

**PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD**  
**PATENTE PCT**  
**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

04-NOV-05

**SOLICITUD DE:**

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE**  
**(71)****Nombre:** PFIZER PRODUCTS INC**Dirección:** Eastern Point Road, Groton,  
Connecticut 06340 E.U.A.**Nacionalidad o Domicilio:** ESTADOUNIDENSE**Lugar de Constitución:** Delaware, Estados  
Unidos de América.**Teléfono:** \_\_\_\_\_**Fax:** \_\_\_\_\_**E-mail:** \_\_\_\_\_**IDENTIFICACIÓN**

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual \_\_\_\_\_

Número \_\_\_\_\_

**REPRESENTANTE**  
**O APODERADO****Nombre:** CARLOS R. OLARTE**Dirección:** World Trade Center Torre A,  
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10**Teléfono:** 601-7700 **Fax:** 601-7799**E-mail:** office@olarteraisbeck.com**IDENTIFICACIÓN**

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual \_\_\_\_\_

Número 79782747Bta  
TP 74.295**INVENTOR (ES)**  
**(72)****Nombre:** VER PAGINA ADJUNTA**Dirección:** VER PAGINA ADJUNTA**Nacionalidad o Domicilio:** VER PAGINA ADJUNTA

5

**PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/000937

Fecha Marzo 22, 2004

Publicación Internacional No. WO 2004/087204

Fecha Octubre 14, 2004

6

**Título (54) EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA MICROFLUIDIZADAS Y**  
**COMPOSICIONES DE VACUNAS.****Clasificación Internacional (51) A61K 39/39****Prioridad**

SI



NO



(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Abril 4, 2003

(31) Número de Solicitud

60/460,301

9

**Comprobante de pago No. 74,861****Fecha Septiembre 28, 2005**

10

**ANEXOS**

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



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



Poderes, si fuere el caso.



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



Declaraciones.



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



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



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



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



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



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



Arte final 12 x 12.



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

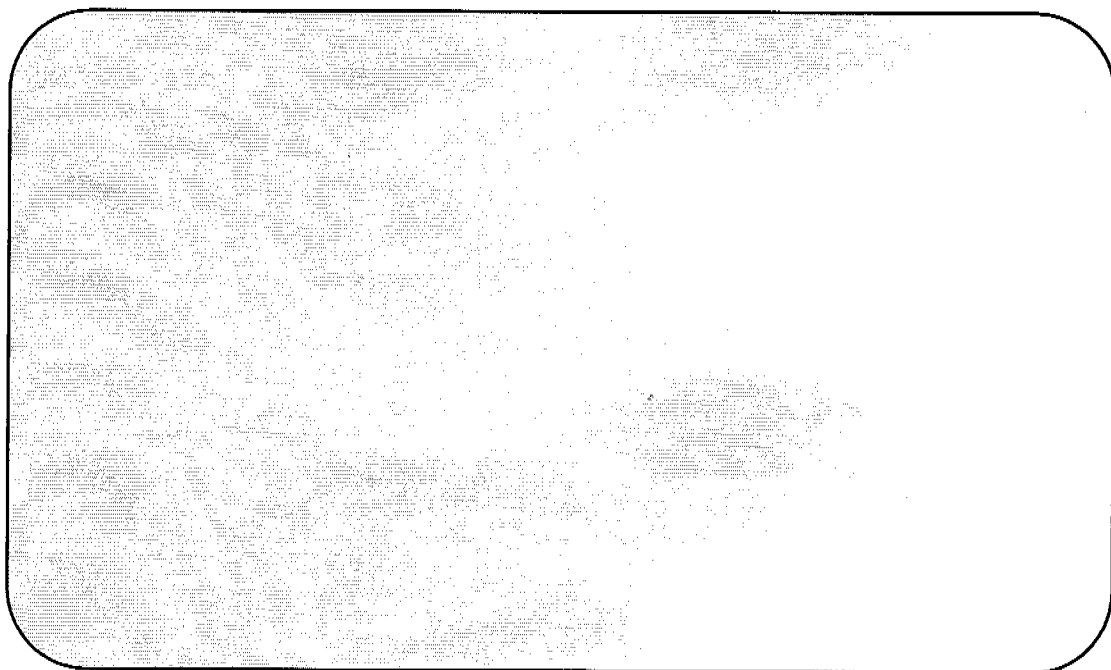


De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



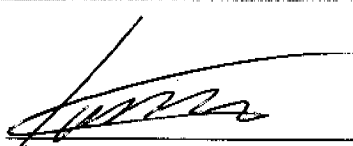
Otros. Búsqueda Internacional

11

**FIGURA CARACTERÍSTICA:**

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

**LISTA DE INVENTORES PCT/IB2004/000937**

PAUL JOSEPH DOMINOWSKI  
301 Henrietta Street, Kalamazoo  
Michigan 49001  
Estados Unidos de América  
Nacionalidad: Estadounidense

PAMELA KAY KLOSE  
Eastern Point Road, Groton  
Connecticut 06340,  
Estados Unidos de América  
Nacionalidad: Estadounidense

RICHARD LEE KREBS  
601 West Cornhusker Highway,  
Lincoln, Nebraska 68521  
Estados Unidos de América  
Nacionalidad: Estadounidense

RAMASAMY MANNAR MANNAN  
301 Henrietta Street, Kalamazoo  
Michigan 49001  
Estados Unidos de América  
Nacionalidad: Estadounidense

RECEIPTO DE DEPÓSITO  
Nº: 00000000000000000000  
FECHA: 27/09/10  
MONTANT: 1.750.000,00

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 900176910

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 66 - 74.861  
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2008

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

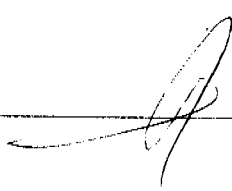
| DEPOSITANTE     | TIPO PAGO    | BANCO         | CUCURA      | Nº. CABI | FECHA REC | MONT. PAGO   |
|-----------------|--------------|---------------|-------------|----------|-----------|--------------|
| CLARTE RAIBECOR | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-4 | 36785073 | 27/09/10  | 1.750.000,00 |

\*\*\*\*\* E D A D E T O \*\*\*\*\*

| CANT. RECIBIDO | CONCEPTO | TOTAL RECIBIDO |
|----------------|----------|----------------|
|----------------|----------|----------------|

|                           |                                     |              |
|---------------------------|-------------------------------------|--------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE I. | 1.750.000,00 |
|                           | TOTAL :                             | 1.750.000,00 |

CUM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°. \_\_\_\_\_

55

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE  
PFIZER PRODUCTS INC.

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

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb ejercía funciones de Vicepresidente de la Compañía Pfizer Products Inc., con sede en Groton, Connecticut, Estados Unidos.

Firma del notario

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

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

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

CERTIFICADO

5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210435
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

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

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

  
MARLEN NEIRA CASTRO  
Traductor e Intérprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

# OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.  
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

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

www.olarteraisbeck.com

## Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 USA

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

Signature/Firma:

Date/Fecha: July 14, 2003

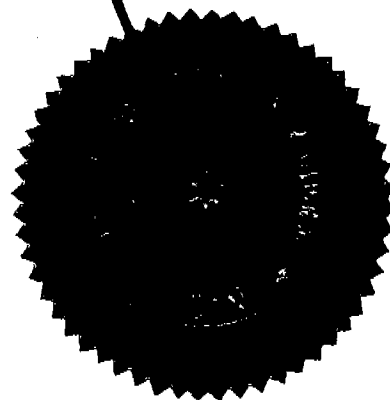
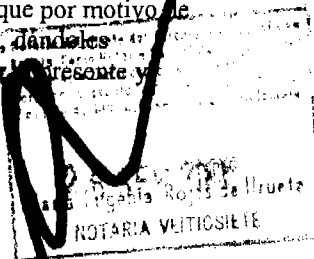
City/Country/Ciudad,País: New York, USA

## Poder

El suscrito,

domiciliado en

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



# OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.  
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

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

www.olarteraisbeck.com

## Notarial Certification

On this date,  
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That *J. Trevor Lumb*  
of legal age and domiciled in  
*NEW YORK, USA*  
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing  
document as Vice President  
of Pfizer Products Inc.

3. That Pfizer Products Inc.,  
having its principal place of business located in  
Groton, Connecticut, U.S.A.  
is duly incorporated, is currently in existence, and  
that the purposes for which the Power of Attorney is  
granted are within the scope of its corporate  
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the  
Power of Attorney and that his/her representation is  
legal.

5. The foundation for my certifications contained in  
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following  
authentic document(s):

## Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que  
J. Trevor Lumb  
mayor de edad y domiciliado  
New York  
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido  
documento en su carácter de  
de

4. Que  
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia  
legal vigente y que los propósitos para los cuales  
se otorga el poder se encuentra dentro de los que  
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para  
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones  
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición  
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

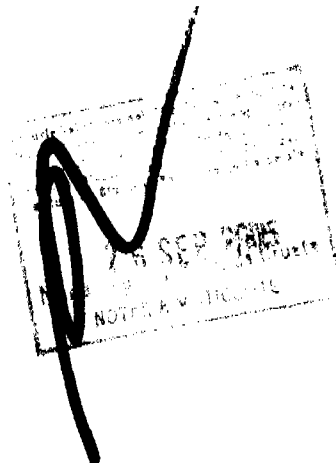
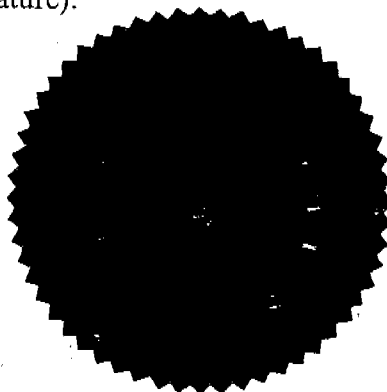
EXECUTION  
Certified Verified and Authenticated  
In The Town Of Egham In Surrey

This 14

Day Of

July  
2003

KENNETH GREENWOOD  
NOTARY PUBLIC  
HORN ENGALL AND FREEMAN



**APOSTILLE**

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

**UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND**

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

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **K Greenwood**  
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**  
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**  
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté  
6. the/le 17 July 2003

5. at London/à Londres
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /  
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **G210435**
9. Stamp:  
timbre:
10. Signature: **R. Bawden**



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

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

*[Handwritten signature and stamp]*

*[Handwritten signature]*

## CESION

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por **PFIZER PRODUCTS INC.**, sociedad constituida en virtud de las leyes del **Estado de Connecticut, Estados Unidos de América.** cuya dirección postal completa es **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América,** por el presente vendemos y traspasamos a la citada **PFIZER PRODUCTS INC,** todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en **EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA MICROFLUIDIZADAS Y COMPOSICIONES DE VACUNAS,** en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada **PFIZER PRODUCTS INC,** de conformidad con esta Cesión.

En fe de lo cual, firmamos de nuestro puño y letra,

Kalamazoo, MI (Fdo) Paul Joseph DOMINOWSKI  
Lugar, fecha y firma - Paul Joseph DOMINOWSKI

Groton, CT, USA 09 de agosto de 2005 (Fdo) Pamela Kay KLOSE  
Lugar, fecha y firma - Pamela Kay KLOSE

Lincoln, NE, 28 de julio de 2005 (Fdo) Richard Lee KREBS  
Lugar, fecha y firma - Richard Lee KREBS

Kalamazoo, MI 25 de agosto de 2005 (Fdo) Ramasamy Mannar MANNAN  
Lugar, fecha y firma - Ramasamy Mannar MANNAN

Por el presente certifico que este es el documento original.

(Fdo) Kay Zummi 02/sept/05

Suscrito y jurado ante mí, el 2 de septiembre de 2005.

(Fdo.) ALBERT L. THEMES, Notario Público de Washington Distrito Capital,  
cuyo cargo vence el 14 de junio de 2009, según consta en su  
correspondiente sello notarial.

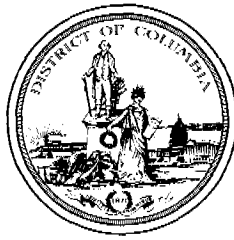
(Sello Oficial)

9  
9

**APOSTILLA**

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Distrito de Columbia  
Estados Unidos de América
2. El presente documento público fue firmado por: Albert L. Themes
3. Que actuó en su calidad de Notario Público del Distrito de Columbia
4. Lleva el sello de Albert L. Themes Notario Público del Distrito de  
Columbia  
Se certificó
5. En Washington D.C.
6. El 02 de septiembre de 2005
7. Por parte del Secretario del Distrito de Columbia.
8. Bajo el Número 146588
9. Aparece el sello del Distrito de Columbia
10. Firmado por Sherryl H. Newman.



# Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*  
*United States of America*

**ALBERT L. THEMES**

2. This public document has been signed by \_\_\_\_\_

3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT**  
**OF COLUMBIA**

**ALBERT L. THEMES, NOTARY PUBLIC, D.C.**

4. bears the seal/stamp of \_\_\_\_\_

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.  
<sup>2<sup>ND</sup></sup>

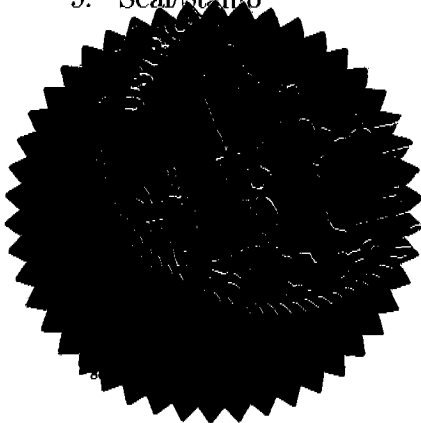
**SEPTEMBER 2005**

6. the \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_

7. by *Secretary of the District of Columbia*

8. No. **146588**

9. Seal/Stamp



10. Signature

*Sherryl H. Newman*  
**SHERYL H. NEWMAN**

72  
12

## ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER PRODUCTS INC.** a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America**, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER PRODUCTS INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **MICROFLUIDIZED OIL-IN-WATER EMULSIONS AND VACCINE COMPOSITIONS** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER PRODUCTS INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

Kalamazoo, MI 09 Aug 05 Paul Joseph DOMINOWSKI  
Place, date and signature - Paul Joseph DOMINOWSKI

Groton, CT 09 Aug 05 Pamela Kay KLOSE  
Place, date and signature - Pamela Kay KLOSE

Lincoln, NE 28 July 05 Richard Lee KREBS  
Place, date and signature - Richard Lee KREBS

Kalamazoo, MI 25 Aug 05 Ramasamy Mannar MANNAN  
Place, date and signature - Ramasamy Mannar MANNAN

I HEREBY CERTIFY THAT THIS  
IS THE ORIGINAL DOCUMENT

KAY ZUNNI

9.2.2005

Subscribed and sworn to before me, in my presence, this  
2 day of Sept, 2005, a Notary Public

In and for the Washington of DC

Albert L. Themes  
Notary Public

My commission expires 6/14, 2009

ALBERT L. THEMES  
NOTARY PUBLIC DISTRICT OF COLUMBIA  
My Commission Expires June 14, 2009

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
14 October 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2004/087204 A2**

(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: **A61K 39/39**

(21) International Application Number:  
PCT/IB2004/000937

(22) International Filing Date: 22 March 2004 (22.03.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/460,301 4 April 2003 (04.04.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER PRODUCTS INC.** [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DOMINOWSKI, Paul, Joseph** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **KLOSE, Pamela, Kay** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, Eastern Point Road, Groton,

CT 06340 (US). **KREBS, Richard, Lee** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 601 West Cornhusker Highway, Lincoln, Nebraska 68521 (US). **MANNAN, Ramasamy, Mannar** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).

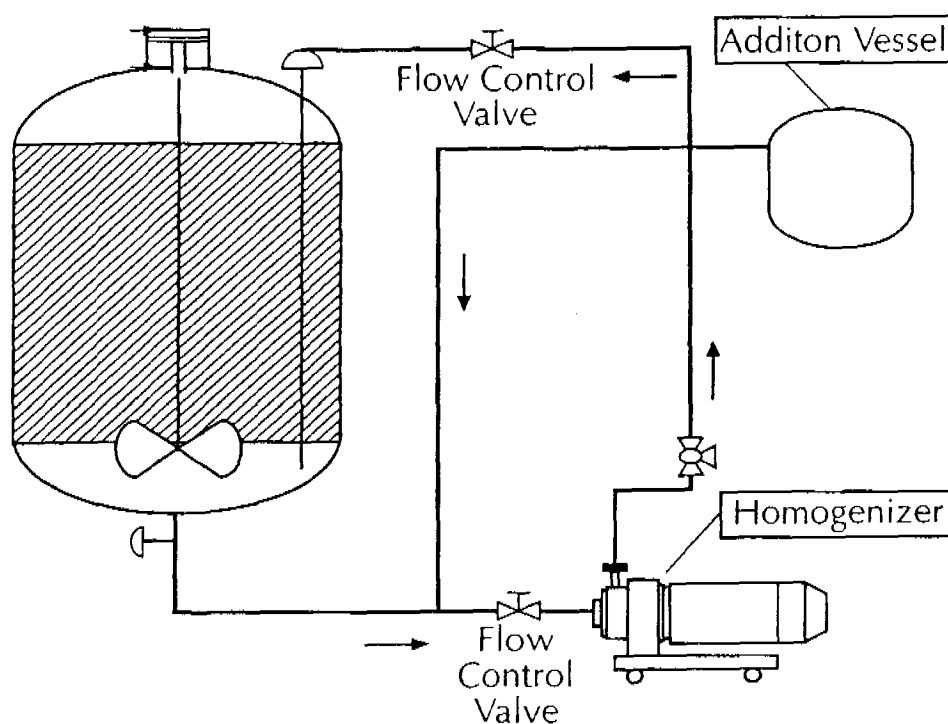
(74) Agents: **LUMB, J., Trevor** et al.; Pfizer Inc., 201 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: MICROFLUIDIZED OIL-IN-WATER EMULSIONS AND VACCINE COMPOSITIONS



(57) Abstract: This invention provides submicron oil-in-water emulsions useful as a vaccine adjuvant for enhancing the immunogenicity of antigens. The present invention also provides vaccine compositions containing an antigen combined intrinsically or extrinsically. Methods of preparing the emulsions and vaccines are also provided by the present invention.

WO 2004/087204 A2



GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## Microfluidized Oil-in-Water Emulsions and Vaccine Compositions

### 5 FIELD OF INVENTION

This invention relates generally to the field of vaccines and particularly, to adjuvant formulations for enhancing immune response in veterinary animals. In particular, the invention relates to the use of a submicron oil-in-water emulsion as a vaccine adjuvant for enhancing the immunogenicity of antigens. Submicron oil-in-water emulsion formulations, vaccine  
10 compositions containing an antigen incorporated into such emulsions, as well as methods of preparing the emulsions and vaccines, are provided by the present invention.

### BACKGROUND OF THE INVENTION

Bacterial, viral, parasitic and mycoplasma infections are wide spread in the veterinary  
15 animals such as cattle, swine and companion animal. Diseases caused by these infectious agents are often resistant to antimicrobial pharmaceutical therapy, leaving no effective means of treatment. Consequently, a vaccinology approach is increasingly used to control the infectious disease in the veterinary animals. A whole infectious pathogen can be made suitable for use in a vaccine formulation after chemical inactivation or appropriate genetic manipulation.  
20 Alternatively, a protein subunit of the pathogen can be expressed in a recombinant expression system and purified for use in a vaccine formulation.

Adjuvant generally refers to any material that increases the humoral and/or cellular immune response to an antigen. The traditional vaccines are composed of crude preparation of killed pathogenic microorganisms, and the impurities associated with the cultures of  
25 pathological microorganisms could act as adjuvant to enhance the immune response. However, when homogeneous preparations of pathological microorganisms or purified protein subunits are used as antigens for vaccination, the immunity invoked by such antigens is poor and the addition of certain exogenous materials as adjuvant therefore becomes necessary. Further, synthetic and subunit vaccines are expensive to produce. Therefore, with the aid of  
30 adjuvant, a smaller dose of antigen may be required to stimulate the immune response, thereby saving the production cost of vaccines.

Adjuvants are known to act in a number of different ways to enhance the immune response. Many adjuvants modify the cytokine network associated with immune response. These immunomodulatory adjuvants can exert their effect even when they are not together with  
35 antigens. In general the immunomodulatory adjuvants cause a general up-regulation of certain cytokines and a concomitant down regulation of others leading to a cellular Th1 and/or a humoral Th2 response.

Some adjuvants have the ability to preserve the conformational integrity of an antigen so that the antigens can be efficiently presented to appropriate immune effector cells. As a

result of this preservation of antigen conformation by the adjuvant formulation, the vaccine would have an increased shelf-life such as that shown for immune stimulating complexes (ISCOMs). Ozel M., et.al.; Quarternary Structure of the Immunestimulating Complex (Iscom), *J. of Ultrastruc. and Molec. Struc. Res.* 102, 240-248 (1989).

5           Some adjuvants have the property of retaining the antigen as a depot at the site of injection. As a result of this depot effect the antigen is not quickly lost by liver clearance. Aluminum salts and the water-in-oil emulsions act through this depot effect for a shorter duration. For example, one can obtain a long-term depot by using Freund's complete adjuvant (FCA) which is an water-in-oil emulsion. FCA typically remains at the injection site until  
10       biodegradation permits removal of the antigen by antigen-presenting cells.

          Based on their physical nature, adjuvants can be grouped under two very broad categories, namely particulate adjuvants and non-particulate adjuvants. Particulate adjuvants exist as microparticles. The immunogen is either able to incorporate or associate with the microparticles. Aluminum salts, water-in-oil emulsions, oil-in-water emulsions, immune  
15       stimulating complexes, liposomes, and nano- and microparticles are examples of particulate adjuvants. The non-particulate adjuvants are generally immunomodulators and they are generally used in conjunction with particulate adjuvants. Muramyl dipeptide (an adjuvant-active component of a peptidoglycan extracted from *Mycobacteria*), non-ionic block copolymers, Saponins (a complex mixture of triterpenoids extracted from the bark of the *Quillaja saponaria*  
20       tree), Lipid A (a disaccharide of glucosamine with two phosphate groups and five or six fatty acid chains generally C12 to C16 in length), cytokines, carbohydrate polymers, derivatized polysaccharides, and bacterial toxins such as cholera toxin and *E. coli* labile toxin (LT) are examples of non-particulate adjuvants.

          Some of the best-known adjuvants are combination of non-particulate  
25       immunomodulators and particulate materials which could impart depot effect to the adjuvant formulation. For example, FCA combines the immunomodulatory properties of *Mycobacterium tuberculosis* components along with the short-term depot effect of oil emulsions.

          Oil emulsions have been used as vaccine adjuvant for a long time. Le Moignic and Pinoy found in 1916 that a suspension of killed *Salmonella typhimurium* in mineral oil increased  
30       the immune response. Subsequently in 1925, Ramon described starch oil as one of the substances augmenting the antitoxic response to diphtheria toxoid. However, the oil emulsions did not become popular until 1937 when Freund came out with his adjuvant formulation now known as Freund's Complete Adjuvant (FCA). FCA is a water-in-oil emulsion composed of mineral (paraffin) oil mixed with killed *Mycobacteria* and Arlacel A. Arlacel A is principally  
35       mannide monooleate and is used as an emulsifying agent. Although FCA is excellent in inducing an antibody response, it causes severe pain, abscess formation, fever and granulomatous inflammation. To avoid these undesirable side reactions, Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) was developed. IFA is similar to FCA in its composition except for the absence

of mycobacterial components. IFA acts through depot formulation at the site of injection and slow release of the antigen with stimulation of antibody-producing cells.

Another approach to improve FCA was based on the notion that replacing the mineral oil with a biocompatible oil would help eliminate the reactions associated with FCA at the injection site. It was also believed that the emulsion should be oil-in-water rather than water-in-oil, because the latter produces a long-lasting depot at the injection site. Hilleman et al. described an oil-based adjuvant "Adjuvant 65", consisting of 86% peanut oil, 10% Arlacel A as emulsifier and 4% aluminum monostearate as stabilizer. Hilleman, 1966, Prog. Med. Virol. 8: 131-182; Hilleman and Beale, 1983, in New Approaches to Vaccine Development (Eds. Bell, R. and Torrigiani, G.), Schwabe, Basel. In humans, Adjuvant 65 was safe and potent but exhibited less adjuvanticity than IFA. Nevertheless, the use of Adjuvant 65 was discontinued due to reactogenicity for man with certain lots of vaccine and reduction in adjuvanticity when a purified or synthetic emulsifier was used in place of Arlacel A. U.S. Patents 5,718,904 and 5,690,942 teach that the mineral oil in the oil-in-water emulsion can be replaced with metabolizable oil for the purpose of improving the safety profile.

Besides the adjuvanticity and safety, the physical appearance of an emulsion is also an important commercial consideration. Physical appearance depends on the stability of the emulsion. Creaming, sedimentation and coalescence are indicators of the emulsion instability. Creaming occurs when oil and aqueous phases of the emulsion have different specific gravity. Creaming also occurs when the initial droplet size of the emulsion is large and the emulsion droplets are not having any Brownian motion. When the droplet size is large, there is a tendency for the interfacial rupture and the droplets coalesce into large particles. The stability of the emulsion is determined by a number of factors such as the nature and amount of emulsifier used, the size of the droplet size in the emulsion, and the difference in the density between the oil and water phase.

Emulsifiers promote stabilization of dispersed droplet by reducing the interfacial free energy and creating physical or electrostatic barriers to droplet coalescence. Nonionic as well as ionic detergents have been used as emulsifiers. Nonionic emulsifiers orient at the interface and produce relatively bulky structures, which leads to steric avoidance of the dispersed droplets. Anionic or cationic emulsifiers induce formation of an electrical double layer by attracting counter ions; the double layer repulsive forces cause droplets to repel one another when they approach.

Besides using the emulsifiers, the stability of the emulsion can also be achieved through reducing the droplet size of the emulsion by mechanical means. Typically propeller mixers, turbine rotors, colloid mills, homogenizers, and sonicators have been used to manufacture emulsions. Microfluidization is another way to increase the homogeneity of the droplet size in the emulsion. Microfluidization can produce an elegant, physically stable emulsion with consistent particle size in the submicron range. Besides increasing the stability of the emulsion, the process of microfluidization allows terminal filtration which is a preferred

way of ensuring the sterility of the final product. Moreover, submicron oil particles can pass from injection sites into the lymphatics and then to lymph nodes of the drainage chain, blood and spleen. This reduces the likelihood of establishing an oily depot at the injection site which may produce local inflammation and significant injection site reaction.

5 Microfluidizers are now commercially available. Emulsion formation occurs in a microfluidizer as two fluidized streams interact at high velocities within an interaction chamber. The microfluidizer is air or nitrogen driven and can operate at internal pressures in the excess of 20,000 psi. U.S. Patent 4,908,154 teaches the use of microfluidizer for obtaining emulsions essentially free of any emulsifying agents.

10 A number of submicron oil-in-water adjuvant formulations have been described in the literature. U.S. Patent 5,376,369 teaches a submicron oil-in-water emulsion adjuvant formulation known as Syntax Adjuvant Formulation (SAF). SAF contains squalene or squalane as the oil component, an emulsion-forming amount of Pluronic L121 (polyoxy-propylene-polyoxyethylene) block polymer and an immunopotentiating amount of muramyl dipeptide.

15 Squalene is a linear hydrocarbon precursor of cholesterol found in many tissues, notably in the livers of sharks and other fishes. Squalane is prepared by hydrogenation of squalene and is fully saturated. Both squalene and squalane can be metabolized and have a good record of toxicological studies. Squalene or squalane emulsions have been used in human cancer vaccines with mild side effects and a desirable efficacy. See, e.g., Anthony C. Allison, 1999, 20 Squalene and Squalane emulsions as adjuvants, *Methods* 19:87-93.

U.S. Patent 6,299,884 and International Patent Publication WO 90/14837 teach that the polyoxy-propylene-polyoxyethylene block copolymers are not essential for the formation of submicron oil-in-water emulsion. Moreover, these references teach the use of non-toxic, metabolizable oil and expressly exclude the use of mineral oil and toxic petroleum distillate oils in their emulsion formulations.

25 U.S. Patent 5,961,970 teaches yet another submicron oil-in-water emulsion to be used as a vaccine adjuvant. In the emulsion described in this patent, the hydrophobic component is selected from the group consisting of a medium chain triglyceride oil, a vegetable oil and a mixture thereof. The surfactant included in this emulsion can be a natural biologically 30 compatible surfactant such as phospholipid (e.g., lecithin) or a pharmaceutically acceptable non-natural surfactant such as TWEEN-80. This patent also teaches incorporating the antigen into the emulsion at the time the emulsion is formed, in contrast to mixing the antigen with the emulsion after the emulsion has been independently and extrinsically formed.

U.S. Patent 5,084,269 teaches that an adjuvant formulation containing lecithin in 35 combination with mineral oil causes a decrease in irritation within the host animal and simultaneously induces increased systemic immunity. The adjuvant formulation resulting from US patent 5,084,269 is commercially used in veterinary vaccines under the trade name AMPHIGEN®. The AMPHIGEN® formulation is made up of micelles - oil droplets surrounded by lecithin. These micelles allow more whole cell antigens to attach than traditional oil-based

adjuvants. Moreover, the AMPHIGEN®-based vaccine formulations contain a low oil content of 2.5 to 5% mineral oil, compared to other vaccine formulations containing oil adjuvants, which typically contain from 10% to 20% oil. Its low oil content makes this adjuvant-based vaccine formulation less irritating to tissues at the injection site, resulting in fewer lesions and less trim at slaughter. In addition, the lecithin coating surrounding the oil droplets further reduces injection site reactions resulting in a vaccine that is both safe and efficacious.

The AMPHIGEN® formulation is used as an adjuvant in a number of veterinary vaccines and there is need to maintain the physical appearance of the vaccine product during short and long storage periods as well as at the time of reconstitution. In addition, a lyophilized antigen is mixed with the pre-made adjuvant formulation just before the injection. This practice does not always ensure that there is a uniform distribution of the antigen within the oil-in-water emulsion and the appearance of the emulsion may not be desirable. Moreover, upon standing, the homogenized emulsion can show phase separation. Therefore, there exists a need for a stable adjuvant formulation which does not show phase separation upon long shelf-life. One way to prevent the phase separation is to reduce the droplet size and increase the particle homogeneity of the emulsion. While the process of microfluidization of metabolizable oil-based emulsion formulations has been documented, microfluidization of oil-in-water emulsions such as the AMPHIGEN® formulation has not yet been carried out.

In the present invention, microfluidization has been used to bring the size of lecithin-surrounded mineral oil droplets to submicron size. Unexpectedly, it has been discovered by the present inventors that microfluidization of vaccine formulations adjuvanted with an oil-in-water emulsion comprised of a mixture of lecithin and oil not only improves the physical appearance of the formulations, but also enhances the immunizing effects of the formulations. Microfluidized formulations are also characterized by an improved safety profile.

25

## SUMMARY OF THE INVENTION

It has been unexpectedly discovered by the present inventors that the adjuvant activity and the safety profile of non-metabolizable oil based oil-in-water emulsions can be improved through microfluidization. Antigens incorporated in microfluidized emulsions are stable even when the antigens are intrinsically incorporated into the emulsions prior to microfluidization.

Accordingly, in one embodiment, the present invention provides submicron oil-in-water emulsion formulations useful as a vaccine adjuvant. The submicron oil-in-water emulsions of the present invention are composed of a non-metabolizable oil, at least one surfactant, and an aqueous component, where the oil is dispersed in the aqueous component with an average oil droplet size in the submicron range. A preferred non-metabolizable oil is light mineral oil. Preferred surfactants include lecithin, Tween-80 and SPAN-80.

35

A preferred oil-in-water emulsion provided by the present invention is composed of an AMPHIGEN® formulation.

The oil-in-water emulsions of the present invention can include additional components that are appropriate and desirable, including preservatives, osmotic agents, bioadhesive molecules, and immunostimulatory molecules. Preferred immunostimulatory molecules include, e.g., Quil A, cholesterol, GPI-0100, dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA).

5 In another embodiment, the present invention provides methods of preparing a submicron oil-in-water emulsion. According to the present invention, the various components of the emulsion, including oil, one or more surfactants, an aqueous component and any other component appropriate for use in the emulsion, are mixed together. The mixture is subjected to a primary emulsification process to form an oil-in-water emulsion, which is then passed  
10 through a microfluidizer to obtain an oil-in-water emulsion with droplets of less than 1 micron in diameter, preferably with a mean droplet size of less than 0.5 micron.

In still another embodiment, the present invention provides vaccine compositions which contain an antigen and a submicron oil-in-water emulsion described hereinabove. The antigen is incorporated into the emulsion either extrinsically or intrinsically, preferably, intrinsically.

15 The antigen which can be included in the vaccine compositions of the present invention can be a bacterial, fungal, or viral antigen, or a combination thereof. The antigen can take the form of an inactivated whole or partial cell or virus preparation, or the form of antigenic molecules obtained by conventional protein purification, genetic engineering techniques or chemical synthesis.

20 In a further embodiment, the present invention provides methods of preparing vaccine compositions containing an antigen or antigens combined with a submicron oil-in-water emulsion.

In preparing the vaccine compositions of the present invention, the antigen(s) can be combined either intrinsically (e.g., prior to microfluidization) or extrinsically (e.g., after  
25 microfluidization) with the components of the oil-in-water emulsion. Preferably, the antigen is combined with the components of the oil-in-water emulsion intrinsically.

In still another embodiment, the present invention provides vaccine compositions which contain a microencapsulated antigen and a submicron oil-in-water emulsion described hereinabove, where the microencapsulated antigen is combined with the emulsion extrinsically.

30

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**Figure 1** depicts the process for the batch preparation of non-microfluidized vaccine compositions. In this process the various vaccine components are added to the addition vessel on the left and ultimately pumped into the blend vessel where the components are mixed  
35 together through simple mechanical means.

**Figure 2** depicts the process for preparation of microfluidized vaccine compositions containing intrinsically incorporated antigen. The various vaccine components are added to the addition vessel and transferred to the pre-emulsion blending unit for mixing through simple

mechanical means. Subsequently, the emulsion is passed through a microfluidizer and is collected in the post-microfluidization chamber.

**Figure 3** depicts the droplet size distribution of the non-microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine, the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine, and the bench blend vaccine preparation.

**Figure 4** shows absence of phase separation in the microfluidized vaccine preparation.

**Figure 5** depicts a comparison of the stability of antigens intrinsically incorporated in microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine preparation (A907505) and three control, non-microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine preparations (A904369, A904370, and A904371). All four vaccine preparations were stored at 4°C for two years. At different points during the storage (0, 6, 12 or 24 months), all four formulations were used to vaccinate the three months old cows. Vaccination was done Day 0 and 21 with a 2 ml vaccine dose and the sera were collected two weeks post second vaccination. Neutralizing antibody titer for BVD Type II virus was determined in each of the serum samples. The data are presented as the geometric mean for 5 animals.

**Figure 6** shows least squares mean rectal temperature of cattle prior to and following administration of microfluidized and non-microfluidized vaccines. T01: Placebo group- single dose; T02: Placebo group - Double dose; T03: Non-microfluidized formulation - Single Dose; T04: Non-microfluidized formulation - Double dose; T05: Microfluidized formulation - Single Dose; T06: Microfluidized formulation - Double dose.

**Figure 7** depicts least squares mean injection site reaction volumes observed in cattle following administration of non-microfluidized and microfluidized vaccine formulations. T03: Non-microfluidized formulation - Single Dose; T04: Non-microfluidized formulation - Double dose; T05: Microfluidized formulation - Single Dose; T06: Microfluidized formulation - Double dose.

**Figure 8** depicts geometric mean IgG titers for recombinant PauA antigen from *Streptococcus uberis* after vaccination with the various vaccine formulations containing both recombinant PauA antigen and E.coli whole cell antigen.

**Figure 9** depicts geometric mean IgG titers for E. coli whole cell antigen from *Streptococcus uberis* after vaccination with the various vaccine formulations containing both recombinant PauA antigen and E.coli whole cell antigen.

**Figure 10A and 10B** depict the particle size distribution of a Microfluidized Amphigen formulation at initial production (Figure 10A) and at 22 months post production (Figure 10B).

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

It has been unexpectedly discovered by the present inventors that microfluidization of vaccine formulations adjuvanted with an oil-in-water emulsion comprised of a mixture of lecithin and mineral oil not only improves the physical appearance of the vaccine formulations, but also

enhances the immunizing effects of the vaccine formulations. Microfluidized vaccine formulations are also characterized by an improved safety profile.

Based on these discoveries, the present invention provides submicron oil-in-water emulsions useful as an adjuvant in vaccine compositions. Methods of making these submicron oil-in-water emulsions by using a microfluidizer are also provided. Furthermore, the present invention provides submicron vaccine compositions in which an antigen is combined with a submicron oil-in-water emulsion. Methods for making such vaccine compositions are also provided. The present invention further provides vaccine compositions containing microencapsulated antigens combined with a submicron oil-in-water emulsion and methods for making such vaccines.

For clarity of disclosure, and not by way of limitation, the detailed description of the invention is divided into the following subsections which describe or illustrate certain features, embodiments or applications of the invention.

#### 15 **Submicron Oil-In-Water Emulsions**

In one embodiment, the present invention provides submicron oil-in-water emulsion formulations useful as a vaccine adjuvant. The submicron oil-in-water emulsions of the present invention enhance the immunogenicity of antigens in vaccine compositions, are safe for administration to animals and stable during storage.

20 The submicron oil-in-water emulsions of the present invention are composed of a non-metabolizable oil, at least one surfactant, and an aqueous component, where the oil is dispersed in the aqueous component with an average oil droplet size in the submicron range.

By "submicron" is meant that the droplets are of a size of less than 1  $\mu\text{m}$  (micron) and the average or mean oil droplet size is less than 1  $\mu\text{m}$ . Preferably, the mean droplet size of the emulsion is less than 0.8  $\mu\text{m}$ ; more preferably, less than 0.5  $\mu\text{m}$ ; and even more preferably, less than 0.4  $\mu\text{m}$ , or about 0.1-0.3  $\mu\text{m}$ .

The "mean droplet size" is defined as the Volume Mean Diameter (VMD) particle size within a volume distribution of particle sizes. The VMD is calculated by multiplying each particle diameter by the volume of all particles of that size and summing. This is then divided by the total volume of all particles.

The term "non-metabolizable oil" as used herein refers to oils that cannot be metabolized by the body of the animal subject to which the emulsion is administered.

The terms "animal" and "animal subject" as used herein refer to all non-human animals, including cattle, sheeps, and pigs, for example.

