09/05	05/12/09	+	0	0.39	0.146	0.790
Experimento 9	27/09/05	05/12/09	+	0.8	0.39	0.145	0.789
Experimento 10	27/09/05	05/12/09	+	2.5	0.39	0.145	0.787

Ejemplo 5

Resultados de Serología después de la Administración de
Múltiples Dosis de una Vacuna de Virus de Enfermedad de Pata
y Boca (FMD) Adyuvantada con la Emulsión TSAP-Estudio en
Bovinos

Materiales y Métodos: 90 Animales bovinos, de 12 a 14 meses de edad, nunca vacunados y sin anticuerpos FMD se seleccionaron, se aleatorizaron y se distribuyeron entre 10 grupos de 9 animales que son vacunados. Los animales se vacunaron con las formulaciones de vacuna indicadas (9807-9814) en el día 1. Cada una de las formulaciones listadas en las Tablas 8, 9, 10, y 11 se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1 y comprende todos los componentes citados en el Ejemplo 1 con las cantidades de saponina e hidróxido de aluminio que varían de acuerdo con lo siguiente: la cantidad de saponina es ya sea 0, 0.7, 1.3, o 2.7 mg/dosis, y la cantidad de hidróxido de aluminio al gel es ya sea 0% o

0.37%. Ocho (8) grupos se vacunaron mediante la ruta intramuscular (el grupo IM) y dos (2) grupos se vacunaron mediante la ruta subcutánea (el grupo SC). Cada animal del grupo IM se revacunó con la vacuna respectiva en el día 56 mediante la ruta intramuscular en el día 84 mediante la ruta subcutánea. Cada animal del grupo SC se revacunó con la vacuna respectiva en los días 56 y 84 mediante la ruta subcutánea.

La Tabla 8 resume la estabilidad de las formulaciones de vacuna.

Tabla 8

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

No hubo alguna lesión después de la primera vacunación mediante la ruta intramuscular. Hubo algunas lesiones después de la segunda vacunación mediante la ruta intramuscular pero todas estas lesiones sucedieron 28 días después de la segunda vacunación por la ruta intramuscular. La Tabla 9 resume la seguridad de las formulaciones de vacuna, como es indicado por la medición del peso corporal del animal en las fechas especificadas.

Tabla 9

Identificador del Experimento	Estadística	Fecha de Medición del Peso Corporal								
		17- Nov- 08	8- Dic- 08	15- Dic- 08	12- Ene- 09	15- Ene- 09	9- Feb- 09	12- Feb- 09	16- Feb- 09	0- Mar- 09
EXP 9807	Peso Medio	294	303	305	331	330	354	352	355	372
	(kg)	33	30	31	35	33	34	34	32	37
	Desviación Estándar									
EXP 9808	Peso Medio	293	304	305	331	328	352	355	354	370
	(kg)	34	36	35	35	41	39	42	41	42
	Desviación Estándar									
EXP 9809	Peso Medio	293	304	305	327	325	351	345	348	365
	(kg)	33	33	32	29	33	29	37	35	37
	Desviación Estándar									
EXP 9810	Peso Medio	293	305	307	330	330	350	348	351	374
	(kg)	33	32	30	39	39	37	34	34	40
	Desviación Estándar									
EXP 9811 G1	Peso Medio	295	307	307	328	329	352	346	352	369
	(kg)	34	31	31	31	34	36	35	40	39
	Desviación Estándar									
EXP 9811 G2	Peso Medio	293	304	305	328	329	346	342	345	364
	(kg)	31	32	34	34	37	41	39	41	43
	Desviación Estándar									
EXP 98121 G1	Peso Medio	294	307	307	629	331	352	350	354	371
	(kg)	29	33	34	35	35	37	36	35	32
	Desviación Estándar									
EXP 9812 G2	Peso Medio	292	304	304	330	329	352	349	355	369
	(kg)	30	32	32	34	37	35	32	37	33
	Desviación Estándar									
EXP 9813	Peso Medio	293	304	304	332	331	357	354	360	378
	(kg)	30	27	27	28	30	33	30	30	35
	Desviación Estándar									
EXP 9814	Peso Medio	293	304	305	327	325	348	343	346	365
	(kg)	30	31	29	31	30	32	35	31	29
	Desviación Estándar									

Resultados: La Tabla 10 resume los datos serológicos recolectados durante los ensayos experimentales. 01 Campos, A24 Cruzeiro, y C3 Indaial son tres serotipos independientes del virus FMD, y la presencia de los anticuerpos 01, A24, y C3 es un indicador positivo que la formulación de vacuna

indujo una respuesta inmune en los vacunados. "G1" indica la formulación de vacuna que se administró intramuscularmente y "G2" indica la formulación de vacuna que se administró subcutáneamente. Para la presente invención, particularmente para los antígenos virales de FMD, hay una fuerte correlación directa entre el título de anticuerpos (es decir, niveles de suero de O1 Campos, A24 Cruzeiro, y C3 Indaial) y el número de Protección de Población Equivalente (EPP). Simplemente establecido, cuando los títulos de anticuerpo son altos, los animales vacunados son de manera correspondiente altamente protegidos de la infección viral.

