



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-17807

54. TÍTULO

NUEVAS FORMULACIONES DE VACUNAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K39/00, 39/02, 39/12, 9/107,
A61P43/00, 47/00

71. SOLICITANTE

MERIAL LIMITED

DOMICILIO

GEORGIA, U.S.A.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 06817887 00000000

Folios: 127 ón

Fecha (MD): 2006-02-22 17:46:59

Trámite : 011 PCT-PATENT 376 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**
ENTRADA EN FASE NACIONAL 24-02-2006
SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

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

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

 Domicilio: Duluth, Georgia
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
APODERADO**

 Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

 1. **Alexis Guy Andre PARISOT**
371 Rue Garibaldi
Lyon 69007
Francia

 3. **Robert M NORDGREN**
1210 Thornwell Drive
Athens
Georgia 30606
Estados Unidos de América

 2. **Stephanie Marie-Catherine DESGUILLES- BLECHET**
23 Rue Henri Gorjus,
Lyon 69004
Francia

 4. **Catherine CHARREYRE**
42 Rue Ferdinand Gauthier
Saint-Laurent De Mure 69720
Francia

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/US2004/024027

 Fecha: 26 de julio de 2004

 Publicación Internacional No. WO 2005/009462 A2

 Fecha: 3 de febrero de 2005

6

Título (54)
NUEVAS FORMULACIONES DE VACUNAS

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00, A61P 43/00, A61K 39/02, 39/12,
A61K 9/107, A7/00

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

 SI ☒ NO ☐
US
24 de julio de 2003
60/490,345

9

Comprobante de pago No.: 06-12,148
Fecha: 14 de febrero de 2006

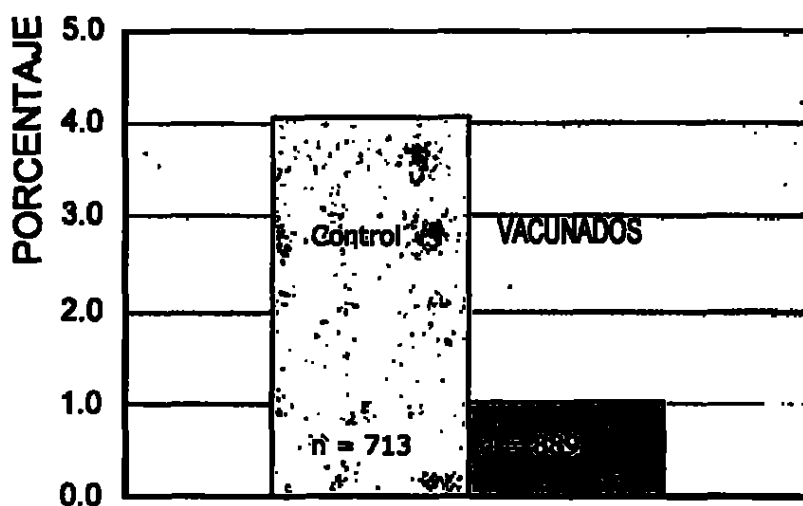
10

An xos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ 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 efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

PORCENTAJE DE CASOS DE PMWS EN CERDOS HASTA EL
SACRIFICIO

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA:

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2005/009462 A2**

Descripción:

Páginas 35 en el idioma original

Páginas 49 en español

Reivindicaciones: Número (s) 30

Figuras: Número (s) 4

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
3. ☒ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita del Informe de Búsqueda Internacional.**
4. ☒ **Extracto de publicación.**

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES
EN FASE INTERNACIONAL**

**GEORGIA SUPERIOR COURT
CLERKS' COOPERATIVE AUTHORITY**

Notary Division

1875 Century Boulevard, Suite 100

Atlanta, Georgia 30345

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

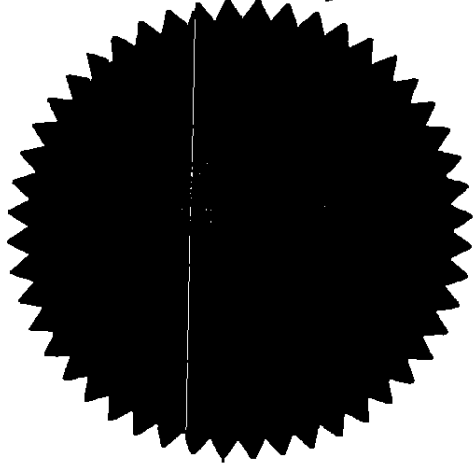
1. Country: **UNITED STATES OF AMERICA**
2. This public document
has been signed by **TIKI CANTRELL**
3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC, STATE OF GEORGIA**
4. bears the seal/stamp of **TIKI CANTRELL
NOTARY PUBLIC
FULTON COUNTY, GEORGIA**

CERTIFIED

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

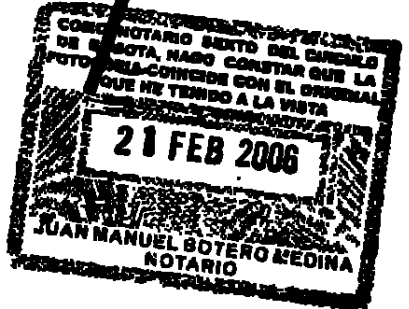
9. Seal/Stamp

10. Signature:



David R. Williams

**DAVID R. WILLIAMS
EXECUTIVE DIRECTOR**



**NOTARY PUBLIC
(404) 327-6023**

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

MERIAL LIMITED

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

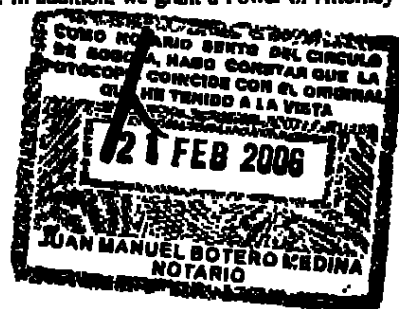
Duluth, Georgia 30096, Estados Unidos de América, hereby ratify the patent

application No. 04.051.017 filed by **EMILIO FERRERO** on June 1^o 2004 and

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

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba

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

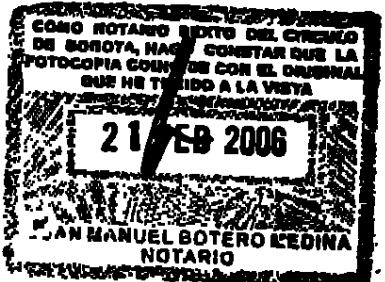


nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo,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

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

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

© CAVELIER ABOGADOS
WPRODEU -181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 16 días del mes de Julio
de 200 4 ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
de 200 de

compareció(eron)
personalmente

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

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

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 16 días del mes de Julio
de 200 4 compareció(eron) ante mí,
Horace D. Nalle

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

Merial Limited

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

Artículos de constitución, 31 Julio, 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Merial Limited

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

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

3239 Satellite Blvd
Duluth, Georgia 30096

© CAVELIER ABOGADOS
WPIODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this 16th day of June
200 4 before me, a Notary Public or Attesting Official
of

personally
appeared

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

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 16th day of June
200 4 appeared before me
Horace D. Nalle

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

Merial Limited

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

ARTICLES OF ASSOCIATION dated
July 31, 1997

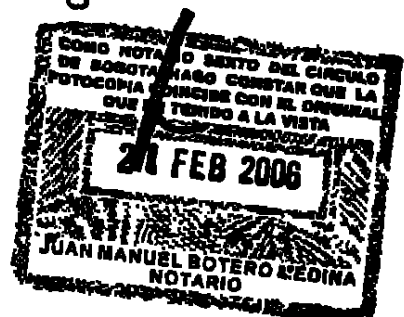
2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Merial Limited

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

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

3239 Satellite Blvd.
Duluth, Georgia 30096



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

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

Horace Nalle

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

Ciudad Duluth

Estado Georgia

Hoy 16 Junio de 2004

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

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

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

City Duluth

State Georgia

This 16th day of June 2004

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

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

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

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature

© CAVELIER ABOGADOS
WPPDF01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

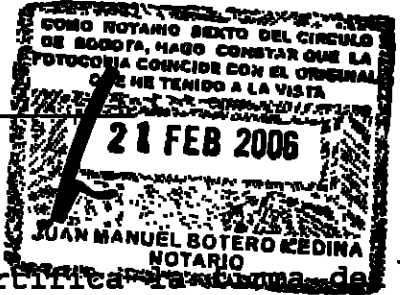
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE SOCIEDAD, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
COMETIENDO A LA VISTA
21 FEB 2006
JUAN MANUEL BOYERO MEDINA
NOTARIO

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

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

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

Firma _____ Firma Ilegible _____



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

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

Notario Público o Funcionario Autorizado _____ Firma Ilegible _____

Sello:

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

AUTORIDAD COOPERATIVA DEL SECRETARIO

DEL TRIBUNAL SUPERIOR DE GEORGIA

División Notarial

1875 Century Boulevard, Suite 100

Atlanta, Georgia 30345

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

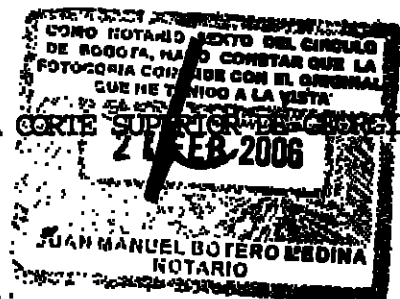
1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
- Este documento público
2. ha sido firmado por TIKI CANTRELL
3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE GEORGIA
4. lleva el sello/estampilla de TIKI CANTRELL

NOTARIO PÚBLICO

CONDADO DE FULTON, GEORGIA

CERTIFICADO

5. En ATLANTA, GEORGIA
6. El 8 DE JULIO DE 2004
7. por la AUTORIDAD COOPERATIVA DEL SECRETARIO DE LA CORTE SUPERIOR DE GEORGIA
8. No. I-103889
9. Sello/estampilla:
10. Firma



ESTADO DE GEORGIA

1776

Firma Ilegible
DAVID R. WILLIAMS
DIRECTOR EJECUTIVO

NOTARIO PÚBLICO
(404) 327-6023

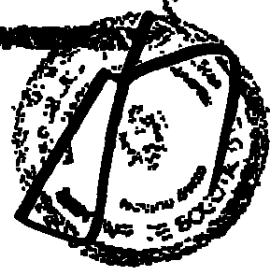
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

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

Cns C-2004-00009516

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

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA FE
HAGO CONSTAR QUE LA S.
Diego D. Vargo
A FIRMA REGISTRADA POR
EN ESTA NOTARIA
29 JUL 2004



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE SANTA FE, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
21 FEB 2006
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
3 February 2005 (03.02.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/009462 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/00

Catherine [FR/FR]; 42 Rue Ferdinand Gauthier, F-69720
Saint-Laurent De Mure (FR).