35 Non-metabolizable oils suitable for use in the emulsions of the present invention include alkanes, alkenes, alkynes, and their corresponding acids and alcohols, the ethers and esters thereof, and mixtures thereof. Preferably, the individual compounds of the oil are light hydrocarbon compounds, i.e., such components have 6 to 30 carbon atoms. The oil can be synthetically prepared or purified from petroleum products. Preferred non-metabolizable oils for

18  
18

use in the emulsions of the present invention include mineral oil, paraffin oil, and cycloparaffins, for example.

The term "mineral oil" refers to a mixture of liquid hydrocarbons obtained from pétrolatum via a distillation technique. The term is synonymous with "liquefied paraffin", "liquid petrolatum" and "white mineral oil." The term is also intended to include "light mineral oil," i.e., oil which is similarly obtained by distillation of petrolatum, but which has a slightly lower specific gravity than white mineral oil. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1990, at pages 788 and 1323). Mineral oil can be obtained from various commercial sources, for example, J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). Preferred mineral oil is light mineral oil commercially available under the name DRAKEOL®.

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

The oil-in-water emulsions of the present invention typically include at least one (i.e., one or more) surfactant. Surfactants and emulsifiers, which terms are used interchangeably herein, are agents which stabilize the surface of the oil droplets and maintain the oil droplets within the desired size.

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

Non-natural, synthetic surfactants suitable for use in the submicron emulsions of the present invention include sorbitan-based non-ionic surfactants, e.g. fatty-acid-substituted sorbitan surfactants (commercially available under the name SPAN® or ARLACEL®), fatty acid esters of polyethoxylated sorbitol (TWEEN®), polyethylene glycol esters of fatty acids from sources such as castor oil (EMULFOR); polyethoxylated fatty acid (e.g., stearic acid available under the name SIMULSOL M-53), polyethoxylated isooctylphenol/formaldehyde polymer (TYLOXAPOL), polyoxyethylene fatty alcohol ethers (BRIJ®); polyoxyethylene nonphenyl ethers (TRITON® N), polyoxyethylene isooctylphenyl ethers (TRITON® X). Preferred synthetic surfactants are the surfactants available under the name SPAN® and TWEEN®.

Preferred surfactants for use in the oil-in-water emulsions of the present invention include lecithin, Tween-80 and SPAN-80.

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

The aqueous component constitutes the continuous phase of the emulsion and can be water, buffered-saline or any other suitable aqueous solution.

The oil-in-water emulsions of the present invention can include additional components that are appropriate and desirable, including preservatives, osmotic agents, bioadhesive molecules, and immunostimulatory molecules.

It is believed that bioadhesive molecules can enhance the delivery and attachment of antigens on or through the target mucous surface conferring mucosal immunity. Examples of suitable bioadhesive molecules include acidic non-naturally occurring polymers such as polyacrylic acid and polymethacrylic acid (e.g., CARBOPOL®, CARBOMER); acidic synthetically modified natural polymers such as carboxymethylcellulose; neutral synthetically modified natural polymers such as (hydroxypropyl) methylcellulose; basic amine-bearing polymers such as chitosan; acidic polymers obtainable from natural sources such as alginic acid, hyaluronic acid, pectin, gum tragacanth, and karaya gum; and neutral non-naturally occurring polymers, such as polyvinylalcohol; or combinations thereof.

The phrase "immunostimulatory molecules", as used herein, refers to those molecules that enhance the protective immune response induced by an antigenic component in vaccine compositions. Suitable immunostimulatory materials include bacterial cell wall components, e.g., derivatives of N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine such as murabutide, threonyl-MDP and muramyl tripeptide; saponin glycosides and derivatives thereof, e.g., Quil A, QS 21 and GPI-0100; cholesterol; and quaternary ammonium compounds, e.g., dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA) and N,N-dioctadecyl-N,N-bis(2-hydroxyethyl)propanediamine ("avridine").

Saponins are glycosidic compounds that are produced as secondary metabolites in a wide variety of plant species. The chemical structure of saponins imparts a wide range of pharmacological and biological activities, including some potent and efficacious immunological activity.

Structurally, saponins consist of any aglycone attached to one or more sugar chains. Saponins can be classified according to their aglycone composition: Triterpene glycosides, Steroid glycosides, and Steroid alkaloid glycosides.

Saponin can be isolated from the bark of *Quillaja saponaria*. Saponin has long been known as an immunostimulator. Dalsgaard, K., "Evaluation of its adjuvant activity with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease", *Acta. Vet. Scand.* 69: 1-40 1978. Crude extracts of plants containing saponin enhanced potency of foot and mouth disease vaccines. However, the crude extracts were associated

29  
19

with adverse side effects when used in vaccines. Subsequently, Dalsgaard partially purified the adjuvant active component from saponin by dialysis, ion exchange and gel filtration chromatography. Dalsgaard, K. et al., "Saponin adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Morina with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines", *Arch.*

- 5 *Gesamte. Virusforsch.* 44: 243-254 1974. An adjuvant active component purified in this way is known as "Quil A." On a weight basis Quil A showed increased potency and exhibited reduced local reactions when compared to saponin. Quil A is widely used in veterinary vaccines.

Further analysis of Quil A by high pressure liquid chromatography (HPLC) revealed a heterogenous mixture of closely related saponins and led to discovery of QS21 which was a  
10 potent adjuvant with reduced or minimal toxicity. Kensil C.R. et al., "Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex," *J. Immunol.* 146: 431-437, 1991. Unlike most other immunostimulators, QS 21 is water-soluble and can be used in vaccines with or without emulsion type formulations. QS21 has been shown to elicit a Th1 type response in mice stimulating the production of IgG2a and IgG2b  
15 antibodies and induced antigen-specific CD8<sup>+</sup> CTL (MHC class I) in response to subunit antigens. Clinical studies in humans have proved its adjuvant activity with an acceptable toxicological profile. Kensil, C.R. et al., "Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. In *Vaccine Design: the subunit and Adjuvant Approach*," Eds. Powell, M.F. and Newman, M. J. Plenum Publishing Corporation, New York. 1995, pp. 525-541.

20 U.S. Patent 6,080,725 teaches the methods of making and using saponin-lipophile conjugate. In this saponin-lipophile conjugate, a lipophile moiety such as lipid, fatty acid, polyethylene glycol or terpene is covalently attached to a non-acylated or desacylated triterpene saponin via a carboxy group present on the 3-O-glucuronic acid of the triterpene saponin. The attachment of a lipophilic moiety to the 3-O-glucuronic acid of a saponin such as  
25 *Quillaja* desacylsaponin, lucyoside P, or saponin from *Gypsophila*, *saponaria* and *Acanthophyllum* enhances their adjuvant effects on humoral and cell-mediated immunity. Additionally, the attachment of a lipophile moiety to the 3-O-glucuronic acid residue of non- or desacylsaponin yields a saponin analog that is easier to purify, less toxic, chemically more stable, and possesses equal or better adjuvant properties than the original saponin.

30 GPI-0100 is a saponin-lipophile conjugate described in the US patent 6,080,725. GPI-0100 is produced by the addition of aliphatic amine to desacylsaponin via the carboxyl group of glucuronic acid.

*Quaternary ammonium compounds* – A number of aliphatic nitrogenous bases have been proposed for use as immunological adjuvants, including amines, quaternary ammonium  
35 compounds, guanidines, benzamidines and thiuroniums. Specific such compounds include dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA) and N,N-dioctadecyl-N,N-bis(2-hydroxyethyl)propanediamine ("avridine").

US Patent 5,951,988 teaches adjuvant formulation containing quaternary ammonium salts such as DDA in conjunction with an oil component. This formulation is useful in

conjunction with known immunological substances, e.g., viral or bacterial antigens in a vaccine composition, in order to enhance the immunogenic response. The composition is also useful without an incorporated antigen as nonspecific immunostimulatory formulation.

US patent 4,310,550 describes the use of N,N-higher alkyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-propanediamine and N,N-higher alkyl-xylylenediamines formulated with fat or lipid emulsion as a vaccine adjuvant. A method of inducing or enhancing the immunogenic response of an antigen in man or an animal through parenteral administration of the adjuvant formulation is described in the US patent 4,310,550.

In a preferred embodiment, the present invention provides a submicron oil-in-water emulsion useful as vaccine adjuvant, which is composed of an AMPHIGEN® formulation, with droplets of a size less than 1 µm and a mean droplet size of about 0.25 µm.

The term "AMPHIGEN® formulation" as used herein refers to a solution formed by mixing a DRAKEOL® lecithin oil solution (Hydronics, Lincoln, NE) with saline solution in the presence of TWEEN® 80 and SPAN® 80. A typical AMPHIGEN® formulation contains 40% light mineral oil by volume (v/v), about 25% w/v lecithin, about 0.18% TWEEN 80 by volume (v/v) and about 0.08% Span 80 by volume (v/v).

#### **Methods of Preparing Submicron Oil-In-Water Emulsions**

In another embodiment, the present invention provides methods of preparing the submicron oil-in-water emulsions described hereinabove.

According to the present invention, the various components of the emulsion, including oil, one or more surfactants, an aqueous component and any other component appropriate for use in the emulsion, are combined and mixed together.

The mixture formed is subjected to an emulsification process, typically by passage one or more times through one or more homogenizers or emulsifiers to form an oil-in-water emulsion which has a uniform appearance and an average droplet size of about 0.5 µm. Any commercially available homogenizer or emulsifier can be used for this purpose, e.g., Ross emulsifier (Hauppauge, NY), Gaulin homogenizer (Everett, MA).

The emulsion so formed is then subjected to microfluidization to bring the droplet size in the submicron range. Microfluidization can be achieved by use of a commercial microfluidizer, such as model number 110Y available from Microfluidics, Newton, Mass; Gaulin Model 30CD (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); and Rainnie Minilab Type 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, Wis.). These microfluidizers operate by forcing fluids through small apertures under high pressure, such that two fluid streams interact at high velocities in an interaction chamber to form emulsions with droplets of a submicron size.

Droplet size can be determined by a variety of methods known in the art, e.g., laser diffraction, by use of commercially available sizing instruments. The size may vary depending on the type of surfactant used, the ratio of surfactant to oil, operating pressure, temperature, and the like. The skilled artisan can determine the desired combination of these parameters to

obtain emulsions with desired droplet size without undue experimentation. The droplets of the emulsions of the present invention are less than 1  $\mu\text{m}$  in diameter, preferably with a mean droplet size of less than 0.8  $\mu\text{m}$ , and more preferably with a mean droplet size less than 0.5  $\mu\text{m}$ , and even more preferably with a mean droplet size of less than 0.3  $\mu\text{m}$ .

- 5 In a preferred embodiment of the present invention, the DRAKEOL lecithin oil solution, which is commercially available from Hydronics (Lincoln, NE) and contains 25 % lecithin in light mineral oil, is combined and mixed with saline as well as surfactants TWEEN® 80 and SPAN® 80 to form an "AMPHGEN® solution" or "AMPHIGEN® formulation". The AMPHGEN® solution is then emulsified with a Ross® (Hauppauge, NY 11788) emulsifier at approximately 3400 rpm
- 10 to form an oil-in-water emulsion. Subsequently the emulsion is passed once through a Microfluidizer operating at about  $4500 \pm 500$  psi. The microfluidized oil-in-water emulsion has droplets of a size less than 1  $\mu\text{m}$ , with a mean droplet size of about 0.25  $\mu\text{m}$ .

#### **Vaccine Compositions Containing Antigens Incorporated in Submicron Oil-In-Water**

##### **Emulsions**

- 15 In another embodiment, the present invention provides vaccine compositions which contain an antigen(s) and a submicron oil-in-water emulsion described hereinabove. These vaccine compositions are characterized by having an enhanced immunogenic effect and an improved physical appearance (e.g., no phase separation is observed after an extended period
- 20 of storage). In addition, the vaccine compositions of the present invention are safe for administration to animals.

- According to the present invention, the antigen can be combined with the emulsion extrinsically, or preferably, intrinsically. The term "intrinsically" refers to the process wherein the antigen is combined with the emulsion components prior to the microfluidization step. The
- 25 term "extrinsically" refers to the process where the antigen is added to the emulsion after the emulsion has been microfluidized. The extrinsically added antigen can be free antigen or it can be encapsulated in microparticles as further described herein below.

- The term "antigen" as used herein refers to any molecule, compound or composition that is immunogenic in an animal and is included in the vaccine composition to elicit a
- 30 protective immune response in the animal to which the vaccine composition is administered.

- The term "immunogenic" as used in connection with an antigen refers to the capacity of the antigen to provoke an immune response in an animal against the antigen. The immune response can be a cellular immune response mediated primarily by cytotoxic T-cells, or a humoral immune response mediated primarily by helper T-cells, which in turn activates B-cells
- 35 leading to antibody production.

A "protective immune response" is defined as any immune response, either antibody or cell mediated immune response, or both, occurring in the animal that either prevents or detectably reduces the occurrence, or eliminates or detectably reduces the severity, or

detectably slows the rate of progression, of the disorder or disease caused by the antigen or a pathogen containing the antigen.

Antigens which can be included in the vaccine composition of the present invention include antigens prepared from pathogenic bacteria such as *Mycoplasma hyopneumoniae*,  
5 *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Manheimia hemolytica*, *Mycoplasma bovis*,  
*Mycoplasma galanacium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridia*  
*spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix*  
10 *rhusopathiae*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Salmonella*  
*enterica* serovars, *Leptospira spp.*; pathogenic fungi such as *Candida*; protozoa such as  
*Cryptosporidium parvum*, *Neospora canium*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria spp.*; helminths such  
as *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Fasciola*, either in the form of an inactivated whole or  
partial cell preparation, or in the form of antigenic molecules obtained by conventional protein  
purification, genetic engineering techniques or chemical synthesis. Additional antigens include  
15 pathogenic viruses such as Bovine herpesviruses-1,3,6, Bovine viral diarrhea virus (BVDV)  
types 1 and 2, Bovine parainfluenza virus, Bovine respiratory syncytial virus, bovine leukosis  
virus, rinderpest virus, foot and mouth disease virus, rabies, swine fever virus, African swine  
fever virus, Porcine parvovirus, PRRS virus, Porcine circovirus, influenza virus, swine vesicular  
disease virus, Techen fever virus, Pseudorabies virus, either in the form of an inactivated whole  
20 or partial virus preparation, or in the form of antigenic molecules obtained by conventional  
protein purification, genetic engineering techniques or chemical synthesis.

The amount of the antigen should be such that the antigen which, in combination with  
the oil-in-water emulsion, is effective to induce a protective immune response in an animal.  
The precise amount of an antigen to be effective depends on the nature, activity and purity of  
25 the antigen, and can be determined by one skilled in the art.

The amount of the oil-in-water emulsion present in the vaccine compositions should be  
sufficient for potentiating the immunogenicity of the antigen(s) in the vaccine compositions.  
When desirable and appropriate, additional amounts of surfactant(s) or additional surfactant(s)  
can be added in the vaccine composition in addition to the surfactant(s) provided by the oil-in-  
30 water emulsion. Generally speaking, the oil component is present in the final volume of a  
vaccine composition in an amount from 1.0% to 20% by volume; preferably, in an amount of  
1.0% to 10%; more preferably, in an amount from 2.0% to 5.0%. The surfactant, or the  
combination of surfactants if two or more surfactants are used, is present in the final volume of  
a vaccine composition in an amount of 0.1% to 20% by volume, preferably, 0.15% to 10%,  
35 more preferably 0.2% to 6.0%.

In addition to the antigen(s) and the oil-in-water emulsion, the vaccine composition can  
include other components which are appropriate and desirable, such as preservatives, osmotic  
agents, bioadhesive molecules, and immunostimulatory molecules (e.g., Quil A, cholesterol,

21  
21

GPI-0100, dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA)), as described hereinabove in connection with the oil-in-water emulsion.

The vaccine compositions of the present invention can also include a veterinarily-acceptable carrier. The term "a veterinarily-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption delaying agents, and the like. Diluents can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others. Stabilizers include albumin, among others.

In a preferred embodiment, the present invention provides a vaccine composition which includes at least one of a BVDV type I or BVDV type II antigen, incorporated intrinsically in an oil-in-water emulsion which has droplets of a size of less than 1  $\mu\text{m}$ , preferably with a mean droplet size of less than 0.8  $\mu\text{m}$ , more preferably less than 0.5  $\mu\text{m}$ , and even more preferably with a mean droplet size of about 0.5  $\mu\text{m}$ . The BVDV type I and/or II antigen is preferably in the form of an inactivated viral preparation. The submicron oil-in-water emulsion preferably is composed of an AMPHIGEN® formulation (i.e., a formulation which contains light mineral oil, lecithin, TWEEN® 80, and SPAN® 80). The vaccine composition preferably also includes Quil-A, cholesterol, and thimerosol.

In another preferred embodiment, the present invention provides a vaccine composition which includes a Leptospira antigen and at least one of a BVDV type I or BVDV type II antigen in an oil-in-water emulsion. The antigens, preferably in the form of inactivated cell or viral preparation, are incorporated intrinsically in the oil-in-water emulsion having droplets of a size of less than 1  $\mu\text{m}$ , preferably with a mean droplet size of less than 0.8  $\mu\text{m}$ , more preferably less than 0.5  $\mu\text{m}$ , and even more preferably with a mean droplet size of about 0.5  $\mu\text{m}$ . The submicron oil-in-water emulsion preferably is composed of an AMPHIGEN formulation (i.e., a formulation which contains light mineral oil, lecithin, TWEEN® 80, and SPAN® 80). The vaccine composition preferably also includes one or more immunostimulatory molecules selected from Quil-A, cholesterol, DDA, GPI-100 and aluminum hydroxide (AlOH).

In still another preferred embodiment, the present invention provides a vaccine composition which includes at least one bacterial antigen, e.g., the recombinant *Streptococcus uberis* PauA protein or a cell preparation of *E. coli* or a combination of both, in an oil-in-water emulsion. The antigen(s) is combined intrinsically with the oil-in-water emulsion which has droplets of a size of less than 1  $\mu\text{m}$ , preferably with a mean droplet size of less than 0.8  $\mu\text{m}$ , more preferably less than 0.5  $\mu\text{m}$ , and even more preferably with a mean droplet size of about 0.25  $\mu\text{m}$ . The submicron oil-in-water emulsion preferably is composed of an AMPHIGEN® formulation (i.e., a formulation which contains light mineral oil, lecithin, TWEEN® 80, and SPAN® 80). The vaccine composition preferably also includes one or more immunostimulatory molecules selected from Quil A, DDA and GPI-100.

The vaccine compositions of the present invention can be administered to an animal by known routes, including the oral, intranasal, mucosal, topical, transdermal, and parenteral (e.g., intravenous, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous or intramuscular) route. Administration can be achieved using a combination of routes, e.g., first administration using a parental route and subsequent administration using a mucosal route.

#### Methods of Preparing Vaccine Compositions

In a further embodiment, the present invention provides methods of preparing vaccine compositions containing an antigen or antigens and a submicron oil-in-water emulsion.

10 In preparing the vaccine compositions of the present invention, the antigen(s) can be combined either intrinsically or extrinsically with the components of the oil-in-water emulsion. Preferably, the antigen is combined with the components of the oil-in-water emulsion intrinsically.

The antigen can be combined with the various components of the emulsion, including oil, one or more surfactants, an aqueous component and any other appropriate component, to form a mixture. The mixture is subjected to a primary blending process, typically by passage one or more times through one or more homogenizers or emulsifiers, to form an oil-in-water emulsion containing the antigen. Any commercially available homogenizer or emulsifier can be used for this purpose, e.g., Ross emulsifier (Hauppauge, NY), Gaulin homogenizer (Everett, MA), or Microfluidics (Newton, MA). Alternatively, the various components of the emulsion adjuvant, including oil, one or more surfactants, and an aqueous component can be combined first to form an oil-in-water emulsion by using a homogenizer or emulsifier; and the antigen is then added to this emulsion. The mean droplet size of the oil-in-water emulsion after the primary blending is approximately 1.0-1.2 micron.

25 The emulsion containing the antigen is then subjected to microfluidization to bring the droplet size in the submicron range. Microfluidization can be achieved by use of a commercial microfluidizer, such as model number 110Y available from Microfluidics, Newton, Mass; Gaulin Model 30CD (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); and Rainnie Minilab Type 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy, Inc., Hudson, Wis.).

30 Droplet size can be determined by a variety of methods known in the art, e.g., laser diffraction, by use of commercially available sizing instruments. The size may vary depending on the type of surfactant used, the ratio of surfactant to oil, operating pressure, temperature, and the like. One can determine a desired combination of these parameters to obtain emulsions with a desired droplet size. The oil droplets of the emulsions of the present invention are less than 1  $\mu\text{m}$  in diameter. Preferably the mean droplet size is less than 0.8  $\mu\text{m}$ . More preferably, the mean droplet size is less than 0.5  $\mu\text{m}$ . Even more preferably, the mean droplet size is about 0.1 to 0.3  $\mu\text{m}$ .

In a preferred embodiment of the present invention, the DRAKEOL® lecithin oil solution, which contains 25 % lecithin in light mineral oil, is combined and mixed with

surfactants TWEEN® 80 and SPAN® 80 and saline solution to form a mixture that contains 40% light mineral oil, lecithin, 0.18% TWEEN® 80, and 0.08% SPAN® 80. The mixture is then emulsified with a Ross® (Hauppauge, NY 11788) emulsifier at approximately 3400 rpm to form an emulsion product, which is also referred to as an "AMPHIGEN® formulation" or

5 "AMPHIGEN® solution". Subsequently, the desired antigen(s) are combined with the AMPHIGEN® solution and any other appropriate components (e.g., immunostimulatory molecules) with the aid of an emulsifier, e.g., Ross homogenizer, to form an oil-in-water emulsion containing the antigen(s). Such emulsion is passed once through a Microfluidizer operating at about  $10000 \pm 500$  psi. The microfluidized oil-in-water emulsion has droplets of a

10 size of less than  $1 \mu\text{m}$ , with the mean droplet size of about  $0.25 \mu\text{m}$ .

### **Vaccine Compositions Containing Microencapsulated Antigens in a Submicron Oil-in-Water Emulsion and Methods of Preparation**

In still another embodiment, the present invention provides vaccine compositions which

15 contain an antigen encapsulated in microparticles (or "microencapsulated antigen"), where the microencapsulated antigen is extrinsically incorporated into a submicron oil-in-water emulsion described hereinabove.

Methods for absorbing or entrapping antigens in particulate carriers are known in the art. See, e.g., *Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications* (Justin Hanes, Masatoshi Chiba and Robert Langer. Polymer microspheres for vaccine delivery. In: *Vaccine design. The subunit and adjuvant approach*. Eds. Michael F. Powell and Mark J. Newman, 1995 Plenum Press, New York and London ). Particulate carriers can present multiple copies of a selected antigen to the immune system in an animal subject and promote trapping and retention of antigens in local lymph nodes. The particles can be phagocytosed by

25 macrophages and can enhance antigen presentation through cytokine release. Particulate carriers have also been described in the art and include, e.g., those derived from polymethyl methacrylate polymers, as well as those derived from poly(lactides) and poly(lactide-co-glycolides), known as PLG. Polymethyl methacrylate polymers are non-biodegradable while PLG particles can be biodegrade by random non-enzymatic hydrolysis of ester bonds to lactic and glycolic acids which are excreted along normal metabolic pathways.

30

Biodegradable microspheres have also used to achieve controlled release of vaccines. For example, a continuous release of antigen over a prolonged period can be achieved. Depending upon the molecular weight of the polymer and the ratio of lactic to glycolic acid in the polymer, a PLGA polymer can have a hydrolysis rate from a few days or weeks to several

35 months or a year. A slow, controlled release may result in the formation of high levels of antibodies similar to those observed after multiple injections. Alternatively, a pulsatile release of vaccine antigens can be achieved by selecting polymers with different rates of hydrolysis. The rate of hydrolysis of a polymer typically depends upon the molecular weight of the polymer and the ratio of lactic to glycolic acid in the polymer. Microparticles made from two or more

different polymers with varying rates of antigen release provide pulsatile releases of antigens and mimics multiple-dose regimes of vaccination.

According to the present invention, an antigen, including any of those described hereinabove, can be absorbed to a particulate polymer carrier, preferably a PLG polymer, by  
5 using any procedure known in the art (such as one exemplified in Example 17), to form a microencapsulated antigen preparation. The microencapsulated antigen preparation is then mixed with and dispersed in a submicron oil-in-water emulsion, which emulsion has been described hereinabove, to form the vaccine composition.

In a preferred embodiment, the present invention provides a vaccine composition which  
10 contains an antigen encapsulated in a PLG polymer, wherein the microencapsulated antigen is dispersed extrinsically in a microfluidized oil-in-water emulsion which is composed of light mineral oil, lecithin, TWEEN80, SPAN80 and saline, and has a mean droplet size of less than 1.0  $\mu\text{m}$ .

Below are examples of specific embodiments for carrying out the present invention.  
15 The examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

20

**EXAMPLE 1****Preparation of An AMPHIGEN® Formulation**

An AMPHIGEN® formulation was prepared in a two-step process. In the first step, 80  
5 liters of Drakeol Lecithin oil solution, 116 liters of Tetanus Toxoid saline, 1.2 liters of SPAN 80,  
and 2.8 liters of Tween 80 were mixed together and emulsified using a Ross emulsifier. The  
Drakeol Lecithin oil solution contained 25% soya lecithin and 75% mineral oil. Emulsified  
product was recirculated through Ross emulsifier for a minimum of 5 volumes or a minimum of  
10 minutes. The emulsified product was stored at 2-7°C for a maximum of 24 hours for further  
10 processing. The emulsion from the Ross emulsifier tank was transferred to a Gaulin  
homogenizer and was homogenized for 20 minutes under a pressure of 4500psi. The resulting  
40% Drakeol Lecithin oil solution (hereinafter the "AMPHIGEN® formulation" or "AMPHIGEN®  
solution") was then dispensed into sterile polypropylene carboxy containers. The dispensing  
was performed inside a class 100 dispensing hood located in a class 10,000 controlled  
15 environment. The containers were stored at 2-7°C. This AMPHIGEN® formulation was used in  
the experiments described hereinbelow unless indicated otherwise.

**EXAMPLE 2****Primary Blending by Flashblend Homogenization of the BVD vaccine.**

The apparatus used for this homogenization process is shown in **Figure 1**. Using  
aseptic technique or steam cross valves, a bottle containing an BVD Type I antigen (an  
inactivated BVD Type I viral preparation) was attached to the bottom side port on the blend  
25 vessel. After the transfer of required volume of the BVD Type I antigen was completed, the  
BVD Type I bottle was replaced with the bottle containing an inactivated BVD Type II viral  
preparation (an inactivated BVD type II viral preparation). After the required amount of a BVD  
Type II antigen transfer was completed, the Ross homogenizer was attached to the portable  
vessel and the recirculation was initiated at maximum RPM (3300 rpm). Vessel agitation was  
30 maintained at medium speed.

Using aseptic technique or stream cross valve, a bottle containing Quil-A at 50 mg/ml  
concentration was attached to the homogenizer in-line port on the blend vessel. A required  
amount of the Quil-A solution was passed into the vessel through line suction. After the  
transfer of the Quil-A solution was completed, the bottle was removed. In the same way, a  
35 required amount of cholesterol in ethanol solution (18 mg/ml) was transferred to the blend  
vessel. Subsequently, a required amount of the AMPHIGEN® formulation, 10% thimerosal  
solution, and Basic Modified Eagles media ("BME") extender solutions were added to the blend  
vessel.

Once all the additions were complete, the mixing was continued for an additional 15 minutes. The resulting formulation was aliquoted into 2 ml doses and represented a non-microfluidized AMPHIGEN® formulation-based BVD vaccine. Each dose of the vaccine contained 500µg Quil-A, 500µg Cholesterol, 2.5% AMPHIGEN® formulation and 0.009% thimerosol. The antigen concentration for the two different BVD strains was determined in terms of the ELISA titer for gp53.

### EXAMPLE 3

#### **Secondary Blending by Microfluidization**

Figure 2 illustrates the process used for the secondary blending through microfluidization. The microfluidizer was steam sterilized. First the auxiliary processing module chamber was installed in the unit and the blank chamber was installed on the second chamber position. The vessel containing the fully adjuvanted BVD vaccine prepared as described in the Example 2 was connected to the microfluidizer by attaching a transfer line from the supply vessel drain valve to the microfluidizer inlet. Nitrogen gas was connected to the supply vessel air filter inlet and the vessel pressure setting was adjusted to 20 +/- 5 PSI. Collection vessel drain valve was connected to the transfer line from the microfluidizer outlet. After making all the necessary connections, the valves were opened and microfluidization was initiated at an operating pressure of 10,000 +/- 500 PSI. The entire content of the vaccine was passed through the microfluidizer one time and was collected in the post-microfluidization chamber. This preparation was aliquoted into 2mL doses and represents the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based BVD vaccine.

### EXAMPLE 4

#### **Preparation of a Vaccine Composition through Bench Blend.**

The AMPHIGEN® formulation prepared as described in Example 1 was diluted to the 2.5% with the addition of BVD antigens and the extender. The resulting solution was blended at the bench using a stir bar instead of using a homogenizer. The final preparation contained the following composition: BVD Type 1 and Type 2 antigens, 2.5% AMPHIGEN® formulation (which contains oil, lecithin, SPAN® and TWEEN®, as described in Example 1), and saline. TWEEN 80 and SPAN 80 are present in the final vaccine preparation at 0.18% and 0.08% by volume, respectively.

24  
24**EXAMPLE 5****Comparison of Droplet Size Distribution between the Non-microfluidized and Microfluidized AMPHIGEN® Formulation-Based Vaccine Preparations**

5        The non-microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine prepared as described in the Example 2, the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine prepared as described in the Example 3, and the preparation made through bench blend as described in Example 4, were used to compare the droplet size of the vaccine preparations. Two milliliters of the sample from each of the preparations were added to a Malvern 2000 Laser Diffraction  
10        meter and the droplet size distribution was determined. As shown in **Figure 3**, the results indicate that the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine preparation had the maximum particle volume around 0.1 micron while the non-microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine preparation had the maximum particle distribution volume around 1  
15        micron.

**EXAMPLE 6****Reduction in Vaccine Phase Separation.**

20        Three different vaccine preparations: the non-microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine prepared as described in the Example 2, the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine prepared as described in the Example 3, and the vaccine prepared through bench blend as described in Example 4, were compared side by side to determine their phase separation properties upon long storage. All these preparations were allowed to stand at 4°C for about one month and the phase separation was monitored in terms of appearance of a  
25        creamy layer at the top of the vaccine preparations. As shown in **Figure 4**, there was no phase separation in the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based preparation when compared to the other two preparations.

**EXAMPLE 7****Preparation of Microfluidized and Non-microfluidized Cattle Vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus**

30        Bovine Virus Diarrhea viral antigen was intrinsically incorporated into the AMPHIGEN® formulation through microfluidization. The term "intrinsically incorporated" refers to the process whereby the antigen was added to the AMPHIGEN® formulation prior to the microfluidization. The antigen was subjected to the physical forces of the microfluidization process along with the components of the adjuvant formulation. In the control non-microfluidized group, the antigen preparation was dispersed in the AMPHIGEN® formulation through blending.

40        The final composition of both the control and microfluidized preparations was as follow: BVD type I with a post-inactivation ELISA titer of 2535 RU/ dose for gp53, BVD Type II with a

post-inactivation ELISA titer of 3290 RU/dose for gp53, Quil-A at the concentration of 1.25 mg/dose, cholesterol at the concentration of 1.25 mg/dose, the AMPHIGEN® formulation at the final concentration of 2.5%, and thimerosal at the final concentration of 0.009%. The vaccine dose was 5 ml.

5

#### **EXAMPLE 8**

##### **Long term Stability of Intrinsically Incorporated BVD Viral Antigens in the Microfluidized AMPHIGEN® formulation-Based Vaccine Preparation**

10 This experiment was carried out to determine the stability of the intrinsically incorporated antigen during the long storage. Killed BVD Type II viral antigen was intrinsically incorporated into the AMPHIGEN® formulation during microfluidization process to obtain microfluidized vaccine preparation (A907505). Three other vaccine preparations containing the same antigen in non-microfluidized AMPHIGEN® formulation (A904369, A904370, and  
15 A904371) served as the control. In the non-microfluidized preparations, the antigen was mixed with AMPHIGEN® formulation and mixed through blending using a Ross homogenizer. All four vaccine preparations were stored at 4°C for two years. At different points during the storage (0, 6, 12 or 24 months), all four formulations were used to vaccinate three months' old cows.

On days 0 and 21, three-month old cows were vaccinated through subcutaneous route  
20 with a 2 ml vaccine formulation. The serum from the vaccinated animals was collected on day 35, and serological response to the vaccine was measured in terms of the antibody titer through BVDV-E2 ELISA. As shown in **Figure 5**, the microfluidized vaccine preparation showed a higher antibody titer at all the time points tested (0, 6, 12, and 24 months), suggesting the stability of the antigen preparation is not lost during the intrinsic incorporation of  
25 the antigen during the microfluidization process. Moreover, it was also surprisingly found that the microfluidized vaccine preparation induced an enhanced immune response at all time points.

#### **EXAMPLE 9**

##### **Reduction In The Vaccine-Induced Increase In Rectal Temperature After Microfluidization**

30

The microfluidized and non-microfluidized vaccine preparations made as described in Example 7 were used to vaccinate the cattle on day zero and the rectal temperature was  
35 monitored during the period from one day prior to vaccination till four days post vaccination. The vaccine dose was 2 ml. The groups were vaccinated either with a single or double dose of the vaccine. Rectal temperatures were measured and recorded daily on Day -1 through Day 4, inclusive. Rectal temperatures on day 0 were measured prior to administration of test article.

As shown in **Figure 6**, the results indicate that there was a steep rise in the rectal  
40 temperature in about 24 hours following vaccination in those animals vaccinated with either a

single or double dose of the non-microfluidized vaccine formulation. However, in the animals vaccinated with microfluidized forms of vaccine, the rise in rectal temperature following the vaccination was only minimal and significantly lower than in the animals vaccinated with the non-microfluidized formulation (Figure 6).

5

#### **EXAMPLE 10**

##### **The Injection Site Reaction Volume Was Resolved Faster When Vaccinated With Microfluidized Vaccine Formulations.**

10

The microfluidized and non-microfluidized vaccine preparations made as described in the Example 7 were used to vaccinate the cattle on day zero. The animals included in this study were cross-bred beef cattle. There were three animals in each of the placebo treatment groups (T01 and T02). There were six animals in each of the groups T03 through T06. The vaccine dose was 2 ml and the groups were vaccinated either with one or two doses of the vaccine on day zero. On day 0, test article was administered in the right neck. Animals receiving the double dose (4 ml) of the test article (T02, T04, and T06) received the entire double dose as a single injection at one side. Observation of injection sites, including estimation of reaction size at the injection site were made on the right side of the neck on Day 0 through Day 4, inclusive, and Days 6, 9, and 14. On Day 0 injection sites were observed prior to administration of test articles. The groups vaccinated with one or two doses of the placebo did not show any significant increase in the injection site reaction volume and therefore those data are not shown in the Figure 7. In the case of the non-microfluidized vaccine formulation, there was a proportional increase in the injection site reaction volume between the one dose and two dose vaccination. On the other hand, in the case of the microfluidized vaccine formulation, although the single dose induced a larger injection site reaction volume, the injection with second dose did not cause any further increase. Moreover, in the case of the animals injected with microfluidized vaccine formulation, the injection site reaction site volume was resolved at a faster rate when compared to that in the animals injected with a non-microfluidized vaccine formulation. These results are shown in Figure 7.

30

#### **EXAMPLE 11**

35

##### **Preparation Of Microfluidized AMPHIGEN® Formulation-Based Vaccine Preparations With Intrinsically Incorporated BVD Viral And Leptospira Antigens And Immunostimulatory Molecules Such As Quil A And DDA**

Formalin-inactivated *Leptospira hardjo-bovis* strain CSL was formulated in the appropriate adjuvant at direct counts of about  $1.4 \times 10^9$  organisms/5 ml dose. Formalin-inactivated *Leptospira Pomona* strain T262 was formulated at about 2400 Nephelomeric

40

Units/5 ml dose. Nephalomeric units were calculated based on nephelometric measurement of preprocessed fermentation fluid. BVD virus Type 1 was formulated at E2 Elisa titer of about 3000 Relative Units/5 ml dose. BVD virus Type 2 was formulated at E2 Elisa titer of about 3500 Relative Units/5 ml dose. The Relative Unit was calculated based on the E2 ELISA titer of pre-assembly post-inactivation bulk fluid. Both Quil-A and cholesterol were used at the concentration of 0.5 mg per dose. Thimerosol and the AMPHIGEN® formulation were used at the final concentration of 0.009% and 2.5%, respectively. Aluminum hydroxide (Rehydragel LV) was used at the final concentration of 2.0%. When DDA was used as an immunomodulator, DDA was included within the AMPHIGEN® formulation. The AMPHIGEN® formulation (i.e., the 40% Drakeol-lecithin stock solution) contained 1.6 mg/ml of DDA and, when appropriately diluted, the final vaccine preparation contained 2.5% AMPHIGEN® formulation and 0.1 mg/ml of DDA.

In the preparation of different vaccine formulations, BVD fractions, Leptos, Quil-A, chloestrol, thimerosol, the AMPHIGEN® formulation, and saline as an extender were added to a Silverson homogenizer and mixed for 15 minutes at  $10,000 \pm 500$  RPM. Components were then microfluidized through a 200 micron screen at 10,000 psi.

When the vaccine formulation contained aluminum hydroxide, the microfluidization was carried out without aluminum hydroxide. After the microfluidization was completed, aluminum hydroxide was added and mixed with a stir bar overnight at 4°C.

## EXAMPLE 12

### Preparation Of BVD Viral Vaccine For Challenge Studies

The vaccine preparation used in this experiment contained antigens from both BVD virus Type 1 and BVD Virus Type 2. BVD1-5960 antigen was used at the post-inactivation ELISA titer of 2535 RU/dose for gp53. BVD2-890 antigen was used at the post-inactivation ELISA titer of 3290 RU/dose for gp53. Quil A and cholesterol were used at the concentration of 0.5 mg/ml. Thimersol and the AMPHIGEN® formulation were used at the final concentration of 0.009% and 2.5%, respectively. When DDA was used as an immune modulator, DDA was included within the the AMPHIGEN® formulation. The AMPHIGEN® stock solution (40% Drakeol-lecithin solution) contained varying amounts of DDA and when appropriately diluted, the final vaccine preparation contained 2.5% AMPHIGEN® formulation and DDA concentration ranging from 0.5 mg/dose to 2.0 mg/dose. Aluminum gel (Rehydragel-LV) was used at the final concentration of 2%. GPI-0100 was used in the range of 2, 3, and 5 mg/dose.