De manera sorprendente, la presencia de hidróxido de aluminio es asociada con una diferencia significativa en la respuesta inmune que depende de la ruta de administración. Cuando está presente hidróxido de aluminio, como en las formulaciones 9812G1 y 9812G2, hay un incremento significativo en la respuesta inmune en el vacunado, como es medido por los títulos de anticuerpo, cuando la formulación de vacuna se administra subcutáneamente. No hay diferencia significativa similar a la eficacia debido a la ruta de administración para las formulaciones de vacuna correspondientes que no contienen hidróxido de aluminio, específicamente 9811G1 y 9811G2.

La razón para esta respuesta inmune aumentado debido a la presencia de hidróxido de aluminio coincidente con el uso de las rutas subcutáneas de administración no es conocida en ese momento, pero una modalidad efectiva de la invención actual podría incluir, pero de ninguna manera limitada a, variar la ruta de administración de vacuna dependiente de los datos de eficacia actuales y futuros (por ejemplo, título de anticuerpo).

Como es comparado con las formulaciones de vacuna de control no adyuvantadas con saponina (es decir, 9807 & 9808), las formulaciones de vacuna adyuvantadas con saponina inducen en los animales de estudio una respuesta inmune más

rápida a todos los tres antígenos de virus FMD, como es indicado por los títulos de anticuerpo promedio más altos para las formulaciones adyuvantadas con saponina en el Día 21. Tomados conjuntamente, la evidencia indica que la presente invención proporciona estabilidad mejorada y permite respuestas inmunes más rápidas que las formulaciones no adyuvantadas con saponina.

Tabla 10

Saponina (mg/dosis)	Al (OH) ₃ (%)	Form. ID	01 CAMPOS				A24 CRUZEIRO				C3 INDAIAL				MEDIAS	
			D21		D56		D21		D56		D21		D56		D21	D67
			TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	TIT
0	0	9807	1.47	37.7	2.07	80.4	1.56	29.4	2.01	71.6	1.97	69.5	2.41	92.3	1.67	2.2
0	0.37	9808	1.64	51.3	1.59	45.6	1.9	55.1	1.66	30.5	2.08	77.3	2.14	85.8	1.88	1.8
0.7	0	9809	1.66	49.4	1.91	64.9	1.97	61.5	1.9	52.8	2.05	77.4	2.37	87.7	1.89	2.1
0.7	0.37	9810	1.91	71.3	1.82	64.5	2.02	65.7	1.81	46.9	2.27	88.7	2.28	88	2.07	2
1.3	0	9811 G1	1.97	74.6	2.18	82.6	2.03	67.8	2.01	70.1	2.32	88.6	2.46	92.2	2.11	2.2
1.3	0	9811 G2	1.92	73.4	2.06	84	2.05	68.2	2.11	74	2.33	92.2	2.55	95.3	2.1	2.2
1.3	0.37	9812 G1	1.81	62.5	1.98	67.3	2.08	73.4	1.88	49.2	2.29	88.5	2.27	87.4	2.06	2
1.3	0.37	9812 G2	2.58	98.9	2.42	97	2.5	94.5	2.29	90	2.59	96.7	2.76	98.8	2.56	2.5
2.7	0	9813	2	79.5	2.31	93.5	2.22	87.5	2.23	88.6	2.43	93.4	2.69	96.5	2.22	2.4
2.7	0.37	9814	2.14	88.2	2.03	80.2	2.34	95.1	1.96	57.4	2.6	96.4	2.39	92.5	2.36	2.1

G1 - formulación de vacuna se administró intramuscularmente

G2 - formulación de vacuna se administró subcutáneamente

Ejemplo 6

Resultados de Serología después de la Administración de Dos Dosis de una Vacuna de Virus de Enfermedad de Pata y Boca (FMD) Adyuvantada con la Emulsión TSAP-Estudio Porcino

Materiales y Métodos: 57 Cerdos, nunca vacunados, y sin anticuerpos FMD se seleccionaron, se aleatorizaron y se distribuyeron entre 9 grupos de 6 animales que son vacunados y 1 grupo de 3 animales que no es vacunado (animales no vacunados). Los animales se vacunaron con ya sea las formulaciones de vacuna indicadas (A-I) en el día 1. Cada una de las formulaciones listadas en la Tabla 11 se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1 y comprenden todos los componentes

citados en el Ejemplo 1 con la saponina e hidróxido de aluminio que varía de acuerdo con lo siguiente: la cantidad de saponina es ya sea 0, 0.7, 1.3, o 2.7 mg/dosis y la cantidad de hidróxido de aluminio Algel es ya sea 0% o 0.37%. La seguridad de la formulación de vacuna se estimó por la vía de la medición de varios parámetros incluyendo la temperatura rectal y los indicios visuales de la reacción del animal a la vacunación.