(21) International Application Number:
PCT/US2004/024027

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

(22) International Filing Date: 26 July 2004 (26.07.2004)

(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.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/490,345 24 July 2003 (24.07.2003) US

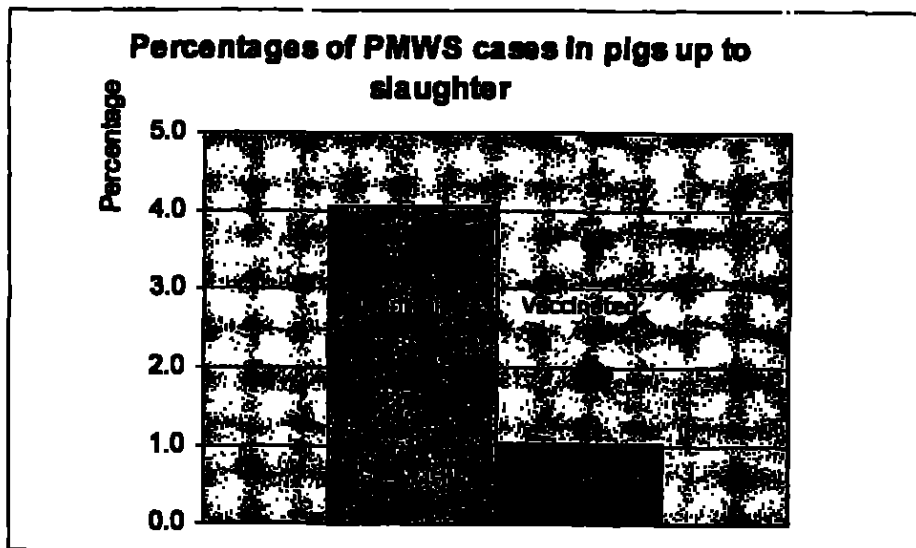
(71) Applicant (for all designated States except US): MERIAL
LIMITED [US/US]; 3239 Satellite Blvd., Duluth, GA
30096 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, 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).

(71) Applicants (for US only): PARISOT, Alexis, Guy, Andre
[FR/FR]; 371 Rue Garibaldi, F-69007 Lyon (FR). DES-
GUILLES-BLECHET, Stephanie, Marie-Catherine
[FR/FR]; 23 Rue Henri Gorjus, F-69004 Lyon (FR).
NORDGREN, Robert, M. [US/US]; 1210 Thorn-
well Drive, Athens, GA 30606 (US). CHARREYRE,

[Continued on next page]

(54) Title: NEW VACCINE FORMULATIONS



(57) Abstract: The present invention provides for a novel oil-in-water (O/W) emulsion, with increased stability in the presence of bacterial or viral suspensions, especially those concentrated and non-purified or weakly purified. The emulsion of the present invention can act as vehicle for the delivery of a pharmaceutical composition comprising at least one immunogen and, in particular, an immunogen selected from the group comprising an inactivated pathogen, an attenuated pathogen, a subunit, a recombinant expression vector, and a plasmid or combinations thereof. In one embodiment, the present invention provides for an injectable oil-in-water (O/W) emulsion comprising: (1) an aqueous solution containing an immunogen, said immunogen selected from the group comprising an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterium, an inactivated d porcine circovirus type 2 (PCV-2) virus or combinations thereof; (2) a mineral oil; (3) a non-ionic lipophilic surfactant; and (4) a non-ionic hydrophilic surfactant having a low HLB value which comprises ethoxylated fatty acid diesters of sorbitan (generally having HLB value between 11 and 13).

WPC14306

**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.

New vaccine formulations

This application claims priority to US Provisional App. No. 60/490,345 filed 24 July 2003, the contents of which is incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to oil-in-water emulsions, their use as adjuvants, and pharmaceutical, immunologic, or vaccine compositions comprising the same.

DESCRIPTION OF THE RELATED ARTS

The use of adjuvants in vaccines is well known. An adjuvant is a compound that, when combined with a vaccine antigen, increases the immune response to the vaccine antigen as compared to the response induced by the vaccine antigen alone. Among strategies that promote antigen immunogenicity are those that render vaccine antigens particulate, those that polymerize or emulsify vaccine antigens, methods of encapsulating vaccine antigens, ways of increasing host innate cytokine responses, and methods that target vaccine antigens to antigen presenting cells (Nossal, 1999, In: *Fundamental Immunology*. Paul (Ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.; Vogel and Powell, 1995, In: *Vaccine Design*. The Subunit and Adjuvant Approach. Powell and Newman (Eds.), Plenum Press, NY, N.Y. p. 141). Because of the essential role adjuvants play in improving the immunogenicity of vaccine antigens, the use of adjuvants in the formulation of vaccines has been virtually ubiquitous (Nossal, 1999, *supra*; Vogel and Powell, 1995, *supra*; see also PCT publication WO 97/18837, the teachings of which are incorporated herein by reference). Conventional adjuvants, well-known in the art, are diverse in nature. They may, for example, consist of water-insoluble inorganic salts, liposomes, micelles or emulsions, *i.e.* Freund's adjuvant. Other adjuvants may be found in Vogel and Powell, 1995, mentioned *supra*. Although there is no single mechanism of adjuvant action, an essential characteristic is their ability to significantly increase the immune response to a vaccine antigen as compared to the response induced by the vaccine antigen alone (Nossal, 1999, *supra*; Vogel and Powell, 1995, *supra*). In this regard, some adjuvants are more effective at augmenting humoral immune responses; other adjuvants are more effective at increasing cell-mediated immune responses (Vogel and Powell, 1995, *supra*); and yet another group of adjuvants increase both humoral and cell-mediated immune responses against vaccine antigens (Vogel and Powell, 1995, *supra*).

Generally, emulsions used in vaccine formulation comprise a mixture of oil, aqueous solution and surfactants. Some emulsions incorporate a lipophilic surfactant such as Span 80[®] and a hydrophilic surfactant such as Tween 80[®]. These emulsions may also contain compounds such as lecithin or saponin known to have ionic surfactant properties.

However, problems of stability can be observed with emulsions used as vaccine adjuvants, in particular during storage or transport. This is particularly true when these compositions contain concentrated immunogens, especially non-purified concentrated immunogens. Typically, this is the case with adjuvants used in inactivated (killed) vaccines. This problem is even more significant with multivalent vaccine compositions because the immunogens are more concentrated in the same volume of diluent.

Another problem with adjuvant use is linked to a risk of adverse events such as toxicity or local inflammation at the site of injection. For example, a local inflammatory response and/or granulomae may result after injection. In order to limit such an adverse reaction, surfactants and other components in the emulsion may be reduced; however, the reduction may then result in a decrease in the stability of the vaccine composition. There is, therefore, a need for novel adjuvants and vaccine compositions containing such adjuvants with increased safety and stability.

SUMMARY OF THE INVENTION

In a first embodiment the present invention provides for a novel oil-in-water (O/W) emulsion, with increased stability in the presence of bacterial or viral suspensions, especially those concentrated and non-purified or weakly purified.

Another embodiment of the present invention provides for a stable, safe and easily administrable, in particular injectable, O/W emulsion acting as a vehicle for the delivery of a pharmaceutical composition comprising at least one active ingredient that may be, more particularly, an immunogen.

Yet another embodiment of the present invention provides for a stable, safe and injectable O/W emulsion acting as an adjuvant to increase the immune response induced by an immunogen. In particular, the present invention provides a novel adjuvant which, when used in a vaccine composition containing an immunogen increases the vaccinee's cellular immune response, humoral immune response or, preferably, both to the immunogen.

Yet another embodiment of the present invention provides a stable, safe and immunogenic composition or vaccine comprising an O/W emulsion.

A further embodiment of the present invention provides for a method of making a vaccine composition using the adjuvant of the instant invention; the vaccine composition so obtained; and methods of using thereof.

Still another embodiment of the present invention provides for a kit comprising an immunogen or other pharmaceutical product in a first vial, and an adjuvant made according to

the present invention in a second vial, with the adjuvant designed to be mixed with the immunogen or other vaccine product before use.

In one preferred embodiment, the present invention provides for an injectable oil-in-water (O/W) emulsion comprising:

- (1) an aqueous solution containing an immunogen;
- (2) a mineral oil;
- (3) a non-ionic lipophilic surfactant;
- (4) a non-ionic hydrophilic surfactant having a low HLB value which comprises ethoxylated fatty acid diesters of sorbitan (generally having HLB value between 11 and 13).

In another preferred embodiment, the present invention provides for an injectable oil-in-water (O/W) emulsion comprising:

- (1) an aqueous solution containing an immunogen;
- (2) a non-ionic hydrophilic surfactant having a high hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value greater than 13 and less than 40, in particular $HLB \geq 13.5$, and preferably $HLB \geq 14$;
- (3) a mineral oil;
- (4) a non-ionic lipophilic surfactant;
- (5) a non-ionic hydrophilic surfactant having a low HLB value (HLB value of about 9 to about 13).

In yet another preferred embodiment, the present invention provides for a vaccine composition comprising a novel emulsion containing at least one immunogen suitable for eliciting an immunologic response in a vaccinee. The invention further provides such compositions wherein the emulsion acts as an adjuvant to increase the immune response induced by the immunogen, in particular, to increase the cellular response, the humoral response or preferably both.

In another preferred embodiment the present invention provides for a method of making a vaccine composition wherein an immunogen, especially an immunogen in lyophilized form or in an aqueous solution, is mixed with the adjuvant according to the instant invention. The immunogen may be selected from the group consisting of: inactivated pathogens, attenuated pathogens, sub-unit antigens, recombinant expression vectors including plasmids, and the like. The pathogen may be bacterial, viral, protozoal, or fungal in origin or the immunogen may constitute an antitoxin.

In another preferred embodiment, the present invention provides for a method of inducing an immune response in a vaccinate against a pathogen comprising administering the vaccine composition of the present invention to the vaccinate.

In another preferred embodiment, the present invention provides for kits comprising at least two vials, in a first vial an immunogen, especially an immunogen in lyophilized form or in solution in an aqueous medium, and in a second vial an adjuvant or emulsion according to the present invention.