All the components were added to a Silverson homogenizer and blended for 15 minutes at 10,500 rpm and then microfluidized by passing through a 200 micron chamber with 10,000 psi. When the vaccine preparation contained aluminum hydroxide, the microfluidization

was carried out without aluminum hydroxide. After the microfluidization was completed, aluminum hydroxide was added and mixed with a stir bar overnight at 4°C.

### EXAMPLE 13

#### Protection Against Leptospira Challenge After Vaccination With A Microfluidized Amphigen Vaccine Formulation With Leptospira Antigens.

Table 1 - Treatment Groups

| Treatment group | Composition of adjuvant                                            |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|
| T01             | Saline                                                             |
| T02             | Quil-A, Cholesterol, and the AMPHIGEN® formulation (QAC)           |
| T03             | Quil-A, Cholesterol, the AMPHIGEN® formulation and AIOH (QAC-AIOH) |
| T04             | DDA, Cholesterol, and the AMPHIGEN® formulation (DDA)              |
| T05             | DDA, Cholesterol, the AMPHIGEN® formulation, and AIOH (DDA-AIOH)   |

Table 1 shows the composition of the adjuvant formulations in the vaccine preparations tested in this study. The vaccine preparations were prepared as described in the Example 11. There were six animals in each group. About seven-month old beef cross-bred heifers were used in this study. Vaccination was done on Day 0 and Day 21 through subcutaneous route with 5 ml vaccine volume. Challenge was done with L. hardjo-bovis strain 203 from NADC (National agricultural Disease Center). Challenge was done during Days 57-59 with a 1-ml inoculum. Challenge was administered conjunctively in the eye and vaginally. The challenge material contained  $5.0 \times 10^6$  leptospire/ml. Urine was collected weekly for leptospire culture, FA and PCR. Kidney collection was made during Days 112 and 113.

**Table 2 - Results of the Leptospira Challenge Study**

| Treatment | Percent calves ever positive for Leptospira in urine and Kidney through Culture | Percent of calves ever positive for Leptospira in urine and Kidney through FA | Percent of calves ever positive for Leptospira in urine and Kidney through PCR | Percent of Calves ever positive for Leptospira in Urine and Kidneys across all assays |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Saline    | 100                                                                             | 83.3                                                                          | 83.3                                                                           | 100                                                                                   |
| QAC       | 0                                                                               | 0                                                                             | 0                                                                              | 0                                                                                     |
| QAC/AIOH  | 0                                                                               | 50.0                                                                          | 0                                                                              | 50.0                                                                                  |
| DDA       | 0                                                                               | 0                                                                             | 0                                                                              | 0                                                                                     |
| DDA/AIOH  | 0                                                                               | 33.3                                                                          | 16.7                                                                           | 50.0                                                                                  |

5 Table 2 shows the data from the Leptospira challenge study. In determining the percentage of Leptospira infection in the challenged animal, the following criteria were used. If the kidney culture was positive for only one sample, the animal is considered to be positive for Leptospira. If an animal is positive in only one sample for either FA or PCR, the animal is considered to be negative. If the sample is positive for both FA and PCR in only one sample, it was considered positive for Leptospira.

The results shown in Table 2 indicate that there was a significant shorter duration of urinary shedding in all vaccine groups based on all the three assays. As far as urinary and kidney colonization are concerned, the efficacies of the QAC- and DDA-containing formulations without AIOH were comparable. AIOH did not improve and even reduced the efficacies of the QAC- or DDA-containing vaccines in this challenge study.

**Table 3 - Microscopic Agglutination Titer Range**  
**On Day Of Peak Geometric Mean Titer Prior To Challenge (Day 35)**

| Treatment | L. Hardjo  | L. pomona    |
|-----------|------------|--------------|
| Saline    | <20        | <20          |
| QAC       | 160 - 640  | 1280 - 10240 |
| QAC/AIOH  | 160 - 2560 | 8- - 10240   |
| DDA       | 40 - 1280  | 320 - 2560   |
| DDA/AIOH  | 320 - 640  | 1280 - 5120  |

Serological responses against both of the *Leptospira* antigens in the vaccine formulation were detected in the vaccinated animal and the peak response was noted on Day 35. There was no correlation between the serological response and the protection against the challenge. The presence of aluminum gel in the vaccine formulation reduced the level of protection although the serological response was enhanced by the presence of aluminum gel in the vaccine.

#### EXAMPLE 14

#### **Elicitation Of Immune Response To The BVD Viral Antigen And Protection Against The BVD Type 2 Virus Challenge After Immunization With A Microfluidized Vaccine Preparation Containing AMPHIGEN® Formulation and DDA.**

Four to seven month-old seronegative calves were used in this experiment. There were six different groups and each group had ten animals (Table 4). On Day 0 and Day 21 each animal received one 2 ml subcutaneous dose of the vaccine or placebo in the lateral neck approximately midway between the scapula and poll.

**Table 4 - Treatment Groups**

| Treatment | Adjuvant composition                                              |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|
| T01       | Saline                                                            |
| T02       | Quil-A, AMPHIGEN® formulation, and Chloesterol                    |
| T03       | AMPHIGEN® formulation, Choloesterol, DDA (0.5 mg / dose) and AIOH |
| T04       | AMPHIGEN® formulation, Cholesterol, and DDA (0.5 mg / dose)       |
| T05       | AMPHIGEN® formulation, Cholesterol, and DDA (1.0 mg / dose)       |
| T06       | AMPHIGEN® formulation, Cholesterol, and DDA (2.0 mg / dose)       |

A 5 ml dose of the challenge virus preparation (approximately 2.5 ml per nostril) was administered intranasally on Day 44 of the study. Noncytopathic BVD virus Type 2, isolate # 24515 (Ellis Strain), lot # 46325-70 was used in this study as the challenge strain. Retained samples of challenge material were tittered (two replicates per titration) at the time challenge was initiated and immediately upon its completion. The mean live virus titer per 5 ml dose was  $5.3 \log_{10}$  FAID<sub>50</sub>/5 ml prior to challenge and  $5.4 \log_{10}$  FAID<sub>50</sub>/5 ml post challenge (FAID is equivalent to TCID<sub>50</sub>).

Animals were monitored daily from Day -3 through Day 58. Clinical disease scores of 0, 1, 2, or 3, based on clinical signs attributable to BVD 2 infection were made for each animal on Days 42 through 58. The scores on Day 44 were recorded prior to challenge. Blood samples (two 13 ml Serum Separation Tubes, SST) were collected from each animal on Days

0, 21, 35, 44, and 58 for determination of serum titers of BVD Type 1 and BVD Type 2 virus neutralization antibodies.

Blood samples were collected from each animal on Days 42 through Day 58, inclusive, and the presence of BVD virus in buffy coat cell was determined. On Day 44, samples were obtained prior to challenge.

For determining white blood cell counts, blood samples (one 4 ml EDTA tube) were collected from each animal on Day 42 through Day 58, inclusive. On Day 44, samples were obtained prior to challenge.

Leukopenia was defined as a 40% or greater decrease in the WBC count from baseline (average of pre-challenge WBC counts from two days prior to, and the day of challenge).

Clinical disease scores were used to define disease status as follows; if the score is  $\leq 1$ , then disease = no; if the score is  $> 2$ , then disease = yes.

As shown in the Tables 5 and 6, the groups vaccinated with vaccines containing BVD viral antigens along with the AMPHIGEN® formulation, Quil A or DDA and microfluidized, seroconverted with significant serum virus neutralization titers for both BVD Type 1 and BVD Type 2 viruses. In those groups there was also a significant reduction in the percentage of animals showing viremia following challenge, while in the control group 100% of the animals were viremic (Table 7). In addition, in those vaccinated groups the frequency of the disease was also significantly reduced (Table 8). Similarly, the percentage of animals showing leukopenia was also reduced in the vaccine groups and the reduction of leukopenia was more significant in the group containing DDA than in the group containing Quil A (Table 9). In the control group there was a significant drop in the weight gain when compared to the vaccinated groups. (Table 10)

## Serology

Prior to vaccination on Day 0, all animals in the study were seronegative (SVN  $< 1:2$ ) for antibodies to BVD virus Types 1 and 2 (data not shown). Fourteen days after the second vaccination (Day 35), all animals that were administered the placebo (T01) remained seronegative for antibodies to BVD virus Types 1 and 2; and all of the animals vaccinated with the ITAs (Investigational Test Antigen) (T02, T03, T04, T05 and T06) were seropositive (SVN  $\geq 1:8$ ) for antibodies to BVD virus, Types 1 and 2. One animal which was administered with the vaccine adjuvanted with the AMPHIGEN® formulation at 2 mg/dose of DDA had an SVN titer of 3 for antibodies to BVD virus Type 2 on Day 35 (Table 11 and 12).

Prior to challenge on Day 44, all controls (T01), except one, were seronegative (SVN  $< 1:2$ ) for antibodies to BVD virus Types 1 and 2 (data now shown). The one control (#2497) was seropositive (SVN = 10) for antibodies to BVD virus Type 1 and seronegative for antibodies to BVD virus Type 2. Fourteen days following challenge, all animals in the study were seropositive for antibodies to BVD virus Types 1 and 2.

28  
28

Table 5. BVD Virus Type 1 Geometric Mean Serum Virus Neutralization Titers

| Treatment |                                | BVDv Type 1 Geometric Mean SVN Titers on Study Day |      |         |         |         |
|-----------|--------------------------------|----------------------------------------------------|------|---------|---------|---------|
|           |                                | 0                                                  | 21   | 35      | 44      | 58      |
| T01       | Saline                         | <2                                                 | <2   | <2      | <2      | 23.9    |
| T02       | Amphigen,<br>Quil A            | <2                                                 | 39.1 | 19824.5 | 14018.2 | 27554.5 |
| T03       | Amphigen,<br>0.5 mg DDA,<br>AI | <2                                                 | 51.8 | 32204.8 | 22381.1 | 23170.4 |
| T04       | Amphigen,<br>0.5 mg DDA        | <2                                                 | 27.0 | 14512.4 | 8932.0  | 21996.2 |
| T05       | Amphigen,<br>1.0 mg DDA        | <2                                                 | 26.7 | 11585.2 | 8194.6  | 20882.0 |
| T06       | Amphigen,<br>2.0 mg DDA        | <2                                                 | 23.5 | 8778.7  | 6769.3  | 16961.1 |

Table 6. BVD Virus Type 2 Geometric Mean Serum Virus Neutralization Titers

5

| Treatment |                                | BVDv Type 1 Geometric Mean SVN Titers on Study Day |     |        |        |         |
|-----------|--------------------------------|----------------------------------------------------|-----|--------|--------|---------|
|           |                                | 0                                                  | 21  | 35     | 44     | 58      |
| T01       | Saline                         | <2                                                 | <2  | <2     | <2     | 522.0   |
| T02       | Amphigen,<br>Quil A            | <2                                                 | 8.9 | 2272.4 | 2048.2 | 24833.6 |
| T03       | Amphigen,<br>0.5 mg<br>DDA, AI | <2                                                 | 9.5 | 3565.7 | 2702.2 | 20881.8 |
| T04       | Amphigen, 0.<br>5 mg DDA       | <2                                                 | 4.1 | 1260.7 | 989.1  | 18496.2 |
| T05       | Amphigen,<br>1.0 mg DDA        | <2                                                 | 6.4 | 1398.8 | 1453.9 | 30047.8 |
| T06       | Amphigen, 2.<br>0 mg DDA       | <2                                                 | 7.7 | 1673.2 | 1428.9 | 16384.0 |

10

Table 7. BVD Virus Isolation Following Challenge

| Treatment |                          | BVD Virus Isolation   |                                  |                          |
|-----------|--------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------|
|           |                          | On Study Days         | Frequency (%) of Viremic Animals | LSMean Days with Viremia |
| T01       | Saline                   | 47 through 58         | 10/10 (100.0)                    | 10.4                     |
| T02       | Amphigen, Quil A         | 50 through 53         | 1/10 (10.0)                      | 0.4                      |
| T03       | Amphigen, 0.5 mg DDA, AI | ---                   | 0/10 (0.0)                       | 0.0                      |
| T04       | Amphigen, 0.5 mg DDA     | 48, 50 through 52, 57 | 3/10 (30.0)                      | 0.5                      |
| T05       | Amphigen, 1.0 mg DDA     | 49 through 51         | 2/10 (20.0)                      | 0.4                      |
| T06       | Amphigen, 2.0 mg DDA     | 48 through 52         | 2/10 (20.0)                      | 0.5                      |

5

Table 8. Clinical Signs Of BVD Disease Following Challenge

| Treatment |                          | Frequency (%) with Disease | Frequency (%) Observations with Clinical Sign of BVD Disease |           |           |         | Total Obs. |
|-----------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|-----------|---------|------------|
|           |                          |                            | 0                                                            | 1         | 2         | 3       |            |
| T01       | Saline                   | 9/10 (90.0)                | 75 (46)                                                      | 63 (37.5) | 29 (17.3) | 1 (0.6) | 168        |
| T02       | Amphigen, Quil A         | 1/10 (10.0)                | 105 (61.8)                                                   | 63 (37.1) | 2 (1.2)   | 0 (0)   | 170        |
| T03       | Amphigen, 0.5 mg DDA, AI | 2/10 (20.0)                | 99 (58.2)                                                    | 67 (39.4) | 4 (2.4)   | 0 (0)   | 170        |
| T04       | Amphigen, 0.5 mg DDA     | 0/10 (0.0)                 | 118 (69.4)                                                   | 52 (30.6) | 0 (0)     | 0 (0)   | 170        |
| T05       | Amphigen, 1.0 mg DDA     | 0/10 (0.0)                 | 101 (59.4)                                                   | 69 (40.6) | 0 (0)     | 0 (0)   | 170        |
| T06       | Amphigen, 2.0 mg DDA     | 0/10 (0.0)                 | 104 (61.2)                                                   | 66 (38.8) | 0 (0)     | 0 (0)   | 170        |

29  
29

Table 9. Leukopenia Following Challenge

| Treatment |                          | Leukopenia                        |                           |
|-----------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
|           |                          | Frequency (%) of Leukemic Animals | LSMean Days with Leukemia |
| T01       | Saline                   | 10/10 (100.0)                     | 7.8                       |
| T02       | Amphigen, Quil A         | 6/10 (60.0)                       | 1.2                       |
| T03       | Amphigen, 0.5 mg DDA, AI | 2/10 (20.0)                       | 0.2                       |
| T04       | Amphigen, 0.5 mg DDA     | 4/10 (40.0)                       | 0.8                       |
| T05       | Amphigen, 1.0 mg DDA     | 3/10 (30.0)                       | 0.9                       |
| T06       | Amphigen, 2.0 mg DDA     | 2/10 (30.0)                       | 0.5                       |

5

Table 10. Body Weight and Body Weight Gain During the Study

| Treatment |                            | Mean Body Weight (lb.) on Study Day |       |       |       | Weight Gain (lb) |
|-----------|----------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|------------------|
|           |                            | -1                                  | 43    | 50    | 58    |                  |
| T01       | Saline                     | 378.0                               | 484.9 | 491.0 | 476.9 | 98.9             |
| T02       | Amphigen, Quil A           | 428.0                               | 526.5 | 546.7 | 579.0 | 151.0            |
| T03       | Amphigen, 0.5 mg DDA, AIOH | 410.5                               | 514.4 | 534.2 | 579.0 | 168.5            |
| T04       | Amphigen, 0.5 mg DDA       | 373.7                               | 472.3 | 492.6 | 538.1 | 164.4            |
| T05       | Amphigen, 1.0 mg DDA       | 358.9                               | 451.4 | 478.9 | 507.1 | 148.2            |
| T06       | Amphigen, 2.0 mg DDA       | 408.                                | 513.3 | 533.9 | 560.3 | 151.6            |

10

### Virus Isolation

As the data shown in Table 13, during the challenge period (Days 44 through 58), all ten animals in the control (T01) were viremic (BVD virus was isolated on one or more days). In the groups administered with the ITAs, the frequency of viremic animals was one, zero, three, two and two in each group of ten (T02, T03, T04, T05 and T06, respectively). The difference between the control and the groups administered with the ITAs was statistically significant ( $P \leq 0.05$ ). The least squares mean number of days of viremia was also significantly greater (10.4 days) for the control as compared to the groups administered with the ITAs (0.0 to 0.5 days).

### Clinical Disease

Animals with clinical sign scores of 2 or 3 were considered demonstrating signs of BVD disease. As shown in the Table 14, the frequency of animals with clinical signs of BVD virus disease was nine of ten in the control (T01) and one, two, zero, zero and zero of ten in each of the groups administered the ITAs (T02, T03, T04, T05 and T06, respectively). The difference between the control and groups that were administered the ITAs was statistically significant ( $P \leq 0.05$ ).

### Leukopenia

As shown in Table 15, during the challenge period (Days 44 through 58), all ten animals in the control (T01) were leukemic (a 40% reduction in white blood cell count from pre-challenge baseline, Days 42-44). The frequency of animals with leukemia was six, two, four, three and two of the ten animals in each of the groups administered with the ITAs (T02, T03, T04, T05 and T06, respectively). The difference between the control and the group administered with vaccine which was adjuvanted with the AMPHIGNEN® formulation at 0.5 mg/dose and aluminum hydroxide (T03) was statistically significant ( $P \leq 0.05$ ). The least squares mean number of days of leukemia was significantly greater (7.8 days) for the control as compared to the groups administered with the ITAs (0.2 to 1.2 days).

## **EXAMPLE 15**

### **Elicitation Of Immune Response To The BVD Viral Antigen And Protection Against The BVD Type 2 Virus Challenge After Immunization With Microfluidized Vaccine Formulation Containing GPI-0100.**

A set of experimental conditions as described in the Example 14 was followed and a direct comparison between Quil A and GPI-0100 was made. As shown in the Tables 11 and 12, the animals vaccinated with BVD antigens in the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based preparation containing either Quil A or GPI-0100 had a significant antibody titer both for BVD Type 1 and BVD Type 2 viruses. The antibody titer for BVD Type 1 virus was much more higher than that for BVD Type 2 virus. However, subsequent challenge with BVD Type 2 virus

30  
30

showed a strong protection and the disease incidence was significantly reduced in the calves vaccinated with the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based vaccine preparation containing GPI-0100.

5 **Table 11. BVD virus Type 1 Geometric Mean Serum Virus Neutralization Titers**

| Treatment |                               | Geometric mean SVN titer |       |         |         |         |
|-----------|-------------------------------|--------------------------|-------|---------|---------|---------|
|           |                               | 0                        | 21    | 35      | 43      | 57      |
| T01       | Saline                        | <2                       | <2    | <2      | <2      | 35.5    |
| T02       | Amphigen, Quil A              | <2                       | 98.7  | 20171.0 | 12203.4 | 44762.4 |
| T03       | Amphigen, 2 mg GPI-0100, AIOH | <2                       | 84.6  | 10998.5 | 7383.2  | 25709.2 |
| T04       | Amphigen, 2 mg GPI-0100       | <2                       | 106.0 | 18179.2 | 8933.2  | 28526.2 |
| T05       | Amphigen, 3 mg GPI-0100       | <2                       | 62.9  | 15024.3 | 8780.1  | 19824.4 |
| T06       | Amphigen, 5 mg GPI-0100       | <2                       | 71.1  | 12203.3 | 7512.0  | 16670.2 |

10 **Table 12. BVD virus Type 2 Geometric Mean Serum Virus Neutralization Titers**

| Treatment |                               | BVDv Type 1 Geometric Mean SVN Titers on Study Day |      |        |        |        |
|-----------|-------------------------------|----------------------------------------------------|------|--------|--------|--------|
|           |                               | 0                                                  | 21   | 35     | 44     | 58     |
| T01       | Saline                        | <2                                                 | <2   | <2     | <2     | 14.7   |
| T02       | Amphigen, Quil A              | <2                                                 | 12.9 | 2312.0 | 1692.5 | 1663.4 |
| T03       | Amphigen, 2 mg GPI-0100, AIOH | <2                                                 | 13.2 | 1663.5 | 1116.8 | 1562.3 |
| T04       | Amphigen, 2 mg GPI-0100       | <2                                                 | 20.5 | 2610.2 | 1978.2 | 2478.7 |
| T05       | Amphigen, 3 mg GPI-0100       | <2                                                 | 11.4 | 1752.8 | 1305.2 | 2435.4 |
| T06       | Amphigen, 5 mg GPI-0100       | <2                                                 | 12.0 | 3158.4 | 2120.2 | 1845.6 |

15

20

Table 13. BVD Virus Isolation Following Challenge

| Treatment |                              | BVD Virus Isolation              |                          |
|-----------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
|           |                              | Frequency (%) of Viremic Animals | LSMean Days with Viremia |
| T01       | Saline                       | 10/10 (100.0)                    | 8.4                      |
| T02       | Amphigen, Quil A             | 3/10 (30.0)                      | 0.3                      |
| T03       | Amphigen, 2mg GPI-0100, AIOH | 0/10 (0.0)                       | 0.0                      |
| T04       | Amphigen, 2 mg GPI-0100      | 1/10 (10.0)                      | 0.1                      |
| T05       | Amphigen, 3 mg GPI-0100      | 3/10 (30.0)                      | 0.3                      |
| T06       | Amphigen, 5 mg GPI-0100      | 2/10 (20.0)                      | 0.2                      |

5

Table 14. Clinical Signs of BVD Disease Following Challenge

| Treatment |                               | Frequency (%) with Disease | Frequency (%) Observations with Clinical Disease Score of |           |          | Total Obs. |
|-----------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------|----------|------------|
|           |                               |                            | 0                                                         | 1         | 2        |            |
| T01       | Saline                        | 5/10 (50.0)                | 103 (60.6)                                                | 55 (32.4) | 12 (7.1) | 170        |
| T02       | Amphigen, Quil A              | 5/10 (50.0)                | 115 (67.6)                                                | 48 (28.2) | 7 (4.1)  | 170        |
| T03       | Amphigen, 2 mg GPI-0100, AIOH | 0/10 (0.0)                 | 128 (75.3)                                                | 42 (24.7) | 0 (0)    | 170        |
| T04       | Amphigen, 2 mg GPI-0100       | 0/10 (0.0)                 | 124 (72.9)                                                | 46 (27.1) | 0 (0)    | 170        |
| T05       | Amphigen, 3 mg GPI-0100       | 0/10 (0.0)                 | 104 (61.2)                                                | 66 (38.8) | 0 (0)    | 170        |
| T06       | Amphigen, 5mg GPI-0100        | 0/10 (0.0)                 | 128 (75.3)                                                | 42 (24.7) | 0 (0)    | 170        |

10

31

Table 15. Leukopenia Following Challenge

| Treatment |                     | Leukopenia                          |                             |
|-----------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
|           |                     | Frequency (%) of Leukopenic Animals | LSMean Days with Leukopenia |
| T01       | Saline              | 9/10 (90.0)                         | 8.7                         |
| T02       | Quil A              | 6/10 (60.0)                         | 1.6                         |
| T03       | 2 mg GPI-0100, AIOH | 7/10 (70.0)                         | 2.6                         |
| T04       | 2 mg GPI-0100       | 4/10 (40.0)                         | 1.5                         |
| T05       | 3 mg GPI-0100       | 7/10 (70.0)                         | 2.6                         |
| T06       | 5 mg GPI-0100       | 8/10 (80.0)                         | 2.9                         |

In conclusion, safety of each vaccine was demonstrated by the absence of adverse reactions or mortality in the vaccinated animals. Potency of each vaccine was demonstrated by seroconversion (SVN antibody titers to BVD-1 and BVD-2 >1:8) in 100% of the vaccinated animals. Satisfactory resistance to challenge was demonstrated by the vaccine adjuvanted with 2 mg GPI-0100 only.

#### EXAMPLE 16

##### Vaccine Preparation Containing Microencapsulated Antigen in Microfluidized Oil-in-Water Emulsion

Three grams of Trehalose (Fluka) was added to water to get a stock of 333mg/ml of Trehalose solution. Recombinant PauA antigen solubilized in 0.8% SDS solution (SDS/rPauA) was added to Trehalose solution to get a final concentration of 494 µg rPauA/ml. In the next step 10 grams of polylactide glycolic acid (PLG- Resomer RE 503H, Boehringer Ingelheim) was dissolved in 200 ml Methylene Chloride (MeCl<sub>2</sub>). The resulting PLG/MeCl<sub>2</sub> solution was combined with the SDS-rPauA/trehalose solution prepared in the first step. The combined solution was subjected to microfluidization using (Microfluidizer from Microfluidics Model M110EH) and the microfluidized preparation was spray dried using (Temco Spray Dryer Model SD-05). The spray dried material was collected using a 500 micron screen.

The concentration of rPauA in this spray dried material was quantified using a Western blot analysis. 1.04 mg of spray-dried material was dissolved in 50 µl of acetone and centrifuged at 13,200 rpm at room temperature for 10 minutes. The supernatant was removed. The supernatant and the pellet fractions were dried in a biological safety hood for 2.5 hours. The pellet was resuspended in 47.43 µL of sample solution (25µl of sample buffer + 10 µl of reducing agent+ 65µl of water). The dried supernatant fraction was resuspended with 20 µl of

sample solution. In the western analysis purified PauA was used as a standard to quantify the rPauA content of the spray dried material.

A 20 % Mannitol stock solution was prepared by dissolving 100 grams of mannitol (Sigma) in 500 ml of Water for Injection (WFI). Solution was heated to 40°C with hot plate/stirrer and cooled to 30°C. Solution was sterile filtered through a 0.22micron sterile filter (Millipore). 2.5% Carboxymethylcellulose solution was prepared by dissolving 12.5 grams of carboxymethylulcellulose (Sigma) in 500 ml of WFI and mixed overnight at 4°C. Solution was autoclaved at 121°C.

The powder resulting from spray drying was reconstituted in a solution containing 5% mannitol, 0.3% carboxymethyl cellulose, and 1:5000 of thimerosol. The final solution was aliquoted in to 3 ml vials and lyophilized using a Lyophilizer (USIFROID). The lyophilized powder represents the microencapsulated rPauA. The microencapsulated subunit protein antigen is resuspended in 2 ml of microfluidized oil-in-water emulsion containing an AMPHIGEN® formulation (such as the microfluidized emulsion described in Example 20) and used as a vaccine.

#### EXAMPLE 17

##### Preparation Of Microfluidized Vaccine Formulation Containing Both Bacterial Whole Cell Antigen And Recombinant Protein Antigen In Oil-In-Water Emulsion

Two vaccine preparations were made which contained both recombinant *Streptococcus uberis* PauA protein and *Escherichia coli* bacterial cells, added intrinsically to oil-in-water emulsions as described in Examples 2 and 3. The recombinant PauA antigen was at the concentration of 100 µg per dose and the *E. coli* cells were at the final count of  $4 \times 10^9$  per dose. The emulsion adjuvant compositions of the two vaccine formulations are shown in the Table 16.

Table. 16 Vaccine formulations containing both the recombinant protein and whole *E. coli* cells.

| Treatment | Antigen               | Adjuvant                                                                             |
|-----------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| T01       | Placebo               | Saline                                                                               |
| T02       | Pau A/ <i>E. coli</i> | SEAM-14                                                                              |
| T03       | Pau A/ <i>E. coli</i> | 2.5 % Amphigen, 0.5 mg GPI-0100, 0.5 mg cholesterol                                  |
| T04       | Pau A/ <i>E. coli</i> | 2.5 % Amphigen, 0.5 mg dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA), 0.5 mg cholesterol |

38  
52**EXAMPLE 18****Immune Response to Microfluidized Vaccine Containing the rPauA  
and Whole Cell Bacterial Agents in Oil-In-Water Emulsion**

5 Mature dairy cows were used in this experiment. Animals were at the end of their first  
or second lactation at the time of enrollment. Two ml of each vaccine formulation was  
administered subcutaneously three times, once at the time of drying off (D-0), 28 days later  
(D=28), and again 4 to 10 days following calving (C+4 - C+10). The first and third dose was  
administered on the left side of the neck and the second dose was administered on the right  
10 side of the neck. Blood was collected prior to each vaccination and approximately 14 days and  
32 days following third vaccination. The antibody titer for E. coli and the rPauA antigen were  
determined through ELISA. As shown in **Figure 8**, the results indicate that the antibody titer for  
rPauA was higher in the group vaccinated with vaccine formulation containing GPI-0100 as an  
immunostimulant and peaked on day 70 post initial vaccination. The antibody titer for E. coli  
15 antigen is shown in **Figure 9**. The antibody titer for E. coli antigen was comparable in both  
vaccine formulations, although the presence of GPI-0100 as an immunostimulant induced a  
relatively higher antibody titer when compared to the formulation with DDA as an  
immunostimulant.

20

**EXAMPLE 19****Analysis Of Virucidal Activity Of The Microfluidized  
AMPHIGEN® Formulation Based Vaccine Preparations**

25 In order to determine whether microfluidization inactivates the virus, the viricidal activity  
of three microfluidized AMPHIGEN® formulation based vaccine preparations were determined.  
The three preparations contained three different bovine infectious viruses, namely bovine  
herpes virus (BHV), parainfluenza virus 3 (PI3), and bovine respiratory syncytial virus (BRSV).

Detection of the viricidal activity in the three vaccine preparations was conducted in  
30 accordance with the USDA 9CFR.113.35 requirements.

The results shown in Table 17 indicate that microfluidization of AMPHIGEN®  
formulation-based vaccine preparations does not cause any significant inactivation of the  
vaccine preparation.

35

40

Table 17. Analysis Of Viricidal Activities Of Microfluidized Vaccines

| Serial   | BRSV | BHV  | PI3  |
|----------|------|------|------|
| A        | 0    | 0.2  | 0    |
| AM200    | -0.2 | 0    | -0.2 |
| AM75     | 0    | -0.3 | -0.3 |
| AM75@37C | 0.1  | -0.3 | -0.2 |
| B        | 0    | -0.1 | -0.2 |
| BM200    | 0    | 0    | -0.2 |
| BM75     | -0.2 | -0.5 | 0    |
| BM75@37C | 0.5  | -0.5 | 0    |
| C        | 0.1  | -0.1 | -0.2 |
| CM200    | -0.2 | -0.1 | -0.2 |
| CM75     | 0.1  | 0.5  | -0.2 |
| CM75@37C | 0.5  | 0.5  | -0.2 |

A=Choloesterol added at 650 ml/min

5 B=Cholesterol added at 28 ml/min

C=Cholesterol added at 5 ml/min

M200=Microfluidized with 200 micron screen

M75=Microfluidized with 75 micron screen

M75@37C=Fluids heated to 37°C prior to microfluidization

10

A value above 0.7 is an indication of viricidal effect.

#### EXAMPLE 20

15

#### Preparation of a Microfluidized AMPHIGEN® Formulation

20

An AMPHIGEN® formulation was prepared by combining the DRAKEOL lecithin oil solution (light mineral oil with 25 % lecithin) and TWEEN 80 (with the final concentration of 0.18%) and Span 80 (with the final concentration of 0.08%) with mixing for 8-22 hours at  $36 \pm 1$  °C. The oil mixture was then added to saline with the aide of a Ross® (Hauppauge, NY 11788) emulsifier at approximately 3400 rpm. Subsequently the mixture was passed once through a microfluidizer with a 200  $\mu$ m interaction chamber at  $4500 \pm 500$  psi. Figure 10 A and 10B show the stability of the microfluidized AMPHIGEN® formulation. Particle size distribution, as measured by laser diffraction, at the starting, initial time point (Figure 10A) was nearly identical

25 to the particle size distribution after 22 months of 4°C storage (Figure 10B).

33  
33

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. A submicron oil-in-water emulsion useful as a vaccine adjuvant comprising a light hydrocarbon non-metabolizable oil, a surfactant, and an aqueous component, wherein said oil is dispersed in said aqueous component and the mean oil droplet size is less than 1  $\mu\text{m}$ .
2. The emulsion of claim 1, wherein said oil is light mineral oil and is in an amount of 1% to 50% v/v, said surfactant comprises lecithin and is in an amount of 0.01% to 10% v/v, and wherein said oil is dispersed in said aqueous component and the mean oil droplet size is between 0.1  $\mu\text{m}$  to 0.5  $\mu\text{m}$ .
3. A submicron oil-in-water emulsion useful as a vaccine adjuvant comprising about 40% v/v of mineral oil, about 10% w/v of lecithin, about .18% v/v of TWEEN-80, about 0.08% v/v of SPAN-80, and an aqueous phase, wherein said oil is dispersed in said aqueous phase and the mean oil droplet size is between 0.1  $\mu\text{m}$  to 0.5  $\mu\text{m}$ .
4. A method of preparing a submicron oil-in-water emulsion, comprising:
  - (a) preparing a mixture by combining a light hydrocarbon non-metabolizable oil, a surfactant, and an aqueous component;
  - (b) subjecting said mixture to a primary emulsification process to produce an oil-in-water emulsion which has a mean oil droplet size of 1.0  $\mu\text{m}$  to 1.1  $\mu\text{m}$ ; and
  - (c) subjecting the oil-in-water emulsion prepared in (b) to microfluidization to produce said submicron oil-in-water emulsion, wherein the submicron emulsion has a mean oil droplet size of less than 1  $\mu\text{m}$ .
5. The method of claim 4, wherein said oil is light mineral oil and is in an amount of 1% to 50% v/v, said surfactant comprises lecithin and is in an amount of 0.01% to 10% v/v, and wherein said mean oil droplet size of said submicron emulsion is between 0.1  $\mu\text{m}$  to 0.5  $\mu\text{m}$ .
6. A vaccine composition comprising an oil-in-water emulsion and an antigen, wherein said antigen is dispersed in said emulsion, said emulsion comprises a light hydrocarbon non-metabolizable oil, a surfactant and an aqueous component, and wherein the mean oil droplet size of said emulsion is less than 1  $\mu\text{m}$ .
7. The vaccine composition of claim 6, wherein said oil is light mineral oil and is present in said vaccine composition in an amount of 1% to 20% v/v, said surfactant comprises lecithin and is present in said vaccine composition in an amount of 0.01% to 10% v/v, and wherein said mean droplet size is between 0.1 to 0.5  $\mu\text{m}$ .