Tabla 11

Formulación de Vacuna	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Ag (µg/dosis)	0	10	10	10	10	10	10	10	10
Saponina (mg/dosis)	0	0	0	0.7	0.7	1.3	1.3	2.7	2.7
Algel (% final)	0	0	0.37	0	0.37	0	0.37	0	0.37
Emulsión Incompleta	333	333	333	333	333	333	333	333	333
Fase Acuosa 2 (166 mL)									
FMDV Purificado (mL)	0	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1	11.1
Saponina (mL)	0	0	0	2.48	2.48	4.96	4.96	9.92	9.92
Algel 3% (mL)	0	0	61.7	0	61.7	0	61.7	0	67.7
M102 a 5°C	166	154.9	93.2	152.4	90.8	149.9	88.2	145	83.3
Total									
Volumen Total (mL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Número total (dosis)	250	250	250	250	250	250	250	250	250

Resultados: Todas las formulaciones de vacuna que contuvieron el antígeno (formulaciones **B-I**, descritas en la Tabla 11) indujeron en los animales de prueba una respuesta de anticuerpo que fue significativamente más grande que aquella inducida por el control sin antígenos (formulación **I**, descrita en la Tabla 11). Las formulaciones que contuvieron saponina indujeron respuestas de anticuerpo relativamente más grandes como es comparado con las formulaciones que no contuvieron saponina. La Tabla 12 resume los datos de título de anticuerpo, y restablece las cantidades de antígeno, saponina e hidróxido de aluminio para cada formulación. En particular, los datos de título de anticuerpo indica que la presencia en las formulaciones de vacuna de entre aproximadamente 0.7 mg/dosis y aproximadamente 2.7 mg/dosis de saponina incrementa la respuesta de anticuerpo, con relación a las formulaciones de vacuna que no contienen saponina.

Tabla 12

Grupo de Animales	Formulación de Vacuna	Antígeno (µg/dosis)	Saponina (mg/dosis)	Algel	Datos del Título del Anticuerpo		
					Promedio		
					Estadística	D21	D44
G1	A	0	0	0	Media	0.75	0.67
					Dsv.	0.26	0.26
					Estándar		
G2	B	10	0	0	Media	1.45	3.17
					Dsv.	0.50	0.48
					Estándar		
G3	C	10	0	0.37	Media	1.40	2.92
					Dsv.	0.18	0.31
					Estándar		
G4	D	10	0.7	0	Media	1.60	3.12
					Dsv.	0.31	0.42
					Estándar		
G5	E	10	0.7	0.37	Media	1.87	3.20
					Dsv.	0.69	0.45
					Estándar		
G6	F	10	1.3	0	Media	1.40	3.41
					Dsv.	0.37	0.27
					Estándar		
G7	G	10	1.3	0.37	Media	1.80	3.37
					Dsv.	0.22	0.43
					Estándar		
G8	H	10	2.7	0	Media	1.72	3.47
					Dsv.	0.66	0.30
					Estándar		
G9	I	10	2.7	0.37	Media	1.47	2.97
					Dsv.	0.18	0.57
					Estándar		
G10	No Vacunado	-	-	-	Media	0.67	0.67
					Dsv.	0.17	0.09
					Estándar		

Ejemplo 7

Determinación de la Dosis Protectora 50% (PD50) de tres vacunas FMD experimentales en cerdos

Vista General. El propósito del estudio fue probar la eficacia contra la estimulación virulenta de FMD en cerdos de 3 formulaciones de vacuna de FMD experimentales de acuerdo con la presente invención. Cuatro vacunas (A, B, C, y D) se prepararon con respectivamente no Antígeno (A), y dosis variables del antígeno O1 Manisa de FMD purificado inactivado (vacunas B, C, y D) formuladas con adyuvante de acuerdo con la presente invención. Las vacunas se presentaron como frasquitos de 30 mL rellenos con 25 mL y las dosis fueron 2

mL por dosis. La cepa de estimulación fue 01 Manisa FMD, 449402 4D:911, 20-07-1994 (que se ha aislado originalmente como 01 Manisa Turkey 1/78), y el título en las células de riñón porcinas secundarias fue 7.67 log₁₀ TCID₅₀/mL. El diluyente para la cepa estimulante fue MEM de Hanks, suero bovino fetal al 2% (FBS) con antibióticos estándares.

Procedimiento. Porcinos libres de FMDV y no previamente vacunados contra FMD se utilizaron para el estudio. Cada uno de 47 cerdos con edad de 10 semanas (más o menos 1 semana) se aclimató durante por lo menos 24 horas antes de los procedimientos experimentales. Los cerdos se alojaron 2 a 3 animales por espacio, y se alimentaron con alimentación de pelotillas estándar y agua ad libitum. En el Día 1 (D1), los cerdos (sin considerar el sexo) se asignaron a 15 grupos de tres animales y un grupo de dos animales. Cada grupo se alojó en un cuarto particular y en cada cuarto, los animales se separaron individualmente por planchas de madera (1.5 M) de la estimulación hasta la terminación del estudio.