It is noted that in this disclosure and particularly in the claims, terms such as "comprises", "comprised", "comprising" and the like can have the meaning attributed to such terms in U.S. Patent law; e.g., they can mean "includes", "included", "including", and the like; and that terms such as "consisting essentially of" and "consists essentially of" have the meaning ascribed to them by U.S. Patent law, e.g., they allow for elements not explicitly recited, but exclude elements that are found in the prior art or that affect a basic or novel characteristic of the invention.

These and other embodiments are disclosed or are obvious from and encompassed by, the following Detailed Description.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

A full and enabling disclosure of the present invention, including the best mode thereof, to one of ordinary skill in the art, is set forth more particularly in the remainder of the specification, including reference to the accompanying figures, wherein:

Figure 1 illustrates lung lesion scores of piglets challenged 28 days after vaccination according to example 3. The mean value is shown by a cross, the lower quartile and the upper quartile by a box, the statistical median by a horizontal line in the box, the minimum to the maximum value by a vertical line.

Figure 2 illustrates lung lesion scores of piglets challenged 20 weeks after vaccination according to example 4. The mean value is shown by a cross, the lower quartile and the upper quartile by a box, the statistical median by a horizontal line in the box, the minimum to the maximum value by a vertical line.

Figure 3 provides a graph depicting the progression of clinical disease as exemplified by clinical score following challenge according to example 6.

Figure 4 depicts the results of a field efficacy trial wherein piglets ($n = 889$ piglets) borne to sows vaccinated once before farrowing with a PCV-2 vaccine composition made according to the present invention showed a significant reduction in mortality (75% decrease)

due to postweaning multisystem wasting syndrome (PMWS) as compared to control piglets (n = 713) borne to unvaccinated sows.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Other objects, features and aspects of the present invention are disclosed in, or are obvious from, the following Detailed Description. It is to be understood by one of ordinary skill in the art that the present discussion is a description of exemplary embodiments only and is not intended as limiting the broader aspects of the present invention, which broader aspects are embodied in the exemplary construction. In fact, it will be apparent to those skilled in the art that various modifications and variations can be made in the present invention without departing from the scope or spirit of the invention. For instance, features illustrated or described as part of one embodiment can be used in another embodiment to yield a still further embodiment. It is intended that the present invention cover such modifications and variations as come within the scope of the appended claims and their equivalents. The contents of all references, published patents, and patents cited throughout the present application are hereby incorporated by reference in their entirety.

For convenience, certain terms employed in the Specification, Examples, and appended Claims are collected here.

As used herein, the term "animal" includes all vertebrate animals including humans. It also includes an individual animal in all stages of development, including embryonic and fetal stages. In particular, the term "vertebrate animal" includes, but not limited to, humans, canines (e.g., dogs), felines (e.g., cats), equines (e.g., horses), bovines (e.g., cattle) porcine (e.g., pigs), as well as in avians. The term "avian" as used herein refers to any species or subspecies of the taxonomic class *avz*, such as, but not limited to, chickens (breeders, broilers and layers), turkeys, ducks, a goose, a quail, pheasants, parrots, finches, hawks, crows and ratites including ostrich, emu and cassowary.

As used herein, the term "pig" or "piglet" means an animal of porcine origin, while "sow" refers to a female of reproductive age and capability.

As used herein, the term "virulent" means an isolate that retains its ability to be infectious in an animal host.

As used herein, the term "inactivated vaccine" means a vaccine composition containing an infectious organism or pathogen that is no longer capable of replication or growth. The pathogen may be bacterial, viral, protozoal or fungal in origin. Inactivation may be accomplished by a variety of methods including freeze-thawing, chemical treatment (for example, treatment with thimerosal or formalin), sonication, radiation, heat or any other

18

convention means sufficient to prevent replication or growth of the organism while maintaining its immunogenicity.

As used herein, the term "immunogenicity" means capable of producing an immune response in a host animal against an antigen or antigens. This immune response forms the basis of the protective immunity elicited by a vaccine against a specific infectious organism.

As used herein, the term "immune response" refers to a response elicited in an animal. An immune response may refer to cellular immunity (CMI); humoral immunity or may involve both. The present invention also contemplates a response limited to a part of the immune system. For example, a vaccine composition of the present invention may specifically induce an increased gamma interferon response.

As used herein, the term "antigen" or "immunogen" means a substance that induces a specific immune response in a host animal. The antigen may comprise a whole organism, killed, attenuated or live; a subunit or portion of an organism; a recombinant vector containing an insert with immunogenic properties; a piece or fragment of DNA capable of inducing an immune response upon presentation to a host animal; a protein, a polypeptide, a peptide, an epitope, a hapten, or any combination thereof. Alternately, the immunogen or antigen may comprise a toxin or antitoxin.

As used herein, the term "multivalent" means a vaccine containing more than one antigen whether from the same species (*i.e.*, different isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae*), from a different species (*i.e.*, isolates from both *Pasteurella hemolytica* and *Pasteurella multocida*), or a vaccine containing a combination of antigens from different genera (for example, a vaccine comprising antigens from *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* and *Clostridium*).

As used herein, the term "adjuvant" means a substance added to a vaccine to increase a vaccine's immunogenicity. The mechanism of how an adjuvant operates is not entirely known. Some adjuvants are believed to enhance the immune response by slowly releasing the antigen, while other adjuvants are strongly immunogenic in their own right and are believed to function synergistically. Known vaccine adjuvants include, but are not limited to, oil and water emulsions (for example, complete Freund's adjuvant and incomplete Freund's adjuvant), *Corynebacterium parvum*, Bacillus Calmette Guerin, aluminum hydroxide, glucan, dextran sulfate, iron oxide, sodium alginate, Bacto-Adjuvant, certain synthetic polymers such as poly amino acids and co-polymers of amino acids, saponin, "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), "AVRIDINE" (N, N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl)-propanediamine), paraffin oil, muramyl dipeptide and the like.

As used herein, the terms "pharmaceutically acceptable carrier" and "pharmaceutically acceptable vehicle" are interchangeable and refer to a fluid vehicle for containing vaccine antigens that can be injected into a host without adverse effects. Suitable pharmaceutically acceptable carriers known in the art include, but are not limited to, sterile water, saline, glucose, dextrose, or buffered solutions. Carriers may include auxiliary agents including, but not limited to, diluents, stabilizers (*i.e.*, sugars and amino acids), preservatives, wetting agents, emulsifying agents, pH buffering agents, viscosity enhancing additives, colors and the like.

As used herein, the term "vaccine composition" includes at least one antigen or immunogen in a pharmaceutically acceptable vehicle useful for inducing an immune response in a host. Vaccine compositions can be administered in dosages and by techniques well known to those skilled in the medical or veterinary arts, taking into consideration such factors as the age, sex, weight, species and condition of the recipient animal, and the route of administration. The route of administration can be percutaneous, via mucosal administration (*e.g.*, oral, nasal, anal, vaginal) or via a parenteral route (intradermal, intramuscular, subcutaneous, intravenous, or intraperitoneal). Vaccine compositions can be administered alone, or can be co-administered or sequentially administered with other treatments or therapies. Forms of administration may include suspensions, syrups or elixirs, and preparations for parenteral, subcutaneous, intradermal, intramuscular or intravenous administration (*e.g.*, injectable administration) such as sterile suspensions or emulsions. Vaccine compositions may be administered as a spray or mixed in food and/or water or delivered in admixture with a suitable carrier, diluent, or excipient such as sterile water, physiological saline, glucose, or the like. The compositions can contain auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, adjuvants, gelling or viscosity enhancing additives, preservatives, flavoring agents, colors, and the like, depending upon the route of administration and the preparation desired. Standard pharmaceutical texts, such as "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990 may be consulted to prepare suitable preparations, without undue experimentation.

The present invention provides a novel oil-in-water (O/W) adjuvant or emulsion comprising:

- (1) an aqueous solution containing a vaccine antigen or immunogen capable of inducing an immune response in a host ;

- (2) a non-ionic hydrophilic surfactant having a hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value of greater than 13 and less than 40 (HLB > 13, in particular HLB ≥ 13.5, and preferably HLB ≥ 14);
- (3) a mineral oil;
- (4) a non-ionic lipophilic surfactant; and
- (5) a non-ionic hydrophilic surfactant having a low HLB value (HLB value between 9 and 13).

The emulsions made according to the present invention are based on a combination of at least 3 surfactants chosen among the members of three different groups of surfactants, and it is possible to use one or more surfactant pertaining to each group.

In a preferred embodiment, the concentration of non-ionic hydrophilic surfactant (5) in the emulsion (in the present specification this means the final emulsion comprising all ingredients unless otherwise indicated) is from 1% to 8%, in particular from 1.5% to 6%, preferably from 2% to 5%, more preferably from 2.5% to 4%, expressed as a percentage in weight by volume of emulsion (w/v).

This group of surfactants comprises non-ionic hydrophilic surfactants having a low HLB value (HLB value between 9 and 13). This group includes but is not limited to ethoxylated fatty acid monoester of sorbitan (in particular 5 ethoxyl groups) (e.g. ethoxylated sorbitan monooleate such as Tween 81[®]), ethoxylated fatty acid diesters of sorbitan, ethoxylated fatty acid triesters of sorbitan (in particular 20 ethoxyl groups) (e.g. ethoxylated sorbitan trioleate such as Tween 85[®]), ethoxylated sorbitan tristearate such as Tween 65[®], ethoxylated fatty alcohols (in particular 5-10 ethoxyl groups) (e.g. Brij 76[®], Brij 56[®], Brij 96[®]), ethoxylated fatty acids (in particular 5-10 ethoxyl groups) (e.g. Simulcol 2599[®], Myrij 45[®]), ethoxylated castor oil (in particular 25-35 ethoxyl groups) (e.g. Arlatone 650[®], Arlatone G[®]), and combinations thereof.

Ethoxylated fatty acid diesters of sorbitan and ethoxylated fatty acid triesters of sorbitan are preferred, as well combinations of both species. The fatty acid is preferably selected from the group consisting of oleate, palmitate, stearate, isostearate, laurate and the combinations thereof. Preferred ethoxylated fatty acid triester of sorbitan comprise ethoxylated sorbitan trioleate such as Tween 85[®], or ethoxylated sorbitan tristearate such as Tween 65[®].

In a preferred embodiment, the concentration of non-ionic hydrophilic surfactant (2) is generally from 0.1% to 1.5%, in particular from 0.2% to 1.4%, preferably from 0.3% to 1.3%,

more preferably from 0.4% to 1.2%, expressed as a percentage in weight by volume of emulsion (w/v).