8. The vaccine composition of claim 6, wherein said antigen is a viral antigen or a bacterial antigen.
9. The vaccine composition of claim 8, wherein said viral antigen comprises killed Bovine Viral Diarrhea virus Type 1 or Type 2, and wherein said bacterial antigen comprises at least one of an inactivated *Leptospira* bacterin, the recombinant *Streptococcus uberis* PauA protein, or an *E. coli* cell preparation.
10. A method of preparing a vaccine composition, comprising:
- (a) preparing a mixture by combining a light hydrocarbon non-metabolizable oil, a surfactant, and an aqueous component;
  - (b) adding an antigen to the mixture formed in (a);
  - (c) subjecting the mixture containing said antigen, which is formed in (b), to a primary emulsification process to produce an oil-in-water emulsion which has a mean oil droplet size of 1.0  $\mu\text{m}$  to 1.1  $\mu\text{m}$ ; and
  - (d) subjecting the emulsion formed in (c) to microfluidization to produce said vaccine composition, wherein the composition has a mean oil droplet size of less than 1  $\mu\text{m}$ .
11. The method of claim 10, wherein said oil is light mineral oil and is present in the vaccine composition in an amount of 1% to 20% v/v, said surfactant comprises lecithin and is present in said vaccine composition in an amount of 0.01% to 10% v/v, and wherein said mean oil droplet size is between 0.1 to 0.5  $\mu\text{m}$ .
12. The method of claim 10, wherein said antigen is a viral antigen or a bacterial antigen.
13. The method of claim 12, wherein said viral antigen comprises killed Bovine Viral Diarrhea virus Type 1 or Type 2, and wherein said bacterial antigen comprises at least one of an inactivated *Leptospira* bacterin, the recombinant *Streptococcus uberis* PauA protein, or an *E. coli* cell preparation.
14. A vaccine composition comprising an microencapsulated antigen and an oil-in-water emulsion, wherein said microencapsulated antigen is dispersed in said emulsion, and said emulsion comprises a light hydrocarbon non-metabolizable oil, a surfactant and an aqueous component, and wherein the mean oil droplet size of said emulsion is less than 1  $\mu\text{m}$ .
15. The vaccine composition of claim 14, wherein said oil is light mineral oil and is present in said vaccine composition in an amount of 1.0% to 20% v/v, said surfactant comprises lecithin and is present in said vaccine composition in an amount of 0.01% to 10% v/v, said antigen is a

1/6

FIG. 1

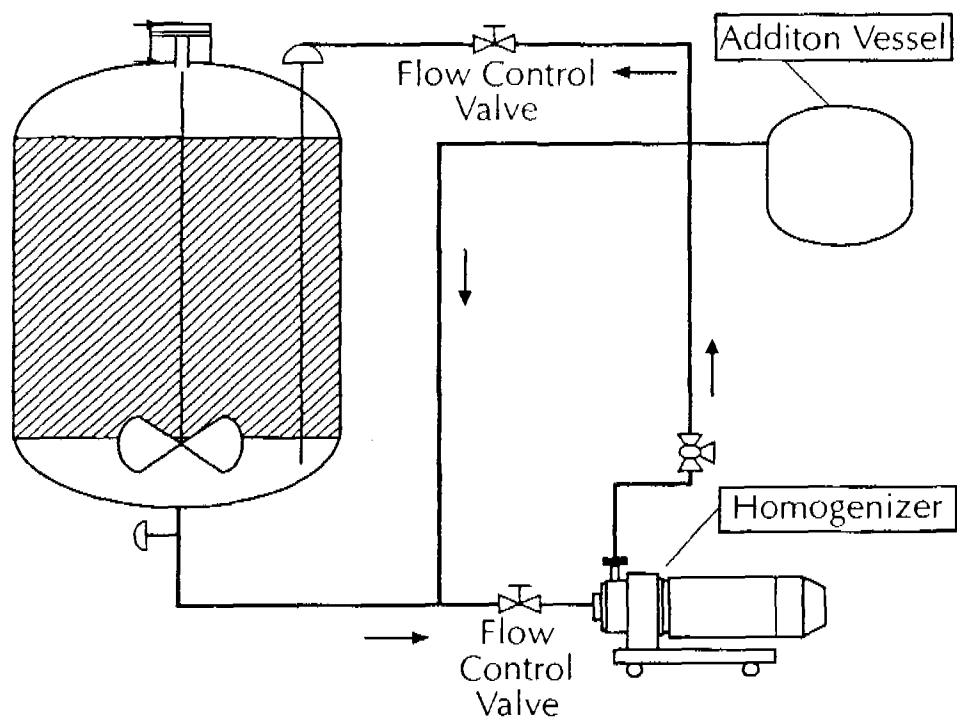
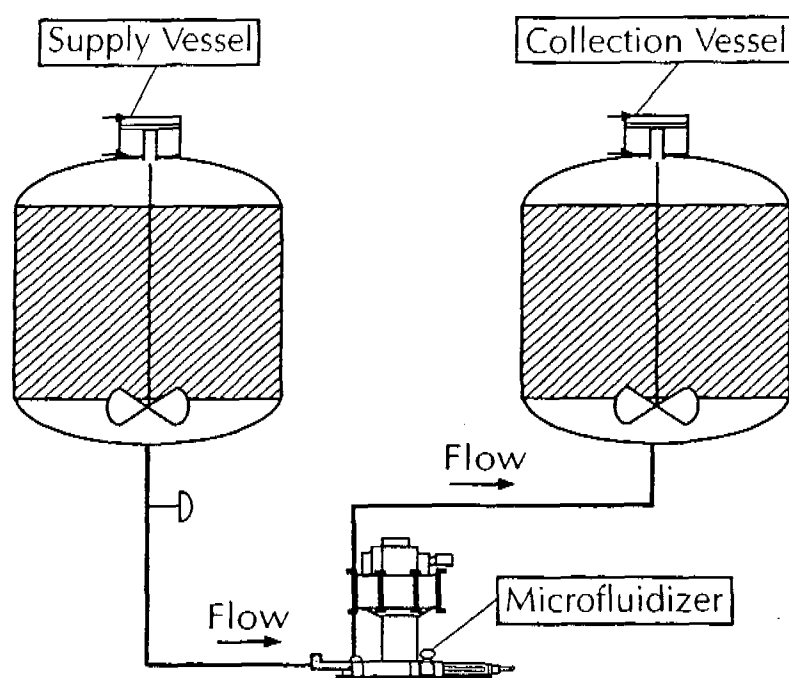
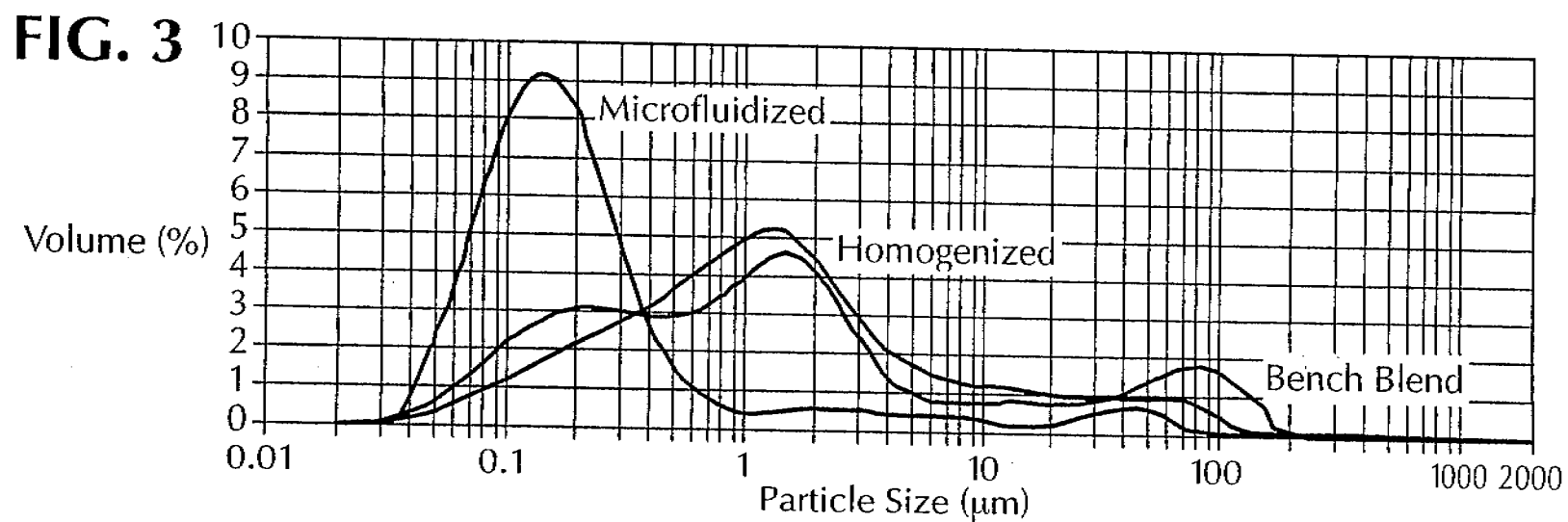


FIG. 2



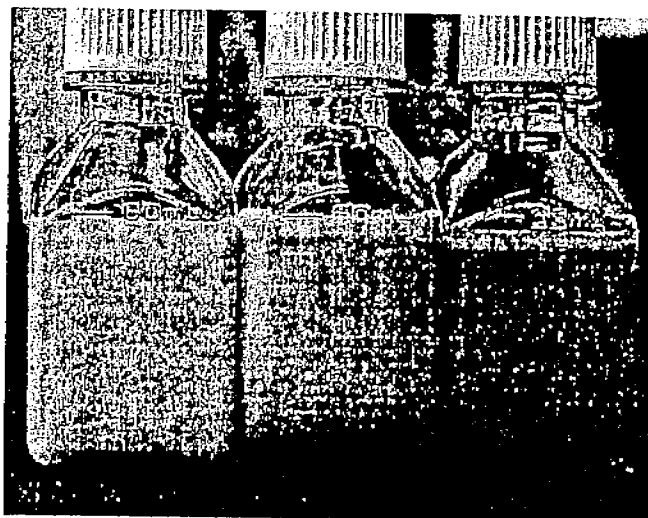
36

WO 2004/087204



2/6

**FIG. 4**



PCT/IB2004/000937

36

3/6

FIG. 5

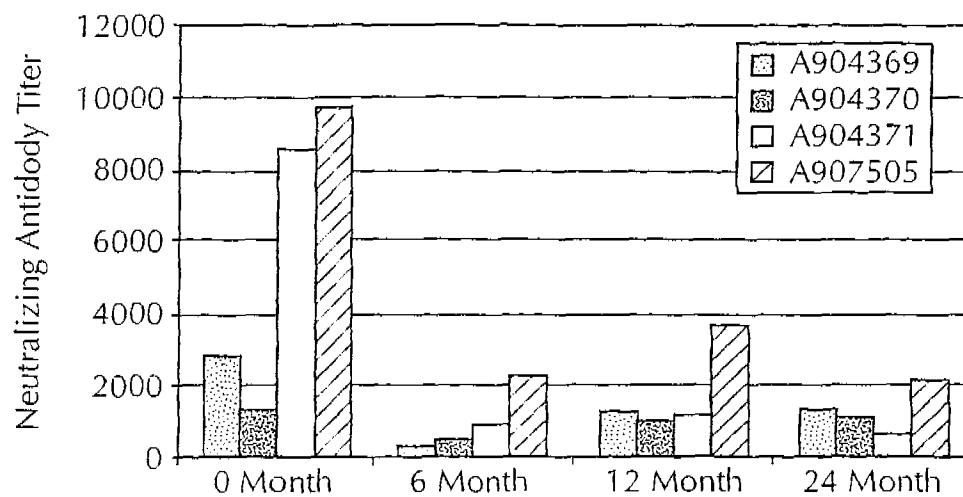
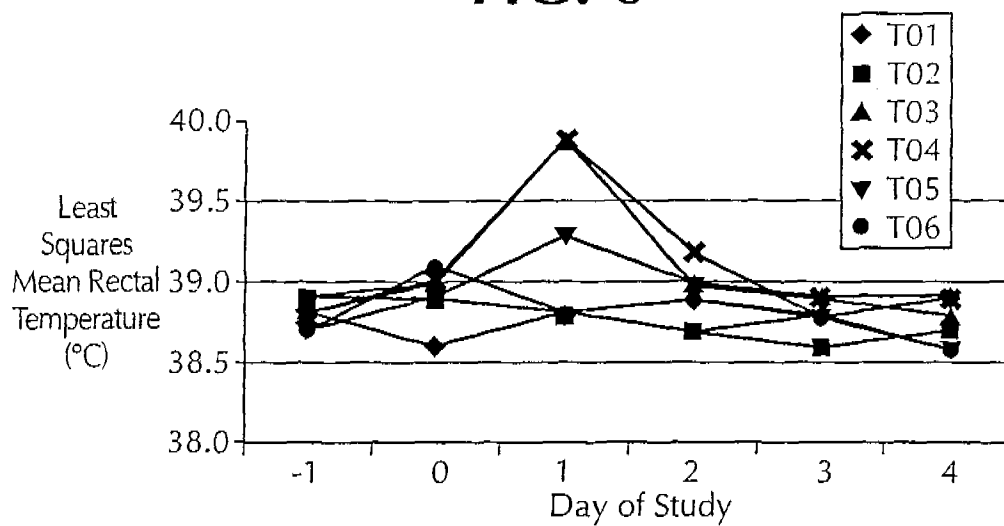


FIG. 6



4/6

FIG. 7

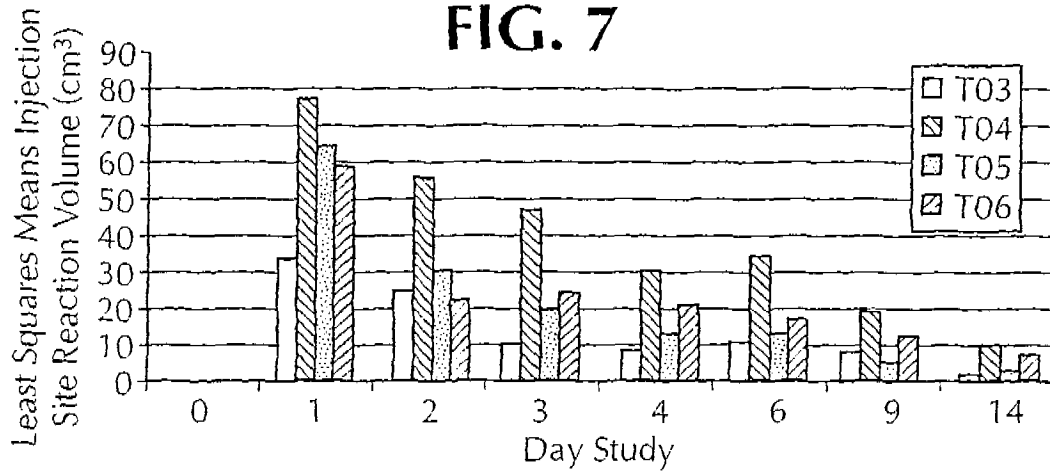
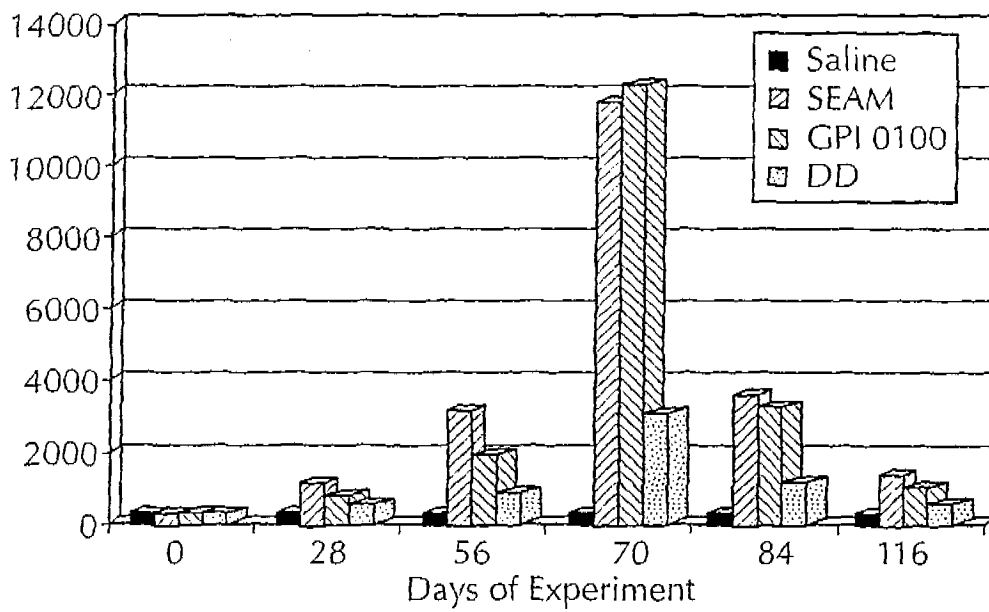
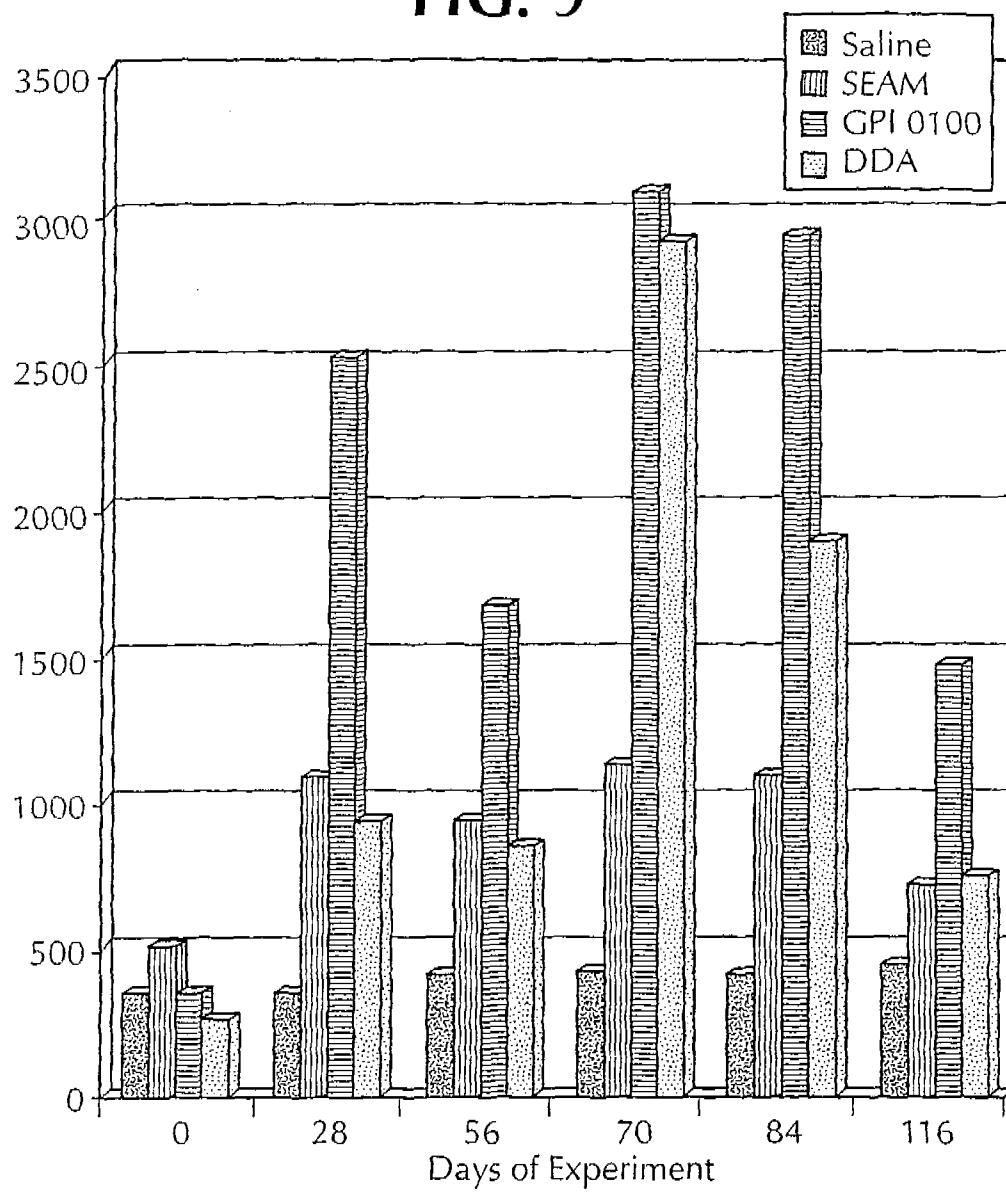


FIG. 8

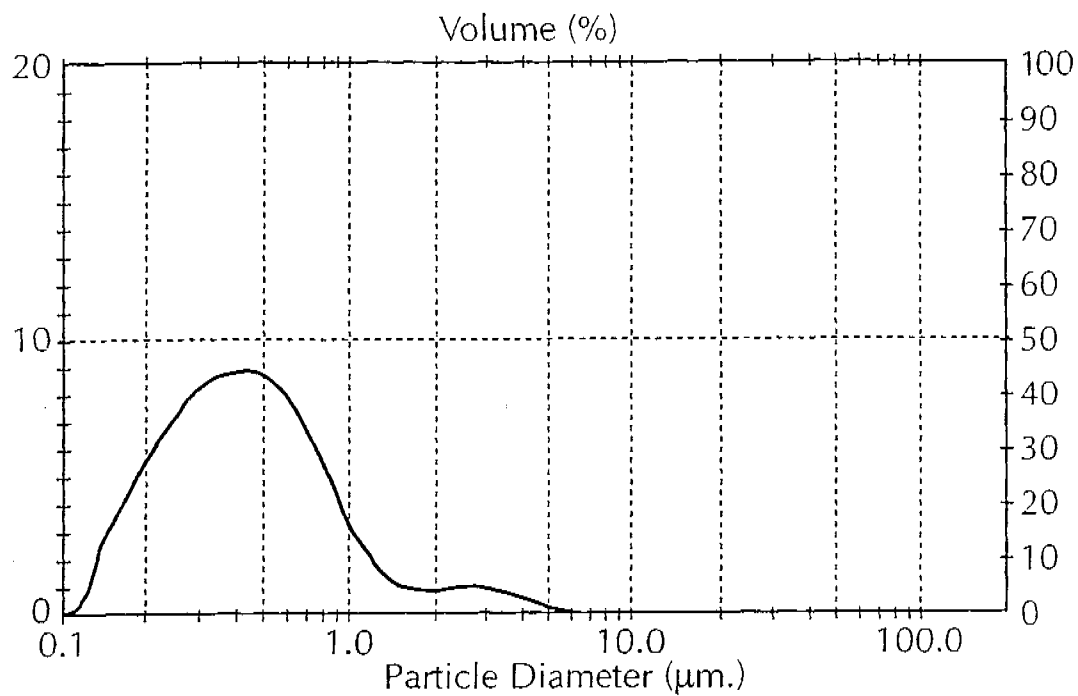
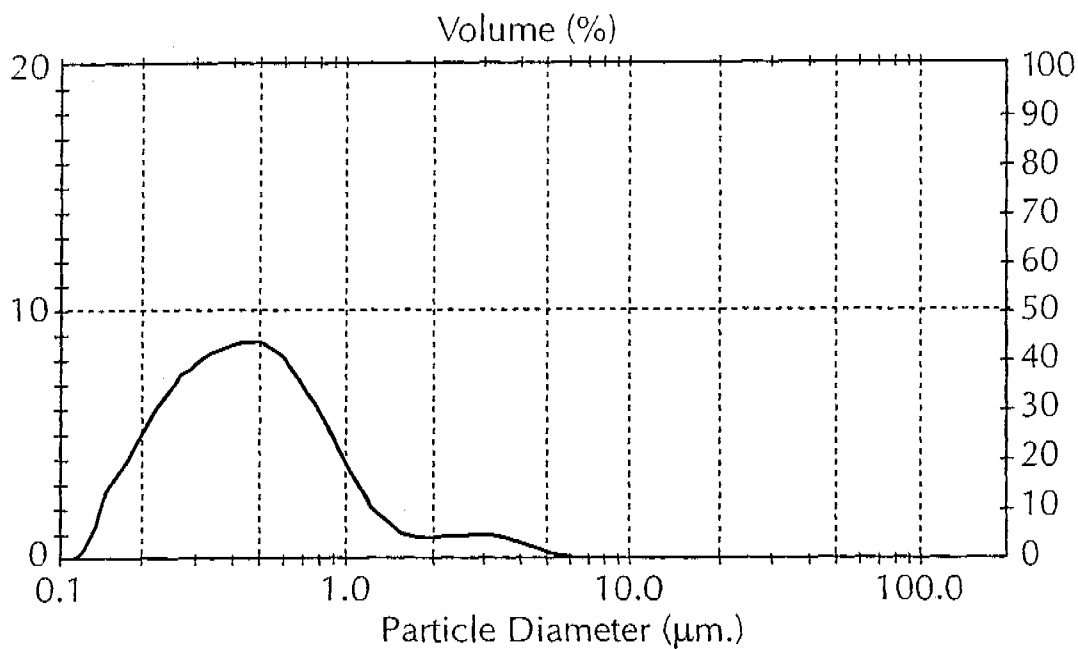


5/6

FIG. 9



6/6

**FIG. 10A****FIG. 10B**

**EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA MICROFLUIDIZADAS Y**  
**COMPOSICIONES DE VACUNAS**

**CAMPO DE LA INVENCION**

- 5        Esta invención se refiere de forma general al campo de las vacunas y, en particular, a formulaciones de adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria en animales veterinarios. En particular, la invención se refiere al uso de una emulsión submicrométrica de aceite en agua como un adyuvante de vacunas para potenciar la capacidad inmunógena de los antígenos. La
- 10    presente invención proporciona formulaciones de emulsiones submicrométricas de aceite en agua, composiciones de vacunas que contienen un antígeno incorporado en dicha emulsión, así como procedimientos para preparar las emulsiones y vacunas.

15    **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- Las infecciones bacterianas, víricas, parasitarias y micoplásmicas están ampliamente difundidas en los animales veterinarios tales como ganado vacuno, porcino y animales de compañía. Las enfermedades provocadas por estos agentes infecciosos son a menudo resistentes a la terapia farmacéutica
- 20    antimicrobiana, sin dejar medios efectivos de tratamiento. En consecuencia, cada vez se usa más una estrategia de vacunación para controlar la enfermedad infecciosa en los animales veterinarios. Un patógeno infeccioso entero puede hacerse adecuado para usarse en una formulación de vacuna después de la inactivación química o manipulación genética apropiada. De
- 25    forma alternativa, puede expresarse una subunidad proteínica del patógeno en

un sistema de expresión recombinante y purificarse para su uso en una formulación de vacuna.

Adyuvante en general se refiere a cualquier material que aumenta la respuesta inmunitaria humoral y/o celular a un antígeno. Las vacunas tradicionales están compuestas por una preparación bruta de microorganismos patógenos inactivados y las impurezas asociadas a los cultivos de microorganismos patológicos podrían actuar como adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria. Sin embargo, cuando se usan preparaciones homogéneas de microorganismos patológicos o subunidades proteínicas purificadas como antígenos para la vacunación, la inmunidad provocada por dichos antígenos es deficiente y, por lo tanto, se hace necesaria la adición de ciertos materiales exógenos como adyuvantes. Además, las vacunas sintéticas y de subunidades son caras de producir. Por lo tanto, con la ayuda de adyuvantes, puede ser necesaria una dosis menor de antígeno para estimular la respuesta inmunitaria, reduciendo así en el coste de producción de las vacunas.

Se sabe que los adyuvantes actúan de diferentes maneras para potenciar la respuesta inmunitaria. Muchos adyuvantes modifican la red de citocinas asociadas a la respuesta inmunitaria. Estos adyuvantes inmunomoduladores pueden ejercer su efecto incluso cuando no están combinados con antígenos. En general, los adyuvantes inmunomoduladores provocan una regulación por aumento general de ciertas citocinas y una regulación por disminución concomitante de otras provocando una respuesta celular Th1 y/o humoral Th2.

Algunos adyuvantes tienen la capacidad de preservar la integridad de la

conformación de un antígeno de forma que los antígenos puedan presentarse de forma eficiente a las células efectoras inmunitarias apropiadas. Como resultado de esta preservación de la conformación del antígeno por la formulación del adyuvante, la vacuna tendría una vida útil mayor como la mostrada por los complejos inmunoestimuladores (ISCOM). Ozel M. y cols.; Quaternary Structure of the Immunestimulating Complex (Iscom), *J. of Ultrastruc. And Molec. Struc. Res.* 102, 240-248 (1989).

Algunos adyuvantes tienen la propiedad de retener el antígeno en forma de formulación de liberación prolongada en el sitio de inyección. Como resultado de este efecto de liberación prolongada el antígeno no se pierde rápidamente por aclaramiento hepático. Las sales de aluminio y las emulsiones de agua en aceite actúan a través de este efecto de liberación prolongada con una duración menor. Por ejemplo, se puede obtener una formulación de liberación prolongada a largo plazo usando adyuvante completo de Freund (FCA) que es una emulsión de agua en aceite. FCA típicamente se mantiene en el sitio de inyección hasta que la biodegradación permite la separación del antígeno por las células presentadoras de antígeno.

Basándose en su naturaleza física, los adyuvantes pueden agruparse en dos categorías muy amplias, en concreto adyuvantes particulados y adyuvantes no particulados. Los adyuvantes particulados existen en forma de micropartículas. El inmunógeno es capaz de incorporar o asociarse a las micropartículas. Sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, complejos inmunoestimuladores, liposomas y nanopartículas y micropartículas son ejemplos de adyuvantes particulados. Los adyuvantes no particulados son generalmente inmunomoduladores y se usan

generalmente junto con adyuvantes particulados. Muramil dipéptido (un componente activo-adyuvante de un peptidoglicano extraído de *Mycobacteria*), copolímeros de bloque no iónicos, saponinas (una mezcla compleja de triterpenoides extraídos de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*), Lípido A (un  
5 disacárido de glucosamina con dos grupos fosfato y cinco o seis cadenas de ácidos grasos generalmente de C12 a C16 de longitud), citocinas, polímeros de carbohidratos, polisacáridos derivatizados y toxinas bacterianas tales como la toxina del cólera y la toxina lábil de *E. coli* (LT) son ejemplos de adyuvantes no particulados.

10 Algunos de los adyuvantes mejor conocidos son combinaciones de inmunomoduladores no particulados y materiales particulados que podrían conferir un efecto de liberación prolongada a la formulación de adyuvante. Por ejemplo, FCA combina las propiedades inmunomoduladoras de componentes de *Mycobacterium tuberculosis* con el efecto depósito a corto plazo de las  
15 emulsiones en aceite.

Las emulsiones en aceite se han usado como adyuvante de vacunas durante mucho tiempo. Le Moignic y Pinoy encontraron en 1916 que una suspensión de *Salmonella typhimurium* inactivados en aceite mineral aumentaba la respuesta inmunitaria. Subsiguientemente, en 1925, Ramon  
20 describió el aceite de almidón como una de las sustancias que aumentan la respuesta antitóxica al toxoide de la difteria. Sin embargo, las emulsiones en aceite no se hicieron populares hasta 1937 cuando Freund logró su formulación de adyuvante que hoy se conoce como Adyuvante Completo de Freund (FCA). FCA es una emulsión de agua en aceite compuesta por aceite mineral  
25 (parafina) mezclado con *Mycobacteria* inactivadas y Arlacel A. Arlacel A es

- principalmente monooleato de manida y se usa como agente emulsionante. Aunque FCA es excelente para inducir una respuesta de anticuerpos, provoca un dolor fuerte, formación de abscesos, fiebre e inflamación granulomatosa. Para evitar estas reacciones secundarias indeseables, se desarrolló el
- 5 Adyuvante Incompleto de Freund (IFA). IFA es similar a FCA en su composición excepto por la ausencia de componentes de micobacteria. IFA actúa mediante formulación de liberación prolongada en el sitio de inyección y liberación lenta del antígeno con estimulación de células productoras de anticuerpos.
- 10 Otra estrategia para mejorar FCA se basó en la noción de que la sustitución del aceite mineral por un aceite biocompatible ayudaría a eliminar las reacciones asociadas a FCA en el sitio de inyección. Se creía también que la emulsión debería ser una de aceite en agua en lugar de agua en aceite porque ésta produce efecto de liberación prolongada de larga duración en el
- 15 sitio de inyección. Hilleman y cols. describieron un adyuvante basado en aceite "Adjuvant 65", que consiste en aceite de cacahuete al 86%, Arlacel A al 10% como emulsionante y monoestearato de aluminio al 4% como estabilizador. Hilleman, 1966, Prog. Med. Virol. 8: 131-182; Hilleman y Beale, 1983, en New Approaches to Vaccine Development (Editores Bell, R. y Torrigiani, G.),
- 20 Schwabe, Basel. En los seres humanos, el uso de Adjuvant 65 era seguro y potente, pero mostraba menos capacidad adyuvante que IFA. Sin embargo, se suspendió el uso de Adjuvant 65 debido a la capacidad reactógena en el hombre con ciertos lotes de vacunas y la reducción de la capacidad de adyuvante cuando se usaba emulsionante purificado o sintético en lugar de
- 25 Arlacel A. Las patentes de Estados Unidos nº 5.718.904 y 5.690.942 enseñan

que el aceite mineral en la emulsión de aceite en agua puede sustituirse por aceite metabolizable con el fin de mejorar el perfil de seguridad.

Además de la capacidad adyuvante y la seguridad, el aspecto físico de una emulsión es también una consideración comercial importante. El aspecto físico depende de la estabilidad de la emulsión. La separación de fases, sedimentación y coalescencia son indicadores de la inestabilidad de la emulsión. La separación de fases ocurre cuando las fases oleaginosas y acuosas de la emulsión tienen una gravedad específica diferente. También se da la separación de fases cuando el tamaño inicial de la gota de la emulsión es grande y las gotas de emulsión no tienen movimiento Browniano. Cuando el tamaño de la gota es grande, hay una tendencia a la ruptura de la interfase y las gotas se fusionan en forma de partículas grandes. La estabilidad de la emulsión se determina mediante un número de factores tales como la naturaleza y cantidad de emulsionante usado, el tamaño de la gota en la emulsión y la diferencia de densidades entre la fase oleaginosas y acuosas.

Los emulsionantes promueven la estabilización de gotas dispersas reduciendo la energía libre de la interfase y creando barreras físicas o electroestáticas a la coalescencia de las gotas. Se han usado detergentes no iónicos así como iónicos como emulsionantes. Los emulsionantes no iónicos se orientan en la interfase y producen estructuras relativamente voluminosas, lo que conlleva al impedimento estérico de las gotas dispersas. Los emulsionantes aniónicos o catiónicos inducen la formación de una capa doble eléctrica atrayendo los contraiones; las fuerzas de repulsión de la capa doble provocan que las gotas se repelan las unas a las otras cuando se acercan.

Además de usar emulsionantes, puede lograrse también la estabilidad

de la emulsión reduciendo el tamaño de la gota de la emulsión por medios mecánicos. Típicamente se han usado mezcladores de propelentes, rotores de turbina, molinos de coloides, homogeneizadores y aparatos de ultrasonidos para fabricar emulsiones. La microfluidización es otra forma de aumentar la

5 homogeneidad del tamaño de la gota en la emulsión. La microfluidización puede producir una emulsión elegante, físicamente estable con un tamaño de partícula consistente en el intervalo submicrométrico. Además de aumentar la estabilidad de la emulsión, el proceso de la microfluidización permite la filtración final que es una forma preferida de asegurar la esterilidad del producto

10 final. Además, las partículas oleaginosas submicrométricas pueden pasar desde los sitios de inyección a los vasos linfáticos y después a los nódulos linfáticos de la cadena de drenaje, sangre y bazo. Esto reduce la probabilidad de establecer una formulación de liberación prolongada oleaginosa en el sitio de la inyección que puede producir inflamación local y una reacción significativa

15 en el sitio de inyección.

Los microfluidizadores están ahora disponibles en el mercado. La formación de emulsiones ocurre en un microfluidizador al interactuar dos corrientes fluidizadas a velocidades elevadas dentro de una cámara de interacción. El microfluidizador es aire o nitrógeno impulsado que puede operar

20 con presiones internas por encima de 137900 KPai. La patente de Estados Unidos 4.908.154 enseña el uso de un microfluidizador para obtener emulsiones esencialmente libres de cualesquiera agentes emulsionantes.

En la bibliografía se han descrito un número de formulaciones de adyuvantes de aceite en agua submicrométricas. La patente de Estados Unidos

25 5.376.369 describe un adyuvante de emulsión submicrométrica de aceite en

agua que se conoce como Syntax Adjuvant Formulation (SAF). SAF contiene escualeno o escualano como el componente oleaginoso, una cantidad de polímero de bloque Plurónico L121 que forma emulsiones (polioxi-propilen-polioxietileno) y una cantidad inmunopotenciadora de muramil dipéptido.

- 5 Escualeno es un precursor de colesterol de tipo hidrocarburo lineal que se encuentra en muchos tejidos, de forma notable en el hígado de tiburones y otros peces. Escualano se prepara mediante hidrogenación de escualeno y está completamente saturado. Tanto escualeno como escualano pueden metabolizarse y tienen unos buenos antecedentes en estudios toxicológicos.
- 10 Las emulsiones de escualeno o escualano se han usado en vacunas contra el cáncer en humanos con efectos secundarios leves y con una eficacia deseable. Véase, por ejemplo, Anthony C. Allison, 1999, Squalene and Squalane emulsions as adjuvants, *Methods* 19: 87-93.

- La patente de Estados Unidos 6.299.884 y la publicación de patente internacional WO 90/14837 enseñan que los copolímeros de bloque de polioxi-propilen-polioxietileno no son esenciales para la formación de emulsiones submicrométricas de aceite en agua. Además, estas referencias enseñan el uso de aceite metabolizable no tóxico y expresamente excluyen el uso de aceite mineral y aceites de derivados del petróleo tóxicos en sus formulaciones
- 15 de emulsiones.
- 20

- La patente de Estados Unidos 5.961.970 enseña otra emulsión submicrométrica de aceite en agua más para usarse como adyuvante en vacunas. En la emulsión que se describe en esta patente, el componente hidrófobo se selecciona del grupo que consiste en un aceite triglicérido de
- 25 cadena media, un aceite vegetal y una mezcla de los mismos. El tensioactivo

que se incluye en esta emulsión puede ser un tensioactivo biológicamente compatible natural tal como un fosfolípido (por ejemplo lecitina) o un tensioactivo no natural farmacéuticamente aceptable tal como TWEEN-80. Esta patente enseña también la incorporación del antígeno a la emulsión en el momento en que se forma la emulsión, contrastando con la mezcla del antígeno con la emulsión después de que se ha formado la emulsión de forma independiente y extrínseca.

La patente de Estados Unidos 5.084.269 enseña que una formulación de adyuvante que contiene lecitina combinada con aceite mineral provoca un descenso de la irritación en el animal hospedador y simultáneamente induce una inmunidad sistémica aumentada. La formulación del adyuvante que resulta de la patente de Estados Unidos 5.084.269 se usa comercialmente en vacunas veterinarias con el nombre comercial AMPHIGEN®. La formulación de AMPHIGEN® está formada por micelas – gotas de aceite rodeadas de lecitina. Estas micelas permiten que se unan más antígenos celulares completos que los adyuvantes con base oleaginosa tradicionales. Además, las formulaciones de vacunas a base de AMPHIGEN® contienen un bajo contenido en aceite de 2,5 a 5% de aceite mineral, comparado con otras formulaciones de vacunas que contienen adyuvantes oleaginosos, que típicamente contienen de 10% a 20% de aceite. Su bajo contenido en aceite hace que esta vacuna con base de adyuvante sea menos irritante para los tejidos en el sitio de inyección, dando como resultado menos lesiones y que haya menos desechos al sacrificar. Además, el recubrimiento de lecitina que rodea las gotas de aceite reduce adicionalmente las reacciones en el sitio de inyección dando como resultado una vacuna que es tanto segura como eficaz.

La formulación de AMPHIGEN® se usa como adyuvante en un número de vacunas veterinarias y existe una necesidad de mantener el aspecto físico de la vacuna durante periodos de almacenamiento cortos y largos así como en el momento de la reconstitución. Además, un antígeno liofilizado se mezcla con la formulación de adyuvante preparada previamente justo antes de la inyección. Esta práctica no asegura siempre que exista una distribución uniforme del antígeno en la emulsión de aceite en agua y el aspecto de la emulsión puede no ser deseable. Además, al reposar, la emulsión homogeneizada puede mostrar separación de fases. Por lo tanto, existe una necesidad de una formulación de adyuvante estable que no muestre separación de fases durante una vida útil larga. Una forma de prevenir la separación de fases es reducir el tamaño de la gota y aumentar la homogeneidad de las partículas de la emulsión. Aunque se ha documentado el proceso de microfluidización de formulaciones en emulsión a base de aceite metabolizable, la microfluidización de las emulsiones de aceite en agua tales como la formulación de AMPHIGEN® no se ha realizado todavía.

En la presente invención, se ha usado la microfluidización para llevar el tamaño de las gotas de aceite mineral rodeadas de lecitina a tamaño submicrométrico. De forma inesperada, los presentes inventores han descubierto que la microfluidización de formulaciones de vacunas que tienen como adyuvante una emulsión de aceite en agua formada por una mezcla de lecitina y aceite no únicamente mejora el aspecto físico de las formulaciones, sino que potencia también los efectos inmunizadores de las formulaciones. Las formulaciones microfluidizadas se caracterizan también por un perfil de seguridad mejorado.

## SUMARIO DE LA INVENCION

Los presentes inventores han descubierto de forma inesperada que la actividad de adyuvante y perfil de seguridad de emulsiones con base oleaginosa de aceite en agua no metabolizables pueden mejorarse mediante la microfluidización. Los antígenos que se incorporan en emulsiones microfluidizadas son estables incluso cuando los antígenos se incorporan de forma intrínseca a las emulsiones antes de la microfluidización.

En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona formulaciones de emulsión submicrométrica de aceite en agua de utilidad como un adyuvante de vacuna. Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua de la presente invención están compuestas por un aceite no metabolizable, al menos un tensioactivo y un componente acuoso, en el que el aceite está disperso en el componente acuoso con un tamaño medio de gota de aceite en el intervalo submicrométrico. Un aceite no metabolizable preferido es aceite mineral ligero. Tensioactivos preferidos incluyen lecitina, Tween-80 y SPAN-80.

Una emulsión de aceite en agua preferida proporcionada por la presente invención está compuesta por una formulación de AMPHIGEN®.