En el día 0 los animales se vacunaron, intramuscularmente detrás de la oreja en el lado izquierdo, con jeringas individuales de acuerdo con las Tablas 13 y 14. Antes de la vacunación, los frasquitos de vacuna se invirtieron levemente aproximadamente 10 veces para asegurar la suspensión homogénea.

Tabla 13 - composición de vacuna

Vacuna (Emulsión Final)	A	B	C	D
Ag (µg/dosis)	0	0.4	2	10
Saponina (mg/dosis)	0	0.7	0.7	0.7
Algél (% final)	0	0.42	0.42	0.42
Emulsión Incompleta (ml)	333	333	333	333
Fase Acuosa 2 166 ml				
Lote O-Manisa de FMD # OMAd-04-613 (ml)	0	0.66	3.29	16.46
Saponina Pura 08-0314-P (ml)	0	2.48	2.48	2.48
Gel de Aluminio al 3% (ml)	0	61.4	61.4	61.4

Medio 102	166	102.5	99.8	86.7
Total				
Volumen total (ml)	500	500	500	500
# total (dosis)	250	250	250	250

Tabla 14 - resumen de vacunación

Grupo	Vacuna	Dosis	Volumen de Vacuna Inyectada (mL)	# Cerdos
B1	B	Dosis	2.0	3
B2	B	1/2 dosis	1	3
B3	B	1/4 dosis	0.5	3
B4	B	1/8 dosis	0.25	3
B5	B	1/16 dosis	0.13	3
C1	C	Dosis	2.0	3
C2	C	1/2 dosis	1	3
C3	C	1/4 dosis	0.5	3
C4	C	1/8 dosis	0.25	3
C5	C	1/16 dosis	0.13	3
D1	D	Dosis	2.0	3
D2	D	1/2 dosis	1	3
D3	D	1/4 dosis	0.5	3
D4	D	1/8 dosis	0.25	3
D5	D	1/16 dosis	0.13	3
A (control)	A	1	2	2

Estimulación. En el D28, el virus FMD tipo O se diluyó para obtener 100,000 TCID50 por mL (el extracto de virus se diluyó 2.67 log10, o 468 veces). En el mismo día, todos los animales se anestesiaron mediante la administración de STRESSNIL (1 mL/20 kg) y KETAMINE (2 mL/20 kg) mediante la ruta IM y se estimularon con 10,000 TCID50 de virus bajo 0.1 mL mediante la ruta intradérmica, en el bulbo del talón de la uña exterior de la pata trasera izquierda. El bienestar general de los animales se verificó diariamente de D0 a D28.

Se anotaron cualquiera de las observaciones c nicas y tratamientos. Después de la estimulación, los animales se observaron diariamente durante 7 días (D29 a D35). Las observaciones se realizaron en el mismo orden, iniciando por los cuartos con los animales vacunados con la más alta de la dosis a aquellos con animales vacunados con la dosis más baja, y finalizando con los controles (grupo A). El bienestar general se verificó diariamente, con atención particular puesta a los signos de FMD en la trompa y las patas. La sangre se recolectó de cada animal antes de la vacunación (en el D1 o D0), D14 y D28 antes de la estimulación y el final del estudio. Las muestras se inactivaron con calor (56 C durante 30 minutos) y el título de FMDV Ab tipo O se determinó en todos los sueros mediante la prueba VN (MERIAL R&D, Lelystad).

En D36 (fin del período de observación), los animales se eutanizaron (4 a 6 mL por 50 kg IV T61) y se inspeccionaron estrechamente para signos de FMDV. Cualquiera de las lesiones observadas en los grupos vacunados con una dosis completa de vacuna (grupos B1, C1, o D1) fueron muestras y se congelaron a -70 C para la tipificación de virus adicional. La presencia de lesiones en la trompa, boca y/o pata (excepto en la uña mayor de la pata inoculada) se consideraron como una evidencia de FMD. La prueba se consideró válida ya que cumple los criterios, que establece que ambos cerdos de control deben mostrar signos clínicos de FMD. La PD50 de cada vacuna se calculó mediante el método de Spearman Karber.

Resultados. La potencia contra la carga útil se presenta en la FIG. 9, y los datos del estudio relevante se resumen numéricamente en las Tablas 15 y 16 en seguida.

