

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ NUEVAS FORMULACIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN ADYUVANTES
QUE CONTIENEN SAPONINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ MERAL LIMITED

DOMICILIO _____ DULUTH, GEORGIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DETENTORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-058153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-10 11:15:14
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 103

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

☒ Patente de Invención.

☒ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **MERIAL LIMITED**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 3239 Satellite Blvd.,
Duluth,
Georgia 30096,
Estados Unidos de América

Domicilio: Duluth,
Georgia,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C.☐

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.☒

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Noel Joseph Francois DETRAZ
43, Rue Julien,
F-69003 Lyon,
Francia

2. Guillaume RIGAUT
148, Boulevard Yves Farge,
F-69007 Lyon,
Francia

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/048256

Fecha: 09 de septiembre de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/031850 A1

Fecha: 17 de marzo de 2011

6

Título (54)

NUEVAS FORMULACIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN ADYUVANTES QUE CONTIENEN SAPONINA

7

Clasificación Internacional (51) A61K 039/135

8

Prioridad

SI☒ NO☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

10 de septiembre de 2009

61/241,171

9

Comprobante de pago No.: 12-0029293

Fecha: 23 de marzo de 2012

Comprobante de pago No.: 12-0029260

Fecha: 23 de marzo de 2012

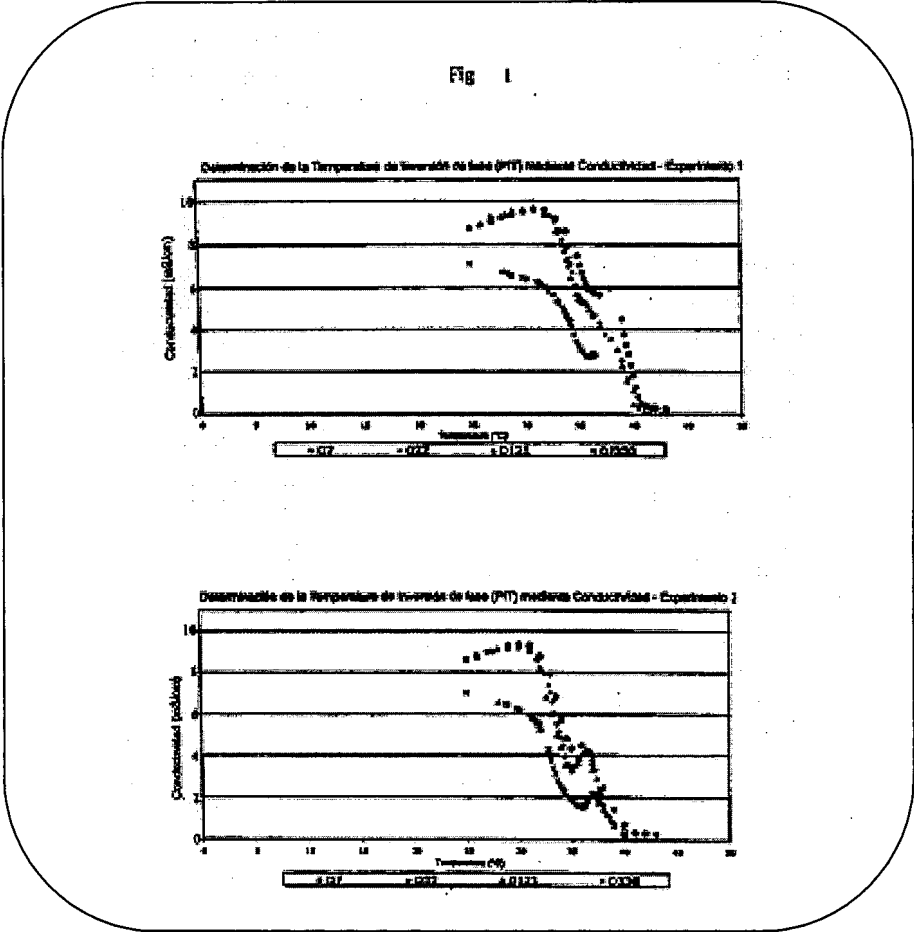
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 10 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$300.000oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder de **MERIAL LIMITED**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011/031850 A1.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia Sobrino
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555



SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1.  Publicación Internacional WO 2011/031850 A1

Descripción:

Páginas 65 en español

Reivindicaciones: Número (s) 20

Figuras: Número (s) 9

2.  **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3.  Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

**GEORGIA SUPERIOR COURT
CLERKS' COOPERATIVE AUTHORITY**

Notary Division

1875 Century Boulevard, Suite 100

Atlanta, Georgia 30345

14306
11485

24

APOSTILLE

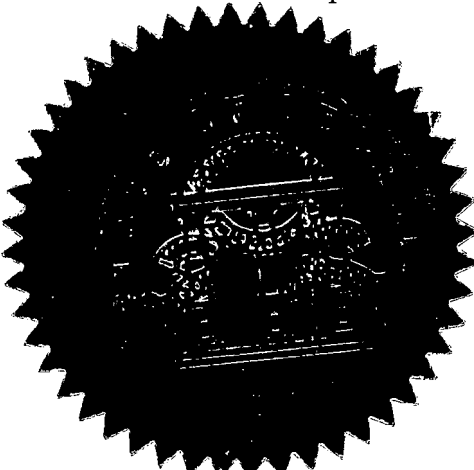
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **UNITED STATES OF AMERICA**
2. This public document
has been signed by **TIKI CANTRELL**
3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC, STATE OF GEORGIA**
4. bears the seal/stamp of **TIKI CANTRELL
NOTARY PUBLIC
FULTON COUNTY, GEORGIA**

CERTIFIED

5. at **ATLANTA, GEORGIA**
6. the **8TH DAY OF JULY, 2004**
7. by **GEORGIA SUPERIOR COURT CLERKS' COOPERATIVE AUTHORITY**
8. No. **I-103889**

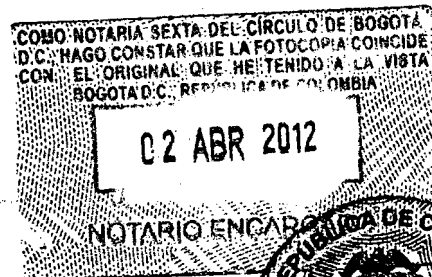
9. Seal/Stamp



10. Signature:

David R. Williams

**DAVID R. WILLIAMS
EXECUTIVE DIRECTOR**



REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

MERIAL LIMITED

domiciliado (s) en/of 3239 Satellite Blvd.,

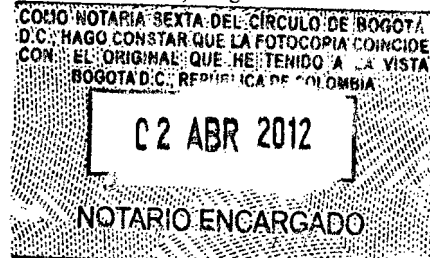
Duluth, Georgia 30096, Estados Unidos de América, hereby ratify the patent

application No. 04.051.017 filed by EMILIO FERRERO on June 1, 2004 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72. 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in



nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this June 16, 2004
en/in Duluth, Georgia
por/by Horace D. Hall
Company Secretary
Firma/Signature x [Signature]



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
de 200 ____ de _____

compareció(eron)
personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y
quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 16 días del mes de Junio
de 200 4 compareció(eron) ante mí,

Horace D Nalle

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada

Merial Limited

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

Artículos de constitución, 31 Julio, 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Merial Limited

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de
acuerdo con las leyes de Delaware

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

3239 Satellite Blvd

Duluth, Georgia 30096

© CAVELIER ABOGADOS

WPP0DE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
before me, a Notary Public or Attesting Official
200 ____ of _____

personally
appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 16th day of June
200 4 appeared before me

Horace D. Nalle

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named

Merial Limited

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

ARTICLES OF ASSOCIATION dated

July 31, 1997

2. That the above documents duly prove the following:

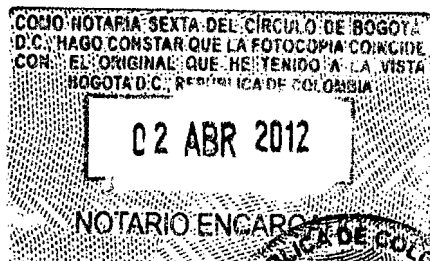
2.1. That Merial Limited

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

3239 Satellite Blvd.

Duluth, Georgia 30096



2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) _____

Horace Nalle

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Duluth

Estado Georgia

Hoy 16 Junio de 2004

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Horace D. Nalle

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City Duluth

State Georgia

This 16th day of June 2004

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

Mark Cartrell
Notary Public, Fulton County, Georgia
My Commission Expires May 3 2008