This second group of surfactants comprises non-ionic hydrophilic surfactants having a high hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value ($HLB > 13$, in particular $HLB \geq 13.5$, and preferably $HLB \geq 14$). This group comprises ethoxylated fatty acid monoesters of sorbitan (in particular 20 ethoxyl groups) (e.g. ethoxylated sorbitan monolaurate such as Tween 20[®], ethoxylated sorbitan monopalmitate such as Tween 40[®], ethoxylated sorbitan monostearate (such as Tween 60[®], ethoxylated sorbitan monooleate such as Tween 80[®], ethoxylated fatty alcohols (in particular 15-30 ethoxyl groups) (e.g. Brij 78[®], Brij 98[®], Brij 721[®]), ethoxylated fatty acids (in particular 15-30 ethoxyl groups) (e.g. Myrj 49[®], Myrj 51[®], Myrj 52[®], Myrj 53[®]), non-ionic block-copolymers (e.g. polyoxyethylene/polyoxypropylene copolymer (POE-POP), such as Lutrol F127[®], Lutrol F68[®]), and combinations thereof.

For the non-ionic block-copolymers, the percentages may be lower and be in particular from 0.1% to 0.5%, more particularly from 0.2% to 0.4% (weight by volume of emulsion (w/v)).

Preferred surfactants (2) comprise ethoxylated fatty acid monoesters of sorbitan, such as those described above.

In a preferred embodiment, the concentration of non-ionic lipophilic surfactant (4) is from 0.1% to 2.5%, in particular from 0.2% to 2%, preferably from 0.2% to 1.5%, more preferably from 0.2% to 1.2%, expressed as a percentage in weight by volume of emulsion (w/v).

This group of surfactants comprises fatty acid esters of sorbitan (e.g. sorbitan monolaurate, like Span 20[®], sorbitan monopalmitate, such as Span 40[®], sorbitan monostearate, such as Span 60[®], sorbitan tristearate, such as Span 65[®], sorbitan monooleate, like Span 80[®], sorbitan trioleate, like Span 85[®], sorbitan monoisostearate, such as Arlacel 987[®], sorbitan isostearate, such as Crill 6[®]), fatty acid esters of mannide (e.g. Montanide 80[®], mannide monooleate (such as Arlacel A[®]), mannide dioleate, mannide trioleate, mannide tetraoleate), ethoxylated fatty acid esters of mannide (2, 3 or 4 ethoxyl groups) (e.g. Montanide 888[®], Montanide 103[®], ethoxylated mannide monooleate, ethoxylated mannide dioleate, ethoxylated mannide trioleate, ethoxylated mannide tetraoleate), and combinations thereof.

The fatty acid is preferably selected from the group consisting of oleate, palmitate, stearate, isostearate, laurate and combinations thereof.

Preferred surfactants (4) comprise the fatty acid esters of sorbitan, in particular those described above, and combinations thereof.

The surfactants of the invention may have fatty acids from animal or vegetal origin. The change of one origin for the other (for example animal Tween 80[®] to vegetal Tween 80[®]) could be done simply with only minor adjustment in the formulation of the emulsion.

An emulsion according to the invention may have an overall concentration of surfactants, by weight per volume of emulsion, from 1.2% to 10%, in particular from 2% to 8%, preferably from 3% to 7%, more preferably from 4% to 6%.

Generally, the emulsion according to the invention may have a phase inversion temperature (PIT) which is $\geq 33^{\circ}\text{C}$, in particular ranges from 33°C to 65°C , more particularly from 36°C to 60°C , preferably from 37°C to 55°C , and more preferably from 38°C to 50°C .

The PIT is the temperature at which a water-in-oil emulsion changes to an oil-in-water emulsion or de-phases (breaks of the emulsion and separation of the 2 phases). The PIT value may be measured by various means, like for example by visual appearance (e.g. see example 2) or by conductivity. The emulsion is placed at a temperature below the PIT of the emulsion, for example of about 25°C in a water-bath. The temperature is progressively increased. The change of the visual aspect of the emulsion is observed in comparison with a control emulsion, notably the fluidity, the viscosity, the separation in two phases, the change of the surface aspect due to the migration of the oily phase to the surface. The temperature, for which this change of visual aspect was observed, is the PIT value of the emulsion. Alternatively, the PIT is determined by the quick passage from a conductivity value of about 5-8 milliSiemens/centimetre (mS/cm) (oil-in-water emulsion) to a value of about 0 mS/cm (water-in-oil emulsion) measured by a probe placed into the emulsion, near its surface. The temperature, for which the transition was observed, is the PIT value of the emulsion. One of ordinary skill in the art will be able to determine combinations of surfactants and oil, including their respective concentrations, in order to produce emulsions according to the invention, and in particular emulsions having a PIT value within the ranges defined above without undue experimentation.

In a particular embodiment of the present invention, an emulsions as described herein does not contain any ionic surfactant or any compound known to have ionic surfactant properties, such as lecithin or saponin. Generally, emulsions according to the present invention may contain, by volume per volume of emulsion, from 3% to 55% of oil, in particular from 5% to 50% of oil, preferably from 10% to 40% of oil and, more preferably,

from 20% to 40% of oil. By definition, ranges of values in the present specification include always the limit of the range, unless otherwise indicated.

The oil used may be a mineral oil including, but not limited to, paraffin oil such as isoparaffinic oil and/or naphthenic oil, squalane, pristane, polyisobutene oil, hydrogenated polyisobutene oil, polydecene oil, polyisoprene oil, polyisopropene oil and the like. One advantageous mineral oil useful in the present invention may include an oil comprising a linear or ramified carbon chain having a number of carbon atoms greater than 15, preferably from 15 to 32, and free of aromatic compounds. Such oils may, for example, be those marketed under the name "MARCOL 52[®]" or "MARCOL 82[®]" (produced by Esso, France) or "DRAKEOL 6VR[®]" (produced by Penreco, USA).

The oil may also be a mixture of oils comprising at least 2 oils selected among the oils described herein, and in any proportion. The mixture of oils may also comprise at least one oil selected among the oils described above and at least one vegetable oil, and this vegetable oil represents from about 0.1% to about 33% of the oily phase, preferably from about 10% to about 25% v/v. These vegetable oils are unsaturated oils rich in oleic acid that are biodegradable and preferably liquid at the storage temperature (about +4 degree C.) or at least make it possible to give emulsions that are liquid at this temperature. For example the vegetable oil may be groundnut oil, nut oil, sunflower oil, safflower oil, soya oil, onager oil and the like.

In a preferred embodiment, hydrophilic surfactants (2) and (5) preferably include surfactants having the same hydrophilic part of the molecules. For instance, use is made of ethoxylated fatty acid esters of sorbitan for each of hydrophilic surfactants (2) and (5). For example if Tween 85[®] is chosen as non-ionic hydrophilic surfactants having a low HLB value, the non-ionic hydrophilic surfactant having a high HLB value will advantageously have a hydrophilic part constituted with an ethoxyleted sorbitan, such as Tween 80[®].

Generally, the present invention envisions using an aqueous solution comprising a suitable veterinary or pharmaceutically acceptable vehicle, excipient, or diluent including, but not limited to, sterile water, physiological saline, glucose, buffer and the like. The vehicle, excipient or diluent may also include polyols, glucids or pH buffering agents. The vehicle, excipient or diluent may, for example, also comprise amino acids, peptides, antioxidants, bactericide, bacteriostatic compounds. The aqueous solution is added to the oil and the surfactants in quantity to obtain 100% of the volume of the emulsion according to the invention.

The hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of an emulsion allows for the estimation of the hydrophilic or lipophilic force of a surfactant. The HLB of an amphiphilic molecule is generally calculated as follow:

$$\text{HLB} = \frac{(20 \times \text{weight of the hydrophilic part})}{(\text{weight of the amphiphilic molecule})}$$

The HLB may have a value ranging from 0 (for the most lipophilic molecule) to 20 (for the most hydrophilic molecule). According to the chemical composition of the surfactant (notably for example the addition of ethoxyl groups or of alkene oxides), this estimation may change and the domain of HLB value may increase (for example, the Lutrol F68® has a HLB of 29). With a mixture of surfactants, the HLB of the mixture is the addition of the HLB of each surfactant, balanced by its weight ratio:

$$\text{HLB} = \frac{(\text{HLB surfactantX} \times \text{weight surfactantX}) + (\text{HLB surfactantY} \times \text{weight surfactantY})}{(\text{weight surfactantX} + \text{weight surfactantY})}$$

In one embodiment of an emulsion made according to the present invention, the final HLB of the emulsion is from about 9 to about 12, preferably from about 9.5 to about 11.5 and more preferably from about 10 to about 11.5.

The present invention contemplates an emulsion comprising a paraffin oil (in particular at a concentration of from about 10% to about 40% and preferably from about 20% to about 40%, expressed as a volume per volume of emulsion (v/v)); a sorbitan fatty acid monoester (as non-ionic lipophilic surfactant), an ethoxylated fatty acid triester of sorbitan (as non-ionic hydrophilic surfactant having a low HLB value); and an ethoxylated fatty acid monoester of sorbitan (as non-ionic hydrophilic surfactant having a high HLB value). In particular the sorbitan fatty acid monoester is a sorbitan monooleate (in particular at the concentration from 0.2% to 1.5%, preferably from 0.2% to 1.2% expressed as a weight per volume of emulsion (w/v)), the ethoxylated fatty acid triester of sorbitan is an ethoxylated trioleate of sorbitan (in particular at the concentration from 2% to 5%, preferably from 2.5% to 4% w/v) and the ethoxylated fatty acid monoester of sorbitan is an ethoxylated sorbitan monooleate (in particular at the concentration from 0.3% to 1.3%, preferably from 0.4% to 1.2% w/v). For example the emulsion comprises the paraffin oil at about 29.3% by volume per volume of emulsion, the sorbitan monooleate at 0.6% by weight per volume of emulsion,

the ethoxylated trioleate of sorbitan at 3.4% by weight per volume of emulsion, and the ethoxylated sorbitan monooleate at 0.75% by weight per volume of emulsion.