Tabla 15

	# de cerdos protegidos por vacuna probada		
Volumen	B	C	D

60

(ml)			
2.000	3/3	2/2	3/3
1.000	2/3	3/3	3/3
0.500	1/3	1/3	3/3
0.250	1/3	1/3	2/3
0.125	0/3	0/3	1/3

Tabla 16

	Cálculo de la potencia de vacuna usando la regresión logística			
Vacuna	Carga útil (µg)	PD50	IC95-	IC95+
B	0.4	3.594	1.6046	2.896
C	2	4.5821	1.7021	2.6979
D	10	11.7	9.533	51.55

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunológica estable, caracterizada porque comprende una emulsión de aceite en agua (O/W) inyectable, que comprende:

- (i) una solución acuosa que comprende por lo menos un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste de virus inactivados y atenuados, y bacteria;
- (ii) una solución acuosa que comprende saponina en la cantidad de 0.7 mg/dosis a 2.7 mg/dosis;
- (iii) una solución acuosa que comprende hidróxido de aluminio en la cantidad de 0.065% p/v a 0.42% p/v;
- (iv) un aceite mineral;
- (v) un surfactante lipofílico no iónico seleccionado de monoésteres de ácido graso de sorbitán, ésteres de ácido graso de manuro, ésteres de ácido graso etoxilados de manuro, y combinaciones de los mismos;
- (vi) un surfactante hidrofílico no iónico seleccionado de monoésteres de ácido graso etoxilado de sorbitán, ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de los mismos; y
- (vii) un surfactante hidrofílico no iónico seleccionado de triésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán, diésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán, monoésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán, ácidos grasos etoxilados, aceite de ricino etoxilado

y combinaciones de los mismos.

2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde la concentración de hidróxido de aluminio es de 0.37% a 0.42% (p/v).

3. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el surfactante hidrofílico no iónico de la parte (vi) está presente en una concentración de 0.1 a 1.5% expresado como un peso por volumen de emulsión (p/v), y en donde el porcentaje de los surfactantes es de 4% a 8% peso/volumen.

4. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el surfactante hidrofílico no iónico de la parte (vii) está presente en una concentración de 1% a 8% expresada como un peso por volumen de emulsión (w/v).

5. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el surfactante lipofílico no iónico de la parte (v) está presente en una concentración de 0.1% a 2.5% expresada como un peso por volumen de emulsión (w/v).

6. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el aceite mineral está presente en una concentración de 20% a 40% (v/v).

7. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el surfactante hidrofílico no iónico de la parte (vii) es seleccionado del grupo que consiste de triésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán, y en donde el éster de dicho éster de ácido graso etoxilado es seleccionado del grupo que consiste de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de los mismos.

8. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el surfactante lipofílico no iónico es seleccionado del grupo que consiste de monoésteres de ácido graso de sorbitán, y en donde el éster de los ésteres de ácido graso es seleccionado del grupo que consiste de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de los mismos.

9. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el surfactante hidrofílico no iónico de la parte (vi) es seleccionado del grupo que consiste de monoésteres de ácido graso etoxilado de sorbitán, y en donde el monoéster etoxilado de sorbitán es seleccionado del grupo que consiste de monolaurato etoxilado de sorbitán, monopalmitato etoxilado de sorbitán, monoestearato etoxilado de sorbitán, monoleato etoxilado de sorbitán, y combinaciones de los mismos.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el aceite mineral es seleccionado del grupo que consiste de aceite de parafina, escualano, pristano, aceite de poliisobuteno, aceite de poliisobuteno hidrogenado, aceite de polideceno, aceite de poliisopreno, aceite de poliisopropeno y combinaciones de los mismos.

11. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el inmunógeno es un virus inactivado.

12. La composición de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque:

el surfactante lipofílico no iónico de la parte (v) es un monoéster de ácido graso de sorbitán;

el surfactante hidrofílico no iónico de la parte (vi) es

un monoéster de ácido graso etoxilado de sorbitán;

el surfactante hidrofílico no iónico de la parte (vii) es un triéster de ácido graso etoxilados de sorbitán; y

en donde el inmunógeno es un virus inactivado de la enfermedad de Pata y Boca (FMD) o un virus inactivado de circovirus tipo 2 porcino (PCV-2).



D YOUNG & CO
AGENTES PÚBLICOS DE PATENTES
AGENTES DE PATENTES EUROPEAS
AGENTES DE MARCAS COMERCIALES EUROPEAS
AGENTES DE DISEÑOS EUROPEOS

En el sitio www.dyoung.com se encuentra
disponible un listado de los
asociados, o por solicitud
120 HOLBORN
LONDON
EC1N2DY
TEL: +44 (0) 2072698550
FAX: +44 (0) 2072698555

Por Fax: 0049 89 2399 4465

EPO – Múnich
63
08 de enero de 2010
CONFIRMACIÓN

OFICINA EUROPEA DE PATENTES
80298 Múnich
Alemania

5 de enero de 2010

Estimados señores
Solicitud Europea de Patente No. 06740939.1
Fase regional de PCT/US06/013936
Merial Limited

Nos referimos a la comunicación expedida de conformidad con el artículo 94 (3) del Convenio Europeo de Patentes fechada el 29 de junio de 2009 y anexamos a la presente un capítulo reivindicatorio modificado. Para ayuda de la división de examen también se adjuntan en el manuscrito copias de las modificaciones efectuadas ahora.