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- Country:
This public document
- has been signed by
- acting in the capacity of
- bears the seal/stamp of

Certified

- at 6. the
- by
- No.
- Seal/stamp 10. Signature

COBO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
02 ABR 2012
NOTARIO ENCARGADO

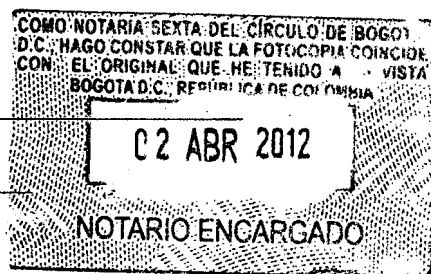


TRADUCCIÓN OFICIAL No. 26.07/04a realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **MERIAL LIMITED** domiciliada en el 3239 Satellite Blvd., Duluth, Georgia 30096, Estados Unidos de América, por el presente ratifica la solicitud de patente No. 04.051.017 presentada por el Doctor Emilio FERRERO el 1 de Junio de 2004, y otorga derechos de representación y poder a los Doctores Emilio Ferrero, tpa. 31929; Gonzalo Perdomo, tpa. 831; Luz Clemencia de Páez, tpa. 23555 y Germán Cavelier, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 16 de junio de 2004 en Duluth, Georgia por Horace D. Nalle, Secretario de la Compañía.

Firma _____ Firma Ilegible



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en donde se certifica que el Señor Horace D. Nalle en el anterior documento en representación de Merial Limited y adicionalmente se certifica que la compañía está legalmente constituida y existente de acuerdo a las leyes del Estado de Delaware, que su domicilio es el 3239 Satellite Blvd., Duluth, Georgia 30096, y que el Señor Horace D. Nalle está autorizado para otorgar el presente Poder.

Dado y firmado en la ciudad de Duluth, Estado de Georgia el 16 de Junio de 2004.

Notario Público o Funcionario Autorizado _____ Firma Ilegible

Sello:

Notario Público Condado de Fulton, Georgia
Mí Comisión vence Mayo 3 de 2008

AUTORIDAD COOPERATIVA DEL SECRETARIO
DEL TRIBUNAL SUPERIOR DE GEORGIA
División Notarial
1875 Century Boulevard, Suite 100
Atlanta, Georgia 30345

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Este documento público

2. ha sido firmado por TIKI CANTRELL

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE GEORGIA

4. lleva el sello/estampilla de TIKI CANTRELL

NOTARIO PÚBLICO

CONDADO DE FULTON, GEORGIA

CERTIFICADO

5. En ATLANTA, GEORGIA

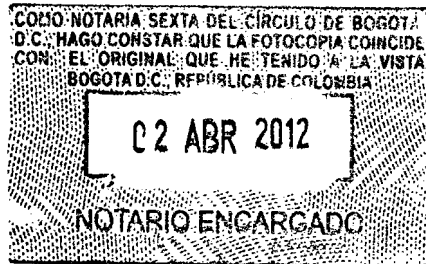
6. El 8 DE JULIO DE 2004

7. por la AUTORIDAD COOPERATIVA DEL SECRETARIO DE LA CORTE SUPERIOR DE GEORGIA

8. No. I-103889

9. Sello/estampilla:

10. Firma



ESTADO DE GEORGIA

1776

Firma Ilegible
DAVID R. WILLIAMS
DIRECTOR EJECUTIVO

NOTARIO PÚBLICO
(404) 327-6023

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ//ID-005829/WPCL002G/COLO 14036-841-001-6

Cns C-2004-00009516

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1998
MINISTERIO DE JUSTICIA

COPIA REGISTRADA POR
EN ESTA NOTARIA
29 JUL 2004

COPIA REGISTRADA POR
EN ESTA NOTARIA
02 ABR 2012
NOTARIO ENCARGADO



CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIAWEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.comTELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : Merial Limited

Poder conferido el : 16/06/2004

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme a lo establecido en el Código de Procedimiento Civil.

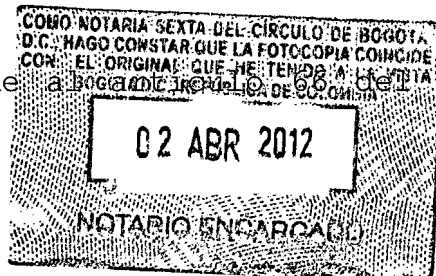
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén



Acepto:



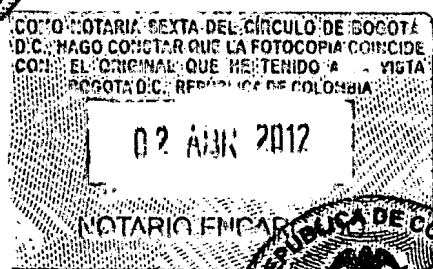
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C.
 Ante el AMPARO QUINTERO AMPARO
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Compareció(eron) Emilio Ferrero
Williamson
Luz Clemente Suarez
de Perez
 Quién(s) exhibió(aron) la(s) C.C.
Cc# 43801978431929
Cc# 354563447042355
 y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
 en el presente documento es(son) la(s) cuya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma sets diligencia.

Emilio Ferrero
Luz Clemente Suarez



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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 March 2011 (17.03.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/031850 A1

(51) International Patent Classification:

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

(21) International Application Number:

PCT/US2010/048256

(22) International Filing Date:

9 September 2010 (09.09.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/241,171 10 September 2009 (10.09.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **MERIAL LIMITED** [US/US]; 3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DETRAZ, Noel Joseph, Francois** [FR/FR]; 43, Rue Julien, F-69003 Lyon (FR). **RIGAUT, Guillaume** [FR/FR]; 148, Boulevard Yves Farge, F-69007 Lyon (FR).

(74) Agent: **JARECKI-BLACK, Judy**; Merial Limited, 3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096 (US).

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

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

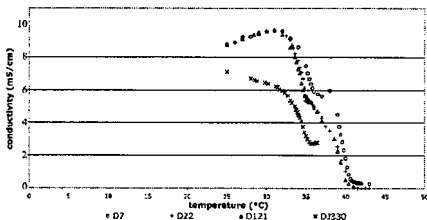
Published:

— with international search report (Art. 21(3))

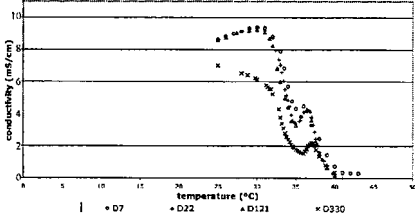
(54) Title: NEW VACCINE FORMULATIONS COMPRISING SAPONIN-CONTAINING ADJUVANTS

Figure 1

Phase Inversion Temperature (PIT) Determination by Conductivity - Trial 1



Phase Inversion Temperature (PIT) Determination by Conductivity - Trial 2



(57) Abstract: The present invention provides for a novel oil-in-water (O/W) emulsion, with increased stability in the presence of bacterial or viral suspensions, especially those concentrated and non-purified (crude extracts) or minimally purified. The emulsion of the present invention can act as vehicle for the delivery of a pharmaceutical composition comprising at least one immunogen and, in particular, an immunogen selected from the group consisting of an inactivated pathogen, an attenuated pathogen, a subunit, a recombinant expression vector, and a plasmid or combinations thereof.

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

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona a emulsiones de
5 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
10 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.
15 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
20 mismas o durante su prosequimiento ("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
25 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
30 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
5 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
10 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
15 (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
20 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
25 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
30 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
5 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,
10 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,
15 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
20 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
25 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
30 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
5 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
10 comprende un inmunógeno u otro producto farmacéutico en un primer frasco, y un adyuvante hecho de acuerdo con la presente invención en un segundo frasco, 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
15 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
20 surfactante iónico hidrofílico tal como saponina;
- (3) una solución acuosa opcional que comprende hidróxido de aluminio;
- (4) un aceite mineral;
- 25 (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).

30 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:

- 5 (1) una solución acuosa que comprende un inmunógeno;
- (2) una solución acuosa que comprende un surfactante iónico hidrofílico tal como saponina;
- 10 (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 $HLB \geq 14$;
- 15 (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).