In a second embodiment according to the present invention, the emulsion comprises a paraffin oil (in particular at a concentration from 10% to 40%, preferably from 20% to 40% v/v), a sorbitan fatty acid monoester (as non-ionic lipophilic surfactant), an ethoxylated fatty acid triester of sorbitan (as non-ionic hydrophilic surfactant having a low HLB value), and a non-ionic block-copolymer (as non-ionic hydrophilic surfactant having a high HLB value). In particular the sorbitan fatty acid monoester is a sorbitan monooleate (in particular at the concentration from 0.2% to 1.5%, preferably from 0.2% to 1.2% w/v), the ethoxylated fatty acid triester of sorbitan is an ethoxylated trioleate of sorbitan (in particular at the concentration from 2% to 5%, preferably from 2.5% to 4% w/v) and the non-ionic block-copolymer is a polyoxyethylene/polyoxypropylene polymer (POE-POP) (in particular at the concentration from 0.1% to 0.5%, preferably from 0.2% to 0.4% w/v). For example the emulsion comprises the paraffin oil at about 29.3% v/v, the sorbitan monooleate at 0.6% w/v, the ethoxylated trioleate of sorbitan at 3.4% w/v, and the ethoxylated sorbitan monooleate at 0.25% w/v.

In a particular embodiment, the invention contemplates an injectable oil-in-water (O/W) emulsion comprising:

- (1) an aqueous solution containing an active ingredient such as a drug or an immunogen, preferably an immunogen;
- (2) a mineral oil;
- (3) a non-ionic lipophilic surfactant; and
- (4) a non-ionic hydrophilic surfactant having a low HLB value which comprises of an ethoxylated fatty acid diester of sorbitan (which may have a HLB value between 11 and 13).

An emulsion according to this embodiment comprises ethoxylated fatty acid diesters of sorbitan that may contain up to 20 ethoxy groups. The fatty acids may be from animal or vegetable origin and may be selected from the group consisting of oleate, palmitate, stearate, isostearate, laurate and combinations thereof. In one embodiment the ethoxylated fatty acid is preferably oleate. The other ingredients, as well as the general properties of the emulsion such as the PTT, may have the same characteristics than those described above.

Preferably, surfactant (4) comprises ethoxylated fatty acid diesters of sorbitan, such as ethoxylated sorbitan dioleate, ethoxylated sorbitan distearate or ethoxylated sorbitan

diisostearate, ethoxylated sorbitan dipalmitate, ethoxylated sorbitan dilaurate, and combinations thereof.

Optionally other compounds may be added as co-adjuvants to the emulsion, including, but not limited to, alum; CpG oligonucleotides (ODN), in particular ODN 2006, 2007, 2059, or 2135 (Pontarollo R.A. et al., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2002, 84: 43-59; Wernette C.M. et al., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2002, 84: 223-236; Mutwiri G. et al., *Vet. Immunol. Immunopath*, 2003, 91: 89-103); polyA-polyU ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, *Pharmaceutical Biotechnology*, 6: 03); dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA) ("Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, *Pharmaceutical Biotechnology*, volume 6: 157), N,N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl)propanediamine (such as Avridine®) (*Ibid*, p. 148), carbomer, chitosan (see US Patent Serial No. 5,980,912 for example).

The present invention also provides a method of making a vaccine composition or immunologic composition comprising at least one antigen or immunogen and an adjuvant or emulsion made according to the present invention. The immunogen may be incorporated during emulsion formation or, in an alternate embodiment, the immunogen may be added to the emulsion later as, for example, just before use.

The entire amount of the aqueous solution used may be present in the emulsion first produced. Or it may be that only a part of this aqueous solution is used to form the emulsion, and the remaining quantity of aqueous solution is added after incorporation of the immunogen. The immunogen or antigen may be in a lyophilized form or present in some other appropriate solid form and then mixed with the emulsion or, alternately, the antigen may be in solution, in particular in an aqueous solution, and this solution mixed with the emulsion.

Surfactants are preferably added to either the oil or the aqueous solution according to their solubility. For example, the non-ionic lipophilic surfactants are added to the oil according to the invention while non-ionic hydrophilic surfactants having a high HLB value are added to the aqueous solution.

The emulsification can be prepared according to conventional methods known to one of ordinary skill in the art. For example, in one embodiment of the present invention, the emulsion can be prepared at a temperature below the PIT of the emulsion, in particular at room temperature, e.g. at about 25°C. The aqueous phase and the oily phase are mixed together by a mechanical agitation, e.g. with a turbine equipped with a rotor-stator able to create a high shearing force. Preferably the agitation starts at a low rotation speed and slowly

increases in relation to the progressive addition generally of the aqueous solution in the oil. Preferably the aqueous solution is progressively added to the oil. The ratio of oil/aqueous solution may be adapted to obtain a water-in oil (W/O) emulsion, for example, at a concentration of about 40% to about 55% of oil (v/v). When the agitation is stopped, the emulsion changes progressively to an O/W emulsion (phase inversion). After inversion and if needed, the emulsion is diluted by addition of an aqueous solution to obtain the desired concentration of oil into the final emulsion. The emulsion may be stored at about 5°C.

In another embodiment, the emulsion can be prepared at a temperature higher than the PIT of the emulsion. In a first step, the aqueous phase and the oily phase are mixed together at a temperature higher than the PIT of the emulsion. Preferably the aqueous solution is progressively added to the oil. The ratio of oil/aqueous solution may be adapted to obtain a water-in oil (W/O) emulsion, for example at a concentration of about 40% to about 55% of oil (v/v). The emulsification may be done by an agitation with low or no shearing force, e.g. with a static mixer or a marine helix or with a turbine at a very low rotation speed. The emulsion obtained is a water-in-oil (W/O) emulsion. In a second step, the emulsion is cooled progressively below the PIT. During this step, the emulsion changes to an O/W emulsion (phases inversion). After inversion and if needed, the emulsion is diluted by addition of an aqueous solution to obtain the desired concentration of oil into the final emulsion. The emulsion may be stored at about 5°C.

The size of the droplets in the emulsion may be from about 100 nm to about 500 nm. The emulsion may be used, for example, as an adjuvant to formulate a vaccine composition or a pharmaceutical composition. The emulsion may also be used as a solvent to dissolve a dried product, especially a lyophilised product containing, for example, attenuated microorganisms or live recombinant vectors.

In a particular embodiment, a pre-emulsion is produced with only a part of the aqueous solution. This pre-emulsion may be diluted by addition of a suspension of an active ingredient such as a drug or an immunogen, preferably an immunogen, to obtain the final composition. Alternatively, the pre-emulsion may be diluted with an aqueous solution and used to dissolve a dried product such as a lyophilised product.

The immunogen or antigen suitable for use in the present invention may be selected from the group consisting of inactivated pathogens, attenuated pathogens, immunogenic subunits (e.g. proteins, polypeptides, peptides, epitopes, haptens), or recombinant expression vectors, including plasmids having immunogenic inserts. In one embodiment of the present invention, the immunogen is an inactivated or killed microorganism. In another embodiment

of the invention, the vaccine composition comprises an immunogen selected from the group of avian pathogens including, but not limited to, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, Infectious Bronchitis virus (IBV), Newcastle Disease virus (NDV), egg drop syndrome virus (EDS), or Infectious Bursal Disease virus (IBDV), avian influenza virus, and the like, and combinations thereof.

Alternately, the vaccine composition comprises an immunogen selected from a feline pathogen such as, but not limited to, feline herpesvirus (FHV), feline calicivirus (FCV), feline leukemia virus (FeLV), feline immunodeficiency virus (FIV), rabies virus, and the like, and combinations thereof.

In yet another embodiment, a vaccine composition of the present invention comprises an immunogen selected from a canine pathogen including, but not limited to, rabies virus, canine herpesvirus (CHV), canine parvovirus (CPV), canine coronavirus, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica* and the like, and combinations thereof.

In yet another embodiment of the invention the composition comprises an immunogen selected from an equine pathogen, such as equine herpesvirus (type 1 or type 4), equine influenza virus, tetanus, west nile virus, and the like or combinations thereof.

In yet another embodiment of the invention, the composition comprises an immunogen selected from an bovine pathogen, such as rabies virus, bovine rotavirus, bovine parainfluenza virus type 3 (bPTV-3), bovine coronavirus, bovine viral diarrhea virus (BVDV), foot and mouth disease virus (FMDV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Infectious Bovine Rhinotracheitis virus (IBR), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* and the like and combinations thereof.

In still another embodiment of the present invention, the composition comprises an immunogen selected from an porcine pathogen such as, but not limited to, swine influenza virus (SIV), porcine circovirus type 2 (PCV-2), porcine reproductive respiratory syndrome virus (PRRS), pseudorabies virus (PRV), porcine parvovirus (PPV), FMDV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* and the like, and combinations thereof.

A preferred embodiment of the invention provides for vaccine compositions comprising at least one immunogen and an emulsion in a pharmaceutically acceptable vehicle. Immunogens comprising viruses, bacteria, fungi and the like may be produced by *in vitro* culture methods using appropriate culture medium or host cells lines and conventional methods well known to those of ordinary skill in the art. For example, PRRS may be cultured

in an appropriate cell line, such as MA-104 cell line (see US Patent Serial Nos. 5,587,164; 5,866,401; 5,840,563; 6,251,404 among others). In a similar manner, PCV-2 may be cultured using PK-15 cells line (see US Patent Serial No. 6,391,314); SIV may be cultured on eggs (US Patent Serial No. 6,048,537); and *Mycoplasma hyopneumoniae* may be cultured in a appropriate culture medium (US Serial Nos. 5,968,525; US 5,338,543; Ross R. F. et al., *Am. J. Vet. Res.*, 1984, 45: 1899-1905).

In order to obtain an inactivated immunologic, or vaccine composition, the pathogen is preferably inactivated after harvesting and, optionally, subjected to clarification by means of a chemical treatment using, for example, formalin or formaldehyde, beta-propiolactone, ethyleneimine, binary ethyleneimine (BEI), thimerosal, and the like, and/or a physical treatment (e.g. a heat treatment or sonication). Methods for inactivation are well known to those of skill in the art. For example, the PRRS virus may be inactivated by beta-propiolactone treatment (Plana-Duran et al., *Vet. Microbiol.*, 1997, 55: 361-370) or by BEI treatment (US Patent Serial No. 5,587,164); inactivation of PCV-2 virus may be accomplished using ethyleneimine treatment or by beta-propiolactone treatment (US Patent Serial No. 6,391,314); swine influenza virus may be inactivated using a detergent like Triton, or with formaldehyde treatment (US Patent Serial No. 6,048,537); *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterium may be inactivated by formaldehyde treatment (Ross R. F. supra), by ethyleneimine or BEI treatment (see WO 91/18627), or by thimerosal treatment (US Patent Serial Nos. 5,968,525 and 5,338,543).