Las emulsiones de aceite en agua de la presente invención pueden incluir componentes adicionales que son apropiados y deseables, incluyendo conservantes, agentes osmóticos, moléculas bioadhesivas y moléculas inmunoestimuladoras. Moléculas inmunoestimuladoras preferidas incluyen, por ejemplo Quil A, colesterol, GPI-0100, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA).

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos

para preparar una emulsión submicrométrica de aceite en agua. De acuerdo con la presente invención, se mezclan los diversos componentes de la emulsión, incluyendo el aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente apropiado para usarse en la emulsión. La  
5 mezcla se somete a un proceso de emulsiónamiento primario para formar una emulsión de aceite en agua, que después se pasa por un microfluidizador para obtener una emulsión de aceite en agua de gotas con un diámetro inferior a 1 micra, preferiblemente con un tamaño de gota medio inferior a 0,5 micras.

En otra realización más, la presente invención proporciona  
10 composiciones de vacuna que contienen un antígeno y una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente. El antígeno se incorpora en la emulsión de forma extrínseca o intrínseca, preferiblemente de forma intrínseca.

El antígeno que puede incluirse en las composiciones de la vacuna de la  
15 presente invención puede ser un antígeno bacteriano, fúngico o vírico o una combinación de ellos. El antígeno puede tener forma de una preparación inactivada de células o virus completos o parciales, o tomar la forma de moléculas antigénicas obtenidas mediante purificación convencional de proteínas, técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

En una realización adicional, la presente invención proporciona  
20 procedimientos para preparar composiciones de vacunas que contienen un antígeno o antígenos combinado(s) con una emulsión submicrométrica de aceite en agua.

Para preparar las composiciones de vacunas de la presente invención, el  
25 (los) antígeno(s) puede(n) combinarse de forma intrínseca (por ejemplo antes

de la microfluidización) o de forma extrínseca (por ejemplo después de la microfluidización) con los componentes de la emulsión de aceite en agua. Preferiblemente, el antígeno se combina con los componentes de la emulsión de aceite en agua de forma intrínseca.

5 En otra realización más, la presente invención proporciona composiciones de vacunas que contienen un antígeno microencapsulado y una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente, en las que el antígeno microencapsulado se combina con la emulsión de forma extrínseca.

10

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** representa el procedimiento para la preparación en lotes de composiciones de vacunas no microfluidizadas. En este procedimiento los diversos componentes de la vacuna se añaden al recipiente de adición de la izquierda y finalmente se bombean al vaso de mezclado donde los  
15 componentes se mezclan por medios mecánicos simples.

La **Figura 2** representa el procedimiento para la preparación de composiciones de vacunas microfluidizadas que contienen antígeno incorporado de forma intrínseca. Los diversos componentes de la vacuna se  
20 añaden al recipiente de adición y se transfieren a la unidad de mezclado de la preemulsión para mezclar por medios mecánicos simples. Subsiguientemente, se pasa la emulsión por un microfluidizador y se recoge en la cámara de post-microfluidización.

La **Figura 3** representa la distribución del tamaño de las gotas de la  
25 vacuna basada en de la formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada, la

vacuna basada en de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada y la preparación de vacuna de mezclado en banco.

La **Figura 4** muestra la ausencia de separación de fases en la preparación de vacuna microfluidizada.

5        La **Figura 5** representa una comparación de la estabilidad de los antígenos que se incorporan de forma intrínseca a la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada (A907505) y tres preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizadas de control (A904369, A904370 y A904371). Las cuatro  
10 preparaciones de vacunas se almacenaron a 4°C durante dos años. En momentos diferentes durante el almacenamiento (0, 6, 12 ó 24 meses), se usaron las cuatro formulaciones para vacunar vacas de tres meses de edad. La vacunación se realizó el Día 0 y 21 con 2 ml de una dosis de vacuna y se recogieron los sueros dos semanas después de la segunda vacunación. Se  
15 determinó la valoración de anticuerpos neutralizadores para el virus de BVD Tipo II en cada una de las muestras de suero. Los datos se presentan como la media geométrica de 5 animales.

La **Figura 6** muestra la media por mínimos cuadrados de la temperatura rectal del ganado vacuno antes y después de la administración de vacunas  
20 microfluidizadas y no microfluidizadas. T01: Grupo placebo – dosis única; Grupo Placebo – Dosis Doble; T03: Formulación no microfluidizada – Dosis única; T04: Formulación no microfluidizada – Dosis doble; T05: Formulación microfluidizada – Dosis única; T06: Formulación microfluidizada – Dosis doble.

La **Figura 7** muestra la media por mínimos cuadrados de los volúmenes  
25 de reacción en el sitio de inyección observados en el ganado vacuno después

de la administración de vacunas microfluidizadas y no microfluidizadas. T03: Formulaci3n no microfluidizada – Dosis 3nica; T04: Formulaci3n no microfluidizada – Dosis doble; T05: Formulaci3n microfluidizada – Dosis 3nica; T06: Formulaci3n microfluidizada – Dosis doble.

5 La **Figura 8** representa la media geom3trica de las valoraciones de IgG para ant3geno PauA recombinante de *Streptococcus uberis* despu3s de la vacunaci3n con las diversas formulaciones de vacuna que conten3an tanto ant3geno PauA recombinante como ant3geno de c3lula entera de *E. coli*.

10 La **Figura 9** representa la media geom3trica de las valoraciones de IgG para ant3geno de c3lulas enteras de *E. coli* de *Streptococcus uberis* despu3s de la vacunaci3n con las diversas formulaciones de vacuna que conten3an tanto ant3geno PauA recombinante como ant3geno de c3lula entera de *E. coli*.

La **Figura 10A y 10B** representan la distribuci3n de tama3o de part3cula de una formulaci3n de Amphigen microfluidizada en la producci3n inicial(Figura 15 10A) y a los 22 meses despu3s de la producci3n (Figura 10B).

## DESCRIPCI3N DETALLADA DE LA INVENCI3N

Los presentes inventores han descubierto de forma inesperada que la microfluidizaci3n de formulaciones de vacunas que tienen como adyuvantes una emulsi3n de aceite en agua compuestas por una mezcla de lecitina y aceite mineral no s3lo mejora el aspecto f3sico de las formulaciones de vacunas, sino que tambi3n potencia los efectos inmunizadores de las formulaciones de vacunas. Las formulaciones de vacunas microfluidizadas se caracterizan tambi3n por un perfil de seguridad mejorado.

25 Bas3ndose en estos descubrimientos, la presente invenci3n proporciona

emulsiones submicrométricas de aceite en agua de utilidad como un adyuvante en composiciones de vacunas. Se proporcionan también procedimientos para preparar estas emulsiones submicrométricas de aceite en agua usando un microfluidizador. Además, la presente invención proporciona composiciones de vacunas submicrométricas en las que un antígeno se combina con una emulsión submicrométrica de aceite en agua . También se proporcionan los procedimientos para preparar dichas composiciones de vacunas. La presente invención proporciona además composiciones de vacunas que contienen antígenos microencapsulados combinados con una emulsión submicrométrica de aceite en agua y procedimientos para preparar dichas vacunas.

Para hacer más clara la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la invención.

### **Emulsiones submicrométricas de aceite en agua**

En una realización, la presente invención proporciona emulsiones submicrométricas de aceite en agua de utilidad como un adyuvante de vacunas. Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua de la presente invención potencian la capacidad inmunógena de los antígenos de las composiciones de vacunas, son seguras para administrarse a animales y permanecen estables durante el almacenamiento.

Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua de la presente invención están compuestas por un aceite no metabolizable, al menos un

tensioactivo y un componente acuoso, en los que el aceite está disperso en el componente acuoso con un tamaño medio de gota de aceite en el intervalo submicrométrico.

Por "submicrométrico" se quiere decir que las gotas son de un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$  (micra) y el tamaño medio de gota de aceite es inferior a 1  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, el tamaño medio de gota de la emulsión es inferior a 0,8  $\mu\text{m}$ ; más preferiblemente inferior a 0,5  $\mu\text{m}$ ; e incluso más preferiblemente inferior a 0,4  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 0,1-0,3  $\mu\text{m}$ .

El "tamaño medio de la gota" se define como el tamaño de partícula del Diámetro Medio del Volumen (DMV) en una distribución de volumen de tamaños de partícula. EL DMV se calcula multiplicando cada diámetro de partícula por el volumen de todas las partículas de ese tamaño y sumando. Esto se divide después entre el volumen total de todas las partículas.

El término "aceite no metabolizable" como se usa en la presente memoria se refiere a aceites que no pueden ser metabolizados por el cuerpo del sujeto animal al que se administra la emulsión.

Los términos "animal" y "sujeto animal" como se usan en la presente memoria se refieren a todos los animales no humanos, incluyendo ganado vacuno, ovejas y cerdos por ejemplo.

Los aceites no metabolizables adecuados para usarse en las emulsiones de la presente invención incluyen alcanos, alquenos, alquinos y sus ácidos y alcoholes correspondientes, sus éteres y ésteres, y sus mezclas. Preferiblemente, los compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarburo ligeros, es decir, los componentes de ese tipo tienen 6 a 30 átomos de carbono. El aceite puede prepararse o purificarse sintéticamente a

partir de productos de petróleo. Los aceites preferidos no metabolizables para usarse en las emulsiones de la presente invención incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas por ejemplo.

El término "aceite mineral" se refiere a una mezcla de hidrocarburos líquidos que se obtienen a partir de vaselina mediante una técnica de destilación. El término es sinónimo de "parafina líquida", "vaselina líquida" y "aceite mineral blanco". El término se pretende que incluya también "aceite mineral ligero", es decir, aceite que se obtiene de forma similar mediante destilación de vaselina pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que la vaselina. Véase, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pa.; Mack Publishing Company, 1999, en las páginas 788 y 1323). El aceite mineral puede obtenerse a partir de diversas fuentes comerciales, por ejemplo J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). El aceite mineral preferido es el aceite mineral blanco ligero disponible comercialmente con el nombre de DRAKEOL®.

Típicamente, el componente oleaginoso de las emulsiones submicrométricas de la presente invención está presente en una cantidad de 1% a 50% en volumen; preferiblemente, en una cantidad de 10% a 45%; más preferiblemente en una cantidad de 20% a 40%.

Las emulsiones de aceite en agua de la presente invención típicamente incluyen al menos un (es decir, uno o más) tensioactivo. Los tensioactivos y emulsionantes, términos que se usan de forma indistintamente en la presente memoria, son agentes que estabilizan la superficie de las gotas de aceite y mantienen las gotas de aceite dentro del tamaño deseado.

Tensioactivos adecuados para usarse en las presentes emulsiones

incluyen tensioactivos biológicamente compatibles naturales y tensioactivos sintéticos no naturales. Los tensioactivos biológicamente compatibles incluyen compuestos de fosfolípidos o una mezcla de fosfolípidos. Los fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolinas (lecitina), tales como lecitina de soja o de huevo.

- 5 La lecitina puede obtenerse como mezcla de fosfátidos y triglicéridos lavando aceites vegetales crudos con agua, y separando y secando las gomas hidratadas resultantes. Un producto refinado puede obtenerse fraccionando la mezcla para obtener los fosfolípidos y glucolípidos insolubles en acetona que permanecen después de separar los triglicéridos y aceite vegetal lavando con
- 10 acetona. De forma alternativa, puede obtenerse lecitina de diversas fuentes comerciales. Otros fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse convencionalmente.
- 15 Tensioactivos sintéticos no naturales adecuados para usarse en las emulsiones submicrométricas de la presente invención incluyen tensioactivos no iónicos con base de sorbitan, por ejemplo tensioactivos de sorbitan sustituidos con ácidos grasos (disponibles comercialmente con el nombre SPAN® o ARLACEL®), ésteres de ácidos grasos de sorbitol polietoxilado
- 20 (TWEEN®), ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos de fuentes tales como aceite de ricino (EMULFOR); ácido graso polietoxilado (por ejemplo ácido esteárico disponible con el nombre de SIMULSOL M-53), polímero de isooctilfenol polietoxilado/formaldehído (TYLOXAPOL), éteres de alcoholes grasos de polioxietileno (BRIJ®); éteres de polioxietilen nonfenilo (TRITON®N),
- 25 éteres de polioxietilen isooctilfenilo (TRITON®X). Tensioactivos sintéticos

preferidos son los tensioactivos disponibles con el nombre de SPAN® y TWEEN®.

Tensioactivos preferidos para usarse en las emulsiones de aceite en agua de la presente invención incluyen lecitina, Tween-80 y SPAN-80.

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

- 10       El componente acuoso constituye la fase continua de la emulsión y puede ser agua, solución salina tamponada o cualquier otra solución acuosa adecuada.

Las emulsiones de aceite en agua de la presente invención pueden incluir componentes adicionales que son apropiados y deseables, incluyendo conservantes, agentes osmóticos, moléculas bioadhesivas y moléculas inmunoestimuladoras.

- 15       Se cree que las moléculas bioadhesivas pueden potenciar la administración y unión de antígenos sobre o a través de la superficie mucosa diana confiriendo inmunidad mucosa. Ejemplos de moléculas bioadhesivas adecuadas incluyen polímeros ácidos no naturales tales como ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico (por ejemplo CARBOPOL®, CARBOMER); polímeros
- 20       naturales modificados sintéticamente ácidos tales como carboximetilcelulosa; polímeros naturales modificados sintéticamente neutros tales como (hidroxipropil)metilcelulosa; polímeros que portan aminas básicas tales como chitosan; polímeros ácidos que pueden obtenerse de fuentes naturales tales como ácido algínico, ácido hialurónico, pectina, goma de tragacanto y goma de
- 25       karaya; y polímeros neutros no naturales, tales como polivinilalcohol; o sus

combinaciones.

La frase "moléculas inmunoestimuladoras" como se usa en la presente memoria, se refiere a las moléculas que potencian la respuesta inmunitaria protectora inducida por un componente antígeno en las composiciones de las vacunas. Los materiales inmunoestimuladores adecuados incluyen componentes de la pared celular bacteriana, por ejemplo derivados de N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina tales como murabutida, treonil-MDP y muramil tripéptido; glucósidos de saponina y sus derivados, por ejemplo Quil A, QS 21 y GPI-0100; colesterol y compuestos de amonio cuaternario por ejemplo bromuro de dimetildiocadecilamonio (DDA) y N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina ("avridina").

Las saponinas son compuestos glucosídicos que se producen como metabolitos secundarios en una gran variedad de especies vegetales. La estructura química de las saponinas confiere una amplia gama de actividades farmacológicas y biológicas, que incluyen alguna actividad inmunológica potente y eficaz.

Estructuralmente, las saponinas están constituidas por cualquier aglucona unida a una o más cadenas de azúcares. Las saponinas pueden clasificarse de acuerdo con su composición de agluconas: glucósidos triterpénicos, glucósidos esteroideos y glucósidos alcaloides esteroideos.

La saponina puede aislarse de la corteza de *Quillaja saponaria*. La saponina ha sido conocida desde hace mucho como un inmunoestimulador. Dalsgaard, K., "Evaluation of its adjuvant activity with special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease", *Acta. Vet. Scand.* 69: 1-40 1978. Los extractos brutos de plantas que contenían

saponinas mejoraron la potencia de las vacunas contra la glosopeda. Sin embargo, los extractos brutos se asociaron a efectos secundarios adversos cuando se usaron en vacunas. Subsiguientemente, Dalsgaard purificó parcialmente el componente activo del adyuvante de saponina mediante diálisis, intercambio de iones y cromatografía por filtración en gel. Dalsgaard, K. y cols. "Saponin Adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Morina with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines", *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 44: 243-254 1974. Un componente activo de adyuvante purificado de esta forma se conoce como "Quil A". En base al peso Quil A demostró una potencia aumentada y mostró reacciones locales reducidas cuando se comparó con saponina. Quil A se usa extensamente en vacunas veterinarias.

El análisis adicional de Quil A mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) reveló una mezcla heterogénea de saponinas muy similares y llevó al descubrimiento de QS21 que era un adyuvante potente con una toxicidad mínima o reducida. Kensil C.R. y cols., "Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex", *J. Immunol.* 146: 431-437, 1991. Al contrario que la mayoría de otros inmunoestimuladores, QS21 es soluble en agua y puede usarse en vacunas con o sin formulaciones tipo emulsión. Se ha demostrado que QS21 provoca una respuesta de tipo Th1 en ratones estimulando la producción de anticuerpos IgG2a e IgG2b e indujo CD8 + CTL (MHC clase I) específico de antígeno en respuesta a antígenos subunitarios. Los estudios clínicos en humanos han demostrado su capacidad como adyuvante con un perfil toxicológico aceptable. Kensil, C.R. y cols., "Structural and immunological

characterization of the vaccine adjuvant QS-21. In Vaccine Design: the subunit and Adjuvant Approach," Editores Powell, M.F. y Newman, M.J. Plenum Publishing Corporation, New York 1995, páginas 525-541.

La patente de Estados Unidos 6.080.725 enseña los procedimientos para preparar y usar conjugado de saponina-lipófilo. En este conjugado de saponina-lipófilo, un resto lipófilo tal como un lípido, ácido graso, polietilenglicol o terpeno se une covalentemente a una saponina triterpénica no acilada o desacilada mediante un grupo carboxi presente en el ácido 3-O-glucurónico de la saponina triterpénica. La unión de un resto lipófilo al ácido 3-O-glucurónico de una saponina tal como desacilsaponina de Quillaja, luciosida P o saponina de *Gypsophila*, *saponaria* y *Acanthophyllum* potencia sus efectos adyuvantes sobre la inmunidad mediada humoral y celular. Además, la unión de un resto lipófilo al resto de ácido 3-O-glucurónico de desacilsaponina o saponina no acilada proporciona un análogo de saponina que es más fácil de purificar, menos tóxico, químicamente más estable y posee propiedades como adyuvante iguales o mejores que la saponina original.

GPI-0100 es un conjugado de saponina-lipófilo que se describe en la patente de Estados Unidos 6.080.725. GPI-0100 se produce mediante la adición de una amina alifática a desacilsaponina mediante el grupo carboxilo del ácido glucurónico.

*Compuestos de amonio cuaternario* – Se ha propuesto un número de bases nitrogenadas alifáticas para usarse como adyuvantes inmunológicos, incluyendo aminas, compuestos de amonio cuaternario, guanidinas, benzamidinas y tiuronios. Compuestos de ese tipo específicos incluyen bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-

hidroxietil)propanodiamina ("avridina").

La patente de Estados Unidos 5.951.988 enseña una formulación de adyuvante que contiene sales de amonio cuaternario tales como DDA en conjunción con un componente oleaginoso. Esta formulación es útil en  
5 conjunción con sustancias inmunológicas conocidas, por ejemplo antígenos víricos o bacterianos en una composición de vacuna, para potenciar la respuesta inmunógena. La composición es también útil sin un antígeno incorporado como formulación inmunoestimuladora no específica.

La patente de Estados Unidos 4.310.550 describe el uso de N,N-alquilo  
10 superior-N,N'-bis(2-hidroxietil)propanodiamina y N,N-alquilo superior-xililendiaminas formuladas con emulsión grasa o lipídica como adyuvante de vacunas. En la patente de Estados Unidos 4.310.550 se describe un procedimiento para inducir o potenciar la respuesta inmunógena de un antígeno en el hombre o en un animal a través de la administración parenteral  
15 de la formulación de adyuvante.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una emulsión submicrométrica de aceite en agua de utilidad como adyuvante de vacunas, que se compone de una formulación de AMPHIGEN®, con gotas de un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$  y un tamaño medio de gota de aproximadamente  
20 0,25  $\mu\text{m}$ .

El término "formulación de AMPHIGEN®" como se usa en la presente memoria se refiere a una solución formada mezclando una solución de aceite de lecitina DRAKEOL® (Hydronics, Lincoln, NE) con solución salina en presencia de TWEEN® 80 y SPAN® 80. Una formulación típica de  
25 AMPHIGEN® contiene aceite mineral ligero al 40% en volumen (v/v),

aproximadamente 25% p/v de lecitina, aproximadamente 0,18% de TWEEN 80 en volumen (v/v) y aproximadamente 0,08% de Span 80 en volumen (v/v).

**Procedimientos para preparar emulsiones submicrométricas de aceite en**

**5 agua**

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para preparar las emulsiones submicrométricas de aceite en agua que se describen anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, los diversos componentes de la emulsión, incluyendo el aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente adecuado para usarse en la emulsión se combinan y mezclan los unos con los otros.

La mezcla formada se somete a un procedimiento de emulsificación, típicamente pasando una o más veces a través de uno o más homogenizadores o emulsionadores para formar una emulsión de aceite en agua que tiene un aspecto uniforme y un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ . Para este fin puede usarse cualquier homogenizador o emulsionador comercial, por ejemplo emulsionador Ross (Hauppauge, NY), homogenizador Gaulin (Everett, MA).

La emulsión así formada se somete después a microfluidización para llevar el tamaño de gota al intervalo submicrométrico. La microfluidización puede lograrse usando un microfluidizador comercial tal como el modelo de número 110Y disponible en Microfluidics, Newton, Mass; el modelo 30CD de Gaulin (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); y Rainnie Minilab tipo 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy Inc., Hudson, Wis.). Estos microfluidizadores operan

67  
6b

forzando los fluidos a través de pequeñas aperturas a presión elevada, de tal forma que las dos corrientes de fluido interactúan a velocidades elevadas en una cámara de interacción para formar emulsiones con gotas de un tamaño submicrométrico.

- 5 El tamaño de la gota puede determinarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, difracción por láser, usando instrumentos de medición disponibles en el mercado. El tamaño puede variar dependiendo del tipo de tensioactivo usado, la relación entre tensioactivo y aceite, la presión de trabajo, temperatura y similares. Los expertos en la
- 10 técnica pueden determinar la combinación deseada de estos parámetros para obtener emulsiones con el tamaño de gota deseado sin experimentación excesiva. Las gotas de las emulsiones de la presente invención son inferiores a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, preferiblemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,8  $\mu\text{m}$ , y más preferiblemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,5  $\mu\text{m}$ , e
- 15 incluso más preferiblemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,3  $\mu\text{m}$ .

- En una realización preferida de la presente invención, la solución oleaginosa de lecitina DRAKEOL, que está disponible en el mercado de Hydronics (Llncoln, NE) y contiene lecitina al 25% en aceite mineral ligero, se combina y mezcla con solución salina así como con los tensioactivos TWEEN®
- 20 80 y SPAN® 80 para formar una "solución de AMPHIGEN®" o "formulación de AMPHIGEN®". La solución de AMPHIGEN® se emulsiona después con un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm para formar una emulsión de aceite en agua. Subsiguientemente la emulsión se hace pasar una vez a través de un Microfluidizador que trabaja a
- 25 aproximadamente 3.102,5 $\pm$ 3.447,5 kPa. La emulsión de aceite en agua

68  
67

microfluidizada tiene gotas de un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,25  $\mu\text{m}$ .

**Composiciones de vacuna que contienen antígenos incorporados en**

**5 emulsiones submicrométricas de aceite en agua**

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones de vacunas que contienen un antígeno(s) y una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente. Estas composiciones de vacunas se caracterizan porque tienen un efecto inmunógeno potenciado y un aspecto

10 físico mejorado (por ejemplo no se observa separación de fases después de un periodo de almacenamiento largo). Además, las composiciones de vacunas de la presente invención son seguras para la administración a animales.

De acuerdo con la presente invención, el antígeno puede combinarse con la emulsión de forma extrínseca o, preferiblemente, de forma intrínseca. El

15 término "intrínsecamente" se refiere al procedimiento en el que el antígeno se combina con los componentes de la emulsión antes de la etapa de microfluidización. El término "extrínsecamente" se refiere al procedimiento en el que el antígeno se añade a la emulsión después de que la emulsión ha sido microfluidizada. El antígeno añadido de forma extrínseca puede ser antígeno

20 libre o puede estar encapsulado en micropartículas como se describe con más detalle a continuación.

El término "antígeno" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier molécula, compuesto o composición que es inmunógeno en un animal y se incluye en la composición de vacuna para provocar una respuesta

25 inmunitaria protectora en el animal al que se administra la composición de

vacuna.

El término "inmunógeno" como se usa en relación con un antígeno se refiere a la capacidad del antígeno de provocar una respuesta inmunitaria en un animal contra el antígeno. La respuesta inmunitaria puede ser una  
 5 respuesta inmunitaria celular mediada primordialmente por linfocitos T citotóxicos, o una respuesta inmunitaria humoral mediada primordialmente por linfocitos T cooperadores, que a su vez activa linfocitos B que provocan la producción de anticuerpos.

Una "respuesta inmunitaria protectora" se define como cualquier  
 10 respuesta inmunitaria, ya sea respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos o células, o ambos, que ocurre en el animal que previene o reduce de forma detectable la aparición o elimina o reduce de forma detectable la gravedad, o ralentiza de forma detectable la velocidad de progresión, del trastorno o enfermedad provocada por el antígeno o un patógeno que contiene el antígeno.

15 Los antígenos que pueden incluirse en la composición de vacuna de la presente invención incluyen antígenos preparados a partir de bacterias patógenas tales como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Manheimia hemolytica*, *Mycoplasma bovis*,  
 20 *Mycoplasma galanacium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridial spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovars, *Leptospira spp.*; hongos patógenos tales como *Candida*; protozoos tales como  
 25 *Cryptosporidium parvum*, *Neospora canium*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria spp.*;

- helmintos tales como *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Fasciola*, ya sea en forma de una preparación de células enteras o parciales inactivadas o en forma de moléculas antígenas obtenidas por purificación convencional de proteínas, técnicas de ingeniería genética o síntesis química. Antígenos adicionales
- 5 incluyen virus patógenos tales como virus del herpes bovino 1, 3, 6, virus de diarrea vírica bovina (BVDV) tipos 1 y 2, virus de la pseudogripe bovina, virus sinticial respiratorio bovino, virus de leucosis bovino, virus de rinderpest, virus de la glosopeda, rabia, virus de la fiebre porcina, virus de la fiebre porcina africana, parvovirus porcino, virus PRRS, circovirus porcino, virus de la gripe,
- 10 virus de enfermedad vesicular porcino, virus de fiebre de Techen, virus de pseudorrabia, ya sea en forma de una preparación de virus completos o parciales inactivados, o en forma de moléculas antígenas obtenidas por purificación convencional de proteínas, técnicas de ingeniería genética o síntesis química.
- 15 La cantidad del antígeno debe ser tal que el antígeno combinado con la emulsión de aceite en agua, sea efectivo para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un animal. La cantidad precisa para que un antígeno sea efectivo depende de la naturaleza, actividad y pureza del antígeno y puede ser determinada por los expertos en la técnica.
- 20 La cantidad de emulsión de aceite en agua presente en las composiciones de vacunas debe ser suficiente para potenciar la capacidad inmunógena del (de los) antígeno(s) en las composiciones de vacunas. Cuando sea deseable y apropiado, pueden añadirse cantidades adicionales de tensioactivo(s) o tensioactivo(s) adicional(es) a la composición de vacuna
- 25 además del (de los) tensioactivo(s) proporcionado(s) por la emulsión de aceite

21  
22

en agua. De forma general, el componente oleaginoso está presente en el volumen final de una composición de vacuna en una cantidad de 1,0% a 20% en volumen; preferiblemente en una cantidad de 1,0% a 10%; más preferiblemente en una cantidad de 2,0% a 5,0%. El tensioactivo, o la combinación de tensioactivos si se usan dos o más tensioactivos, está presente en el volumen final de una composición de vacuna en una cantidad de 0,1% a 20% en volumen, preferiblemente 0,15% a 10%, más preferiblemente 0,2% a 6,0%.

Además del (de los) antígeno(s) y la emulsión de aceite en agua, la composición de vacuna puede incluir otros componentes que son apropiados y deseables, tales como conservantes, agentes osmóticos, moléculas bioadhesivas y moléculas inmunoestimuladoras (por ejemplo Quil A, colesterol, GPI-0100, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA)), como se describe anteriormente en relación con la emulsión de aceite en agua.

Las composiciones de vacunas de la presente invención pueden incluir también un vehículo veterinariamente aceptable. El término "un vehículo veterinariamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa entre otros. Estabilizadores incluyen albúmina entre otros.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una composición de vacuna que incluye al menos un antígeno de BVDV tipo I o

BVDV tipo II, que se incorpora de forma intrínseca a un emulsión de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , preferiblemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,8  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente inferior a 0,5  $\mu\text{m}$ , e incluso más preferiblemente con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ . El antígeno de BVDV tipo I y/o II está preferiblemente en forma de una preparación vírica inactivada. La emulsión submicrométrica de aceite en agua preferiblemente está compuesta por una formulación de AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferiblemente incluye también Quil A, colesterol y timerosol.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona una composición de vacuna que incluye un antígeno de Leptospira y al menos un antígeno de BVDV tipo I o BVDV tipo II en una emulsión de aceite en agua. Los antígenos, preferiblemente en forma de preparación celular o vírica inactivada, se incorporan de forma intrínseca a la emulsión submicrométrica de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ ; preferiblemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,8  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente inferior a 0,5  $\mu\text{m}$ , e incluso más preferiblemente con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ . La emulsión submicrométrica de aceite en agua preferiblemente está compuesta por una formulación de AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferiblemente incluye también una o más moléculas inmunoestimuladoras que se seleccionan de Quil-A, colesterol, DDA, GPI-100 e hidróxido de aluminio (AlOH).

En otra realización preferida más, la presente invención proporciona una

composición de vacuna que incluye al menos un agente bacteriano, por ejemplo la proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante o una preparación celular de *E. coli* o una combinación de ambas en una emulsión de aceite en agua. El (los) antígeno(s) se combina(n) de forma intrínseca con la emulsión submicrométrica de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ ; preferiblemente con un tamaño medio de gota inferior a 0,8  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente inferior a 0,5  $\mu\text{m}$ , e incluso más preferiblemente con un tamaño medio de gota de aproximadamente 0,25  $\mu\text{m}$ . La emulsión submicrométrica de aceite en agua preferiblemente está compuesta por una formulación de AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferiblemente incluye también una o más moléculas inmunoestimuladoras que se seleccionan de Quil-A, DDA, GPI-100.

Las composiciones de vacunas de la presente invención pueden administrarse a un animal por vías conocidas, incluyendo la oral, intranasal, mucosa, tópica, transdérmica y parenteral (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). La administración puede lograrse usando una combinación de vías, por ejemplo la primera administración usando una vía parenteral y una administración posterior usando una vía mucosa.

### **Procedimientos para preparar composiciones de vacunas**

En una realización adicional, la presente invención proporciona procedimientos para preparar composiciones de vacunas que contienen un antígeno o antígenos y una emulsión submicrométrica de aceite en agua.

Para preparar las composiciones de vacunas de la presente invención, el (los) antígeno(s) puede(n) combinarse de forma intrínseca o de forma extrínseca con los componentes de la emulsión de aceite en agua. Preferiblemente, el antígeno se combina con los componentes de la emulsión de aceite en agua de forma intrínseca.

El antígeno puede combinarse con los diversos componentes de la emulsión, incluyendo el aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente apropiado para formar una mezcla. La mezcla se somete a un procedimiento de mezclado primario típicamente pasando una o más veces a través de uno o más homogenizadores o emulsionadores para formar una emulsión de aceite en agua que contiene el antígeno. Puede usarse cualquier homogenizador o emulsionador comercial, por ejemplo emulsionador Ross (Hauppauge, NY), homogenizador Gaulin (Everett, MA) o Microfluidics (Newton, MA). De forma alternativa, los diversos componentes del adyuvante de la emulsión, incluyendo aceite, uno o más tensioactivos y un componente acuoso pueden combinarse primero para formar una emulsión submicrométrica de aceite en agua usando un homogenizador o emulsionador; y el antígeno se añade después a esta emulsión. El tamaño medio de gota de la emulsión de aceite en agua después del mezclado primario es de aproximadamente 1,0-1,2 micras.

La emulsión que contiene el antígeno se somete después a microfluidización para llevar el tamaño de gota al intervalo submicrométrico. La microfluidización puede lograrse usando un microfluidizador comercial tal como el modelo de número 11OY disponible en Microfluidics, Newton, Mass; el modelo 30CD de Gaulin (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); y Rainnie Minilab tipo

8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy Inc., Hudson, Wis.).

El tamaño de la gota puede determinarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, difracción por láser, usando instrumentos de medición disponibles en el mercado. El tamaño puede  
5 variar dependiendo del tipo de tensioactivo usado, la relación entre tensioactivo y aceite, la presión de trabajo, temperatura y similares. Se puede determinar una combinación deseada de estos parámetros para obtener emulsiones con un tamaño de gota deseado. Las gotas de aceite de las emulsiones de la presente invención son inferiores a 1  $\mu\text{m}$  en diámetro. Preferiblemente el  
10 tamaño medio de gota es inferior a 0,8  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, el tamaño medio de gota es inferior a 0,5  $\mu\text{m}$ . Incluso más preferiblemente, el tamaño medio de gota está aproximadamente entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,3  $\mu\text{m}$ .

En una realización preferida de la presente invención, la solución oleaginosa de lecitina DRAKEOL®, que contiene lecitina al 25% en aceite  
15 mineral ligero, se combina y mezcla con solución salina así como los tensioactivos TWEEN® 80 y SPAN® 80 para formar una mezcla que contiene aceite mineral ligero al 40%, TWEEN® 80 al 0,18% y SPAN® 80 al 0,08%. La mezcla se emulsiona después con un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm para formar un producto de emulsión que  
20 se denomina también "formulación de AMPHIGEN®" o "solución de AMPHIGEN®". Subsiguientemente, el (los) antígeno(s) deseado(s) se combina con la solución de AMPHIGEN® y cualesquiera otros componentes adecuados (por ejemplo moléculas inmunoestimuladoras) con ayuda de un emulsionador, por ejemplo, homogenizador Ross, para formar una emulsión de aceite en agua  
25 que contiene el (los) antígeno(s). Ésta emulsión se hace pasar una vez a través

de un Microfluidizador que trabaja aproximadamente  $68.950 \pm 3.447,5$  kPa. La emulsión de aceite en agua microfluidizada tiene gotas de un tamaño inferior a  $1 \mu\text{m}$ , con un tamaño medio de gota de aproximadamente  $0,25 \mu\text{m}$ .

**5 Composiciones de vacunas que contienen antígenos microencapsulados en una emulsión submicrométrica de aceite en agua y procedimientos de preparación**

En otra realización más, la presente invención proporciona composiciones de vacunas que contienen un antígeno encapsulado en micropartículas (o "antígeno microencapsulado"), donde el antígeno microencapsulado se incorpora de forma extrínseca a una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente.

Los procedimientos para absorber o atrapar antígenos en vehículos particulados son notorios en la técnica. Véase por ejemplo Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications (Justin Hanes, Masatoshi Chiba y Robert Langer. Polymer microspheres for vaccine delivery. En: Vaccine design. The subunit and adjuvant approach. Editores Michael F. Powell y Mark J. Newman, 1995 Plenum Press, Nueva York y Londres). Los vehículos particulados pueden presentar copias múltiples de un antígeno seleccionado al sistema inmunitario en un sujeto animal y promover la captura y retención de antígenos en nódulos linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígeno a través de la liberación de citocinas. También se han descrito en la técnica vehículos particulados e incluyen por ejemplo los que se derivan de polímeros de polimetilmetacrilato, así como los que se derivan de poli(lactidas) y poli(lactida-

co-glucolidas), que se conocen como PLG. Los polímeros de polimetilmetacrilato no son biodegradables mientras que las partículas de PLG pueden ser biodegradables por hidrólisis aleatoria no enzimática de enlaces éster a ácidos láctico y glicólico que se excretan por rutas metabólicas normales.

También se han usado microesferas biodegradables para lograr la liberación controlada de vacunas. Por ejemplo puede lograrse una liberación continuada de antígeno durante un periodo prolongado. Dependiendo del peso molecular del polímero y la relación entre ácido láctico y glicólico en el polímero, un polímero de PLGA puede tener una velocidad de hidrólisis desde unos pocos días o semanas a varios meses o un año. Una liberación lenta controlada puede dar como resultado la formación de niveles elevados de anticuerpos similares a los que se observan tras inyecciones múltiples. De forma alternativa, puede lograrse una liberación pulsátil de antígenos de vacunas seleccionando polímeros con velocidades diferentes de hidrólisis. La velocidad de hidrólisis de un polímero típicamente depende del peso molecular del polímero y la relación entre ácido láctico y ácido glicólico en el polímero. Las micropartículas que están formadas por dos o más polímeros diferentes con velocidades variables de liberación de antígenos proporcionan liberaciones pulsátiles de antígenos e imitan los regímenes de vacunación de dosis múltiples.

De acuerdo con la presente invención, un antígeno, incluyendo cualquiera de los que se describen anteriormente, puede absorberse sobre un vehículo polimérico particulado, preferiblemente un polímero de PLG, usando cualquier procedimiento conocido en la técnica (tal como el que se ejemplifica

en el Ejemplo 17) para formar una preparación de antígeno microencapsulado. La preparación de antígeno microencapsulado se mezcla después y se dispersa en una emulsión submicrométrica de aceite en agua, emulsión que ha sido descrita anteriormente, para formar la composición de vacuna.

- 5 En una realización preferida, la presente invención proporciona una composición de vacuna que contiene un antígeno encapsulado en un polímero de PLG, en el que el antígeno microencapsulado está disperso de forma extrínseca en una emulsión de aceite en agua microfluidizada que está compuesta por aceite mineral ligero, lecitina, TWEEN80, SPAN80 y solución
- 10 salina y tiene un tamaño medio de gota inferior a 1,0  $\mu\text{m}$ .

A continuación están los ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención en modo alguno.

15

### **EJEMPLO 1**

#### **Preparación de una formulación de AMPHIGEN®**

- Se preparó una formulación de AMPHIGEN® en un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa se mezclaron 80 litros de solución de aceite de
- 20 lecitina Drakeol, 116 litros de solución salina de Toxoide de ténanos, 1,2 litros de SPAN 80, y 2,8 litros de Tween 80 y se emulsionaron usando un emulsionador Ross. La solución de aceite de lecitina Drakeol contenía lecitina de soja al 25% y aceite mineral al 75%. El producto emulsionado se hizo recircular por el emulsionador Ross durante un mínimo de 5 volúmenes o un
- 25 mínimo de 10 minutos. El producto emulsionado se almacenó a 2-7°C durante

un máximo de 24 horas para procesamiento adicional. La emulsión del tanque del emulsionador Ross se transfirió a un homogenizador Gaulin y se homogenizó durante 20 minutos a una presión de 31027,5 kPa. La solución de aceite de lecitina Drakeol al 40% (en lo sucesivo "formulación de AMPHIGEN®" o "solución de AMPHIGEN®") se dispensó después en envases de carboxi polipropileno estériles. El dispensado se realizó dentro de un embudo de dispensado de clase 100 localizado en un ambiente controlado de clase 10.000. Los envases se almacenaron a 2-7°C. Esta formulación de AMPHIGEN® se usó en los experimentos que se describen a continuación a no ser que se indique lo contrario.