20 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

25 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

30 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 frasco que contiene inmunógenos purificados y la emulsión de acuerdo con la presente invención. En tal modalidad, los inmunógenos contenidos dentro del único frasco comprenden antígenos de virus FMD purificados.

En otra modalidad, la presente invención proporciona equipos que comprenden por lo menos dos

frasquitos, en un primar 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 (μ g) para cerdos tratados de acuerdo con los materiales y métodos divulgados en el Ejemplo 7.

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

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

25
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 avia, 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 rápidas 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.

30 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
5 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.

10 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
15 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
20 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
25 "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
30 inmunogénicas; una pieza o fragmento de DNA capaz de inducir una respuesta inmune en la presentación a un animal

27
hospedero; una proteína, un polipéptido, un péptido, un epítope, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

5 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*
10 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*).

15 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
20 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,
25 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
30 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
5 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.

10 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
15 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.

20 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
25 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,
30 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
5 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,
10 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
15 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
20 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
25 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,
30 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
5 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
10 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
15 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 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
25 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
30 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
5 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
10 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
15 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,
20 "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
25 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
30 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
5 "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
10 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,
15 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:

- 20 (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;
- 25 (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
30 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 5 650®, 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 10 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®.

15 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 20 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 25 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 30 sorbitán etoxilado tal como TWEEN 80®, alcohols grasos etoxilados (en particular 15-30 grupos etoxilo) (por ejemplo,

36
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
5 (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
10 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
15 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
20 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®, monoleato de sorbitán, similar a SPAN 80®, trioleato de sorbitán, similar
25 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
30 graso etoxilado de manuro (2, 3 o 4 grupos etoxilo) (por ejemplo, MONTANIDE 888®, MONTANIDE 103®, monoleato 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

38

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
 5 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
 15 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
 20 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
 25 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%
 30 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:

- 5 (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;
- 10 (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).

15 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
- 20 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;
- 25 (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).

30 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 5 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 10 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.

15 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; 20 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); 25 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-hidroxietyl) propanodiamina (tal como AVRIDINE®) (*Ibid*, p. 148), 30 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
5 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
10 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).
15 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
20 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
25 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
30 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 5 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.

10 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 15 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 20 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 25 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, 30 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
5 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,
10 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,
15 *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
20 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
25 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,
30 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, 5 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 10 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), 15 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.)// 20

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, 25 *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 30 similares.

La presente invención además proporciona métodos

5 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

54

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
5 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
10 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,
15 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
20 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
25 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
30 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 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
5 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
10 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

15 **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
20 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 Cada Fase	Por ciento Total (v/v)
<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
- 5 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
- 10 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).

5 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.

10 **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

15 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

20 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

25 (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

30 proféticos enseguida:

Emulsión TSAP-2

La emulsión TSAP-2 es 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

5 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
10 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
15 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
20 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).

25

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
30 emulsiones de aceite en agua) de formulaciones de vacuna preparadas de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1.

5 consideraron de moderadamente a altamente purificados.

20 (24) meses (es decir, la estabilidad del aceite/agua
observada para la formulación 13).

Tabla 2[illegible]

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[illegible]

[aproximadamente 1500 µg]										
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 µn;

	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

5 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

10 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

15 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
	39	36	39	39.5	36	39	39.5	37.5	40	40

PIT	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.

5

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	27/09/05	05/12/09	+	0	0.39	0.146	0.790

8							
Experimento	27/09/05	05/12/09	+	0.8	0.39	0.145	0.789
9							
Experimento	27/09/05	05/12/09	+	2.5	0.39	0.145	0.787
10							

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

5 Bovinos

10 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
15 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
20 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
25 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	2	30	1	2	30
	Semana	Semanas	Días	Semana	Semanas	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
5 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
10 del animal en las fechas especificadas.

Tabla 9[illegible]

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 01 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.

5 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
10 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 &
15 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
20 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			
			D21		D56		D21		D56		D21		D56	
			TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	EPP	TIT	EPP
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
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
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
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

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
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
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
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
2.7	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
2.7	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

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

5 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

5 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

10 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

15 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	1	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 01 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	0	0.7
Algel (% 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 clínicas y tratamientos. Después de la estimulación, los animales se observaron diariamente durante 7 días (D29 a D35). Las
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

30 *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 16enseguida.

Tabla 15

	# de cerdos protegidos por vacuna probada		
Volumen (ml)	B	C	D
2.000	3/3	2/2	3/3
1.000	2/3	3/3	3/3
0.500	1/3	1/3	3/3
0.250	1/3	1/3	2/3
0.125	0/3	0/3	1/3

Tabla 16

	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 de vacuna, caracterizada porque comprende una emulsión de aceite en agua (O/W) inyectable, que comprende:

- 5 (i) una solución acuosa que comprende por lo menos un inmunógeno;
- (ii) una solución acuosa que comprende un surfactante iónico hidrofílico;
- (iii) una solución acuosa opcional que comprende
10 hidróxido de aluminio;
- (iv) un aceite mineral;
- (v) un surfactante lipofílico no iónico;
- (vi) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un alto valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) entre 13 y 40; y
15 (vii) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) entre 9 y 13.

2. La composición de conformidad con la
20 reivindicación 1, caracterizada porque el surfactante iónico hidrofílico es saponina y en donde la concentración de la saponina está entre aproximadamente 0.35 mg/dosis y aproximadamente 3.0 mg/dosis y en donde la concentración del hidróxido de aluminio está entre aproximadamente 0% y
25 aproximadamente 1.0% (w/v).

3. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el surfactante hidrofílico no iónico de alto HLB está presente en una concentración de 0.1 a 1.5% expresado como un peso por
30 volumen de emulsión (p/v), y en donde el porcentaje de los surfactantes es de aproximadamente 4% a aproximadamente 8%

peso/volumen.

4. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el surfactante hidrofílico no iónico de bajo HLB está presente en una
5 concentración de 1% a 8% expresada como un peso por volumen de emulsión (w/v).

5. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el surfactante lipofílico no iónico está presente en una concentración de
10 0.1% a 2.5% expresada como un peso por volumen de emulsión (w/v).

6. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el aceite mineral está presente en una concentración de 20% a 40% (v/v), y en donde
15 la emulsión tiene una temperatura de inversión de fase (PIT) de entre aproximadamente 33°C a aproximadamente 66°C.

7. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el surfactante hidrofílico no iónico de bajo HLB se selecciona del grupo que
20 consiste de triésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán, diésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán, monoésteres de ácido graso etoxilados de sorbitán, alcoholes grasos etoxilados, aceite de ricino etoxilado de ácidos grasos etoxilados y combinaciones de los mismos, y en donde el éster
25 de ácido graso etoxilado se selecciona del grupo que consiste de oleato, palmitado, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de los mismos.

8. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el surfactante
30 lipofílico no iónico se selecciona del grupo que consiste de ésteres de ácido graso de sorbitán, ésteres de ácido graso de

manuro, ésteres de ácido graso dietoxilados de manuro, ésteres de ácido graso trietoxilados de manuro, ésteres de ácido graso tetraetoxilado de manuro y combinaciones de los mismos, y en donde el éster de los ésteres de ácido graso se
5 selecciona del grupo que consiste de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de los mismos.

9. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el surfactante
10 hidrofílico no iónico de alto HLB se selecciona del grupo que consiste de monoésteres de ácido grado etoxilado de sorbitán, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, copolímero de bloque no iónico y combinaciones de los mismos, y en donde el monoéster etoxilado de sorbitán se selecciona
15 del grupo que consiste de monolaurato de sorbitán etoxilado, monopalmitato de sorbitán etoxilado, monoestearato de sorbitán etoxilado, monoleato de sorbitán etoxilado, y combinaciones de los mismos.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el aceite mineral se
20 selecciona 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
25 mismos.

11. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque comprende un aceite de parafina, un monoéster de ácido graso de sorbitán, un surfactante lipofílico no iónico, un triéster de ácido graso
30 etoxilado de sorbitán como un surfactante hidrofílico no iónico de bajo HLB y un copolímero de bloque no iónico como

un surfactante hidrofílico no iónico de alto HLB.

12. La composición de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada porque el monoéster de ácido graso de sorbitán es un monooleato de sorbitán, triéster de
5 ácido graso etoxilado de sorbitán es un trioleato etoxilado de sorbitán y el copolímero de bloque no iónico es un polímero de polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP).