1. Unidad

En respuesta a la objeción por unidad que hizo el examinador, la presente solicitud ha sido limitada a la invención I, tal como se hizo la búsqueda por parte de la autoridad de búsqueda internacional. Por consiguiente, las reivindicaciones anteriores 2, 4, 7, 8, 11, 12 y 14-20 han sido borradas y las reivindicaciones restantes han sido re-numeradas de manera correspondiente.

BRITON HOUSE, SRITON STREET, SOUTHAMPTON SO14 3EB TELÉFONO: +44 (0) 23 80719500 FAX: +44 (0) 23 80719800
ISDN FAX: +44 (0) 23 80719888 EMAIL: mail@dyoung.CO.UK WEBSITE: www.dyoung.com OX.007B LONDRES. CHANCERY LANE

El solicitante se reserva el derecho de presentar una o varias solicitudes divisionales de la materia borrada.

2. Novedad

Agradecemos al examinador por reconocer la novedad de las reivindicaciones de la invención (I) de conformidad con el numeral (V) de la opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional.

3. Nivel inventivo

El examinador ha alegado que D1 es el estado de la técnica más cercano. D1 divulga una emulsión aceite en agua que comprende (1) una solución acuosa que contiene un inmunógeno, (2) un surfactante lipofílico no iónico (por ejemplo, Span 85), (3) un aceite mineral (por ejemplo, parafina) y (4) un alcohol graso etoxilado hidrofílico no iónico (por ejemplo, Brij 96)

Vis-a-vis D1, el problema técnico al cual se dirige la presente invención es proporcionar una emulsión aceite en agua mejorada, adecuada para usarse como adyuvante en composiciones farmacéuticas, inmunológicas o de vacuna.

Este problema técnico es resuelto por la presente invención tal como se reivindica la cual comprende una emulsión aceite en agua que comprende una solución acuosa que contiene (1) un antígeno o inmunógeno de vacuna capaz de inducir una respuesta inmune en un hospedero, (2) un alcohol graso etoxilado lipofílico no iónico, (3) un aceite mineral y (4) un surfactante hidrofílico no iónico que es un alcohol graso etoxilado.

Sorprendentemente, la selección de un alcohol graso etoxilado como surfactante lipofílico no iónico conduce a formulaciones de vacuna que exhiben estabilidad mejorada sobre aquellas divulgados en D1, las cuales usan surfactantes lipofílicos no iónicos convencionales tales como Span 85. No hay enseñanza ni sugerencia en el estado de la técnica de que seleccionar un alcohol graso etoxilado lipofílicos no iónico daría lugar a composiciones que muestran propiedades mejoradas, por ejemplo, en términos de estabilidad a lipasas o esterases.

Como medida de apoyo de este argumento, el solicitante adjunta datos comparativos que demuestran que las emulsiones aceite en agua reivindicadas ahora demuestran un efecto técnico mejorado sobre aquellas conocidas en la técnica. Los experimentos comparan composiciones de vacuna que contienen antígeno idéntico a (i) TS6, una emulsión aceite en agua de conformidad con D1, y (ii) LR4, una emulsión aceite en agua de conformidad con la invención. En el anexo 1 se adjuntan más detalles sobre la preparación y análisis de estas formulaciones, junto con los estudios de estabilidad anexos.

Los resultados demuestran que la vacuna A (TS6) que usa un surfactante no iónico clásico se deteriora el tiempo para formar múltiples capas en la emulsión. Además, las mediciones de

5 de enero de 2010

página 2 de 2

D YOUNG & CO

granulometría indican que con el tiempo se forman múltiples poblaciones de partículas en lugar de permanecer como una población monomodal estable. Finalmente, los estudios muestran una caída en la temperatura de inversión de fase (PIT por sus siglas en inglés Phase Inversion Temperature) en el tiempo, de nuevo indicativa de un cambio de composición.

En contraste, la vacuna B (LR4) no se deteriora en apariencia con el tiempo, incluso después de 24 meses. Con el tiempo tampoco se observa una disminución en el valor de PIT. Además, los estudios de granulometría indican una población monomodelo incluso después de 24 meses.

Por consiguiente, estos estudios demuestran claramente que la formulación de LR4 exhibe estabilidad mejorada sin modificación en el valor de PIT y tamaño de partícula de aceite que pudieran atribuirse a la actividad enzimática. Este efecto es particularmente pertinente dado que la vacuna B (LR4) contiene tres veces más carga de antígeno ($3.17 \log^{10}/2.7 \log^{10}$) y de esta manera tres veces más carga de lipasa/esterasa que la vacuna A (TS6).

A la luz de los datos comparativos de arriba, el solicitante declara que las emulsiones reivindicadas ahora demuestran un efecto sorprendente que no podía haberse predicho con base en las enseñanzas de la técnica anterior. Por consiguiente, declaramos que se satisfacen los requisitos del artículo 56 del convenio europeo de patentes.