## **EJEMPLO 2**

### **Mezclado primario mediante homogenización por mezclado ultrarrápido de la vacuna contra BVD.**

El aparato usado para este procedimiento de homogenización se muestra en la **Figura 1**. Usando técnica aséptica o válvulas de cruce de vapor, se unió un frasco que contenía un antígeno de BVD Tipo I (una preparación vírica de BVD Tipo I inactivada) al puerto de la parte inferior del vaso de mezclado. Después de completar la transferencia del volumen requerido del antígeno de BVD Tipo I, se sustituyó el frasco de BVD Tipo I por el envase que contenía una preparación vírica de BVD Tipo II inactivada (una preparación vírica de BVD Tipo II inactivado). Después de completar la transferencia de la cantidad requerida de un antígeno de BVD Tipo II, se unió el homogenizador Ross al recipiente portátil y se inició la recirculación a RPM máximas (3300 rpm). La agitación del recipiente se mantuvo a velocidad media.

Usando técnica aséptica o válvulas de cruce de vapor, se unió un frasco que contenía Quil-A con una concentración de 50 mg/ml al homogenizador al puerto en línea del vaso de mezclado. Se pasó una cantidad requerida de la solución de Quil-A al recipiente a través de succión en línea. Después de 5 completar la transferencia de solución de Quil-A, se retiró el frasco. Del mismo modo, se transfirió una cantidad requerida de colesterol en solución de etanol (18 mg/ml) al vaso de mezclado. Subsiguientemente, se añadieron al vaso de mezclado una cantidad requerida de la formulación de AMPHIGEN®, solución de timerosol al 10% y soluciones de dilución de medio de Eagle Modificado 10 Básico ("BME").

Una vez se completaron las adiciones, se continuó mezclando durante otros 15 minutos. La formulación resultante se dividió en dosis alícuotas de 2 ml y representaba una vacuna de BVD con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada. Cada dosis de la vacuna contenía 500 µg de 15 Quil-A, 500 µg de colesterol, formulación de AMPHIGEN® al 2,5% y timerosol al 0,009%. La concentración de antígeno para las dos cepas diferentes de BVD se determinó en términos de la valoración de ELISA para gp53.

### **EJEMPLO 3**

#### **20 Mezclado secundario por microfluidización**

La **Figura 2** ilustra el procedimiento usado para la mezcla secundaria mediante microfluidización. El microfluidizador se esterilizó al vapor. Primero se instaló la cámara del módulo de procesamiento auxiliar en la unidad y se instaló la cámara del blanco en la segunda posición de la cámara. Se conectó el vaso 25 que contenía la vacuna de BVD con todos los adyuvantes preparada como se

describe en el Ejemplo 2 al microfluidizador uniendo una línea de transferencia desde la válvula de drenaje del vaso suministrador a la entrada del microfluidizador. Se conectó gas nitrógeno a la entrada del filtro de aire del vaso suministrador y se ajustó la presión de vaso a 138 +/- 34 kPa. La válvula de drenaje del vaso de recogida se conectó a la línea de transferencia de la salida del microfluidizador. Después de realizar todas las conexiones necesarias, se abrieron las válvulas y se inició la microfluidización con una presión de trabajo de 68.950 +/- 3.447,5 kPa. El contenido completo de la vacuna se pasó a través del microfluidizador una vez y se recogió en la cámara post-microfluidización. Esta preparación se dividió en dosis alícuotas de 2 ml y representa la vacuna de BVD con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada.

#### **EJEMPLO 4**

##### **15 Preparación de una composición de vacuna mediante mezclado en banco**

La formulación de AMPHIGEN® preparada como se describe en el ejemplo 1 se diluyó al 2,5% añadiendo antígenos de BVD y el extensor. La solución resultante se mezcló en el banco usando una barra de agitación en lugar de un homogenizador. La preparación final contenía la siguiente composición: antígenos de BVD Tipo 1 y Tipo 2, formulación de AMPHIGEN® al 2,5% (que contiene aceite, lecitina, SPAN® y TWEEN®, como se describe en el Ejemplo 1) y solución salina. TWEEN 80 y SPAN 80 están presentes en la preparación de vacuna final a 0,18% y 0,08% en volumen respectivamente.

### **EJEMPLO 5**

#### **Comparación de una distribución de tamaño de gotas entre las preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada y no microfluidizada**

- 5           Se usaron la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada preparada como se describe en el Ejemplo 2, la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada preparada como se describe en el Ejemplo 3 y la preparación preparada por mezcla en banco como se describe en el Ejemplo 4 para comparar el tamaño de gota de las
- 10 preparaciones de vacunas. Se añadieron 2 ml de la muestra de cada una de las preparaciones a un difractómetro malvern 2000 Laser y se determinó la distribución del tamaño de gota. Como se muestra en la **Figura 3**, los resultados indican que la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada tenía el volumen de partícula máximo alrededor
- 15 de 0,1 micras mientras que la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada tenía el volumen máximo de distribución de partículas alrededor de 1 micra.

### **EJEMPLO 6**

#### **Reducción en la separación de fases de la vacuna.**

- 20           Se compararon tres preparaciones de vacuna diferentes: la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada preparada como se describe en el Ejemplo 2, la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada preparada como se describe en el Ejemplo 3 y la vacuna
- 25 preparada por mezcla en banco como se describe en el Ejemplo 4, para

determinar sus propiedades de separación de fases después de almacenamiento prolongado. Todas estas preparaciones se dejaron reposar a 4°C durante aproximadamente un mes y la separación de fases se controló en términos de aparición de una capa cremosa en la parte superior de las preparaciones de vacunas. Como se muestra en la **Figura 4**, no se produjo separación de fases en la preparación con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada cuando se comparó con las otras dos preparaciones.

10

### **EJEMPLO 7**

#### **Preparación de vacuna para ganado vacuno microfluidizada y no microfluidizada contra el virus de la diarrea vírica bovino**

Se incorporó de forma intrínseca el antígeno vírico del virus de la diarrea bovino a la formulación de AMPHIGEN® mediante microfluidización. El término "incorporado de forma intrínseca" se refiere al procedimiento por el cual se añadió el antígeno a la formulación de AMPHIGEN® antes de la microfluidización. El antígeno se sometió a las fuerzas físicas del procedimiento de microfluidización junto con los componentes de la formulación de adyuvante. En el grupo control no microfluidizado, la preparación de antígeno se dispersó en la formulación de AMPHIGEN® mediante mezclado.

20

La composición final de las preparaciones control y microfluidizada era la siguiente: BVD tipo I con una valoración ELISA tras la inactivación de 2535 UR/dosis para gp53, BVD Tipo II con una valoración ELISA tras la inactivación de 3290 UR/dosis para gp53, Quil-A con la concentración de 1,25 mg/dosis, colesterol con una concentración de 1,25 mg/dosis, la formulación de

25

AMPHIGEN® con una concentración final de 2,5% y timerosol con una concentración final de 0,009%. La dosis de la vacuna era de 5 ml.

### **EJEMPLO 8**

#### **5 Estabilidad a largo plazo de antígenos víricos de BVD incorporados de forma intrínseca en la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada**

Este experimento se realizó para determinar la estabilidad del antígeno incorporado de forma intrínseca durante el almacenamiento a largo plazo. Se  
10 incorporó de forma intrínseca el antígeno vírico de BVD Tipo II inactivado en la formación AMPHIGEN® durante el procedimiento de microfluidización para obtener una preparación de vacuna microfluidizada (A907505). Otras tres preparaciones de vacunas que contenían el mismo antígeno en una formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada (A904369, A904370 y  
15 A904371) sirvió como control. En las preparaciones no microfluidizadas, el antígeno se mezcló con formulación de AMPHIGEN® y se mezcló usando un homogenizador Ross. Las cuatro preparaciones de vacunas se almacenaron a 4°C durante dos años. En momentos diferentes durante el almacenamiento (0, 6, 12 o 24 meses) se usaron las cuatro formulaciones para vacunar vacas de  
20 tres meses de edad.

Los días 0 y 21 se vacunaron vacas de tres meses de edad por vía subcutánea con una formulación de vacuna de 2 ml. El suero de los animales vacunados se extrajo el día 35 y se midió la respuesta serológica a la vacuna en términos de la valoración de anticuerpo mediante un ensayo ELISA de  
25 BVDV-E2. Como se muestra en la **Figura 5**, la preparación de vacuna

96  
21

microfluidizada mostró una valoración de anticuerpos más elevada en todos los tiempos analizados (0, 6, 12 y 24 meses), sugiriendo que no se pierde la estabilidad de la preparación de antígeno durante la incorporación intrínseca del antígeno durante el procedimiento de microfluidización. Además, se encontró también de forma sorprendente que la preparación de vacuna microfluidizada indujo una respuesta inmunitaria potenciada en todos los tiempos.

### **EJEMPLO 9**

#### **10      Reducción del aumento de temperatura rectal inducida por la vacuna después de la microfluidización**

Se usaron las preparaciones de vacunas microfluidizada y no microfluidizada como se describe en el Ejemplo 7 para vacunar el ganado vacuno el día cero y se controló la temperatura rectal durante el periodo desde un día antes de la vacunación hasta cuatro días después de la vacunación. La dosis de la vacuna era de 2 ml. Los grupos se vacunaron con una dosis única o doble de la vacuna. Se midieron las temperaturas rectales y se registraron diariamente desde el Día 1 hasta el Día 4 inclusive. Se midieron las temperaturas rectales el día 0 antes de la administración del artículo de experimentación.

Como se muestra en la **Figura 6**, los resultados indican que se dio un aumento brusco en la temperatura rectal aproximadamente en las 24 horas después de la vacunación en los animales vacunados con una dosis única o doble de la formulación de vacuna no microfluidizada. Sin embargo, en los animales vacunados con formas microfluidizadas de la vacuna, el aumento de

la temperatura rectal tras la vacunación fue mínima y significativamente menor que en los animales vacunados con la formulación no microfluidizada (**Figura 6**).

### **EJEMPLO 10**

#### **5 El volumen de reacción en el sitio de la inyección se resolvió más rápido cuando se vacunó con formulaciones de vacunas microfluidizadas**

Se usaron las preparaciones de vacunas microfluidizadas y no microfluidizadas preparadas como se describe en el Ejemplo 7 para vacunar el ganado vacuno el día cero. Los animales incluidos en este estudio eran ganado vacuno de carne híbridos. Había tres animales en cada uno de los grupos de tratamiento con placebo (T01 y T02). Había seis animales en cada uno de los grupos T03 a T06. La dosis de vacuna era de 2 ml y los grupos se vacunaron con una o dos dosis de la vacuna el día cero. En día 0, se administró el artículo de experimentación en el lado derecho del cuello. Los animales que recibieron la dosis doble (4 ml) del artículo de experimentación (T02, T04 y T06) recibieron la dosis doble completa en forma de inyección única en un lado. La observación de los sitios de inyección, incluyendo la estimación del tamaño de reacción en el sitio de inyección se realizó en el lado derecho del cuello del Día 0 al Día 4 inclusive, y los Días 6, 9 y 14. El Día 0 se observaron los sitios de inyección antes de la administración de los artículos de experimentación. Los grupos vacunados con una o dos dosis del placebo no mostraron aumento significativo del volumen de reacción en el sitio de inyección y por lo tanto esos datos no se muestran en la Figura 7. En el caso de la formulación de vacuna no microfluidizada, se dio un aumento proporcional del volumen de reacción en el sitio de inyección entre la vacunación con una dosis y la de dos dosis. Por otra

parte, en el caso de la formulación de vacuna microfluidizada, aunque la dosis única indujo un volumen de reacción en el sitio de inyección mayor, la inyección con la segunda dosis no provocó un aumento mayor. Sin embargo, en el caso de los animales a los que se inyectó formulación de vacuna microfluidizada, el volumen de reacción en el sitio de inyección se resolvió con una velocidad mayor cuando se comparó con el de los animales inyectados con una formulación de vacuna no microfluidizada. Estos resultados se muestran en la **Figura 7.**

### **EJEMPLO 11**

**10 Preparación de preparaciones de vacuna con base de formulación de  
AMPHIGEN® microfluidizada  
con antígenos víricos BVD y Leptospira incorporados de forma intrínseca  
y moléculas inmunoestimuladoras tales como Quil A y DDA**

Se formuló Leptospira de la cepa hardjo-bovi CSL inactivado en  
15 formalina en el adyuvante apropiado con recuentos directos de  
aproximadamente  $1,4 \times 10^9$  organismos/dosis de 5 ml. La cepa de Leptospira  
Pomna T262 inactivada en formalina se formuló a aproximadamente 2400  
Unidades nefalómeras/dosis de 5 ml. Las unidades nefalómeras se calcularon  
basándose en la medición nefalométrica de fluido de fermentación procesado  
20 previamente. El virus BVD Tipo 1 se formuló con una valoración de Elisa E2 de  
aproximadamente 3000 Unidades relativas/dosis de 5 ml. El virus BVD Tipo 2  
se formuló con una valoración por ELISA E2 de aproximadamente 3500  
Unidades relativas/dosis de 5 ml. La unidad relativa se calculó basándose en la  
valoración por ELISA E2 de fluido volumétrico tras la inactivación antes del  
25 ensamblado. Se usaron tanto Quil-A como colesterol con una concentración de

0,5 mg por dosis. Se usaron timerosol y la formulación de AMPHIGEN® con la concentración final de 0,009% y 2,5% respectivamente. Se usó hidróxido de aluminio (Rehydragel Lv) con una concentración final de 2,0%. Cuando se usó DDA como inmunomodulador, DDA se incluyó en la formulación de AMPHIGEN®. La formulación de AMPHIGEN® (es decir, la solución madre de Drakeol-lecitina al 40%) contenía 1,6 mg/ml de DDA y, cuando se diluía de forma apropiada, la preparación de vacuna final contenía 2,5% de formulación de AMPHIGEN® y 0,1 mg/ml de DDA.

En la preparación de diferentes formulaciones de vacunas se añadieron fracciones de BVD, Leptos, Quil-A, colesterol, timerosol, la formulación de AMPHIGEN® y solución salina como un agente extensor a un homogenizador Silverson y se mezcló durante 15 minutos a  $10.000 \pm 500$  rpm. Después se microfluidizaron los componentes con un tamiz de 200 micras a 68.950 kPa.

Cuando la formulación de la vacuna contenía hidróxido de aluminio, la microfluidicación se llevó a cabo sin hidróxido de aluminio. Cuando se completó la microfluidización, se añadió hidróxido de aluminio y se mezcló con una barra de agitación hasta la mañana siguiente a 4°C.

### **EJEMPLO 12**

#### **Preparación de vacuna de virus BVD para estudios de exposición**

La preparación de vacuna que se usó en este experimento contenía antígenos del virus BVD Tipo 1 y el virus BVD Tipo 2. Se usó antígeno BVD1-5960 con una valoración después de inactivación por ELISA de 2535 UR/dosis para gp53. Se usó el antígeno BVD2-890 con una valoración después de inactivación por ELISA de 3290 UR/dosis para gp53. Se usaron Quil-A y colesterol a la concentración de 0,5 mg/ml. Se usaron timersol y la formulación

de AMPHIGEN® con una concentración final de 0,009% y 2,5% respectivamente. Cuando se uso DDA como inmunomodulador, DDA se incluyó en la formulación de AMPHIGEN®. La solución madre de AMPHIGEN® (solución de Drakeol-lecitina al 40%) contenía cantidades variables de DDA y, cuando se diluía de forma adecuada, la preparación final de vacuna contenía 2,5% de formulación de AMPHIGEN® y concentraciones de DDA que variaban en el intervalo de 0,5 mg/dosis a 2,0 mg/dosis. Se usó gel de aluminio (Rehydragel-LV) con una concentración final de 2%. Se usó GPI-0100 en el intervalo de 2, 3 y 5 mg/dosis.

10 Todos los componentes se añadieron a un homogenizador Silverson y se mezclaron durante 15 minutos a 10.500 rpm y después se microfluidizaron pasando por una cámara de 200 micras con 68.950 kPa. Cuando la preparación de la vacuna contenía hidróxido de aluminio, la microfluidización se llevó a cabo sin hidróxido de aluminio. Cuando se completó la microfluidización, se añadió hidróxido de aluminio y se mezcló con una barra de agitación hasta la mañana siguiente a 4°C.

### **Ejemplo 13**

**Protección contra exposición a Leptospira después de vacunación con una formulación microfluidizada de vacuna con Amphigen con antígenos de Leptospira**

**Tabla 1 – Grupos de tratamiento**

| <b>Grupo de tratamiento</b> | <b>Composición del adyuvante</b>                 |
|-----------------------------|--------------------------------------------------|
| T01                         | Solución salina                                  |
| T02                         | Quil-A, colesterol y la formulación de AMPHIGEN® |

94  
09

|     |                                                                   |
|-----|-------------------------------------------------------------------|
|     | (QAC)                                                             |
| T03 | Quil-A, colesterol, la formulación de AMPHIGEN® y AIOH (QAC-AIOH) |
| T04 | DDA, colesterol y la formulación de AMPHIGEN® (DDA)               |
| T05 | DDA, colesterol, la formulación de AMPHIGEN® y AIOH (DDA-AIOH)    |

La Tabla 1 muestra la composición de las formulaciones de adyuvante en las preparaciones de vacunas experimentadas en este estudio. Las preparaciones de vacunas se prepararon como se describe en el Ejemplo 11.

- 5 Había seis animales en cada grupo. En este estudio se usaron novillos de carne híbridos de aproximadamente siete meses de edad. La vacunación se realizó el Día 0 y el Día 21 por vía subcutánea con un volumen de vacuna de 5 ml. La exposición se realizó con L. Hardjo-bovis cepa 203 de NADC (Nacional Agricultural Disease Center). La exposición se realizó durante los días 57-59
- 10 con un inóculo de 1 ml. La exposición se administró de forma conjunta ocular y por vía vaginal. El material de exposición contenía  $5,0 \times 10^6$  unidades de leptospira/ml. La orina se recogió semanalmente para realizar un cultivo de leptospira, FA y PCR. La recogida de los riñones se realizó durante los días 112 y 113.

**EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA MICROFLUIDIZADAS Y**  
**COMPOSICIONES DE VACUNAS**

**CAMPO DE LA INVENCION**

- 5            Esta invención se refiere de forma general al campo de las vacunas y, en particular, a formulaciones de adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria en animales veterinarios. En particular, la invención se refiere al uso de una emulsión submicrométrica de aceite en agua como un adyuvante de vacunas para potenciar la capacidad inmunógena de los antígenos. La
- 10           presente invención proporciona formulaciones de emulsiones submicrométricas de aceite en agua, composiciones de vacunas que contienen un antígeno incorporado en dicha emulsión, así como procedimientos para preparar las emulsiones y vacunas.

**15    ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- Las infecciones bacterianas, víricas, parasitarias y micoplásmicas están ampliamente difundidas en los animales veterinarios tales como ganado vacuno, porcino y animales de compañía. Las enfermedades provocadas por estos agentes infecciosos son a menudo resistentes a la terapia farmacéutica
- 20           antimicrobiana, sin dejar medios efectivos de tratamiento. En consecuencia, cada vez se usa más una estrategia de vacunación para controlar la enfermedad infecciosa en los animales veterinarios. Un patógeno infeccioso entero puede hacerse adecuado para usarse en una formulación de vacuna después de la inactivación química o manipulación genética apropiada. De
- 25           forma alternativa, puede expresarse una subunidad proteínica del patógeno en

**Tabla 2 – Resultados del estudio de exposición a Leptospira**

| Tratamiento     | Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez de Leptospira en orina y riñón por cultivo | Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez de Leptospira en orina y riñón por FA | Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez de Leptospira en orina y riñón por PCR | Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez de Leptospira en orina y riñón en todos los ensayos |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Solución salina | 100                                                                                                 | 83,3                                                                                           | 83,3                                                                                            | 100                                                                                                          |
| QAC             | 0                                                                                                   | 0                                                                                              | 0                                                                                               | 0                                                                                                            |
| QAC/AIOH        | 0                                                                                                   | 50,0                                                                                           | 0                                                                                               | 50,0                                                                                                         |
| DDA             | 0                                                                                                   | 0                                                                                              | 0                                                                                               | 0                                                                                                            |
| DDA/AIOH        | 0                                                                                                   | 33,3                                                                                           | 16,7                                                                                            | 50,0                                                                                                         |

- 5 La Tabla 2 muestra los datos del estudio de exposición a Leptospira. Para determinar el porcentaje de infección por Leptospira en el animal expuesto, se usaron los siguientes criterios. Si el cultivo de riñón era positivo sólo en una muestra, se considera que el animal es Leptospira positivo. Si un animal es positivo sólo en una muestra para FA o PCR, se considera que el
- 10 animal es negativo. Si la muestra es positiva para FA y PCR sólo en una

muestra, se considera que es *Leptospira* positivo.

Los resultados que se muestran en la Tabla 2 indican que la duración de la eliminación urinaria en todos los grupos vacunados fue significativamente más corta basándose en los tres ensayos. En lo que se refiere a la colonización

5 urinaria y renal, las eficacias de las formulaciones que contenían QAC y DDA sin AIOH fueron comparables. AIOH no mejoró e incluso redujo las eficacias de las vacunas que contenían QAC o DDA en este estudio de exposición.

**Tabla 3 – Intervalo de valoración de aglutinación microscópica**

10 **el día de valoración media geométrica máxima antes de la exposición (Día 35)**

| Tratamiento     | L. Hardjo  | L. pomona    |
|-----------------|------------|--------------|
| Solución salina | <20        | <20          |
| QAC             | 160 – 640  | 1280 – 10240 |
| QAC/AIOH        | 160 – 2560 | 8 – 10240    |
| DDA             | 40 – 1280  | 320 – 2560   |
| DDA/AIOH        | 320 – 640  | 1280 – 5120  |

Se detectaron respuestas serológicas contra ambos antígenos de

15 *Leptospira* de la formulación de vacuna en los animales vacunados y la respuesta máxima se notó el Día 35. No existió correlación entre la respuesta serológica y la protección contra la exposición. La presencia de gel de aluminio en la formulación de vacuna redujo el nivel de protección aunque potenció la respuesta serológica por la presencia de gel de aluminio en la vacuna.

**EJEMPLO 14**

**Provocación de respuesta inmunitaria al antígeno vírico de BVD y**

**Protección contra la exposición al virus BVD Tipo 2 tras**

- 5 **la inmunización con una preparación de vacuna microfluidizada que**  
**contiene formulación de AMPHIGEN® y DDA.**

En este experimento se usaron terneras seronegativas de cuatro a siete meses de edad. Había seis grupos diferentes y cada grupo tenía diez animales (Tabla 4). El Día 0 y el Día 21 cada animal recibió una dosis subcutánea de 2  
 10 ml de la vacuna o placebo en el lado del cuello aproximadamente a medio camino entre la escápula y la cabeza.

**Tabla 4 – Grupos de tratamiento**

| <b>Grupo de tratamiento</b> | <b>Composición del adyuvante</b>                                |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| T01                         | Solución salina                                                 |
| T02                         | Quil-A, formulación de AMPHIGEN® y colesterol                   |
| T03                         | Formulación de AMPHIGEN®, colesterol, DDA (0,5 mg/dosis) y AIOH |
| T04                         | Formulación de AMPHIGEN®, colesterol y DDA (0,5 mg/dosis)       |
| T05                         | Formulación de AMPHIGEN®, colesterol y DDA (1,0 mg/dosis)       |
| T06                         | Formulación de AMPHIGEN®, colesterol y DDA (2,0 mg/dosis)       |

Se administró una dosis de 5 ml de preparación de exposición del virus

(aproximadamente 2,5 ml por fosa) por vía intranasal el día 44 del estudio. En este estudio se usó virus BVD Tipo 2, cepa aislada nº 24515 (Cepa Ellis), lote nº 46325-70 no citopático como cepa de exposición. Se valoraron muestras retenidas de material de exposición (dos copias por valoración) en el momento  
5 del inicio de la exposición e inmediatamente después de completarlo. La valoración de virus vivos media por dosis de 5 ml era de  $5,3 \log_{10}$  DIAF<sub>50</sub>/5 ml antes de la exposición y  $5,4 \log_{10}$  DIAF<sub>50</sub>/5 ml después de la exposición (DIAF es equivalente a DICT<sub>50</sub>).

Se controló a los animales todos los días desde el Día 3 al día 58. Se  
10 asignaron puntuaciones de enfermedad clínica de 0, 1, 2, o 3 basándose en los signos clínicos atribuibles a la infección por BVD 2 para cada animal los Días 42 a 58. Las puntuaciones del Día 44 se registraron antes de la exposición. Se extrajeron muestras de sangre (dos tubos de separación de suero de 13 ml, SST) de cada animal los Días 0, 21, 35, 44 y 58 para determinar las  
15 valoraciones en suero de anticuerpos de neutralización de los virus BVD Tipo 1 y BVD tipo 2.

Se extrajeron muestras de sangre de cada animal del Día 42 al Día 58, inclusive, y se determinó la presencia de virus BVD en la capa leucocitaria. El Día 44 se obtuvieron muestras antes de la exposición.

20 Se extrajeron de cada animal muestras de sangre (un tubo de EDTA de 4 ml) para determinar la leucocitometría el Día 42 al Día 58, inclusive. El Día 44 se obtuvieron muestras antes de la exposición.

Leucopenia se definió como un descenso del 40% o mayor de la leucocitometría desde el nivel inicial (leucocitometría anterior a la exposición  
25 media de dos días anteriores y del día de la exposición).

97  
01

Se usaron las puntuaciones de enfermedad clínica para definir el estado de enfermedad de la forma siguiente; si la puntuación es  $\leq 1$ , entonces enfermedad = no; si la puntuación es  $> 2$ , entonces enfermedad = sí.

Como se muestra en las Tablas 5 y 6, los grupos que se vacunaban con vacunas que contenían antígenos víricos de BVD junto con la formulación de AMPHIGEN®, Quil A o DDA y microfluidizadas, se seroconvirtieron con valoraciones de neutralización de virus en suero significativas para los virus BVD Tipo 1 y BVD Tipo 2. En esos grupos hubo también una reducción significativa del porcentaje de animales que mostraban viremia después de la exposición, mientras que en el grupo de control 100% de los animales mostraban viremia (Tabla 7). Además, en los grupos vacunados la frecuencia de la enfermedad se redujo también de forma significativa (Tabla 8). De forma similar, el porcentaje de animales que mostraban leucopenia se redujo también en los grupos vacunados y la reducción de la leucopenia fue más significativa en el grupo que contenía DDA que en el grupo que contenía Quil A (Tabla 9). En el grupo de control se dio un descenso significativo de la subida de peso comparado con los grupos vacunados. (Tabla 10).

### Serología

Antes de la vacunación el Día 0, todos los animales del estudio eran seronegativos (SVN  $< 1:2$ ) para anticuerpos contra virus de BVD Tipos 1 y 2 (no se muestran los datos). Catorce días después de la segunda vacunación (Día 35) todos los animales a los que se administró placebo (T01) seguían siendo seronegativos para anticuerpos contra el virus BVD Tipos 1 y 2; y los animales vacunados con los ITA (Antígeno en experimentación de

investigación) (T02, T03, T04, T05 y T06) eran seropositivos ( $SVN \geq 1:8$ ) para anticuerpos contra el virus BVD, Tipos 1 y 2. Un animal al que se administró la vacuna con adyuvante de formulación de AMPHIGEN® a 2 mg/dosis de DDA tenía una valoración de SVN de 3 para anticuerpos contra el virus BVD Tipo 2 el Día 35 (Tabla 11 y 12).

Antes de la exposición el Día 44, todos los controles (T01) excepto uno, eran seronegativos ( $SVN < 1:2$ ) para anticuerpos contra el virus BVD Tipos 1 y 2 (no se muestran datos). Uno de los controles (nº 2497) era seropositivo ( $SVN = 10$ ) para anticuerpos contra el virus BVD Tipo 1 y seronegativo para anticuerpos contra el virus BVD Tipo 2. Catorce días después de la exposición, todos los animales del estudio eran seropositivos para anticuerpos contra el virus BVD Tipos 1 y 2.

**Tabla 5. Media geométrica de las valoraciones de neutralización en suero de virus BVD Tipo 1**

| Tratamiento |                             | Media geométrica de valoraciones de SVN contra el virus BVD Tipo 1 en el Día del estudio |      |         |         |         |
|-------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------|---------|---------|
|             |                             | 0                                                                                        | 21   | 35      | 44      | 58      |
| T01         | Solución salina             | <2                                                                                       | <2   | <2      | <2      | 23,9    |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A         | <2                                                                                       | 39,1 | 19824,5 | 14018,2 | 27554,5 |
| T03         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA, | <2                                                                                       | 51,8 | 32204,8 | 22381,1 | 23170,4 |

|     |                            |    |      |         |        |         |
|-----|----------------------------|----|------|---------|--------|---------|
|     | Al                         |    |      |         |        |         |
| T04 | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA | <2 | 27,0 | 14512,4 | 8932,0 | 21996,2 |
| T05 | Amphigen,<br>1,0 mg de DDA | <2 | 26,7 | 11585,2 | 8194,6 | 20882,0 |
| T06 | Amphigen,<br>2,0 mg de DDA | <2 | 23,5 | 8778,7  | 6769,3 | 16961,1 |

**Tabla 6. Media geométrica de las valoraciones de neutralización en suero de virus BVD Tipo 2**

| Tratamiento |                                   | Media geométrica de valoraciones de SVN contra el virus BVD Tipo 1 en el Día del estudio |     |        |        |         |
|-------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------|--------|---------|
|             |                                   | 0                                                                                        | 21  | 35     | 44     | 58      |
| T01         | Solución salina                   | <2                                                                                       | <2  | <2     | <2     | 522,0   |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A               | <2                                                                                       | 8,9 | 2272,4 | 2048,2 | 24833,6 |
| T03         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA,<br>Al | <2                                                                                       | 9,5 | 3565,7 | 2702,2 | 20881,8 |
| T04         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA        | <2                                                                                       | 4,1 | 1260,7 | 989,1  | 18496,2 |

100  
30

|     |                            |    |     |        |        |         |
|-----|----------------------------|----|-----|--------|--------|---------|
| T05 | Amphigen,<br>1,0 mg de DDA | <2 | 6,4 | 1398,8 | 1453,9 | 30047,8 |
| T06 | Amphigen,<br>2,0 mg de DDA | <2 | 7,7 | 1673,2 | 1428,9 | 16384,0 |

**Tabla 7. Aislamiento de virus BVD después de la exposición**

| Tratamiento |                                   | Aislamiento de virus BVD |                                              |                                          |
|-------------|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|
|             |                                   | Días del estudio         | Frecuencia (%)<br>de animales con<br>viremia | Media por<br>MC de<br>Días de<br>viremia |
| T01         | Solución salina                   | 47 a 58                  | 10/10 (100,0)                                | 10,4                                     |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A               | 50 a 53                  | 1/10 (10,0)                                  | 0,4                                      |
| T03         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA,<br>AI | ---                      | 0/10 (0,0)                                   | 0,0                                      |
| T04         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA        | 48, 50 a 52, 57          | 3/10 (30,0)                                  | 0,5                                      |
| T05         | Amphigen,<br>1,0 mg de DDA        | 49 a 51                  | 2/10 (20,0)                                  | 0,4                                      |

|     |                            |         |             |     |
|-----|----------------------------|---------|-------------|-----|
| T06 | Amphigen,<br>2,0 mg de DDA | 48 a 52 | 2/10 (20,0) | 0,5 |
|-----|----------------------------|---------|-------------|-----|

**Tabla 8. Signos clínicos de enfermedad por BVD después de la exposición**

| Tratamiento |                                      | Frecuencia<br>(%) con<br>enfermedad | Frecuencia (%) observaciones<br>con signos clínicos de<br>enfermedad por BVD |              |              |         | Total<br>Obs. |
|-------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|---------|---------------|
|             |                                      |                                     | 0                                                                            | 1            | 2            | 3       |               |
| T01         | Solución<br>salina                   | 9/10 (90,0)                         | 75<br>(46)                                                                   | 63<br>(37,5) | 29<br>(17,3) | 1 (0,6) | 168           |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A                  | 1/10 (10,0)                         | 105<br>(61,8)                                                                | 63<br>(37,1) | 2 (1,2)      | 0 (0)   | 170           |
| T03         | Amphigen,<br>0,5 mg de<br>DDA,<br>Al | 2/10 (20,0)                         | 99<br>(58,2)                                                                 | 67<br>(39,4) | 4 (2,4)      | 0 (0)   | 170           |
| T04         | Amphigen,<br>0,5 mg de<br>DDA        | 0/10 (0,0)                          | 118<br>(69,4)                                                                | 52<br>(30,6) | 0 (0)        | 0 (0)   | 170           |
| T05         | Amphigen,<br>1,0 mg de               | 0/10 (0,0)                          | 101<br>(59,4)                                                                | 69<br>(40,6) | 0 (0)        | 0 (0)   | 170           |

|     |                               |            |               |              |       |       |     |
|-----|-------------------------------|------------|---------------|--------------|-------|-------|-----|
|     | DDA                           |            |               |              |       |       |     |
| T06 | Amphigen,<br>2,0 mg de<br>DDA | 0/10 (0,0) | 104<br>(61,2) | 66<br>(38,8) | 0 (0) | 0 (0) | 170 |

**Tabla 9. Leucopenia tras la exposición**

| Tratamiento |                                   | Leucopenia                                 |                                       |
|-------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|
|             |                                   | Frecuencia (%) de<br>animales leucopénicos | Media por MC de Días<br>de leucopenia |
| T01         | Solución salina                   | 10/10 (100,0)                              | 7,8                                   |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A               | 6/10 (60,0)                                | 1,2                                   |
| T03         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA,<br>Al | 2/10 (20,0)                                | 0,2                                   |
| T04         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA        | 4/10 (40,0)                                | 0,8                                   |
| T05         | Amphigen,<br>1,0 mg de DDA        | 3/10 (30,0)                                | 0,9                                   |
| T06         | Amphigen,<br>2,0 mg de DDA        | 2/10 (30,0)                                | 0,5                                   |

103  
1015 **Tabla 10. Peso corporal y subida de peso corporal durante el estudio**

| Tratamiento |                                   | Peso corporal medio (kg.) en el Día del estudio |        |        |        | Subida de peso (kg) |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|--------|--------|--------|---------------------|
|             |                                   | -1                                              | 43     | 50     | 58     |                     |
| T01         | Solución salina                   | 171,46                                          | 219,95 | 222,72 | 216,32 | 44,86               |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A               | 194,14                                          | 238,82 | 247,98 | 262,63 | 68,49               |
| T03         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA,<br>Al | 186,20                                          | 233,33 | 242,31 | 262,63 | 76,43               |
| T04         | Amphigen,<br>0,5 mg de DDA        | 169,51                                          | 214,24 | 223,44 | 244,08 | 74,57               |
| T05         | Amphigen,<br>1,0 mg de DDA        | 162,80                                          | 204,76 | 217,23 | 230,02 | 67,22               |
| T06         | Amphigen,<br>2,0 mg de DDA        | 185,07                                          | 232,83 | 242,18 | 254,15 | 68,77               |

### Aislamiento de virus

Como muestran los datos en la Tabla 13, durante el periodo de exposición (Días 44 a 58), los diez animales del grupo control (T01) sufrían viremia (se aisló virus BVD uno o más días). En los grupos a los que se había administrado ITA, la frecuencia de los animales con viremia era uno, cero, tres, dos y dos en cada grupo de diez (T02, T03, T04, T05 y T06, respectivamente). La diferencia entre el control y los grupos a los que se había administrado los ITA era estadísticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ). La media por mínimos del número de días de viremia era también significativamente mayor (10,4 días) para el control comparado con los grupos a los que se había administrado los ITA (0,0 a 0,5 días).

### Enfermedad Clínica

Se consideraba que los animales con puntuaciones de señales clínicas de 2 o 3 demostraban signos de enfermedad por BVD. Como se muestra en la Tabla 14, la frecuencia de los animales con signos clínicos de enfermedad por virus BVD era nueve de diez en el control (T01) y uno, dos, cero, cero y cero de diez en cada uno de los grupos a los que se administraron los ITA (T02, T03, T04, T05 y T06 respectivamente). La diferencia entre el control y los grupos a los que se administraron los ITA era estadísticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ).

### Leucopenia

Como se muestra en la Tabla 15, durante el periodo de exposición (Días 44 a 58), los diez animales del control (T01) sufrían leucemia (una reducción del 40% en la leucocitometría comparada con la inicial antes de la exposición, Días 42-44). La frecuencia de animales con leucemia era seis, dos, cuatro, tres y dos de los diez animales de cada uno de los grupos a los que se

administraron los ITA (T02, T03, T04, T05 y T06 respectivamente). La diferencia entre el control y los grupos a los que se administró la vacuna que tenía la formulación de AMPHIGEN® como adyuvante a 0,5 mg/dosis e hidróxido de aluminio (T03) era estadísticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ). La media por mínimos cuadrados del número de días de leucemia era significativamente mayor (7,8 días) para el control comparado con los grupos a los que se administraron los ITA (0,2 a 1,2 días).

### **EJEMPLO 15**

- 10      **Provocación de respuesta inmunitaria al antígeno vírico de BVD y  
Protección contra la exposición al virus BVD Tipo 2 tras  
la inmunización con una formulación de vacuna microfluidizada que  
contiene GPI-0100.**

Se siguió un grupo de condiciones experimentales como se describe en el Ejemplo 14 y se realizó una comparación directa entre Quil A y GPI-0100. Como se muestra en las Tablas 11 y 12, los animales vacunados con antígenos de BVD en la preparación de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada que contenía Quil-A o GPI-0100 tenía una valoración de anticuerpos significativa para los virus BVD Tipo 1 y BVD Tipo 2. La valoración de anticuerpos para el virus BVD Tipo 1 era muy superior a la de virus BVD Tipo 2. Sin embargo, la exposición subsiguiente a virus BVD Tipo 2 demostró una fuerte protección y se redujo significativamente la incidencia de la enfermedad en las terneras vacunadas con la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada que contenía GPI-0100.