13. La composición de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque el aceite de parafina
10 está presente en una concentración de 10% a 40% v/v, el monooleato de sorbitán está presente en una concentración de 0.2% a 1.5% w/v, el trioleato etoxilado de sorbitán está presente en una concentración de 2% a 5% w/v y el POE-POP está presente en una concentración de 0.1% a 0.5% w/v.

14. La composición de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque el aceite de parafina
15 está presente en una concentración de 29.3% v/v, el monooleato de sorbitán está presente en una concentración de 0.6% w/v, el trioleato etoxilado de sorbitán está presente en una
20 concentración de 3.4% w/v y el POE-POP está presente en una concentración de 0.25% w/v.

15. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el inmunógeno se selecciona del grupo que consiste de un patógeno inactivado,
25 un patógeno atenuado, una subunidad, un vector de expresión recombinante, y un plásmido o combinaciones de los mismos, y en donde el patógeno inactivado se selecciona del grupo que consiste de un virus, una bacteria, un hongo, parásito protozoario o combinaciones de los mismos.

30 16. La composición de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque el inmunógeno es un

virus de la enfermedad de Pata y Boca (FMD) inactivado, un virus de circovirus tipo 2 porcino (PCV-2) inactivado, o una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada.

17. Un método para inducir una respuesta
5 inmunológica en un animal contra un patógeno, caracterizado porque comprende administrar al animal una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 15.

18. Un método de conformidad con la reivindicación
17, caracterizado porque el inmunógeno se selecciona del
10 grupo que consiste de un patógeno inactivado, un patógeno atenuado, una subunidad, un vector de expresión recombinante y un plásmido o combinaciones de los mismos.

19. Un método de conformidad con la reivindicación
17, caracterizado porque el inmunógeno se selecciona del
15 grupo que consiste de una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada, un virus de circovirus tipo 2 porcino (PCV-2) inactivado o combinaciones de los mismos.

20. El método de conformidad con la reivindicación
19, caracterizado porque la administración es inyección
20 intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC), o en donde la administración se hace con un inyector sin aguja.

RESUMEN DE LA INVENCION

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 (extractos crudos) o mínimamente purificadas. La emulsión de la presente invención puede actuar como vehículo para el suministro de una composición farmacéutica que comprende por lo menos un inmunógeno y, en particular, un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste de un patógeno inactivado, un patógeno atenuado, una subunidad, un vector de expresión recombinante y un plásmido o combinaciones de los mismos.

Fig 1

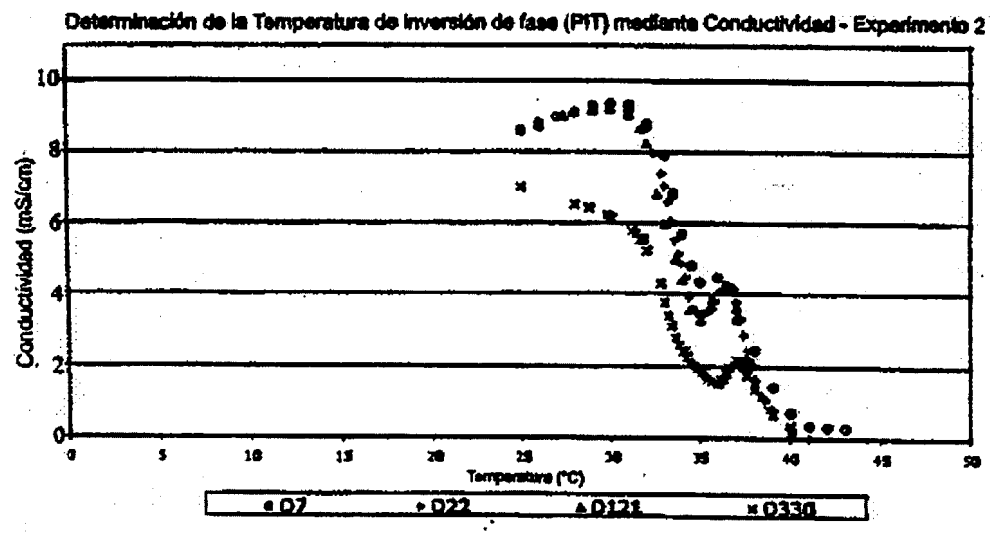
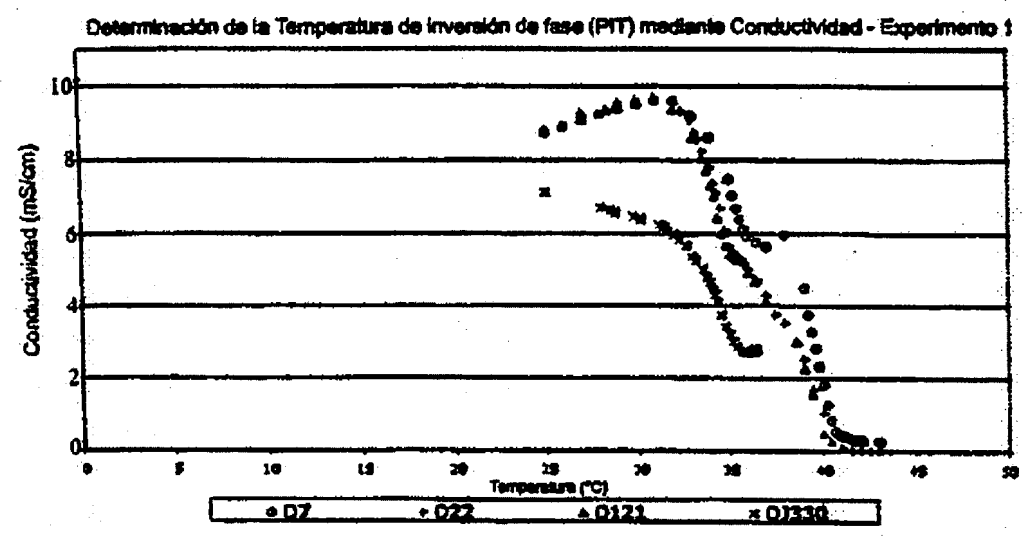


Fig 2

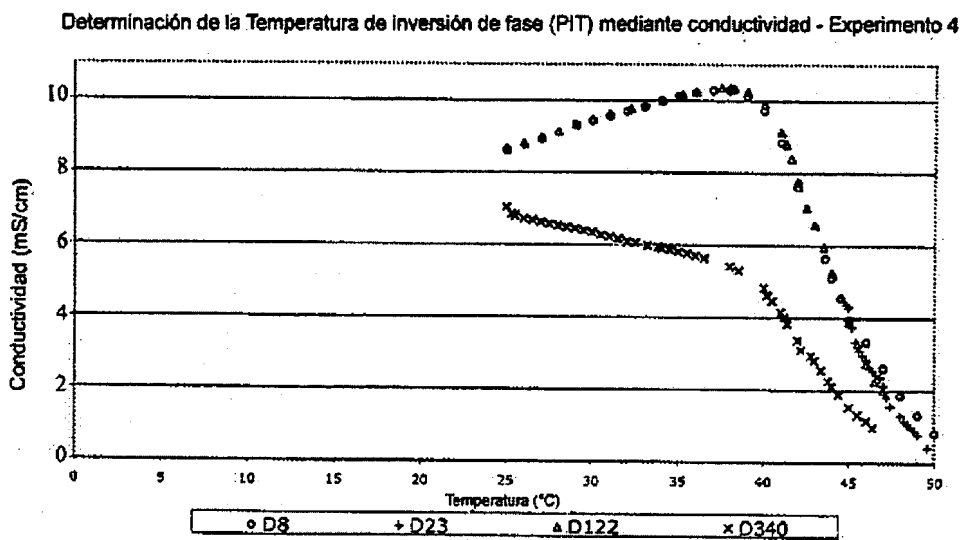
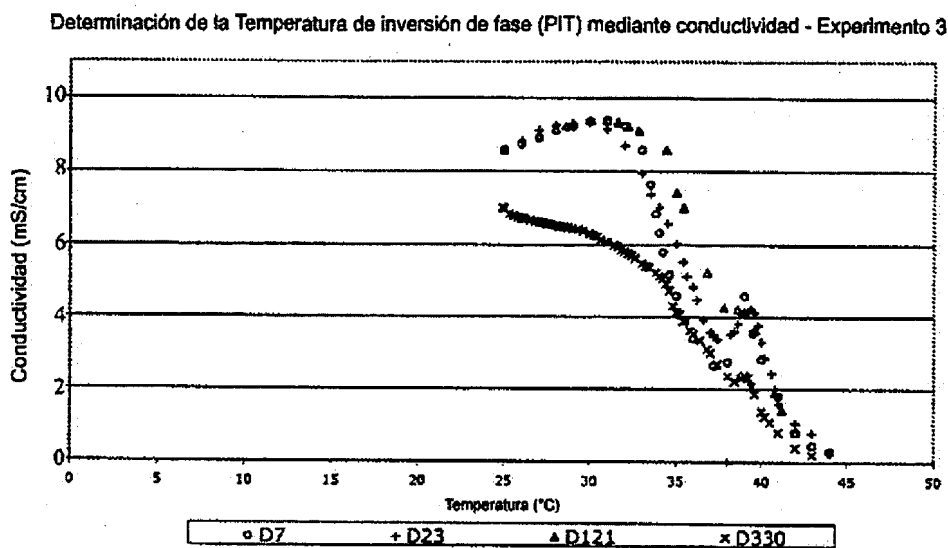