The inactivated pathogen can be concentrated by conventional concentration techniques, in particular by ultrafiltration, and/or purified by conventional purification means, in particular using chromatography techniques including, but not limited to, gel-filtration, ultracentrifugation on a sucrose gradient, or selective precipitations, in particular in the presence of polyethylene glycol (PEG).

Immunogens useful in vaccine compositions according to the present invention also include expression vectors. Such vectors include, but are not limited to, *in vivo* recombinant expression vectors such as a polynucleotide vector or a plasmid (EP-A2-1001025; Chaudhuri P., *Res. Vet. Sci.* 2001, 70: 255-6), virus vectors such as, but not limited to, adenovirus vectors, poxvirus vectors such as fowlpox (US Patent Serial Nos. 5,174,993; 5,505,941; and 5,766,599) or canarypox vectors (US Patent Serial No. 5,756,103) or bacterial vectors (*Escherichia coli* or *Salmonella sp.*)

The present invention also encompasses the formulation of multivalent immunological compositions or combination vaccine compositions. For example, antigens useful in a

combination bovine bacterin made according to the present invention of the present invention include, but are not limited to, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella* sp., particularly *P. multocida* and *P. haemolytica*, *Haemophilus* sp., particularly *H. somnus*, *Clostridium* sp., *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *E. coli* and the like.

The present invention further provides for methods for inducing an immune response in a host, e.g., an animal, comprising administering to the host an immunological composition or a vaccine composition according to the invention. The immune responses elicited in this manner are notably antibody and/or cellular immune responses, and in particular, a gamma-interferon response.

In particular, the present invention provides for methods to immunize against, or to prevent or to reduce the symptoms caused by, infection of an animal with a pathogenic organism (for example, infection by a virus, bacteria, fungus, or protozoan parasite). The method of the present invention is useful in vertebrate animals including, but not limited to, humans, canines (e.g., dogs), felines (e.g., cats); equines (e.g., horses), bovines (e.g., cattle) and porcine animals (e.g., pigs), as well as in avians including, but not limited to, chickens, turkeys, ducks, geese, a quail, a pheasant, parrots, finches, hawks, crows and ratites (ostrich, emu, cassowary, and the like).

In a particular aspect of the invention, these methods consist of the vaccination of pregnant females before parturition by administering a vaccine composition made according to the invention. These methods further include the induction of protective antibodies elicited by the vaccination protocol and the transfer of these protective antibodies from vaccinated pregnant females to their offspring. The transfer of such maternal antibodies subsequently protects the offspring from disease.

The dosage of the vaccine composition made according to the present invention will depend on the species, breed, age, size, vaccination history, and health status of the animal to be vaccinated. Other factors like antigen concentration, additional vaccine components, and route of administration (i.e., subcutaneous, intradermal, oral, intramuscular or intravenous administration) will also impact the effective dosage. The dosage of vaccine to administer is easily determinable based on the antigen concentration of the vaccine, the route of administration, and the age and condition of the animal to be vaccinated. Each batch of antigen may be individually calibrated. Alternatively, methodical immunogenicity trials of different dosages, as well as LD₅₀ studies and other screening procedures can be used to determine effective dosage for a vaccine composition in accordance with the present invention without undue experimentation. From the examples presented below, it will be

readily apparent what approximate dosage and what approximate volume would be appropriate for using the vaccine composition described herein. The critical factor is that the dosage provides at least a partial protective effect against natural infection, as evidenced by a reduction in the mortality and morbidity associated with natural infection. The appropriate volume is likewise easily ascertained by one of ordinary skill in the art. For example, in avian species the volume of a dose may be from about 0.1 ml to about 0.5 ml and, advantageously, from about 0.3 ml to about 0.5 ml. For feline, canine and equine species, the volume of a dose may be from about 0.2 ml to about 3.0 ml, advantageously from about 0.3 ml to about 2.0 ml, and more advantageously, from about 0.5 ml to about 1.0 ml. For bovine and porcine species, the volume of dose may be from about 0.2 ml to about 5.0 ml, advantageously from about 0.3 ml to about 3.0 ml, and more advantageously from 0.5 ml to about 2.0 ml.

Repeated vaccinations may be preferable at periodic time intervals to enhance the immune response initially or when a long period of time has elapsed since the last dose. In one embodiment of the present invention, the vaccine composition is administered as a parenteral injection (*i.e.*, subcutaneously, intradermally, or intramuscularly). The composition may be administered as one dose or, in alternate embodiments, administered in repeated doses of from about two to about five doses given at intervals of about two to about six weeks, preferably from about two to about five weeks. However, one of skill in the art will recognize that the number of doses and the time interval between vaccinations depends on a number of factors including, but not limited to, the age of the animal vaccinated; the condition of the animal; the route of immunization; amount of antigen available per dose; and the like. For initial vaccination, the period will generally be longer than a week and preferably will be between about two to about five weeks. For previously vaccinated animals, a booster vaccination, before or during pregnancy, at about an annual interval may be performed.

The present invention also contemplates administering a vaccine composition using a needlefree injector such as Pigjet[®], Avijet[®], Dermojet[®] or Biojector[®] (Bioject, Oregon, USA). A person of ordinary skill in the art is able to adjust the specifications of the injector as required with regard to factors such as the species of the animal to be vaccinated; the age and weight of the animal, and the like without undue experimentation.

In one embodiment of the present invention, the method comprises a single administration of a vaccine composition formulated with an emulsion according to the invention. For example, in one embodiment, the vaccine composition is an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine, while an alternate embodiment provides for a vaccine comprising an inactivated PCV2 virus composition. Other immunological compositions or

vaccines are suitable for use in a single dose regimen including, but not limited to, inactivated PRRS and SIV. In particular, for the *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine composition, the single dose may be administered between the birth and the slaughtering of a pig, in particular between about 3 to about 56 days of age, preferably between about 10 to about 35 days of age, more preferably between about 15 and about 30 days of age. The vaccine may be administered also in presence of pre-existing antibodies.

The invention further relates to methods to treat a host, e.g., an animal, comprising administering to the host a pharmaceutical composition made according to the invention and comprising at least one immunogen selected from the group consisting of proteins or peptides, antibodies, allergens, CpG ODN, growth factors, cytokines, or antibiotics, and in particular CpG ODN or cytokines. These pharmaceutical compositions can be used to improve growth performances in an animal such as a chicken, a pig, or a cow.

The present invention further relates to a kit comprising a first vial containing an ingredient such as an immunogen or pharmaceutical composition and, in a second vial, an emulsion made according to the present invention. The immunogen may be in a lyophilized form, a dried form or in aqueous solution as described herein.

The invention will now be further described by way of the following non-limiting examples.

Example 1: Emulsion Manufacturing Method

The emulsion is produced in two steps as described as follows:

First Step : A high shear rotor-stator Silverson emulsifier (L4RT type with a disintegrating head with a diameter of 10 mm) was used to produce the formulations. To produce an emulsion, one volume of oily phase was emulsified at 25°C with one volume of aqueous phase #1. The aqueous phase was added to the oily phase under agitation, 5000 rpm (rotation per minute) for 1 minute. The rotation speed was progressively increased with the augmentation of the volume to 8300 rpm during 1 minute. During this step the emulsion was a water-in-oil emulsion. For the TS6 emulsion, phase composition was as follows:

Oily phase (120 ml):

- Sorbitan monooleate (Span 80®) : 1.8% w/v,
- Sorbitan trioleate (20 OE) (Tween 85®) : 10.2% w/v,
- Paraffin oil (Marcol 82®) : 88% v/v,

Aqueous phase #1 (120 ml):

- 20% (w/v) solution of sorbitan monooleate (20 OE) (Tween 80®) : 11.25% w/v
- Phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer (pH 7.8) : 85.75% v/v

- Sodium mercurothiolate (Thiomersal) 1% in water : 1.5% v/v

Sorbitan monooleate (Span 80®) and sorbitan trioleate (20 OE) (Tween 85) were introduced in the oily phase. The sorbitan monooleate (20 OE) (Tween 80®) was not miscible in the paraffin oil. A 20% (w/v) solution of Tween 80® was prepared in the same buffer as the vaccine, for example, in phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer (pH 7.8). Sodium mercurothiolate acts as a preservative and is not essential for the emulsion.

When the agitation stopped, the emulsion changed to an oil-in-water emulsion. The emulsion was placed in a cold chamber at 5°C for at least 4 hours. At this stage, the emulsion was a pre-emulsion containing 50% of oily phase.

Second Step: The aqueous phase #2 was prepared with 120 ml of phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer pH 7.8 with immunogens (inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* immunogen, or PCV-2 immunogen, as described *infra*). The pre-emulsion as prepared in the first step was cooled to about 5°C, diluted by adding half the volume of the aqueous phase #2 at the same temperature, and mixed by the rotation of a magnetic bar for 1 minute. Final surfactant concentration in the TS6 emulsion was 4.75% (w/v).

As prepared herein, the TS6 vaccines are stable for at least one year at 5°C.

Using the same preparation method, other emulsions can be obtained as described below:

TS7 emulsion

The TS7 emulsion is an O/W emulsion containing 33% of an oily phase. The oily phase (120 ml) contains Marcol 82® 88% v/v, Span 80® 1.8% w/v and Tween 85® 10.2% w/v. The aqueous phase #1 (120 ml) contains phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer (pH 7.8) 97.75% v/v, Thiomersal® 1% in water 1.5% v/v and Lutrol F127 0.75% w/v. The aqueous phase #2 (120 ml) is constituted with the phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer (pH 7.8), optionally containing immunogens. Final surfactant concentration in the TS7 emulsion is 4.25% w/v.

TS8 emulsion

The TS8 emulsion is an O/W emulsion containing 50% of an oily phase. The oily phase (160 ml) contains Marcol 82® 92% v/v, Span 85® 1.8% w/v and Brij 96® 6.2% w/v. The aqueous phase #1 (160 ml) contains phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer (pH 7.8) 98.5% v/v, Thiomersal® 1% in water 1.0% v/v and Lutrol F127® 0.5% w/v, optionally containing immunogens. Final surfactant concentration in the TS8 emulsion is 4.25% w/v.