**Tabla 11. Media geométrica de las valoraciones de neutralización en suero de virus BVD Tipo 1**

| Tratamiento |                                           | Media geométrica de valoraciones de SVN |       |         |         |         |
|-------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|-------|---------|---------|---------|
|             |                                           | 0                                       | 21    | 35      | 43      | 57      |
| T01         | Solución salina                           | <2                                      | <2    | <2      | <2      | 35,5    |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A                       | <2                                      | 98,7  | 20171,0 | 12203,4 | 44762,4 |
| T03         | Amphigen,<br>2 mg de GPI-<br>0100<br>AIOH | <2                                      | 84,6  | 10998,5 | 7383,2  | 25709,2 |
| T04         | Amphigen,<br>2 mg de GPI-<br>0100         | <2                                      | 106,0 | 18179,2 | 8933,2  | 28526,2 |
| T05         | Amphigen,<br>3 mg de GPI-<br>0100         | <2                                      | 62,9  | 15024,3 | 8780,1  | 19824,4 |
| T06         | Amphigen,<br>5 mg de GPI-<br>0100         | <2                                      | 71,1  | 12203,3 | 7512,0  | 16670,2 |

107  
105

**Tabla 12. Media geométrica de las valoraciones de neutralización en suero de virus BVD Tipo 2**

| Tratamiento |                                           | Media geométrica de valoraciones de SVN contra el virus BVD Tipo 1 en el Día del estudio |      |        |        |        |
|-------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------|--------|--------|
|             |                                           | 0                                                                                        | 21   | 35     | 44     | 58     |
| T01         | Solución salina                           | <2                                                                                       | <2   | <2     | <2     | 14,7   |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A                       | <2                                                                                       | 12,9 | 2312,0 | 1692,5 | 1663,4 |
| T03         | Amphigen,<br>2 mg de GPI-<br>0100<br>AIOH | <2                                                                                       | 13,2 | 1663,5 | 1116,8 | 1562,3 |
| T04         | Amphigen,<br>2 mg de GPI-<br>0100         | <2                                                                                       | 20,5 | 2610,2 | 1978,2 | 2478,7 |
| T05         | Amphigen,<br>3 mg de GPI-<br>0100         | <2                                                                                       | 11,4 | 1752,8 | 1305,2 | 2435,4 |
| T06         | Amphigen,<br>5 mg de GPI-<br>0100         | <2                                                                                       | 12,0 | 3158,4 | 2120,2 | 1845,6 |

108  
10**Tabla 13. Aislamiento de virus BVD después de la exposición**

| Tratamiento |                                       | Aislamiento de virus BVD               |                                 |
|-------------|---------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|
|             |                                       | Frecuencia (%) de animales con viremia | Media por MC de Días de viremia |
| T01         | Solución salina                       | 10/10 (100,0)                          | 8,4                             |
| T02         | Amphigen,<br>Quil A                   | 3/10 (30,0)                            | 0,3                             |
| T03         | Amphigen,<br>2 mg de GPI-0100<br>AIOH | 0/10 (0,0)                             | 0,0                             |
| T04         | Amphigen,<br>2 mg de GPI-0100         | 1/10 (10,0)                            | 0,1                             |
| T05         | Amphigen,<br>3 mg de GPI-0100         | 3/10 (30,0)                            | 0,3                             |
| T06         | Amphigen,<br>5 mg de GPI-0100         | 2/10 (20,0)                            | 0,2                             |

109

**Tabla 14. Signos clínicos de enfermedad por BVD después de la exposición**

| Tratamiento |                                 | Frecuencia (%) con enfermedad | Frecuencia (%) observaciones con una puntuación de enfermedad clínica de |           |          | Total Obs. |
|-------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|----------|------------|
|             |                                 |                               | 0                                                                        | 1         | 2        |            |
| T01         | Solución salina                 | 5/10 (50,0)                   | 103 (60,6)                                                               | 55 (32,4) | 12 (7,1) | 170        |
| T02         | Amphigen, Quil A                | 5/10 (50,0)                   | 115 (67,6)                                                               | 48 (28,2) | 7 (4,1)  | 170        |
| T03         | Amphigen, 2 mg de GPI-0100 AIOH | 0/10 (0,0)                    | 128 (75,3)                                                               | 42 (24,7) | 0 (0)    | 170        |
| T04         | Amphigen, 2 mg de GPI-0100      | 0/10 (0,0)                    | 124 (72,9)                                                               | 46 (27,1) | 0 (0)    | 170        |
| T05         | Amphigen, 3 mg de GPI-0100      | 0/10 (0,0)                    | 104 (61,2)                                                               | 66 (38,8) | 0 (0)    | 170        |

|     |                                   |            |            |           |       |     |
|-----|-----------------------------------|------------|------------|-----------|-------|-----|
| T06 | Amphigen,<br>5 mg de GPI-<br>0100 | 0/10 (0,0) | 128 (75,3) | 42 (24,7) | 0 (0) | 170 |
|-----|-----------------------------------|------------|------------|-----------|-------|-----|

**Tabla 15. Leucopenia tras la exposición**

| Tratamiento |                          | Leucopenia                                    |                                          |
|-------------|--------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
|             |                          | Frecuencia (%) de<br>animales<br>leucopénicos | Media por MC de<br>Días de<br>leucopenia |
| T01         | Solución salina          | 9/10 (90,0)                                   | 8,7                                      |
| T02         | Quil A                   | 6/10 (60,0)                                   | 1,6                                      |
| T03         | 2 mg de GPI-0100<br>AIOH | 7/10 (70,0)                                   | 2,6                                      |
| T04         | 2 mg de GPI-0100         | 4/10 (40,0)                                   | 1,5                                      |
| T05         | 3 mg de GPI-0100         | 7/10 (70,0)                                   | 2,6                                      |
| T06         | 5 mg de GPI-0100         | 8/10 (80,0)                                   | 2,9                                      |

En conclusión, se demostró la seguridad de cada vacuna por la ausencia  
 5 de reacciones adversas de mortandad en los animales vacunados. La potencia  
 de cada vacuna se demostró por seroconversión (valoraciones de anticuerpos  
 de SVN contra BVD-1 y BVD-2  $>1:8$ ) en 100% de los animales vacunados. Se  
 demostró la resistencia satisfactoria a la exposición por la vacuna con 2 mg de  
 GPI-0100 sólo como adyuvante.



### **EJEMPLO 16**

#### **Preparación de vacuna que contiene antígeno microencapsulado en emulsión microfluidizada de aceite en agua**

Se añadieron tres gramos de Trehalosa (Fluka) a agua para obtener una  
5 solución madre de 333 mg/ml de solución de Trehalosa. Se añadió antígeno  
PauA recombinante solubilizado en solución de SDS al 0,8% (SDS/rPauA) a la  
solución de Trehalosa para obtener una concentración final de 494 µg de  
rPauA/ml. En la siguiente etapa se disolvieron 10 gramos de ácido  
polilactidaglicólico (PLG-Resomer RE 503H, Boeringher Ingelheim) en 200 ml  
10 de cloruro de metileno ( $\text{MeCl}_2$ ). La solución resultante de PLG/ $\text{MeCl}_2$  se  
combinó con la solución de SDS-rPauA/trehalosa preparada en la primera  
etapa. La solución combinada se sometió a microfluidización usando  
Microfluidizador (de Microfluidics Modelo M110EH) y la preparación  
microfluidizada se desecó por pulverización usando un secador por  
15 pulverización Temco Modelo SD-5). El material desecado por pulverización se  
recogió usando un tamiz de 500 micras.

La concentración de rPauA en este material desecado por pulverización  
se cuantificó usando un análisis por transferencia Western. Se disolvió 1,04 mg  
de material desecado por pulverización en 50 µl de acetona y se centrifugó a  
20 13.200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se separó el  
sobrenadante. Las fracciones de sobrenadante y de sedimento se secaron en  
una campana de seguridad biológica durante 2,5 horas. Se resuspendió el  
sedimento en 47,43 µl de solución de muestra (25 µl de tampón de muestra +  
10 µl de agente reductor + 65 µl de agua). La fracción de sobrenadante  
25 desecado se resuspendió con 20 µl de solución de muestra. En el análisis

Western se usó PauA purificado como patrón para cuantificar el contenido de rPauA del material desecado por pulverización.

Se preparó una solución madre de manitol al 20% disolviendo 100 gramos de manitol (Sigma) en 500 ml de agua para inyectables (WFI). La solución se calentó a 40°C con placa calefactora/agitador y se enfrió a 30°C. La solución se esterilizó por filtración con un filtro estéril de 0,22 micras (Millipore). Se preparó una solución de carboximetilcelulosa al 2,5% disolviendo 12,5 gramos de carboximetilcelulosa (Sigma) en 500 ml de WFI y se mezcló hasta la mañana siguiente a 4°C. La solución se sometió a autoclave a 121°C.

El polvo resultante de la desecación por pulverización se reconstituyó en una solución que contenía manitol al 5%, carboximetilcelulosa al 0,3% y timerosol 1:5000. La solución final se dividió en alícuotas en viales de 3 ml y se liofilizó usando un Lyophilizer (USIFROID). El polvo liofilizado representa el rPauA microencapsulado. El antígeno de subunidad proteica microencapsulado se resuspendió en 2 ml de emulsión de aceite en agua microfluidizada que contenía una formulación de AMPHIGEN® (tal como la emulsión microfluidizada que se describe en el Ejemplo 20) y que se usa como vacuna.

### **EJEMPLO 17**

#### **Preparación de una formulación de vacuna microfluidizada que contiene antígeno bacteriano de células enteras y antígeno de proteína recombinante en emulsión de aceite en agua**

Se prepararon dos preparaciones de vacunas que contenían proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante y células bacterianas de *Escherichia coli*, se añadieron de forma intrínseca a emulsiones de aceite en

agua como se describe en los Ejemplos 2 y 3. El antígeno PauA recombinante estaba en una concentración de 100 µg por dosis y las células de E. coli daban un recuento final de  $4 \times 10^9$  por dosis. Las composiciones de adyuvantes en emulsión de las dos formulaciones de vacuna se muestran en la Tabla 16.

5      **Tabla 16. Formulaciones de vacunas que contienen tanto proteína recombinante como células enteras de E. coli**

| Tratamiento | Antígeno      | Adyuvante                                                                                   |
|-------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| T01         | Placebo       | Solución salina                                                                             |
| T02         | Pau A/E. coli | SEAM-14                                                                                     |
| T03         | Pau A/E. coli | Amphigen al 2,5%, 0,5 mg de GPI-0100, 0,5 mg de colesterol                                  |
| T04         | Pau A/E. coli | Amphigen al 2,5%, 0,5 mg de bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), 0,5 mg de colesterol |

### **EJEMPLO 18**

10      **Respuesta inmunitaria a vacuna microfluidizada que contiene rPauA y agentes bacterianos de células enteras en emulsión de aceite en agua**

En este experimento se usaron vacas lecheras maduras. Los animales estaban al final de su primera o segunda lactancia en el momento de la admisión. Se administraron por vía subcutánea 2 ml de cada formulación de vacuna tres veces, una en el momento de secado (D - 0), 28 días después (D =

28) y de nuevo 4 a 10 días después del parto (C + 4 – C+10). La primera y tercera dosis se administraron en el lado izquierdo del cuello y la segunda se administró en el lado derecho del cuello. Se extrajo sangre antes de cada vacunación y aproximadamente 14 días y 32 días después de la tercera  
5 vacunación. La valoración de anticuerpos para E. coli y el antígeno rPauA se determinaron mediante ELISA. Como se muestra en la **Figura 8**, los resultados indican que la valoración de anticuerpos para rPauA era superior en el grupo vacunado con la formulación de vacuna que contiene GPI-0100 como inmunoestimulante y era máxima el día 70 después de la vacunación inicial. La  
10 valoración de anticuerpos para antígeno contra E. coli se muestra en la **Figura 9**. La valoración de anticuerpos contra antígeno de E. coli era comparable en ambas formulaciones de vacunas, aunque la presencia de GPI-0100 como inmunoestimulante indujo una valoración de anticuerpos relativamente mayor comparada con la formulación con DDA como inmunoestimulante.

15

### **EJEMPLO 19**

#### **Análisis de actividad viricida de las preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada**

Para determinar si la microfluidización inactiva el virus, se determinó la  
20 actividad viricida de tres preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada. Las tres preparaciones contenían tres virus infecciosos bovinos diferentes, específicamente virus del herpes bovino (BHV), virus de paragripe 3 (PI3), y virus sintial respiratorio bovino (BRSV).

La detección de la actividad viricida de las tres preparaciones de  
25 vacunas se realizó de acuerdo con los requisitos de la USDA 9CFR-113.35.

Los resultados que se muestran en la Tabla 17 indican que la microfluidización de las preparaciones de vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® no provoca inactivación significativa de la preparación de vacuna.

5 **Tabla 17. Análisis de actividades viricidas de vacunas microfluidizadas**

| Serie      | BRSV | BHV  | PI3  |
|------------|------|------|------|
| A          | 0    | 0,2  | 0    |
| AM200      | -0,2 | 0    | -0,2 |
| AM75       | 0    | -0,3 | -0,3 |
| AM75 a 37C | 0,1  | -0,3 | -0,2 |
| B          | 0    | -0,1 | -0,2 |
| BM200      | 0    | 0    | -0,2 |
| BM75       | -0,2 | -0,5 | 0    |
| BM75 a 37C | 0,5  | -0,5 | 0    |
| C          | 0,1  | -0,1 | -0,2 |
| CM200      | -0,2 | -0,1 | -0,2 |
| CM75       | 0,1  | 0,5  | -0,2 |
| CM75 a 37C | 0,5  | 0,5  | -0,2 |

A = colesterol añadido a 650 ml/minuto

B = colesterol añadido a 28 ml/minuto

C = colesterol añadido a 5 ml/minuto

10

M200 = microfluidizada con tamiz de 200 micras

M75 = microfluidizada con tamiz de 75 micras

M75 a 37°C = fluidos calentados a 37°C antes de microfluidización

Un valor por encima de 0,7 es indicador de efecto viricida.

5

## **EJEMPLO 20**

### **Preparación de una formulación de AMPHIGEN® microfluidizada**

Se preparó una formulación de AMPHIGEN® combinando solución de aceite de lecitina DRAKEOL (aceite mineral ligero con lecitina al 25%) y TWEEN 80 (con la concentración final de 0,18%) y Span 80 (con la

10 concentración final de 0,08%) mezclando durante 8-22 horas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . La mezcla de aceite se añadió después a solución salina con ayuda de un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm. Subsiguientemente la mezcla se pasó una vez por un microfluidizador con una cámara de interacción de 200  $\mu\text{m}$  a  $31.027,5 \pm 3.447,5$  kPa . Las Figuras 10 A y

15 10 B muestran la estabilidad de la formulación de AMPHIGEN® microfluidizada. La distribución del tamaño de partículas, medida por difracción de láser, en el momento inicial de partida (**Figura 10A**) era casi idéntico a la distribución de tamaño de partícula después de 22 meses de almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  (**Figura 10B**).

20

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo contenido en las siguientes:

### **REIVINDICACIONES**

5

1. Una emulsión submicrométrica de aceite en agua de utilidad como adyuvante de vacuna que comprende un aceite no metabolizable hidrocarburo ligero, un tensioactivo y un componente acuoso, en la que dicho aceite está disperso en dicho componente acuoso y el tamaño medio de gota de aceite es

10 inferior a 1  $\mu\text{m}$ .

2. La emulsión de la reivindicación 1, en la que dicho aceite es aceite mineral ligero y está en una cantidad de 1% a 50% v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está en una cantidad de 0,01% a 10% v/v, y en la que  
15 dicho aceite está disperso en dicho componente acuoso y el tamaño medio de gota de aceite está entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,5  $\mu\text{m}$ .

3. Una emulsión submicrométrica de aceite en agua de utilidad como adyuvante de vacuna que comprende aproximadamente 40% v/v de aceite  
20 mineral, aproximadamente 10% p/v de lecitina, aproximadamente 0,18% v/v de TWEEN-80, aproximadamente 0,08% v/v de SPAN-80 y una fase acuosa, en la que dicho aceite está disperso en dicha fase acuosa y el tamaño medio de gota de aceite está entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,5  $\mu\text{m}$ .

25 4. Un procedimiento para preparar una emulsión submicrométrica de aceite

en agua que comprende:

(a) preparar una mezcla combinando un aceite no metabolizable hidrocarburo ligero, un tensioactivo y un componente acuoso;

(b) someter dicha mezcla a un procedimiento de emulsificación primario para producir una emulsión de aceite en agua que tiene un tamaño medio de gota de aceite de 1,0  $\mu\text{m}$  a 1,1  $\mu\text{m}$ ; y

(c) someter la emulsión de aceite en agua preparada en (b) a microfluidización para producir dicha emulsión submicrométrica de aceite en agua, en el que la emulsión submicrométrica tiene un tamaño medio de gota de aceite inferior a 1  $\mu\text{m}$ .

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho aceite es aceite mineral ligero y está en una cantidad de 1% a 50% v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está en una cantidad de 0,01% a 10% v/v y en el que dicho tamaño medio de gota de aceite de dicha emulsión submicrométrica está entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,5  $\mu\text{m}$ .

6. Una composición de vacuna que comprende una emulsión de aceite en agua y un antígeno, en el que dicho antígeno está disperso en dicha emulsión, dicha emulsión comprende un aceite no metabolizable hidrocarburo ligero, un tensioactivo y un componente acuoso, y en la que dicho tamaño medio de gota de aceite de dicha emulsión es inferior a 1  $\mu\text{m}$ .

7. La composición de vacuna de la reivindicación 6, en la que dicho aceite es aceite mineral ligero y está en dicha composición de vacuna en una cantidad

de 1% a 20% v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está presente en dicha composición de vacuna en una cantidad de 0,01% a 10% v/v, y en la que dicho tamaño medio de gota de aceite está entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,5  $\mu\text{m}$ .

- 5 8. La composición de vacuna de la reivindicación 6, en la que dicho antígeno es un antígeno vírico o un antígeno bacteriano.

9. La composición de vacuna de la reivindicación 8, en la que dicho antígeno vírico comprende Virus de Diarrea Bovino Tipo 1 o Tipo 2 inactivado y

- 10 en la que dicho antígeno bacteriano comprende al menos uno de una bacteria *Leptospira* inactivada, la proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante o una preparación de células de *E. coli*.

10. Un procedimiento para preparar una composición de vacuna que  
15 comprende:

(a) preparar una mezcla combinando un aceite no metabolizable hidrocarburo ligero, un tensioactivo y un componente acuoso;

(b) añadir un antígeno a la mezcla formada en (a);

- (c) someter la mezcla que contiene dicho antígeno, que se forma en (b),  
20 a un procedimiento de emulsificación primario para producir una emulsión de aceite en agua que tiene un tamaño medio de gota de aceite de 1,0  $\mu\text{m}$  a 1,1  $\mu\text{m}$ ; y

- (d) someter la emulsión preparada en (c) a microfluidización para producir dicha composición de vacuna, en el que la composición tiene un  
25 tamaño medio de gota de aceite inferior a 1  $\mu\text{m}$ .

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho aceite es aceite mineral ligero y está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 1% a 20% v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está presente en dicha  
5 composición de vacuna en una cantidad de 0,01% a 10% v/v y en el que dicho tamaño medio de gota de aceite está entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,5  $\mu\text{m}$ .

12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho antígeno es un antígeno vírico o un antígeno bacteriano.

10

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho antígeno vírico comprende Virus de Diarrea Bovino Tipo 1 o Tipo 2 inactivado y en el que dicho antígeno bacteriano comprende al menos uno de una bacteria *Leptospira* inactivada, la proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante o una  
15 preparación de células de *E. coli*.

14. Una composición de vacuna que comprende un antígeno microencapsulado y una emulsión de aceite en agua, en la que dicho antígeno microencapsulado está disperso en dicha emulsión, y dicha emulsión  
20 comprende un aceite no metabolizable hidrocarburo ligero, un tensioactivo y un componente acuoso, y en la que el tamaño medio de gota de aceite de dicha emulsión es inferior a 1  $\mu\text{m}$ .

15. La composición de vacuna de la reivindicación 14, en la que dicho aceite  
25 es aceite mineral ligero y está presente en dicha composición de vacuna en

una cantidad de 1,0% a 20% v/v, dicho tensioactivo comprende lecitina y está presente en dicha composición de vacuna en una cantidad de 0,01% a 10% v/v, dicho antígeno es un antígeno vírico o un antígeno bacteriano y está encapsulado en un vehículo particulado, y en la que dicho vehículo comprende

5 ácido polilactidaglicólico.

### **RESUMEN**

Esta invención proporciona emulsiones submicrométricas de aceite en agua de utilidad como adyuvante de vacuna para potenciar la capacidad  
5 inmunógena de antígenos. La presente invención proporciona también composiciones de vacunas que contienen un antígeno combinado con emulsiones de ese tipo de forma intrínseca o extrínseca. La presente invención proporciona también procedimientos para preparar las emulsiones y vacunas.

Figura 1

**Mezclado primario mediante homogenización por mezclado ultrarrápido  
del Cattlemaster más vacuna**

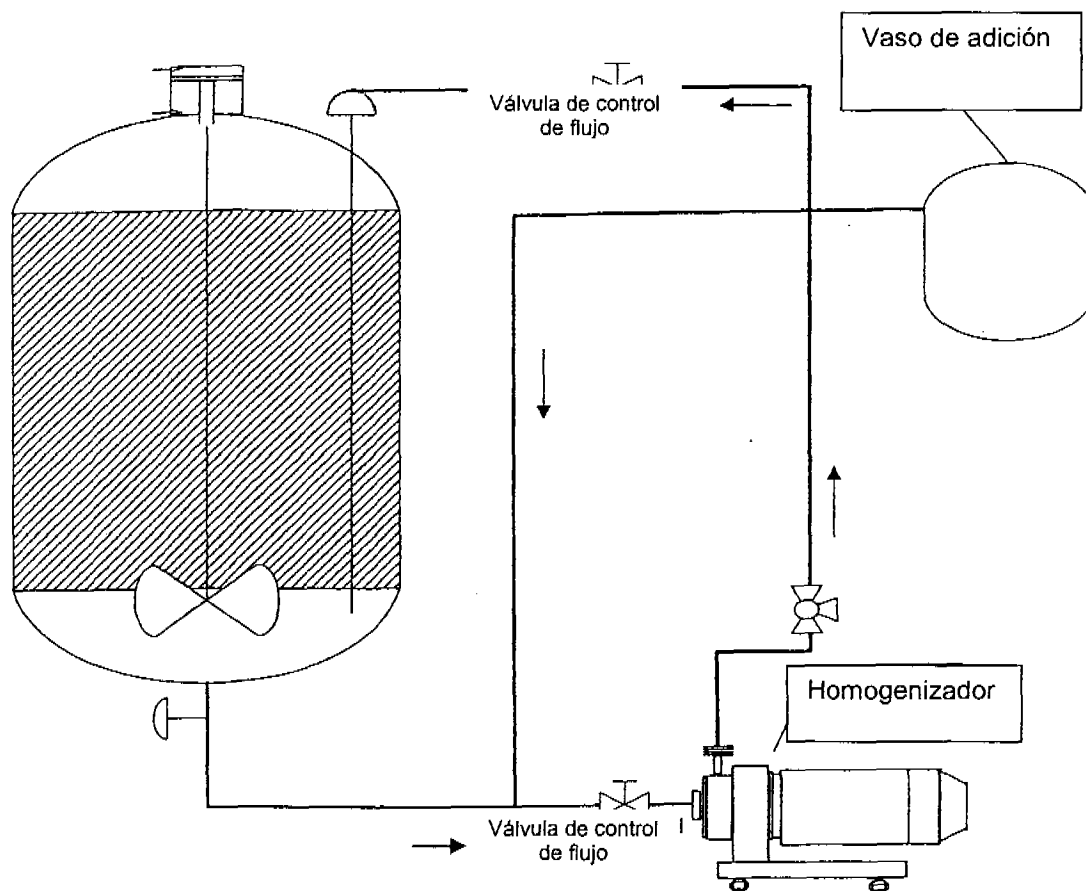
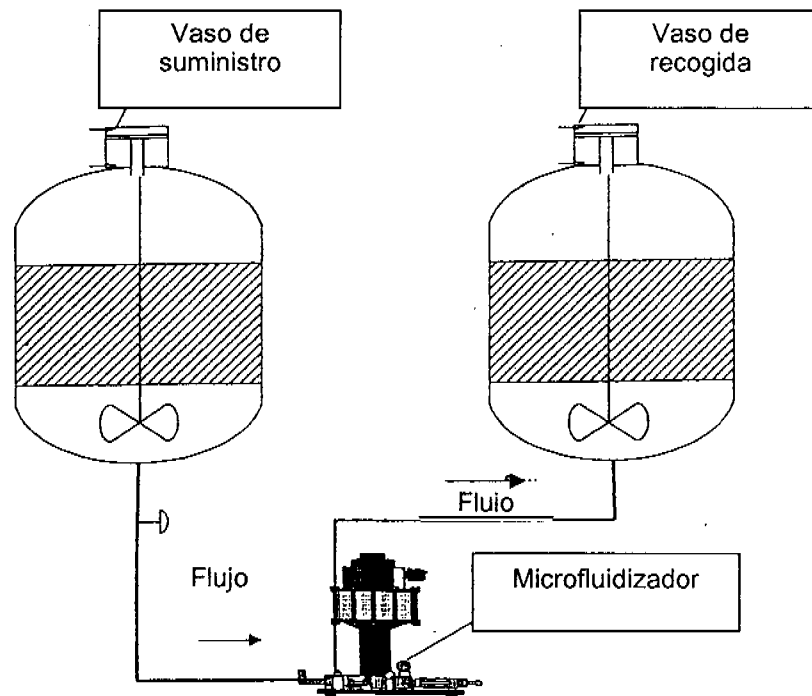


Figura 2

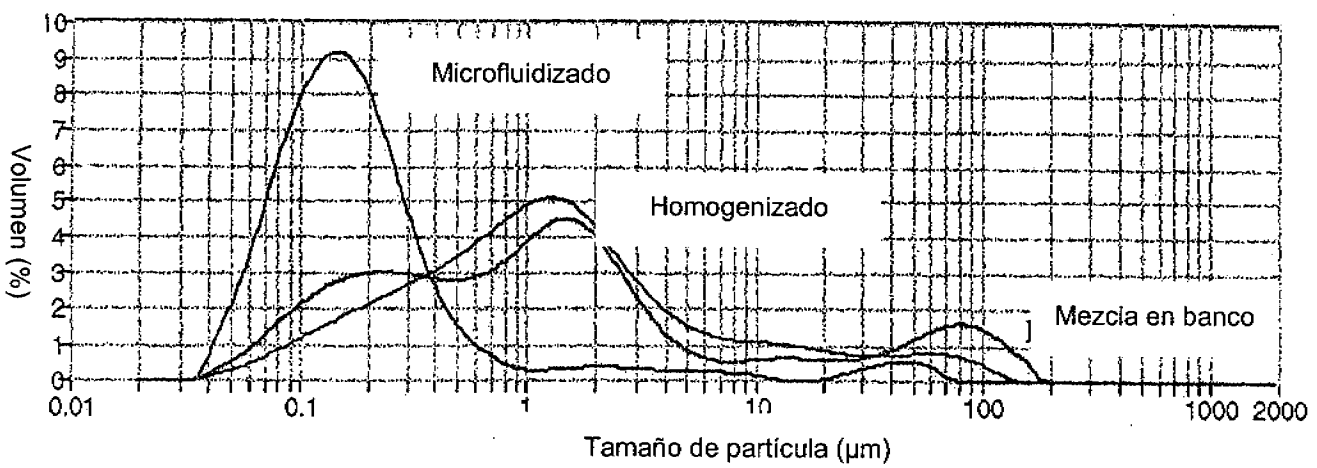
**Mezclado secundario mediante microfluidización del Cattlemaster más vacuna**



125

Figura 3

Distribución del tamaño de partícula entre mezclas



**Figura 4**  
**Tres modos de dispersión**



127

Figura 5

Media geométrica de serología contra BVD Tipo II

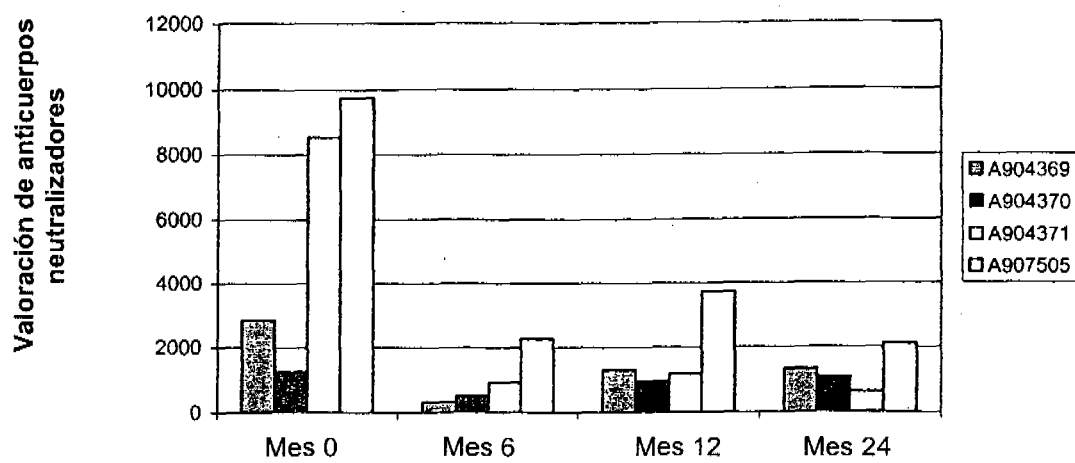


Figura 6

Media de mínimos cuadrados de temperaturas rectales del ganado antes y después de la administración de los artículos de experimentación

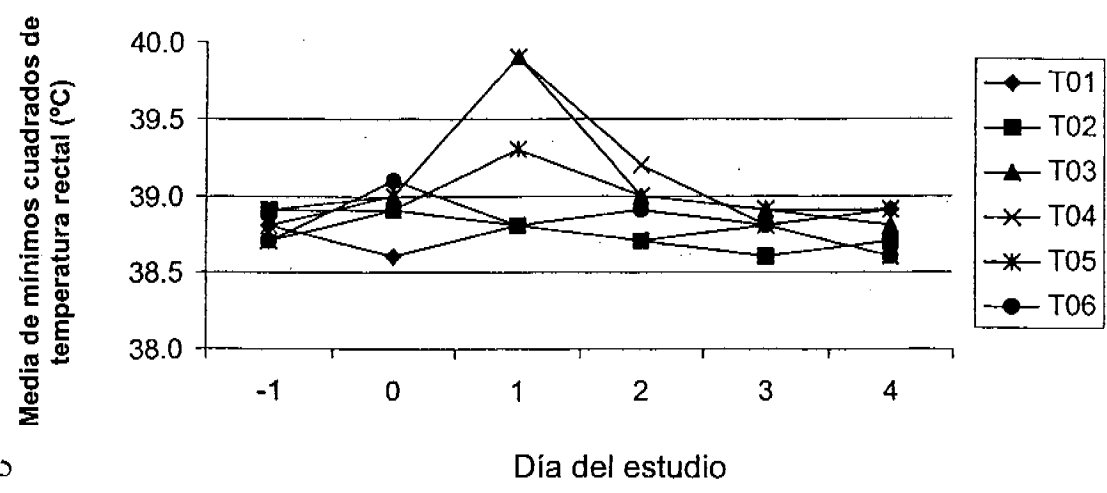
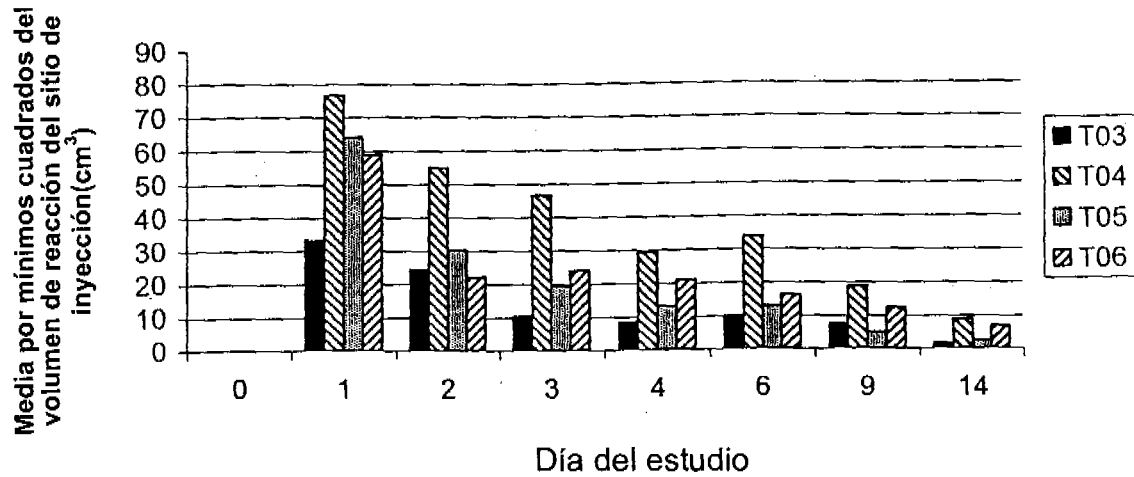


Figura 7

Media por mínimos cuadrados de volúmenes de reacción en los sitios de inyección observados en el ganado después de la administración de los artículos de experimentación



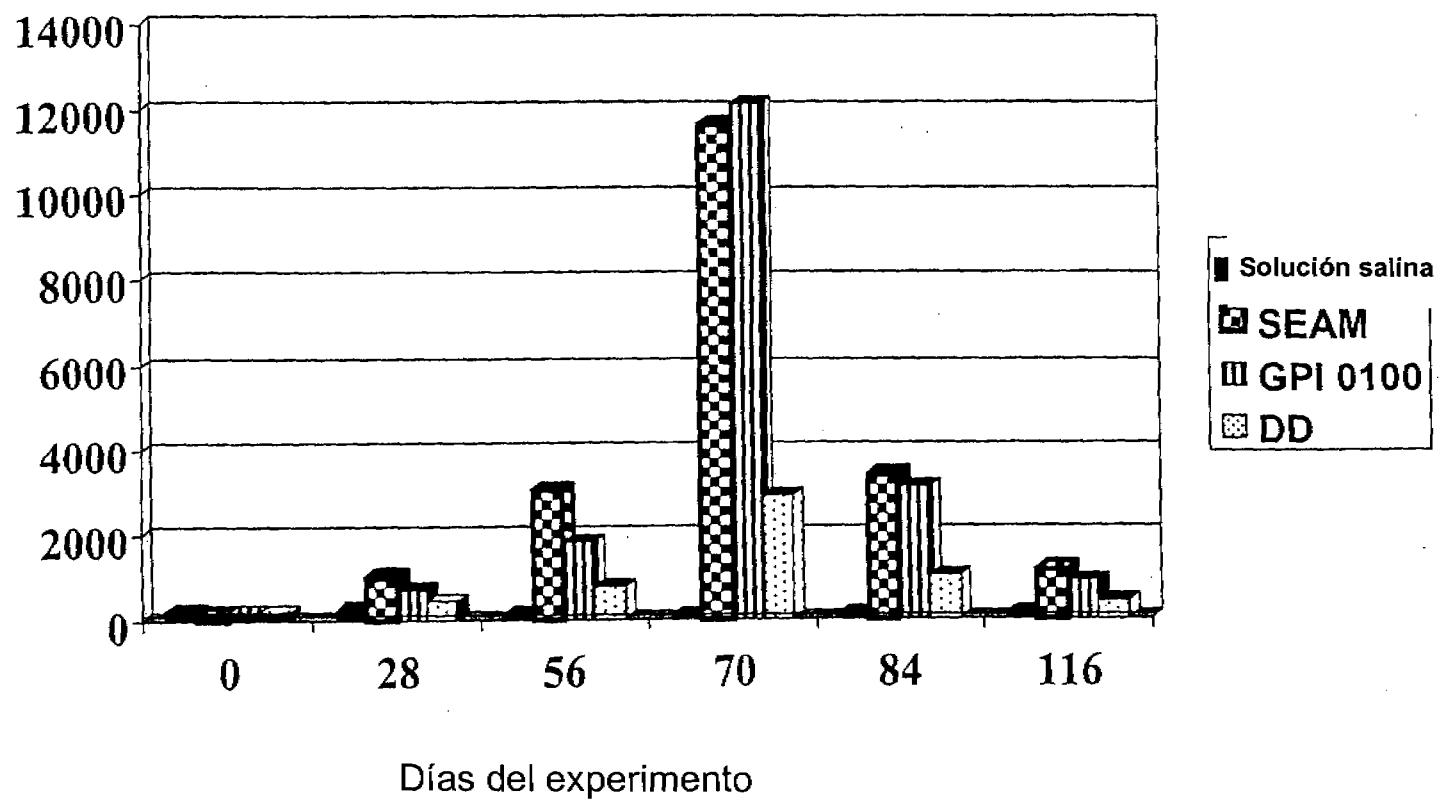
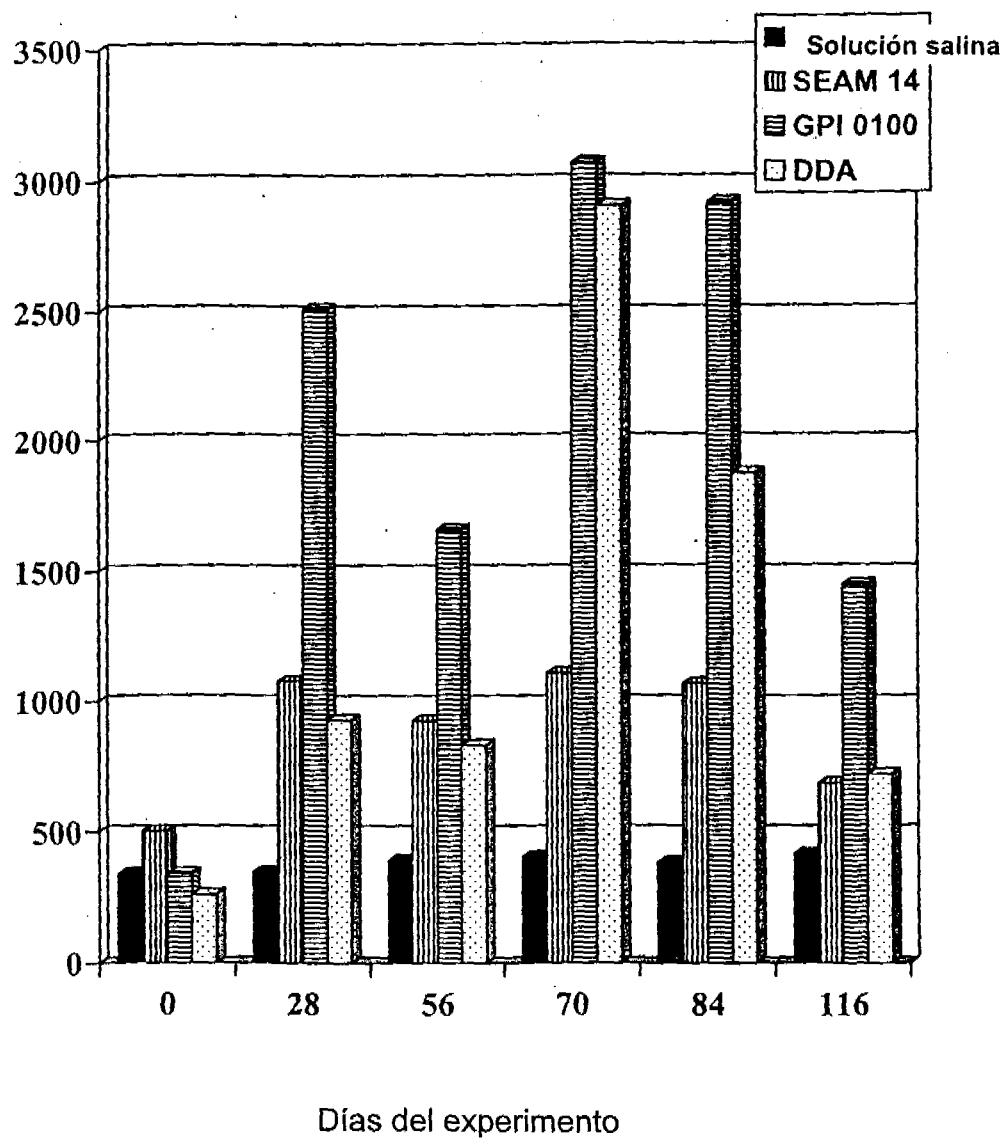