Fig 3

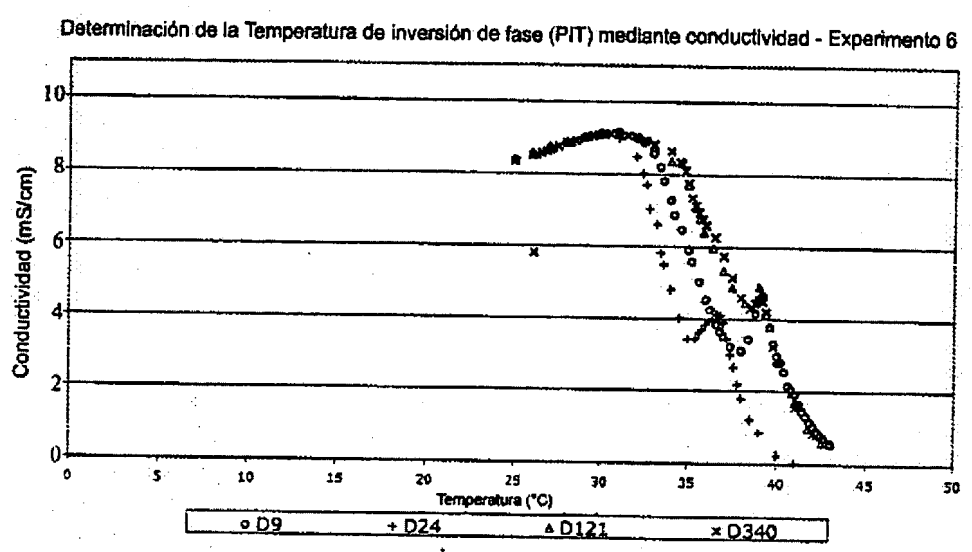
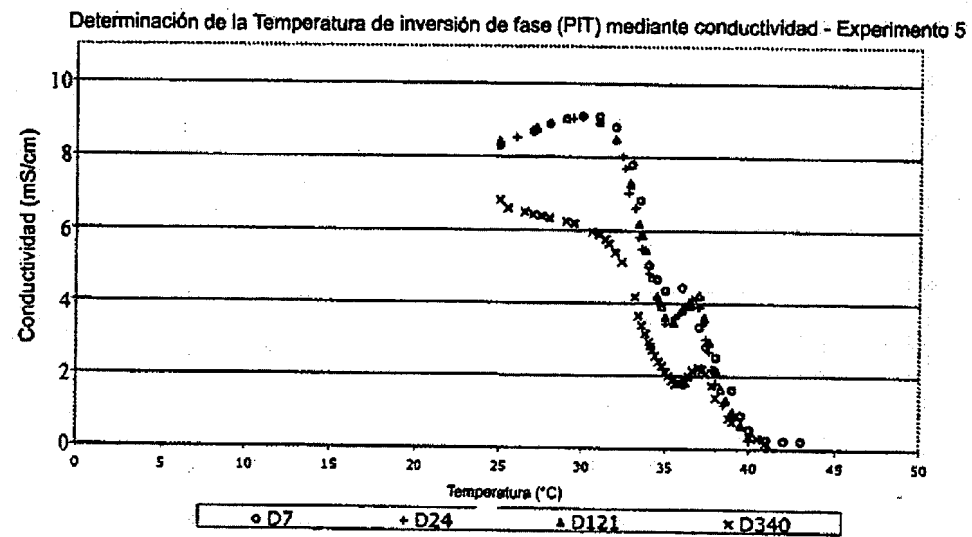


Fig 4

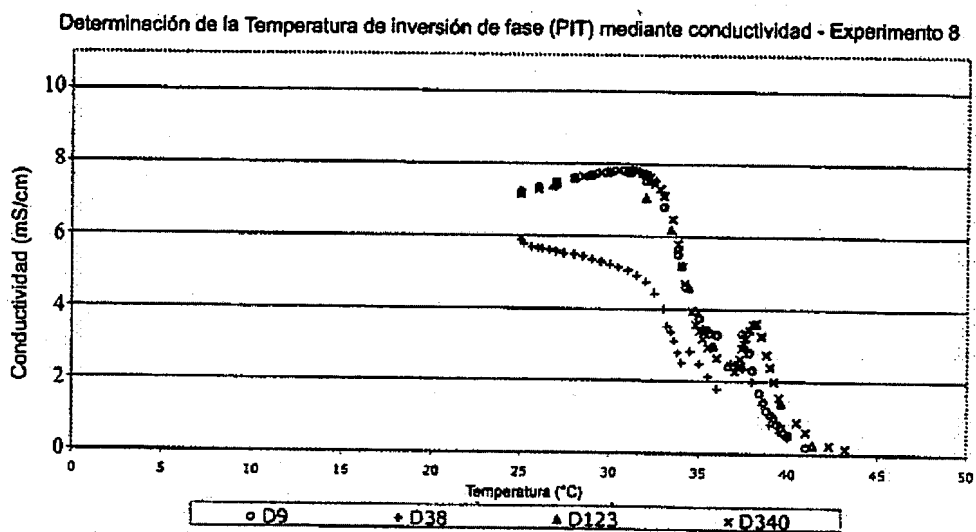
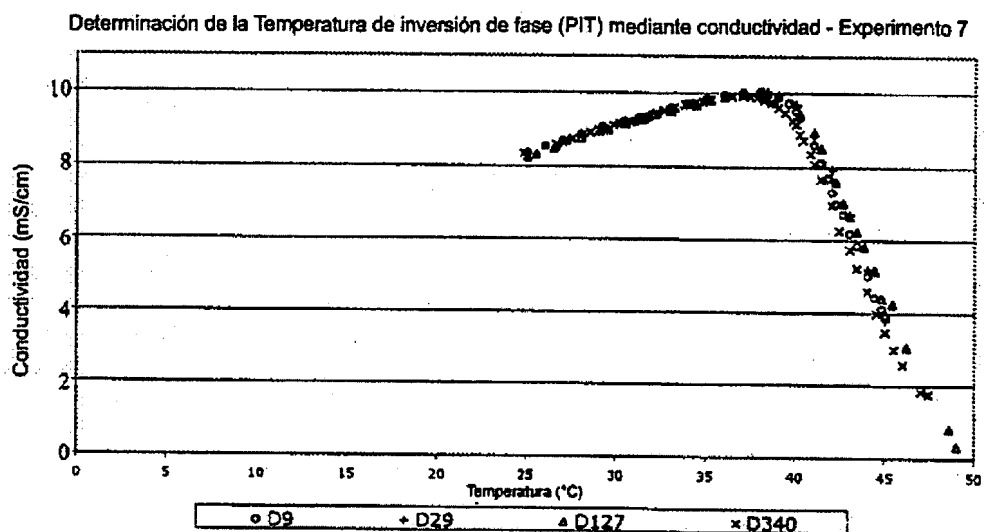