En vista de los comentarios y modificaciones anteriores, creemos que las objeciones del examinador han sido superadas y que la solicitud ahora está en regla para ser concedida la patente. No obstante, si la lesión de examen tiene alguna objeción relevante respetuosamente solicitamos la oportunidad de presentar más modificaciones y/u observaciones.

El solicitante tiene como propósito adaptar la descripción en conformidad con las reivindicaciones a su debido tiempo, una vez la división de examen haya decidido sobre la admisibilidad de las reivindicaciones.

Por favor, nótese que las modificaciones presentadas junto con la presente están hechas sin abandonar el objeto de la solicitud y sin perjuicio de la protección que está en el alcance del artículo 69. En particular, nos reservamos el derecho a presentar una solicitud divisional.

Como una precaución solamente, en el evento de que se contemple una negación solicitamos un proceso oral.

Por favor, acuse recibo mediante sello y devolviendo una copia del formato 1037 adjunto.

Atentamente

Por D Young & Co
[firma ilegible]
Dr Zoe Clyde-Watson
Asociado

7 de enero de 2010 9:53 D YOUNG & CO No. 7358 P. 5

Anexo 1

Productos que van a compararse en términos de estabilidad son:

Producto A- emulsión TS6 tal como está descrita en el ejemplo 1 de WO 05009462 (D1), usando surfactantes no iónicos clásicos (oleatos de sorbitán).

Producto B- emulsión LR4 tal como está descrita en el ejemplo 1 de la solicitud, usando surfactantes de alcoholes grasos etoxilados no iónicos.

Se evaluaron los siguientes criterios de estabilidad:

Apariencia: una emulsión estable debe permanecer blanca y homogénea (B/H) mientras que la inestabilidad puede detectarse por la aparición de diferentes capas en la emulsión.

Granulometría: medición de los tamaños de partículas de aceite y su distribución mediante técnica de difracción de luz dinámica. La inestabilidad se detecta por un incremento en el diámetro de partícula o poblaciones múltiples de partículas (en lugar de mono modal).

Temperatura de inversión de fase: esta es la temperatura en la cual el sistema de emulsión cambia de aceite en agua a agua en aceite (al calentar) o de manera reversible de agua en aceite a aceite en agua (al enfriar). La PIT se mide por conductividad tal como se describe en la descripción detallada de la solicitud. La inestabilidad puede detectarse por una caída del valor de PIT con el tiempo, revelando un cambio de composición - hidrólisis potencial de uno o más surfactantes.

27

Resultados de estabilidad

Vacuna A (TS6) que contiene antígeno título $2.7 \log^{10}$ OD50/dosis (virus desactivado medido por ELISA)

Tiempo en meses	Apariencia	PIT en °C	Tamaño de granulometría en μm
0	B/H	38.5	0.152 - monomodal
1	B/H	37.5	0.152 – monomodal
3	B/H	36.5	0.159 – monomodal
6	B/H	34	0.155 – monomodal
9	B/H	32	0.159 – monomodal
14	B/H	30.5	0.159 – monomodal
16	Múltiples capas	26	1.75 - poblaciones múltiples

Vacuna B (LR4) que contiene antígeno título $3.17 \log^{10}$ OD50/dosis (virus desactivado medido mediante ELISA)

Tiempo en meses	Apariencia	PIT en °C	Tamaño de granulometría en μm
0	B/H	> 45	0.155 - monomodal
1	B/H	> 45	0.156 – monomodal
4	B/H	> 45	0.155 – monomodal
6	B/H	> 45	0.162 – monomodal
15	B/H	> 45	0.159 – monomodal
24	B/H	> 45	0.161 – monomodal

Con tres veces más carga de antígeno ($3.17 \log^{10} / 2.7 \log^{10}$) y por lo tanto tres veces más carga de enzimas lipasa/esterasa, la formulación LR4 demuestra estabilidad de más tiempo sin modificación en el valor de PIT y en el tamaño de partícula de aceite que pueda ligarse con la actividad enzimática.

Ejemplo 1 de WO 05009462 (D1)

Método de fabricación de la emulsión

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

Primera etapa: para producir las formulaciones se usó un emulsionante Silverson de rotor-estator de alto corte (tipo L4RT con una cabeza desintegrante con un diámetro de 10 mm). Para producir una emulsión se emulsionó un volumen de fase oleosa a 25 °C con un volumen de la fase acuosa

#1. La fase acuosa se adicionó a la fase oleosa agitando, 5000 rpm (revoluciones por minuto) durante un minuto. La velocidad de rotación se incrementó progresivamente con el aumento del volumen 8300 rpm durante un minuto. Durante esta etapa la emulsión fue una emulsión de agua en aceite. Para la emulsión TS6, la composición de fase fue tal como sigue:

Fase oleosa (120 ml):

- Mono oleato de sorbitán (Span 80®): 1.8% p/v,
- trioleato de sorbitán (20 OE) (Tween 85®): 10.2% p/v,
- aceite de parafina (Marcol 82®): 88% v/v,

fase acuosa #1 (120 ml):

- solución al 20% (p/v) de mono oleato de sorbitán (20 OE) (Tween 80®): 11.25% p/v
- amortiguador isotónico de 0.0 2M fosfato disódico y mono potásico (pH 7.8): 85.75% v/v
- mercuriotiolato de sodio (Thiomersal®) 1% en agua: 1.5% v/v.