Figura 8

**Figura 9**  
**Media geométrica de valoraciones de IgG – J5**



132  
100

**Figura 10A**  
**Formulación de Amphigen microfluidizada**

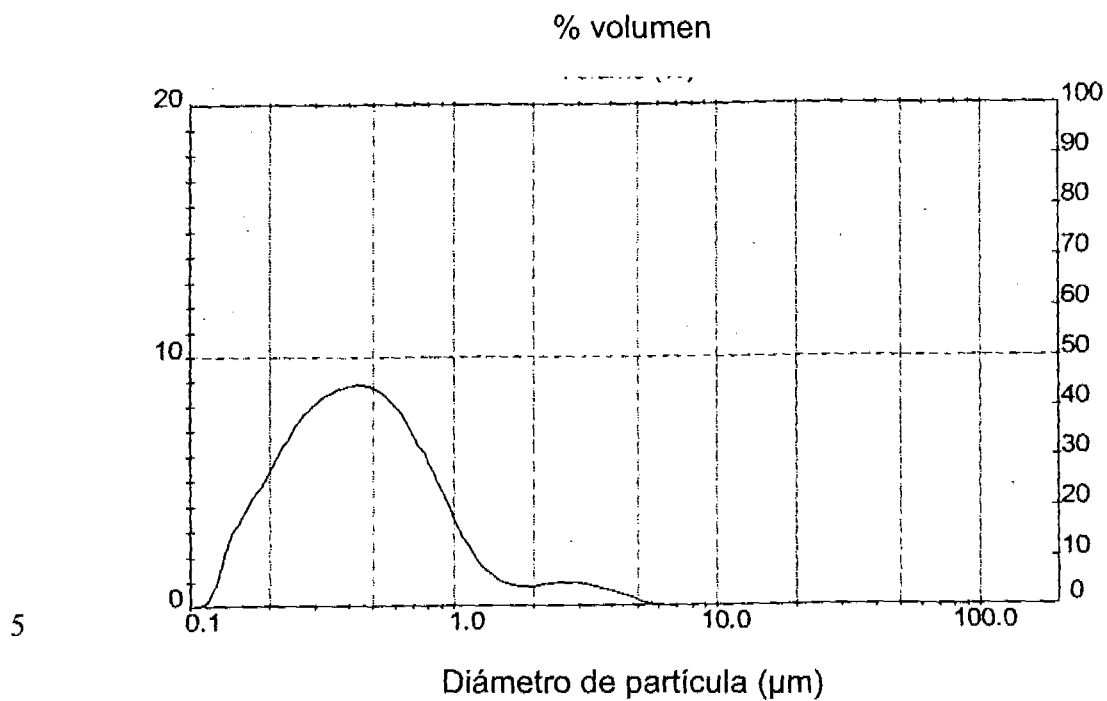
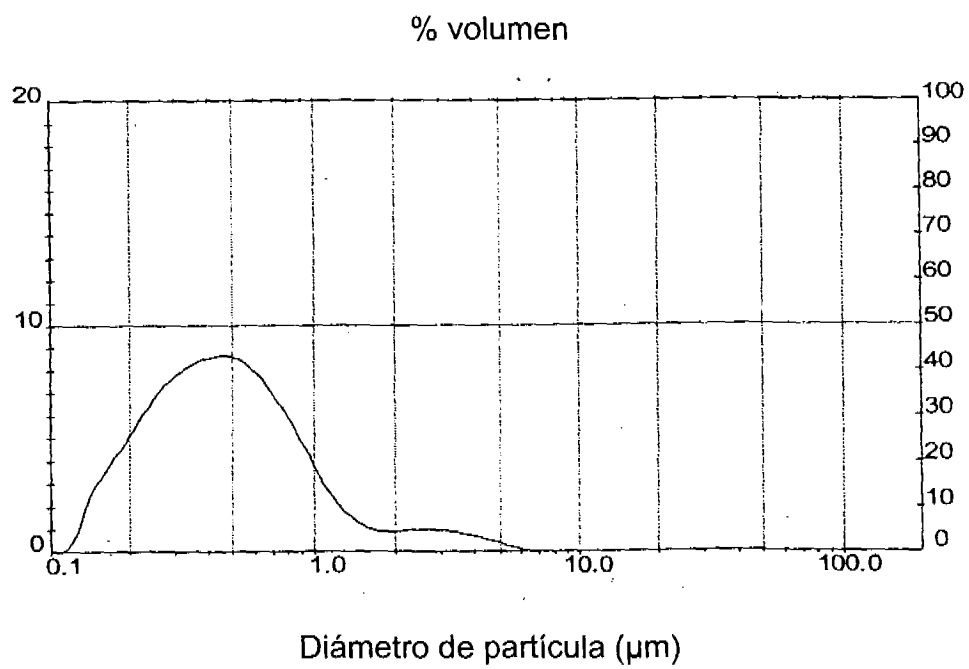


Figura 10B

Amphigen al 40% microfluidizado a los 22 meses



134

**TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES  
PCT**

**NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN  
PRELIMINAR INTERNACIONAL**

(PCT Regla 71.1)

De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:

LUMB, J. TREVOR

PFIZER INC

201 Tabor Road,

Morris Plains, New Jersey 07950

Estados Unidos de América.

Sello de recibido 9 de marzo de 2005, MOPS IP GLBL SRVS

Fecha de expedición: 02.03.2005

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC25328A

Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/000937

Fecha de presentación internacional: 22.03.2004

Fecha de prioridad: 04.04.2003

Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC. et. al.

1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.
2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.

**4. RECORDATORIO**

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39.1) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al

135  
123

solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea P.B. 5818 Patentlaan 2

NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas

Tel: +31 70 340-2040, Tx : 31 651 epo nl

Fax: +31 70 340-3016

Funcionario Autorizado: Wallentin, M

Tel: + 31 70 340-3991

136

**TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES**  
**PCT**  
**INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD**  
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)  
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC25328A  
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/000937  
Fecha de presentación internacional: 22.03.2004  
Fecha de prioridad: 04.04.2003  
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: A61K39/39  
Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC et. al.

1. El presente informe preliminar internacional sobre patentabilidad, se establece por esta Administración encargada del examen preliminar internacional según el Artículo 35 y se transmite al solicitante conforme el Artículo 36.

2. Este INFORME consta de un total de 7 hojas, incluida la presente hoja de portada.

3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.

a. ☐ (*remitido al solicitante y a la oficina internacional*) un total de      hojas, descritas a continuación:

☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).

☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.

b. ☐ (*remitido únicamente a la Oficina Internacional*) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s))     , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- 137
- |                                     |               |                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro I    | Base de este informe                                                                                                                                                 |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro II   | Prioridad                                                                                                                                                            |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro III  | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial                                                                   |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro IV   | Falta de unidad de Invención                                                                                                                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro V    | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro VI   | Ciertos documentos citados                                                                                                                                           |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro VII  | Defectos en la Solicitud Internacional                                                                                                                               |
| <input type="checkbox"/>            | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional                                                                                                                 |

Fecha de radicación de la demanda: 16.04.2004

Fecha de elaboración de este reporte: 02.03.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen

Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea P.B. 5818 Patentlaan 2

NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas

Tel: +31 70 340-2040, Tx : 31 651 epo nl

Fax: +31 70 340-3016

Funcionario Autorizado: Noë, V

Tel: + 31 70 340-4181

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban

más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

\* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

---

**Recuadro V      Declaración razonada según el Artículo 35(2) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial: anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración**

---

1.      Declaración

|                            |                                                                        |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Novedad (N)                | Si:    Reivindicaciones 3-5, 10-15<br>No:    Reivindicaciones 1, 2 6-9 |
| Nivel Inventivo (NI)       | Si:    Reivindicaciones<br>No:    Reivindicaciones 1-15                |
| Aplicación Industrial (AI) | Si:    Reivindicaciones 1-15<br>No:    Reivindicaciones                |

2.      Citas y explicaciones (Regla 70.7)

**ver hoja adjunta.**

140  
138

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD -  
HOJA ANEXA  
Solicitud Internacional No. **PCT/IB2004/000937**

V. Declaración razonada (Continuación)

1. CITACIONES

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: EP-A-1 023 904 (PFIZER PROD INC) 2 AGO 2000 (2000-08-02)  
D2: US-B-6 274 1491 (GANNE VINCENT) 14 AGO 2001 (2001-08-14)  
D3: US-B-6 451 3251 (VAN NEST GARY ET AL) 17 SEP 2002 (2002-09-17)  
D4: US-A-5 961 970 (AVIV HAIM ET AL) 5 OCT 1999 (1999-10-05)  
D5: US-B-6 306 4051 (O'HAGAN DEREK ET AL) 23 OCT 2001 (2001-10-23)  
D6: WO 93/24147 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP; GERBER JAY DEAN (US) 9 DIC 1993 (1993-12-09).

2. NOVEDAD (Art. 33(2) PCT)

1. El Documento 1 revela una vacuna aceite submicron en emulsión de agua adyuvante que comprende un aceite mineral liviano y un surfactante que comprende lecitina con un tamaño medio de gotita de aceite menor de 1  $\mu$ m y composiciones de vacuna que comprenden este adyuvante (ver abstracto; parágrafos 7-13, 16, 32-35, 39, 50, 54, 57, 64). En vista del D1, la materia de la reivindicación 1, 2, 6-9 no es novedosa.
2. El Documento 2 revela aceite en microemulsiones de agua para uso como adyuvante de vacuna comprendiendo un aceite mineral y un surfactante (ej. Lecitinas, entre) y composiciones de vacuna comprendiendo este (ver columna 3, línea 26-34; columna 3, línea 49-63; columna 4, líneas 15, 23, 49-51; columna 6, línea 50-65). En vista de D2 la materia de la reivindicación no es novedosa.
3. El Documento 3 revela una composición adyuvante que comprende un aceite (Ej. alkanes, alkenes, alkynes y sus correspondiente ácidos y alcoholes los éteres y esteres teniendo 6 a 30 átomos de carbón (ver descripción de la presente página de aplicación 8, línea 35-38), un surfactante y una fase acuosa con un tamaño de gotita menor de 1  $\mu$ m y composiciones de vacuna comprendiendo este adyuvante. En vista del Documento 3, la materia de reivindicaciones 1, 6, 8 no es novedosa.

4. La presente aplicación no satisface el criterio establecido en el

Artículo 33(2) PCT porque la materia de las reivindicaciones 1, 2, 6-9 no es novedosa con respecto del arte previo según está definido en las regulaciones (Regla 64(1)-(3) PCT).

3. NIVEL INVENTIVO (Art. 33 (3) PCT)

1. La reivindicación dependiente 3 no contiene ninguna característica adicional que, en combinación con las características de alguna reivindicación a la cual ellos se refieren, incluya un paso inventivo porque la selección de los porcentajes de Tween-80 y SPAN-80 meramente una de varias posibilidades directas de las cuales la persona preparada seleccionaría, sin el ejercicio de habilidad inventiva, con el fin de hacer una emulsión y estos porcentajes han sido revelados en D6 (ver página 4, línea 5-34).

2. Para análisis del nivel inventivo de las reivindicaciones 4 y 10, en relación con un método para hacer un aceite submicron en emulsión de agua útil como una vacuna adyuvante o para un método para hacer una vacuna comprendiendo esta vacuna adyuvante, se considera que D4 representa el más relevante avance y revela un método para hacer un aceite submicron en emulsión de agua comprendiendo: (a) hacer una mezcla de aceite, un surfactante y agua + antígeno (b) emulsificación a una emulsión de tamaño de micrón (c) acomodar el tamaño de la emulsión a grado de submicron mediante alta homogenización de corte (columna 10, línea 47-65). La materia de las reivindicaciones 4 y 10 difieren en que un aceite metabolizable fue usado para hacer un aceite submicron en emulsión de agua.

3. El problema a ser resuelto por la materia de la reivindicación puede por lo tanto ser considerado como la provisión de un aceite alterno. La solución sería la provisión de aceite no metabolizable de hidrocarbón ligero.

4. Esta solución no puede sin embargo considerarse que incluya un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT) porque el uso de un aceite no-metabilizable de carbón ligero en un aceite submicron en una vacuna adyuvante en emulsión de agua ha sido revelado en D1 (ver parágrafo 11) D2 (ver columna 3, línea 49-63) y D3 (ver columna 3, línea 34-38). Por lo tanto, la materia de las reivindicaciones 4 y 10 no son considerados que incluyan un nivel inventivo.

5. Las reivindicaciones dependientes 5, 11, 13 no contienen ningunas características adicionales, que, en combinación con las

1211  
139

142  
140

características de alguna reivindicación a las que ellas se refieren, contengan un paso inventivo porque las cantidades de aceite y surfactante y el tamaño de gotita de aceite son revelados en el D4 (ver abstracto, columna 5, línea 7-19; columna 6, línea 47-50), y D1, D2, D3. La adición de antígeno viral o bacterial también ha sido revelada en D1-D4 y sería obvio para la persona experta.

6. Para el análisis del nivel inventivo de la reivindicación 14, el D5 consideró representar el avance más relevante y revela una composición de vacuna que incluye antígeno microencapsulado y un aceite submicrón en emulsión de agua que incluye esqualeno y surfactante y una fase acuosa (ver columna 3, línea 25-60; columna 4, línea 29-48; columna 7, línea 28-29; columna 8, línea 15-16 y 65-63; columna 9, línea 18-31; columna 11, línea 17-30, y 48-63; columna 12, línea 23-53). La materia de la reivindicación 14 difiere en que el esqualeno fue usado como aceite para hacer el aceite submicrón en emulsión de agua en cambio de un aceite no-metabolizable de hidrocarbón ligero.

7. El problema a ser resuelto por la materia de la reivindicación 14 puede por lo tanto ser considerado como la provisión de aceite alterno. La solución sería la provisión de un aceite no metabolizable de hidrocarbón ligero.

8. Esta solución no se puede sin embargo considerar que incluya un nivel inventivo (Artículo 33 (3) PCT) porque el uso de una vacuna de aceite no metabolizable de hidrocarbón ligero en emulsión de agua ha sido revelado en D1 (ver parágrafo 11), D2 (ver columna 3, línea 49-63) y D3 (ver columna 3, línea 34-38). Por lo tanto, La materia de la reivindicación 14 no es considerado que incluya un paso inventivo.

La reivindicación dependiente 15 no contiene ninguna característica adicional, que, en combinación con las características de cualquier reivindicación a las que ellas se refieren, incluya un paso inventivo porque las cantidades de aceite y surfactante que incluyan lecitina son reveladas en D1-D4 y el uso de ácido poliláctido glicólico para encapsular el antígeno ha sido revelado en D5 (ver columna 4, línea 29-48; columna 9, línea 18-31).

9. La presente aplicación por lo tanto no satisface el criterio establecido en el Artículo 33(3) PCT y la materia de las reivindicaciones 3-5, 10-15 no incluye un nivel inventivo (Regla 65 (2) PCT).

#### VIII. Ciertas observaciones (Continuación)

- 143  
171
4. El término "cerca de" "más o menos" (ABOUT) usado en la reivindicación 3 es vago e indefinido y como tal torna el alcance de la reivindicación no claro, por consiguiente, la reivindicación requiere enmienda para retirar este defecto (Art. 6 PCT).
  5. El número "18%" en la reivindicación 3 debe ser reemplazado por "0.18%" con el fin de hacer clara esta reivindicación (Art. 6 PCT).
  6. El uso de marcas comerciales en las reivindicaciones no es permitido y por lo tanto la reivindicación 3 debe ser enmendada para remover los términos TWEEN-80 y SPAN-80 con el fin de satisfacer los requerimientos de Art. 6 PCT.
  7. La expresión "útil como adyuvante de vacuna" en la reivindicación 1 de composición no es clara, no es considerada como una característica técnica limitando el alcance de la reivindicación 1 (Art. 6 PCT).

MAR 9 2005

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

MOPS IP GLBL SRVS  
PCT

To:

LUMB J. Trevor  
PFIZER Inc  
201 Tabor Road, Morris Plains,  
New Jersey 07950  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing  
(day/month/year)

02.03.2005

Applicant's or agent's file reference  
PC25328A

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/IB2004/000937

International filing date (day/month/year)  
22.03.2004

Priority date (day/month/year)  
04.04.2003

Applicant  
PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas  
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl  
Fax: +31 70 340 - 3016

Authorized Officer

Wallentin, M

Tel. +31 70 340-3991



# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |                                                                       |  |                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>PC25328A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  | <b>FOR FURTHER ACTION</b>                                             |  | See Form PCT/IPEA/416                        |
| International application No.<br>PCT/IB2004/000937                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  | International filing date (day/month/year)<br>22.03.2004              |  | Priority date (day/month/year)<br>04.04.2003 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>A61K39/39                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |                                                                       |  |                                              |
| Applicant<br>PFIZER PRODUCTS INC. et al.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                                       |  |                                              |
| <p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows:</p> <p><input type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).</p> <p><input type="checkbox"/> sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).</p> |  |                                                                       |  |                                              |
| <p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the opinion</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |                                                                       |  |                                              |
| Date of submission of the demand<br><br>16.04.2004                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  | Date of completion of this report<br><br>02.03.2005                   |  |                                              |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:<br> European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas<br>Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl<br>Fax: +31 70 340 - 3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  | Authorized Officer<br><br>Noë, V<br><br>Telephone No. +31 70 340-4181 |  |                                              |

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No. 1416  
PCT/IB2004/000937

**Box No. I Basis of the report**

1. With regard to the **language**, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
  - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
  - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the **elements**\* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

**Description, Pages**

1-38 as originally filed

**Claims, Numbers**

1-15 as originally filed

**Drawings, Sheets**

1/6-6/6 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing (*specify*):
  - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing (*specify*):
  - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

\* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

107  
100

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No. **PCT/IB2004/000937**

---

**Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

---

1. Statement

|                               |             |           |
|-------------------------------|-------------|-----------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | 3-5,10-15 |
|                               | No: Claims  | 1,2,6-9   |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims |           |
|                               | No: Claims  | 1-15      |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-15      |
|                               | No: Claims  |           |

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

**see separate sheet**

**V. Reasoned statement (Continuation)**

**1. CITATIONS**

Reference is made to the following documents:

- D1: EP-A-1 023 904 (PFIZER PROD INC) 2 August 2000 (2000-08-02)
- D2: US-B-6 274 1491 (GANNE VINCENT) 14 August 2001 (2001-08-14)
- D3: US-B-6 451 3251 (VAN NEST GARY ET AL) 17 September 2002 (2002-09-17)
- D4: US-A-5 961 970 (AVIV HAIM ET AL) 5 October 1999 (1999-10-05)
- D5: US-B-6 306 4051 (O'HAGAN DEREK ET AL) 23 October 2001 (2001-10-23)
- D6: WO 93/24147 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ; GERBER JAY DEAN (US)) 9 December 1993 (1993-12-09)

**2. NOVELTY (Art. 33(2) PCT)**

- 1. D1 discloses a submicron oil in water emulsion vaccine adjuvant comprising a light mineral oil and a surfactant comprising lecithin with a mean oil droplet size of less than 1  $\mu\text{m}$  and vaccine compositions comprising this adjuvant (see abstract; paragraphs 7-13,16,32-35,39,50,54,57,64). In view of D1, the subject-matter of claims 1,2,6-9 is not novel.
- 2. D2 discloses oil in water microemulsions for use as vaccine adjuvant comprising a mineral oil and a surfactant (e.g. lecithins, tweens) and vaccine compositions comprising this adjuvant (see column 3, line 26-34; column 3, line 49-63; column 4, lines 15,23,49-51; column 6, line 50-65). In view of D2, the subject-matter of claims 1,2,6-9 is not novel.
- 3. D3 discloses an adjuvant composition comprising an oil (e.g. alkanes, alkenes, alkynes and their corresponding acids and alcohols, the ethers and esters thereof having 6 to 30 carbon atoms (see description of the present application page 8, line 35-38)), a surfactant and an aqueous phase with a droplet size of less than 1  $\mu\text{m}$  and vaccine compositions comprising this

adjuvant. In view of D3, the subject-matter of claims 1,6,8 is not novel.

4. The present application does not satisfy the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject-matter of claims 1,2,6-9 is not new in respect of prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).

3. **INVENTIVE STEP** (Art. 33(3) PCT)

1. Dependent claim 3 does not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, involve an inventive step because the selection of the percentages of Tween-80 and SPAN-80 merely one of several straightforward possibilities from which the skilled person would select, without the exercise of inventive skill, in order to make an emulsion and these percentages have been disclosed in D6 (see page 4, line 5-34).
2. For inventive step analysis of claims 4 and 10, relating to a method for making a submicron oil in water emulsion useful as a vaccine adjuvant or to a method for making a vaccine comprising this vaccine adjuvant, D4 is considered to represent the most relevant state of the art and discloses a method for making a submicron oil in water emulsion comprising : (a) making a mixture of oil, a surfactant and water + antigen (b) emulsification to a micron size emulsion; (c) sizing of the emulsion to submicron range by high shear homogenization (column 10, line 47-65). The subject-matter of claims 4 and 10 differ in that a metabolizable oil was used to make the submicron oil in water emulsion.
3. The problem to be solved by the subject matter of claim may therefore be regarded as the provision of an alternative oil. The solution would be the provision of a light hydrocarbon non-metabolizable oil.
4. This solution cannot however be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) because the use of a light hydrocarbon non-metabolizable oil in a submicron oil in water emulsion vaccine adjuvant has been disclosed in D1, (see paragraph 11), D2 (see column 3, line 49-63) and

D3 (see column 3, line 34-38). Therefore, the subject-matter of claims 4 and 10 are not considered to involve an inventive step.

5. Dependent claims 5,11-13 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, involve an inventive step because the amounts of oil and surfactant and the oil droplet size are disclosed in D4 (see abstract; column 5, line 7-19; column 6, line 47-50) and D1, D2, D3. The addition of viral or bacterial antigen has also been disclosed in D1-D4 and would be obvious for the skilled person.
6. For inventive step analysis of claim 14, D5 is considered to represent the most relevant state of the art and discloses a vaccine composition comprising microencapsulated antigen and a submicron oil in water emulsion comprising squalene and surfactant and an aqueous phase (see column 3, line 25-60; column 4, line 29-48; column 7, line 28-29; column 8, line 15-16 and 65-63; column 9, line 18-31; column 11, line 17-30 and 48-63; column 12, line 23-53). The subject-matter of claim 14 differs in that squalene was used as oil to make the submicron oil in water emulsion instead of a light hydrocarbon non-metabolizable oil.
7. The problem to be solved by the subject matter of claim 14 may therefore be regarded as the provision of an alternative oil. The solution would be the provision of a light hydrocarbon non-metabolizable oil.
8. This solution cannot however be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) because the use of a light hydrocarbon non-metabolizable oil in a submicron oil in water emulsion vaccine adjuvant has been disclosed in D1, (see paragraph 11), D2 (see column 3, line 49-63) and D3 (see column 3, line 34-38). Therefore, the subject-matter of claim 14 is not considered to involve an inventive step.
9. Dependent claim 15 does not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, involve an inventive step because the amounts of oil and surfactant comprising lecithin are disclosed in D1-D4 and the use of polylactide glycolic acid to encapsulate the antigen has been disclosed in D5 (see column 4, line 29-48; column 9, line 18-31).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
REPORT ON PATENTABILITY  
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2004/000937

10. The present application does therefore not satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject-matter of claims 3-5,10-15 does not involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).

**VIII. Certain Observations (Continuation)**

- 4 The term "about" used in claim 3 is vague and indefinite and as such renders the scope of the claims unclear; accordingly, the claim requires amendment to remove this defect (Art. 6 PCT).
- 5 The number ".18%" in claim 3 should be replaced by "0.18%" in order to make this claim clear (Art. 6 PCT).
- 6 The use of trademarks in the claims is not allowed and therefore claim 3 should be amended to remove the terms "TWEEN-80" and "SPAN-80" in order to fulfill the requirements of Art. 6 PCT.
- 7 The expression "useful as vaccine adjuvant" in the composition claim 1 is not clear : it is not considered to be a technical feature limiting the scope of claim 1 (Art. 6 PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
14 October 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2004/087204 A3**

(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: **A61K 39/39**

(21) International Application Number:  
PCT/IB2004/000937

(22) International Filing Date: 22 March 2004 (22.03.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/460,301 4 April 2003 (04.04.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER PRODUCTS INC.** [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DOMINOWSKI, Paul, Joseph** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **KLOSE, Pamela, Kay** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US). **KREBS, Richard, Lee** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 601 West Cornhusker Highway, Lincoln, Nebraska 68521 (US). **MANNAN, Ramasamy, Mannar** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).

(74) Agents: **LUMB, J., Trevor** et al.; Pfizer Inc., 201 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:  
23 December 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MICROFLUIDIZED OIL-IN-WATER EMULSIONS AND VACCINE COMPOSITIONS

(57) Abstract: This invention provides submicron oil-in-water emulsions useful as a vaccine adjuvant for enhancing the immunogenicity of antigens. The present invention also provides vaccine compositions containing an antigen combined with such emulsions intrinsically or extrinsically. Methods of preparing the emulsions and vaccines are also provided by the present invention.

WO 2004/087204 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
T/1B2004/000937

153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K39/39

151

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)  
IPC 7 A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | EP 1 023 904 A (PFIZER PROD INC)<br>2 August 2000 (2000-08-02)                                                                                                                                                  | 1,2,6-9               |
| Y          | abstract<br><br>paragraphs '0007! - '0013!, '0016!,<br>'0032! - '0035!, '0039!, '0050!,<br>'0054!, '0057!, '0064!                                                                                               | 3-5,<br>10-15         |
| X          | US 6 274 149 B1 (GANNE VINCENT)<br>14 August 2001 (2001-08-14)<br>column 3, line 26 - line 34<br>column 3, line 49 - line 63<br>column 4, lines 15,23,49-51<br>column 6, line 50 - line 65<br><br>-----<br>-/-- | 1,2,6-9               |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in 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.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 2004

Date of mailing of the international search report

25/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noë, V

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

T/IB2004/000937

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | <p>US 6 451 325 B1 (VAN NEST GARY ET AL)<br/> 17 September 2002 (2002-09-17)<br/> abstract<br/> column 2, line 64 - column 3, line 2<br/> column 3, line 34 - line 38<br/> column 4, line 49 - line 53<br/> page 7, lines 14,15,34,35<br/> column 13, line 7 - line 10</p>                                                                                                                               | 1,6,8                 |
| Y          | <p>US 5 961 970 A (AVIV HAIM ET AL)<br/> 5 October 1999 (1999-10-05)<br/> cited in the application<br/> abstract<br/> column 4, line 10 - line 43<br/> column 4, line 53 - line 56<br/> column 5, line 7 - line 19<br/> column 6, line 47 - line 50<br/> column 7, line 6 - line 9<br/> column 10, line 47 - line 65<br/> column 7, line 48 - column 8, line 2</p>                                       | 4,5,<br>10-13         |
| Y          | <p>US 6 306 405 B1 (O'HAGAN DEREK ET AL)<br/> 23 October 2001 (2001-10-23)<br/> abstract<br/> column 3, line 25 - line 60<br/> column 4, line 29 - line 48<br/> column 7, line 28 - line 29<br/> column 8, line 15 - line 16<br/> column 8, line 62 - line 63<br/> column 9, line 18 - line 31<br/> column 11, line 17 - line 30<br/> column 11, line 48 - line 63<br/> column 12, line 23 - line 53</p> | 14,15                 |
| Y          | <p>WO 93/24147 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ;<br/> GERBER JAY DEAN (US))<br/> 9 December 1993 (1993-12-09)<br/> page 4, line 5 - line 34</p>                                                                                                                                                                                                                                                               | 3                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

T/IB2004/000937

154

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 1023904                                | A  | 02-08-2000          | AU 769539 B2               | 29-01-2004          |
|                                           |    |                     | AU 6537299 A               | 03-08-2000          |
|                                           |    |                     | BR 0000126 A               | 02-05-2001          |
|                                           |    |                     | CA 2296244 A1              | 29-07-2000          |
|                                           |    |                     | CA 2455134 A1              | 29-07-2000          |
|                                           |    |                     | CN 1270838 A , B           | 25-10-2000          |
|                                           |    |                     | CN 1449825 A               | 22-10-2003          |
|                                           |    |                     | EP 1023904 A2              | 02-08-2000          |
|                                           |    |                     | HK 1030166 A1              | 02-04-2004          |
|                                           |    |                     | JP 2000219636 A            | 08-08-2000          |
|                                           |    |                     | JP 2004002479 A            | 08-01-2004          |
|                                           |    |                     | NZ 502341 A                | 31-08-2001          |
|                                           |    |                     | NZ 513202 A                | 28-02-2003          |
|                                           |    |                     | US 2003175298 A1           | 18-09-2003          |
|                                           |    |                     | US 2003175308 A1           | 18-09-2003          |
|                                           |    |                     | US 2003175299 A1           | 18-09-2003          |
|                                           |    |                     | US 2003175309 A1           | 18-09-2003          |
|                                           |    |                     | US 6572861 B1              | 03-06-2003          |
|                                           |    |                     | ZA 200000142 A             | 16-07-2001          |
| US 6274149                                | B1 | 14-08-2001          | FR 2733151 A1              | 25-10-1996          |
|                                           |    |                     | AU 695802 B2               | 20-08-1998          |
|                                           |    |                     | AU 5696896 A               | 07-11-1996          |
|                                           |    |                     | BR 9608067 A               | 26-01-1999          |
|                                           |    |                     | CN 1184431 A , B           | 10-06-1998          |
|                                           |    |                     | DE 69608962 D1             | 27-07-2000          |
|                                           |    |                     | DE 69608962 T2             | 16-11-2000          |
|                                           |    |                     | EP 0825875 A1              | 04-03-1998          |
|                                           |    |                     | ES 2147924 T3              | 01-10-2000          |
|                                           |    |                     | WO 9632964 A1              | 24-10-1996          |
|                                           |    |                     | JP 3455226 B2              | 14-10-2003          |
|                                           |    |                     | JP 11503743 T              | 30-03-1999          |
|                                           |    |                     | JP 2002193841 A            | 10-07-2002          |
|                                           |    |                     | NO 974837 A                | 20-10-1997          |
|                                           |    |                     | US 2002164359 A1           | 07-11-2002          |
|                                           |    |                     | US 6689370 B1              | 10-02-2004          |
|                                           |    |                     | US 6117432 A               | 12-09-2000          |
|                                           |    |                     | US 6342234 B1              | 29-01-2002          |
|                                           |    |                     | US 6251407 B1              | 26-06-2001          |
|                                           |    |                     | US 2001033845 A1           | 25-10-2001          |
| US 6451325                                | B1 | 17-09-2002          | US 6299884 B1              | 09-10-2001          |
|                                           |    |                     | US 2003147898 A1           | 07-08-2003          |
|                                           |    |                     | AU 3614493 A               | 01-09-1993          |
|                                           |    |                     | WO 9314744 A1              | 05-08-1993          |
|                                           |    |                     | AT 108327 T                | 15-07-1994          |
|                                           |    |                     | CA 2017507 A1              | 25-11-1990          |
|                                           |    |                     | DD 294633 A5               | 10-10-1991          |
|                                           |    |                     | DE 69010574 D1             | 18-08-1994          |
|                                           |    |                     | DE 69010574 T2             | 27-10-1994          |
|                                           |    |                     | DE 399843 T1               | 02-05-1991          |
|                                           |    |                     | DK 399843 T5               | 19-09-1994          |
|                                           |    |                     | EP 0399843 A2              | 28-11-1990          |
|                                           |    |                     | ES 2033626 T1              | 01-04-1993          |
|                                           |    |                     | GR 91300063 T1             | 15-11-1991          |
|                                           |    |                     | HK 107695 A                | 14-07-1995          |
|                                           |    |                     | HU 61203 A2                | 28-12-1992          |
|                                           |    |                     | IE 64766 B1                | 06-09-1995          |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

P/IB2004/000937

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |            |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|------------|
| US 6451325                                | B1                  | JP 8032638 B               | 29-03-1996          |            |
|                                           |                     | JP 5508385 T               | 25-11-1993          |            |
|                                           |                     | PT 94168 A ,B              | 08-01-1991          |            |
|                                           |                     | WO 9014837 A1              | 13-12-1990          |            |
| US 5961970                                | A                   | 05-10-1999                 | WO 9511700 A1       | 04-05-1995 |
|                                           |                     |                            | US 5985284 A        | 16-11-1999 |
|                                           |                     |                            | AU 5543294 A        | 22-05-1995 |
|                                           |                     |                            | US 2002037295 A1    | 28-03-2002 |
| US 6306405                                | B1                  | 23-10-2001                 | US 6086901 A        | 11-07-2000 |
|                                           |                     |                            | US 2003082213 A1    | 01-05-2003 |
|                                           |                     |                            | US 2002025329 A1    | 28-02-2002 |
|                                           |                     |                            | AT 215385 T         | 15-04-2002 |
|                                           |                     |                            | AU 6253898 A        | 05-07-1999 |
|                                           |                     |                            | CA 2314934 A1       | 24-06-1999 |
|                                           |                     |                            | DE 69804671 D1      | 16-05-2002 |
|                                           |                     |                            | DE 69804671 T2      | 21-11-2002 |
|                                           |                     |                            | DK 1042001 T3       | 08-07-2002 |
|                                           |                     |                            | EP 1042001 A1       | 11-10-2000 |
|                                           |                     |                            | ES 2175668 T3       | 16-11-2002 |
|                                           |                     |                            | JP 2002508334 T     | 19-03-2002 |
|                                           |                     |                            | PT 1042001 T        | 30-09-2002 |
|                                           |                     |                            | WO 9930737 A1       | 24-06-1999 |
| WO 9324147                                | A                   | 09-12-1993                 | CA 2136016 A1       | 09-12-1993 |
|                                           |                     |                            | WO 9324147 A1       | 09-12-1993 |

155

SECRETARÍA DE ECONOMÍA  
SUBSECRETARÍA DE FISCALÍA  
DIRECCIÓN GENERAL DE ASESORIA FISCAL  
CALLE DE LA FISCALÍA, S/N. P.O. BOX 2-6350  
MEXICO, D.F. 06000

## REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

|                                                                                                              |                           | USUARIO | RADICADOR |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------|-----------|
| <b>PATENTE DE INVENCION</b>                                                                                  | <b>MODELO DE UTILIDAD</b> | ( )     | ( )       |
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente.                                                 |                           | ( )     | ( )       |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      |                           | ( )     | ( )       |
| - Descripción de la invención.                                                                               |                           | ( )     | ( )       |
| - Dibujos de ser estos pertinentes.                                                                          |                           | ( )     | ( )       |
| - Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             |                           |         |           |
| <b>COMPLETA</b> ( )                                                                                          | <b>INCOMPLETA</b> ( )     |         |           |
| <b>DISEÑO INDUSTRIAL</b> ( )                                                                                 |                           |         |           |
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial                                             |                           | ( )     | ( )       |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.                         |                           | ( )     | ( )       |
| - Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. |                           | ( )     | ( )       |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                              |                           | ( )     | ( )       |
| <b>COMPLETA</b> ( )                                                                                          | <b>INCOMPLETA</b> ( )     |         |           |
| <b>ESQUEMA DE TRAZADO</b> ( )                                                                                |                           |         |           |
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.                                           |                           | ( )     | ( )       |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.                         |                           | ( )     | ( )       |
| - Representación gráfica del esquema de trazado                                                              |                           | ( )     | ( )       |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas.                                                             |                           | ( )     | ( )       |
| <b>COMPLETA</b> ( )                                                                                          | <b>INCOMPLETA</b> ( )     |         |           |

Firma Responsable:

Fecha:

15/1

Folio 156

2020  
Bogotá DC

Doctor(a)  
CARLOS R. OLARTE  
Apoderado(a) y/o Representante  
PFIZER PRODUCTS INC

|             |                                   |                   |
|-------------|-----------------------------------|-------------------|
| REFERENCIA: | Radicación No.                    | 05 98906          |
|             | Solicitud Internacional           | PCT/IB2004/000937 |
|             | Fecha límite inicio fase Nacional | 04 – 11 – 2005    |
|             | Trámite                           | 011               |
|             | Evento                            | 379               |
|             | Actuación                         | 416               |
|             | Oficio No.                        | 1718              |
|             | Folios                            | 001               |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase  
Dado en Bogotá DC

  
CLARA CASTELLANOS DE JAIMES  
Jefe de la División de Nuevas Creaciones (E)