Fig 5

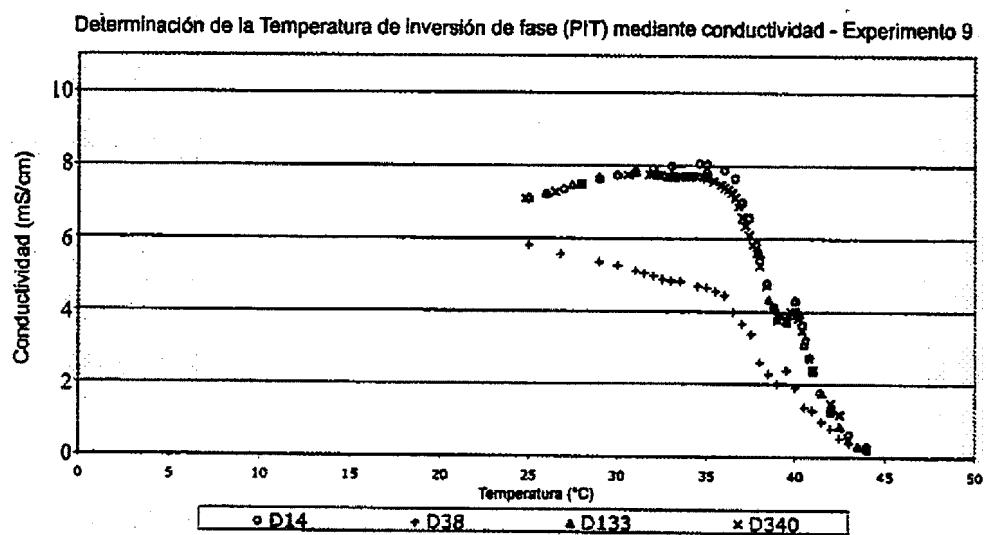


Fig 6

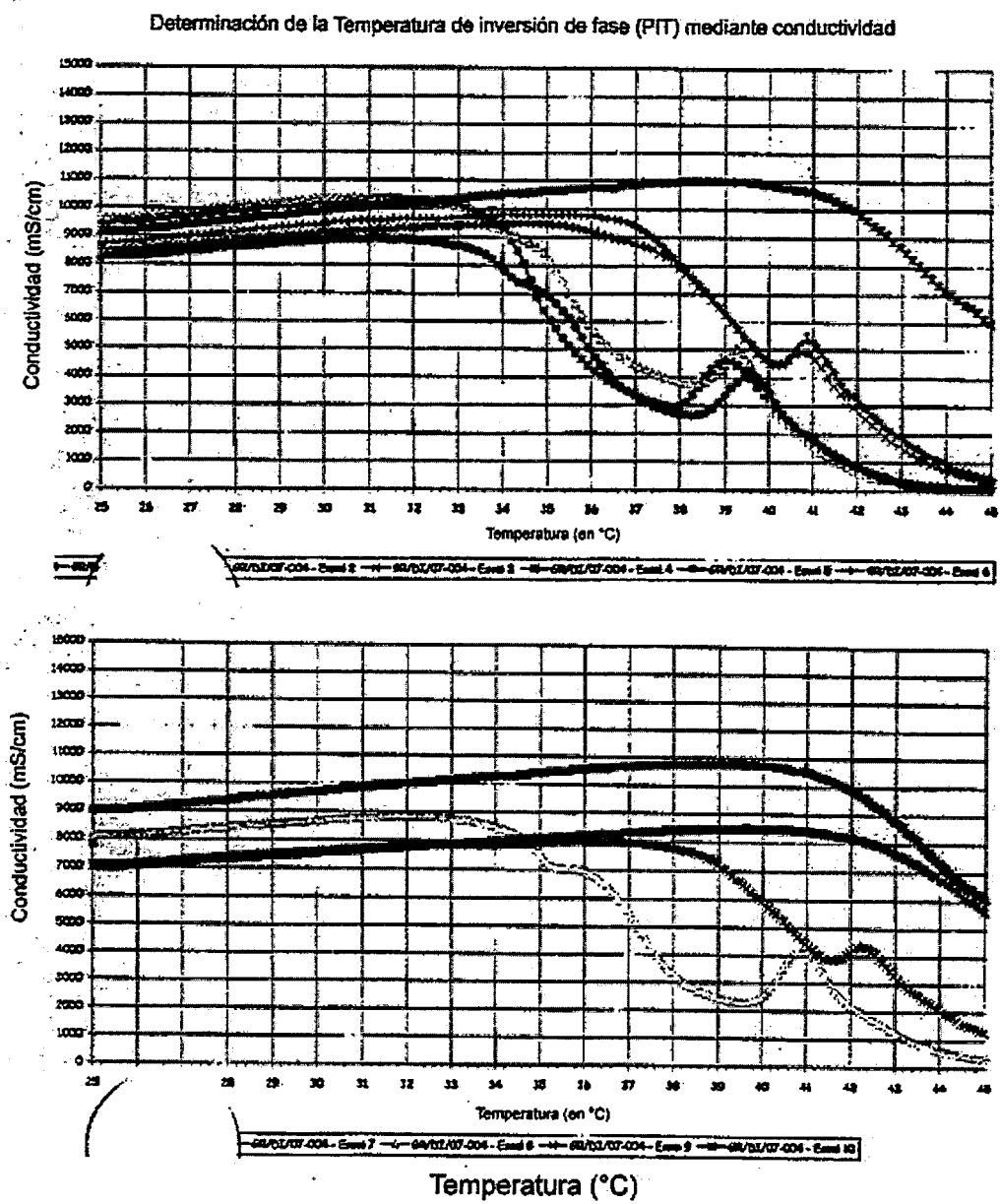


Fig 7

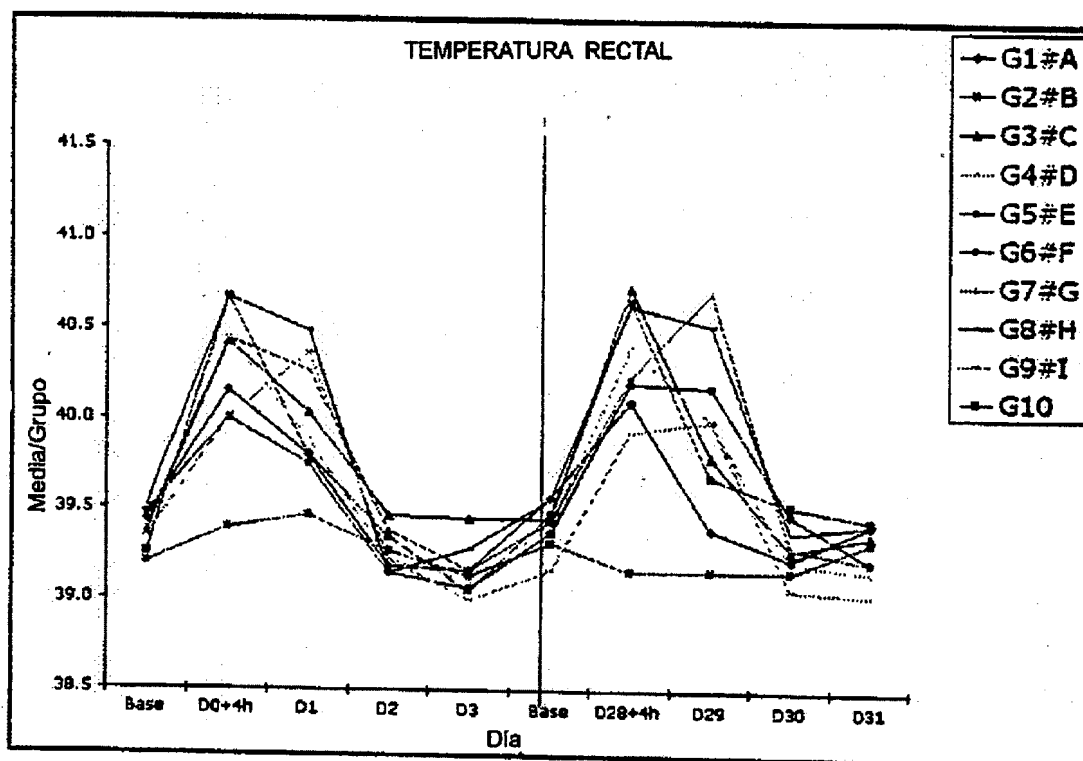


Fig 8

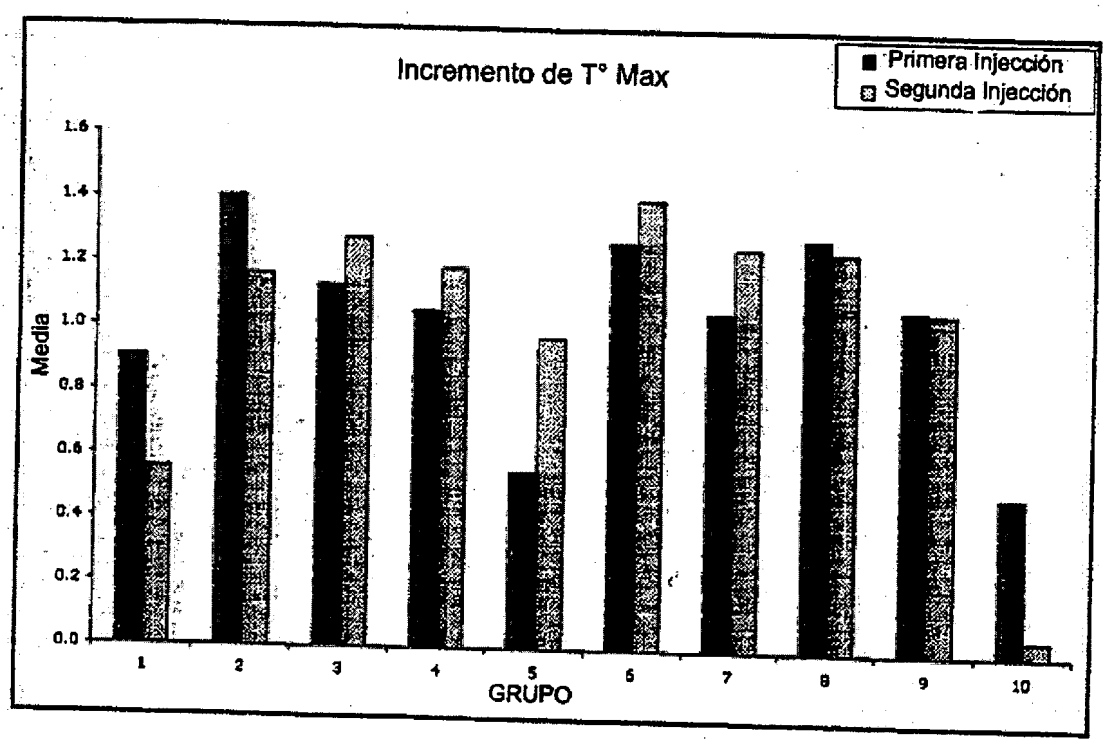
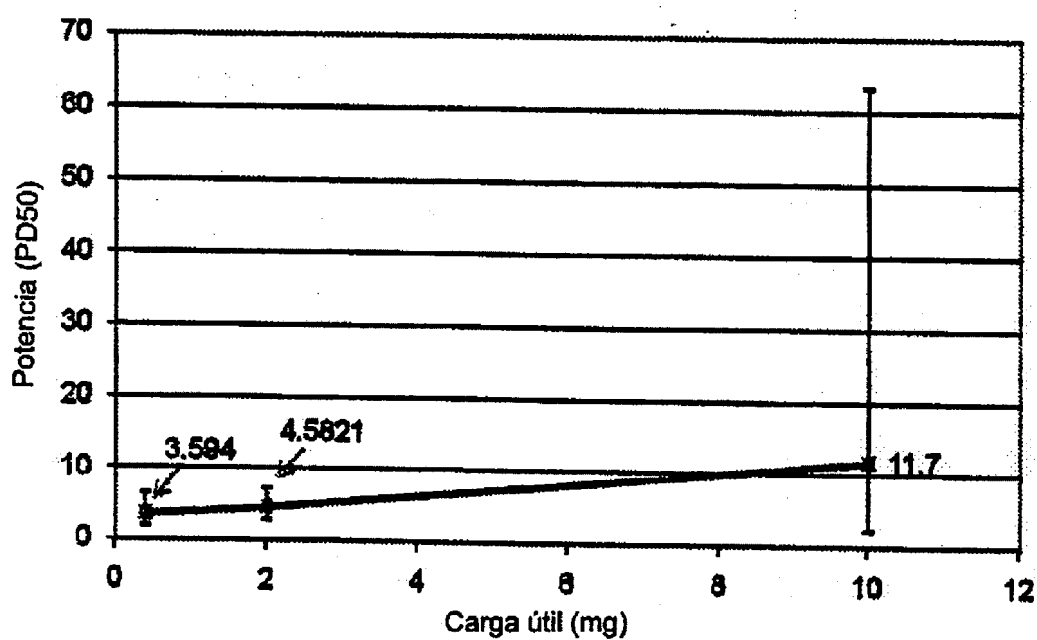


Fig 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/048256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/135 A61K39/39 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/295
A61P31/00

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/009462 A2 (MERIAL LTD [US]; PARISOT ALEXIS GUY ANDRE [FR]; DESGOUILLES BLECHET ST) 3 February 2005 (2005-02-03) the whole document in particular; page 1, line 8 - page 4, line 7 page 7, line 29 - page 14, line 28 claims 1-30; figures 1-4; examples 1-10 -----	1-20
Y	WO 96/33739 A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; GARCON NATHALIE MARIE JOSEPHE [BE]; FR) 31 October 1996 (1996-10-31) the whole document -----	1-20
Y	WO 99/10008 A1 (AQUILA BIOPHARM INC [US]) 4 March 1999 (1999-03-04) the whole document ----- -/--	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 November 2010

Date of mailing of the international search report

01/12/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ferreira, Roger

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/048256

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 057 540 A (KENSIL CHARLOTTE A [US] ET AL) 15 October 1991 (1991-10-15) the whole document	1-20
Y	WO 96/11711 A1 (ISCOTEC AB [SE]; COX JOHN COOPER [AU]; COULTER ALAN ROBERT [AU]; MOREI) 25 April 1996 (1996-04-25) the whole document	1-20
Y	WO 88/09336 A1 (CAMBRIDGE BIOSCIENCE CORP [US]) 1 December 1988 (1988-12-01) the whole document	1-20
Y	WO 99/11241 A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; GARCON NATHALIE [BE]; MOMIN PATRICIA M) 11 March 1999 (1999-03-11) the whole document	1-20
Y	US 2008/160045 A1 (CONTORNI MARIO [IT] ET AL) 3 July 2008 (2008-07-03) the whole document	1-20