Monooleato de sorbitán (Span 80®) y trioleato de sorbitán (20 OE) (Tween 85®) se introdujeron a la fase oleosa. El mono oleato de sorbitán (20 OE) (Tween 80®) no era miscible en el aceite de parafina. Una solución al 20% (p/v) de Tween 80® se preparó en el mismo amortiguador que la vacuna, por ejemplo, en amortiguador isotónico de 0.0 2M fosfato disódico y mono potásico (pH 7.8). El mercuriotiolato de sodio actúa como un preservante y no es esencial para la emulsión.

Cuando se detiene la agitación, la emulsión cambia a una emulsión aceite en agua. La emulsión se colocó en una cámara fría a 5 °C por al menos cuatro horas. En esta etapa la emulsión era una pre-emulsión que contenía 50% de fase oleosa.

Segunda etapa: la etapa acuosa #2 fue preparada con 120 ml de amortiguador de pH 7.8 isotónico de 0.0 2M fosfato disódico y mono potásico con inmunógeno inactivado. La pre-emulsión, tal como se preparó en la primera etapa, fue enfriada a aproximadamente 5 °C, diluida adicionando la mitad del volumen de la fase acuosa #2 a la misma temperatura, y mezclada por la rotación de una barra magnética durante un minuto. La concentración final del surfactante en la emulsión TS6 fue de 4.75% (p/v).

Tal como se prepararon en la presente, las vacunas TS6 son estables durante al menos un año a 5 °C.

Ejemplo 1 de la invención

Método de fabricación de la emulsión

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

primera etapa: para producir las formulaciones se usó un emulsionante Silverston rotor-estator de alto corte (tipo L4RT con una cabeza desintegrante con un diámetro de 10 mm). Para producir un emulsión se emulsionó un volumen de fase oleosa a 35 °C con un volumen de fase acuosa #1. La fase acuosa fue adicionada a la fase oleosa mientras se agitaban, 5000 rpm (revoluciones por minuto) durante un minuto. La velocidad de rotación se incrementó progresivamente con el aumento del volumen hasta 8300 rpm durante un minuto. Durante este paso la emulsión era una emulsión agua en aceite. La emulsión LR4 final es una de aceite/agua que contiene 20% de fase oleosa. Para la emulsión LR4 la composición de fase fue tal como sigue:

Fase oleosa (72 ml)

- Oleth-2 (Brij® 92): 1.8 % p/v,
- Olelh-5 (Volpo® N5): 8.2 % p/v,

- Aceite de parafina (Marcol 82®): 87.5 % vlv,

- Conservante: 2.5% v/v

Fase acuosa #1 (108 ml):

- Poloxamer 407 (Lutrol® F127): 0.58 % w/v,
- amortiguador de pH isotónico que contienen fosfato disódico y mono potásico 0.02 M (pH 7.8): Q. S. a 100.0 % v/v

Una solución al 5% (p/v) de Lutrol® F 127 en el mismo amortiguador que la vacuna, por ejemplo en amortiguador isotónico que contiene fosfato disódico y mono potásico de 0.0 2M (pH 7.8) fue usada para preparar la fase acuosa #1.

Cuando se detuvo la agitación, la emulsión cambió a una emulsión aceite en agua. La emulsión se colocó en una cámara fría a 5 °C durante por lo -4 horas. En esta etapa, la emulsión era una pre-emulsión que contenía 40% de fase oleosa.

Segunda etapa: la fase acuosa #2 fue preparada con 180 ml de amortiguador de pH 7.8 isotónico de fosfato disódico y monopotásico de 0.0 2M con inmunógeno activado. La pre-emulsión tal como se preparó en la primera etapa se enfrió a alrededor de 5 °C, se diluyó adicionando el mismo volumen de la fase acuosa #2 a la misma temperatura, y se mezcló por medio de rotación de una barra magnética durante un minuto. La concentración final del surfactante en la emulsión LR4 fue de 2.18 % (p/v).

Tal como fueron preparadas aquí, las vacunas LR4 son estables durante al menos un año a 5 °C.

Estabilidad de las emulsiones

Las composiciones LR4 y LR3 fueron estables incluso en presencia de inmunógeno concentrado a 21 °C durante al menos nueve meses. La distribución de tamaño de partícula de las emulsiones no cambió durante el período de tiempo.

Traducción realizada por Rafael Baracaldo
Id. 256175-WPC14306