TS9 emulsion

The TS9 emulsion is an O/W emulsion containing 10% of an oily phase. The oily phase (120 ml) contains Marcol 82® 60% v/v, Span 40® 17.2% w/v and Arlatone 650® 22.8% w/v. The aqueous phase #1 (120 ml) contains phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer (pH 7.8) 97.5% v/v and Tween 20® 2.5% w/v. The aqueous phase #2 was prepared with 400 ml of phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer pH 7.8, optionally containing immunogens. 100 ml of the pre-emulsion was diluted with the 400 ml of the aqueous phase #2 to obtain the TS9 emulsion. Final surfactant concentration in the TS9 emulsion is 4.25% w/v.

Example 2: Determination of the Phase Inversion**Temperature (PIT) of an emulsion**

10 ml of the TS6 emulsion was placed into a glass tube in a water-bath at a temperature of about 25°C. The TS6 emulsion was a white homogeneous emulsion. The temperature in the water bath was progressively increased. Changes in the emulsion were visually observed (the emulsion became two separated phases due to the migration of the yellow-brown oily phase to the surface). This change is characteristic of the break down of the emulsion. The temperature at which this change is observed is the PIT value of the emulsion. For the TS6 emulsion, the PIT was 40-45°C, while the PIT for the TS7 emulsion was 44-49°C.

Example 3: *Mycoplasma hyopneumoniae* Vaccine**Composition and Heterologous Challenge**

Materials and Methods: the vaccine composition was formulated containing the TS6 emulsion, prepared as described in Example 1, and inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae*, BQ14 strain (Kobisch M. et al., *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, 1987, 138:693-705) at a concentration of 8.7 log₁₀ CCU (color changing unit) per ml of vaccine. Twenty-two (22) piglets, three weeks old and having maternal antibodies (born from sows seropositive for *Mycoplasma hyopneumoniae*) were randomly allocated into two groups. One group of ten (10) piglets was vaccinated on day 0 with 2 ml of the vaccine composition by intramuscular injection, while the control group of twelve (12) piglets was not vaccinated.

At selected intervals during the experiment (days 0, 27, 42, and 56), nasal swabs were taken from piglets in both groups and anti-BQ14 secretory antibodies determined by ELISA. At day 27, piglets were bled and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained to determine IFN γ levels in the peripheral blood. At day 28, all piglets were challenged

intranasally with a solution containing approximately $6.6 \log_{10}$ CCU/ml of *Mycoplasma hyopneumoniae* Mp88c strain (strain isolated from a sick pig in Denmark and cultivated as described by Kobisch and Friis in *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1996, 15: 1569-1605) with approximately 5 mL being applied to each nostril. The challenge was repeated 24 hours later. Pigs were sacrificed and lungs collected at necropsy. Lung scores were determined by estimating the surface area (expressed in percentage of the whole lobe surface) of the lesion for each of the seven pulmonary lobes. Scores were assigned as follows:

Surface of the lung lesion per lobe	Score
0%	0
1-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
>75%	4

A total score was calculated by adding the scores obtained for the individual lobes of each lung, resulting in a maximum score per animal of 28.

Results: Pigs vaccinated with the TS6 vaccine formulation exhibited a strong cellular response, and one that was significantly higher than the control group, as demonstrated by the number of spots secreting IFN γ from 5×10^5 P peripheral blood mononuclear cells (PBMN). Pigs from the vaccinated group averaged 139 spots (standard deviation 25) as compared to 11 (standard deviation of 5) in the unvaccinated controls.

Groups	Number of spots for 5×10^5 PBMNCs
TS6 vaccine composition	139 (25)
Untreated Controls	11 (5)

Levels of anti-BQ14 secretory antibodies in vaccinates and controls are summarized in the following table, with results showing that vaccinated pigs had significantly higher levels of secretory antibodies two to three weeks after challenge, as compared to untreated controls:

Groups	Anti-BQ14 secretory-antibodies (optical density (OD) values)			
	D0 (before vaccination)	D27 (before challenge test)	D42 (14 days after challenge test)	D56 (28 days after challenge test)
TS6	0.026 ± 0.001	0.033 ± 0.002	0.201 ± 0.089	0.264 ± 0.043
Controls	0.030 ± 0.001	0.031 ± 0.001	0.107 ± 0.028	0.075 ± 0.011

. Referring now to Figure 1, animals vaccinated with the TS6 vaccine composition exhibit an average lung score of 2.1 ± 1.9 (mean $\pm$ standard deviation) as compared to the untreated controls with an average lung score of 7.8 ± 4.1 . These results show a significant reduction in lung lesions for the pigs vaccinated with the vaccine composition as compared to the unvaccinated controls. .

**Example 4: Duration of protection against
a *Mycoplasma hyopneumoniae* heterologous challenge**

Materials and Methods: Thirty-eight (38) piglets, three-weeks old with maternal antibodies (born from sows that were seropositive for *Mycoplasma hyopneumoniae*) were randomly allocated into three groups as follows:

Group 1 (12 piglets) were vaccinated via an intramuscular route on day 0 with 2 ml of the vaccine composition as described in Example 3.

Group 2 (12 piglets) were vaccinated on day 0 by intramuscular injection with 2 ml of a commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine.

Group 3 (14 piglets) served as unvaccinated controls.

All piglets were intranasally challenged 20 weeks after vaccination with about 5 ml/per nostril of a *Mycoplasma hyopneumoniae* Mp88c challenge strain ($6.6 \log_{10}$ CCU/ml) as described above. The challenge was repeated 24 hours later. Blood was collected from all groups and peripheral blood mononuclear cells (PBMN) obtained to determine IFN γ levels as described above. Anti-BQ14 IgA and IgG1 serum antibodies were determined on Day 138 for each group. Following necropsy, lung scores (mean $\pm$ standard deviation) were calculated as described in Example 3 above.

Results: Referring now to Figure 2, piglets from Group 1 vaccinated with the TS6 vaccine composition demonstrated an average lung score of 0.4 ± 0.9 , a statistically significant reduction from the lung score of piglets vaccinated with the commercial vaccine (4.0 ± 5.1) or the unvaccinated controls (6.1 ± 5.8).

The average results ($\pm$ the standard deviation) of anti-BQ14 IgA and IgG1 circulating antibodies in serum collected from each group on Day 138 are summarized as follows:

Groups	Anti-BQ14 IgG (titer)	Anti-BQ14 IgA
TS6 vaccine	4.38 ± 0.14	0.56 ± 0.06
Commercial vaccine	3.09 ± 0.11	0.09 ± 0.01
Controls	2.73 ± 0.08	0.09 ± 0.01

The following table summarizes the average results ($\pm$ the standard deviation) in number of spots for 5×10^5 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) secreting gamma-interferon (IFN γ) in the peripheral blood:

Groups	D28	D138	Day152
TS6 vaccine	81 ± 20	9 ± 2	28 ± 7
Commercial vaccine	5 ± 2	3 ± 1	6 ± 1
Controls	6 ± 3	2 ± 2	$11 \pm 8^*$

*if a piglet expressing an abnormally high number of spots (109) is excluded, the mean of the control group is 4 ± 1 .

As expected when using an inactivated vaccine, the frequency of anti-BQ14 IFN γ secreting T-cells detectable at day 138 post-vaccination was much lower than at day 28. Interestingly, most of the pigs vaccinated with TS6 were still positive at day 138 suggesting that the cellular response was maintained in this group. The frequency of anti-BQ14 IFN γ secreting T-cells circulating at day 152 (13 days post challenge) was very different between the three groups. The group vaccinated with TS6 developed a very high cellular response as opposed to the other groups. This result suggests that the challenge efficiently recalls the immune memory induced by the TS6 vaccine.

**Example 5: Serology results after administration of one dose of
a PCV-2 vaccine adjuvanted with the TS6 emulsion**

Materials and Methods: Ten specific pathogen-free (SPF) piglets, 2-3 months old, were randomly allocated into 2 groups. One group of 5 piglets was vaccinated via an intramuscular route (on day 0) with 2 ml of a vaccine containing inactivated PCV-2 (imp1010 strain) at 6.8 log₁₀ CCID₅₀ per dose (vaccinated group). The control group of 5 piglets was not vaccinated. Blood samples were taken at D0, D7, D14, D21 and D28 post vaccination for titration of the PCV-2 ORF2 antibodies by ELISA.

Results: As demonstrated in the following table, all the vaccinates showed a significant anti-PCV-2 ORF2 antibody response from 7 to 40 days after vaccination:

Groups	ELISA (log ₁₀)	D0	D7	D14	D21	D28
Vaccinated	Mean	1.00	2.53	3.50	3.45	3.88
	Std deviation	0.00	0.89	0.79	0.84	0.37
Controls	Mean	1.00	1.00	1.00	1.00	1.27
	Std deviation	0.00	0.00	0.00	0.00	1.24

**Example 6: Protection against challenge elicited by a PCV-2
vaccine adjuvanted with the TS6 emulsion**

Materials and Methods: sixteen (16) SPF piglets, 4-5 days old, were randomly allocated into 2 groups as follows: one group of 8 piglets was vaccinated twice by intramuscular injection on days 0 and 21 with 2 ml of the vaccine containing inactivated PCV-2 (imp1010 strain) at 7.55 log₁₀ CCID₅₀ per dose (vaccinated group), while the control group of 8 piglets was not vaccinated. All the piglets were intranasally challenged on day 35 with PCV-2 Imp1011-48285 strain (deposited at the ECACC, under the accession number V98011608) containing about 5.5 log₁₀ CCID₅₀ per ml with approximately 5 mL being applied to each nostril. Both ELISA and seroneutralization (SN) studies were performed and clinical scores determined for each piglet as follows:

Score	0	1	2
Prostration	No	Moderate	High
Dyspnea	No	Moderate	High
Anemia (color of the piglet skin)	Pink	White	Yellow
Coughing	No	Yes	
Anorexia	No	Yes	
Vomiting	No	Yes	
Rectal temperature	$\leq 40^{\circ}\text{C}$	$39.9^{\circ}\text{C} < \leq 41^{\circ}\text{C}$	$> 40.9^{\circ}\text{C}$
Weight gain during the week n is superior of the weight gain during the week n-1	Yes	No but $> 100\text{g/day}$	No but $< 101\text{g/day}$
Death	No	Yes*	

* In case of death, the score used is the value corresponding to the day before death.