Y	WO 97/01640 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; CABEZON SILVA TERESA [BE]; MOMIN PATRI) 16 January 1997 (1997-01-16) the whole document	1-20
Y	US 2004/043038 A1 (MOMIN PATRICIA MARIE [BE] ET AL) 4 March 2004 (2004-03-04) the whole document	1-20
A	GB 1 143 545 A (WELLCOME FOUND) 26 February 1969 (1969-02-26) the whole document	1-20
A	US 2008/181949 A1 (BAKER JAMES R [US] ET AL) 31 July 2008 (2008-07-31) the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/048256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005009462 A2	03-02-2005	AT 392905 T AU 2004259034 A1 BR PI0412855 A CA 2533581 A1 CN 1852735 A DE 602004013331 T2 DK 1651265 T3 EP 1651265 A2 ES 2307053 T3 HK 1083764 A1 HR 20080235 T3 JP 2006528647 T KR 20060069429 A MX PA06000942 A NZ 545289 A RU 2354399 C2 SI 1651265 T1 ZA 200600937 A	15-05-2008 03-02-2005 03-10-2006 03-02-2005 25-10-2006 16-07-2009 18-08-2008 03-05-2006 16-11-2008 18-07-2008 31-07-2008 21-12-2006 21-06-2006 30-03-2006 30-05-2008 10-05-2009 31-10-2008 25-04-2007
WO 9633739 A1	31-10-1996	AP 771 A AR 001686 A1 AT 186842 T AT 373487 T AU 693022 B2 AU 5334596 A AU 699213 B2 AU 6987398 A BG 63491 B1 BG 101995 A BR 9608199 A CA 2217178 A1 CN 1515245 A CN 1480214 A CN 1182370 A CZ 9703379 A3 DE 69605296 D1 DE 69605296 T2 DE 69637254 T2 DK 0822831 T3 DK 0955059 T3 DZ 2026 A1 EP 0822831 A1 EP 0884056 A1 EP 0955059 A2 ES 2140076 T3 ES 2293708 T3	07-10-1999 26-11-1997 15-12-1999 15-10-2007 18-06-1998 18-11-1996 26-11-1998 23-07-1998 29-03-2002 30-11-1998 18-05-1999 31-10-1996 28-07-2004 10-03-2004 20-05-1998 18-03-1998 30-12-1999 18-05-2000 19-06-2008 01-05-2000 17-12-2007 21-07-2002 11-02-1998 16-12-1998 10-11-1999 16-02-2000 16-03-2008
WO 9633739 A1		GR 3031912 T3 HK 1025244 A1 HK 1009086 A1 HU 9801560 A2 IL 118004 A JP 3901731 B2 JP 11504020 T MA 23850 A1 NO 974859 A NZ 305365 A OA 10629 A	29-02-2000 14-03-2008 27-10-2000 28-10-1998 30-11-1999 04-04-2007 06-04-1999 31-12-1996 21-10-1997 28-05-1999 16-09-2002

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/048256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PL 322968 A1	02-03-1998
		PT 955059 E	27-11-2007
		RO 119068 B1	30-03-2004
		SI 0822831 T1	29-02-2000
		SI 0955059 T1	29-02-2008
		SK 144297 A3	06-05-1998
		TR 9701252 T1	21-03-1998
		TW 515715 B	01-01-2003
WO 9910008	A1	04-03-1999	
		AP 1207 A	19-09-2003
		AT 435661 T	15-07-2009
		AU 734180 B2	07-06-2001
		AU 9210798 A	16-03-1999
		CA 2302522 A1	04-03-1999
		CA 2654522 A1	04-03-1999
		EP 2050465 A2	22-04-2009
		EP 1009429 A1	21-06-2000
		ES 2327693 T3	02-11-2009
		JP 2001513575 T	04-09-2001
		JP 2009197014 A	03-09-2009
		US 6645495 B1	11-11-2003
US 5057540	A	15-10-1991	NONE
WO 9611711	A1	25-04-1996	
		AT 210463 T	15-12-2001
		CA 2201611 A1	25-04-1996
		DE 69524624 D1	24-01-2002
		DE 69524624 T2	16-05-2002
		EP 0785802 A1	30-07-1997
		FI 971498 A	10-06-1997
		JP 10508301 T	18-08-1998
		NO 971622 A	10-06-1997
		NZ 293882 A	25-02-1999
		US 6352697 B1	05-03-2002
		ZA 9508600 A	14-04-1997
WO 8809336	A1	01-12-1988	
		AT 116993 T	15-01-1995
		AU 616670 B2	07-11-1991
		AU 1934088 A	21-12-1988
		CA 1331443 C	16-08-1994
		DE 3852761 D1	23-02-1995
		DE 3852761 T2	07-09-1995
		DK 602989 A	29-11-1989
		EP 0362279 A1	11-04-1990
		JP 2504266 T	06-12-1990
		JP 2731563 B2	25-03-1998
WO 9911241	A1	11-03-1999	
		AU 1145699 A	22-03-1999
		CA 2302554 A1	11-03-1999
		DE 69815692 D1	24-07-2003
		DE 69815692 T2	29-04-2004
		DE 69838992 T2	24-12-2008
		EP 1009382 A1	21-06-2000
		ES 2298316 T3	16-05-2008
		ES 2201551 T3	16-03-2004
		JP 4426091 B2	03-03-2010
		JP 2001514208 T	11-09-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/048256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008160045 A1	03-07-2008	AT 448794 T	15-12-2009
		BR 0211437 A	13-07-2004
		DK 1409013 T3	18-01-2010
		EP 2168597 A1	31-03-2010
		ES 2334495 T3	11-03-2010
		JP 4509554 B2	21-07-2010
		JP 2004538291 T	24-12-2004
		JP 2009173681 A	06-08-2009
		MX PA04000753 A	17-02-2005
		PT 1409013 E	26-02-2010
		US 2005158334 A1	21-07-2005
WO 9701640 A2	16-01-1997	AU 6304996 A	30-01-1997
		BR 9609258 A	11-05-1999
		CA 2222456 A1	16-01-1997
		CZ 9704223 A3	17-06-1998
		EP 0835318 A2	15-04-1998
		HU 9901901 A2	28-09-1999
		JP 11508769 T	03-08-1999
		NO 976060 A	17-02-1998
		PL 324906 A1	22-06-1998
		TR 9701713 T1	21-05-1998
		ZA 9605459 A	01-04-1997
US 2004043038 A1	04-03-2004	AT 359818 T	15-05-2007
		AT 177322 T	15-03-1999
		AT 265228 T	15-05-2004
		AU 1316495 A	10-07-1995
		AU 687494 B2	26-02-1998
		AU 705521 B2	27-05-1999
		AU 705519 B2	27-05-1999
		CA 2179779 A1	29-06-1995
		CN 1138298 A	18-12-1996
		CY 2530 B1	12-04-2006
		DE 69417063 D1	15-04-1999
		DE 69417063 T2	28-10-1999
		DE 69433750 D1	03-06-2004
		DE 69433750 T2	04-08-2005
		DE 69434956 T2	17-01-2008
		DE 122008000054 I1	19-02-2009
		DE 122008000055 I1	19-02-2009
		DK 1327451 T3	20-08-2007
		DK 0735898 T3	23-08-1999
		DK 0868918 T3	16-08-2004
		WO 9517209 A1	29-06-1995
		WO 9517210 A1	29-06-1995
		EP 1327451 A1	16-07-2003
		EP 1792628 A1	06-06-2007
		EP 0735898 A1	09-10-1996
		EP 0868918 A2	07-10-1998
		ES 2285036 T3	16-11-2007
		ES 2129801 T3	16-06-1999
		ES 2219837 T3	01-12-2004
		GR 3029750 T3	30-06-1999
		HK 1021504 A1	18-03-2005
		HK 1057991 A1	12-10-2007
		HK 1012243 A1	12-05-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/048256

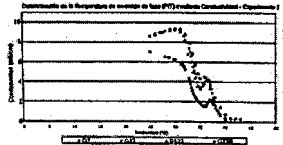
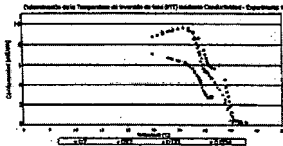
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 9506887 T	08-07-1997
		JP 4125781 B2	30-07-2008
		JP 4126067 B2	30-07-2008
		JP 2006249080 A	21-09-2006
		JP 4126079 B2	30-07-2008
		JP 2007231029 A	13-09-2007
		LU 91485 A9	15-12-2008
		LU 91486 A9	15-12-2008
		NL 300362 I1	05-01-2009
		NL 300363 I1	05-01-2009
		NZ 277802 A	27-04-1998
		NZ 329661 A	24-03-2005
		PT 1327451 E	23-07-2007
US 2004043038 A1		PT 868918 E	31-08-2004
		SG 49257 A1	18-05-1998
		SG 73578 A1	20-06-2000
GB 1143545 A	26-02-1969	FR 1562758 A	11-04-1969
		MY 15071 A	31-12-1971
		US 3579633 A	18-05-1971
US 2008181949 A1	31-07-2008	AU 2002367976 A1	23-04-2004
		EP 1528937 A2	11-05-2005
		JP 2006512401 T	13-04-2006
		JP 2010195788 A	09-09-2010
		WO 2004030608 A2	15-04-2004
		US 2003194412 A1	16-10-2003
		US 2006257426 A1	16-11-2006
		US 2008181905 A1	31-07-2008
		US 2008254066 A1	16-10-2008

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 039/135	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) MERAL LIMITED	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 61/241,171	(32) Fecha 10/09/2009	(33) País US
		(72) Inventor(es) NOEL JOSEPH FRANCOIS DETRAZ GUILLAUME RIGAUT	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 10/04/2012		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 17/03/2011	
Fecha de presentación de la solicitud: 09/09/2010		N° publicación: WO 2011/031850 A1	
No. de solicitud PCT/US2010/048256			
(54) Título: NUEVAS FORMULACIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN ADYUVANTES QUE CONTIENEN SAPONINA			

Resumen:

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 (extractos crudos) o mínimamente purificadas. La emulsión de la presente invención puede actuar como vehículo para el suministro de una composición farmacéutica que comprende por lo menos un inmunógeno y, en particular, un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste de un patógeno inactivado, un patógeno atenuado, una subunidad, un vector de expresión recombinante y un plásmido o combinaciones de los mismos.

Fig. 1



SOBRE
CON ARTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0029293

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2012 - 17:18:08

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	185803214	23/03/2012	75.635.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-058153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-10 11:15:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

Colo: 14306 - 841 - 021 - 4.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 23 de 2012 - 17:18:26

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0029260

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2012 - 17:18:08

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	185803214	23/03/2012	75.635.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL)	300.000.00	300.000.00
				\$300.000.00

=====

SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-058153- -00000-0000

Fecha. 2012-04-10 11:15:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

COLO: 14306 - 841 - 021 - Y.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 23 de 2012 - 17:18:25



No. 12-058153- -00000-0000

Fecha: 2012-04-10 11:15:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño.
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