Following necropsy, a lesion score was calculated as follows:

Score	0	1	2	3
Corpulence	Normal	Lean	Very lean	Rachitic
Carcass aspect	Normal	White	Yellow	
Mucosa	Normal	White	Yellow	
Subcutaneous connective tissue	Normal	Bright	Yellow	
Superficial lymphatic ganglions	Normal	1 fat and/or white and/or congestive	> 1 fat and/or white and/or congestive	> 1 very fat and/or white and/or congestive
Thoracic discharge	No	Bright thoracic cavity	Visible presence	
Hearth	No lesion	Lesion		
Lung	No lesion	Lesion		
Pleura	No lesion	Small lesions	Large lesions	
Mediastinal lymphatic ganglions	Normal	1 fat and/or white and/or congestive	> 1 fat and/or white and/or congestive	> 1 very fat and/or white and/or congestive
Abdominal cavity	Normal	Bright	Visible ascites liquide	

Peritoneum	No lesion	Lesion		
Stomach	No lesion	Lesion	Ulcer	
Small intestine	No lesion	Lesion		
Intestine	No lesion	Lesion		
Mesenteric lymphatic ganglions	Normal	1 fat and/or white and/or congestive	> 1 fat and/or white and/or congestive	> 1 very fat and/or white and/or congestive
Peyers plaques	Not visible	Visible only in one intestinal segment	Visible in several intestinal segments	Visible in several intestinal segments and very important
Liver	No lesion	Lesion		
Kidneys	No lesion	Lesion		
Bladder	No lesion	Lesion		

Results: Results of serology as performed by ELISA and serum neutralizing antibody titers at days 30 and 63 show vaccinated piglets with higher levels than those seen in the untreated controls. The table below summarizes PCV-2 virus isolation results from fecal swabs and ganglionic tissue as well as shows average clinical and lesion scores from vaccinates and control groups. Results show higher levels of both circulating antibodies and SN titers in vaccinates as compared to controls. Clinical scores and lung lesions are significantly reduced in the vaccinated piglets as well. The evolution of the clinical score after challenge is shown in Figure 3.

Groups	vaccinates	controls
Serology ELISA at D30 (log10)	4.1 +/- 0.70	2.8 +/- 0.50
Serology ELISA at D63 (log10)	5.2 +/- 0.28	3.4 +/- 0.67
Serology SN at D30 (log10)	3.4 +/- 0.25	1.6 +/- 0.23
Serology SN at D63 (log10)	3.7 +/- 0.31	2.2 +/- 0.53
PCV-2 in feces (% of positives)	40	61
PCV-2 in mediastinal ganglions (% of positives)	25	100
Clinical score	14	31
Lesion score	9.8	18.8

**Example 7: Field efficacy results following one dose vaccination
with a TS6-adjuvanted inactivated PCV-2 vaccine**

Vaccine composition: The TS6 adjuvant was prepared as described in Example 1. The PCV-2 virus was grown on PK/15 cells and viral multiplication carried out as described in US Patent Serial No. 6,517,843 (Ellis et al.; the contents of which is hereby incorporated herein in its entirety). Briefly, at the end of viral culture, the infected cells are harvested, lysed and the viral harvest inactivated with conventional methods. For example, inactivation may be accomplished with 0.1% ethyleneimine for 18 hours at +37 degrees C; with 0.5% beta-propiolactone for 24 hours at +28 degrees C.; or with 0.2% and 0.1% beta-propiolactone for 24 hours at +4 degrees C. If the virus titer before inactivation was inadequate, the viral suspension was concentrated by ultrafiltration using a membrane with a 150 - 300 kDa cut-off. The inactivated viral suspension was stored at +5 degrees C before formulating the vaccine. The antigen content of the vaccine was set at 2.1 log 10 antigen Units per dose. Based on this content, the activity of the vaccine determined through the quantification of the active ingredient in the final product by an ELISA method was arbitrarily set at a minimum of 100 ELISA Units per dose.

Vaccination protocol: To test the efficacy of the vaccine composition under field conditions, a farm was chosen which typically exhibits endemic outbreaks of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) caused by PCV-2 infection in piglets. Sows were divided into two groups with vaccinates receiving one intramuscular injection (2 ml dose) of the TS6 adjuvanted PCV-2 inactivated vaccine two to three weeks before farrowing. The second group was not vaccinated and served as a control. The sows were allowed to farrow and piglets from vaccinated sows (n = 889) and control sows (n = 713) were monitored for mortality up to age of slaughter.

Results: Figure 4 shows a graph depicting the percentages of PMWS cases in piglets up to the time of slaughter. As can be seen from the graph, there was a 75% reduction in the number of cases of PMWS in piglets born to vaccinated sows as compared to the number of cases in piglets from unvaccinated controls. These results show a significant decrease in the clinical disease associated with PCV-2 infection and demonstrate the feasibility of vaccinating sows shortly before farrowing with a TS6 adjuvanted inactivated PCV2 vaccine to prevent the mortality and morbidity associated with PCV2 infection in piglets. These results further demonstrate that a significant reduction of PMWS among piglets in actual field conditions can be achieved using only one dose of a vaccine composition according to the present invention.

Example 8: LF2 emulsion

Using the method described above in Example 1, an oil-in-water (O/W) emulsion containing 10% oily phase emulsion and designated as LF2 was made. The oily phase (100 ml) contained Marcol 82 88% v/v, Span 80® 1.8% w/v and Tween 85® 10.2% w/v. The aqueous phase #1 (100 ml) contained phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer (pH 7.8) 88.5% v/v and 20% (w/v) solution of Tween 80® 11.5% w/v. The aqueous phase #2 (400 ml) was constituted with the phosphate disodic and monopotassic 0.02M isotonic buffer (pH 7.8), optionally containing immunogens. 100 ml of the pre-emulsion was diluted with 400 ml of the aqueous phase #2 to obtain the LF2 emulsion. The final surfactant concentration in the LF2 emulsion was 1.43% w/v. The PIT of the LF2 emulsion was > 45°C, as determined by conductivity.

Example 9: Serology analysis after the administration of a swine influenza vaccine adjuvanted with the LF2 emulsion

Materials and Methods: fifteen (15) piglets, about 10 weeks of age were randomly allocated into 3 groups. Group one (vaccinated) had 5 piglets vaccinated twice (on day 0 and day 28) with 2 ml of a recombinant swine influenza vaccine at 7.7 log₁₀ CCID₅₀ per dose by intramuscular injection. This recombinant expression vector vaccine contained a canarypox vector encoding and expressing nucleoprotein (NP) and haemagglutinin (HA) of an H1N1 swine flu virus. The second group of 5 piglets was vaccinated twice (by intramuscular injection on day 0 and day 28) with 2 ml of the recombinant swine influenza vaccine (at 7.7 log₁₀ CCID₅₀ per dose) adjuvanted with the LF2 emulsion (LF2 vaccinated group). Five piglets were left unvaccinated (control group). Blood samples were taken at D0, D14, D28, D42 and D56 post vaccination for determining haemagglutination inhibition (HI) titers.

Results: As summarized in the following table, all vaccinates showed a significant anti-swine flu antibody response from 42 to 56 days after vaccination (ANOVA, p<0.0001) as compared to untreated controls. However, pigs vaccinated with the LF2 adjuvanted vaccine showed a significant increase in antibody response at days 42 to 56 days post-vaccination as compared to pigs receiving the unadjuvanted recombinant vaccine (ANOVA, p<0.0001).

Groups	HI (log10)	D0	D14	D28	D42	D56
Vaccinated	Mean	0.9	0.9	0.9	1.2	1.2
	Std deviation	0.00	0.00	0.00	0.37	0.21
LF2 vaccinated	Mean	0.9	0.9	0.9	2.04	1.92
	Std deviation	0.00	0.00	0.00	0.33	0.16
Controls	Mean	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
	Std deviation	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

As demonstrated by these results, the adjuvant effect of the LF2 emulsion allows the vaccine to induce a higher antibody response against the swine flu virus, as compared to the non-adjuvanted vaccine.

**Example 10: Protection induced by a *Mannheimia haemolytica*
vaccine adjuvanted with the LF2 emulsion**

Materials and Methods: twenty (20) calves, five months of age, negative or with low *Mannheimia haemolytica* leucotoxin antibody titers, were randomly allocated into two groups of 10 calves each. An LF2 emulsion was made as described in Example 8 above and a vaccine formulated containing inactivated *Mannheimia haemolytica* (A1 strain) at approximately 60 to 70 ELISA units (corresponding to about 0.34 mL to 1.1 mL of crude non-concentrated bacterial culture) per dose of vaccine and adjuvanted with the LF2 emulsion. One group of 10 calves was vaccinated on day 0 with 2 ml of the LF2 vaccine composition by subcutaneous injection, while the control group of 10 calves was not vaccinated. From the day of vaccination (D0) to the day of challenge (D20), all vaccinated calves were regularly examined for general and local reactions to vaccination. Clinical examination comprised an assessment of systemic reactions (such as apathy, anorexia, polypnea, salivation, trembling), recordation rectal temperature, and a measurement of local reaction at injection sites. None of the calves presented any systemic reaction to vaccination. Rectal temperatures (in °C, mean +/- standard deviation) summarized in the following table showed a transient and slight phase of hyperthermia was observed in the vaccinated group, with a peak within 24 hours after vaccination.

	D0	D0+4h	D1	D2	D3	D7	D14	D20
Vaccinated	39.3 +/- 0.3	39.6 +/- 0.4	39.5 +/- 0.3	39.2 +/- 0.3	39.0 +/- 0.2	39.0 +/- 0.2	39.1 +/- 0.3	38.7 +/- 0.3
Controls	39.3 +/- 0.2	39.3 +/- 0.2	39.1 +/- 0.2	39.1 +/- 0.2	38.9 +/- 0.2	39.0 +/- 0.2	38.9 +/- 0.1	38.7 +/- 0.3

Local reactions in vaccinated calves (measured as the surface area in cm², mean +/- standard deviation) showed a strong local reaction that appeared approximately 24 to 48 hours post vaccination in all vaccinated animals and then rapidly decreased to a size of approximately 3 cm² by D 14. These reactions had almost disappeared by D 20. The reactions are summarized as follows:

	D0	D0+4h	D1	D2	D3	D7	D14	D20
Vaccinated	0.9 +/- 0.4	9.2 +/- 12.4	71.3 +/- 25.8	72.5 +/- 29.3	56.9 +/- 18.0	15.9 +/- 8.0	2.6 +/- 2.6	2.0 +/- 1.2

Blood samples were obtained from all animals at various intervals (D0, D7, D14, D20 and D28) and levels of antibodies against *Mannheimia haemolytica* A1 leucotoxin performed by ELISA (titer in log10 OD50). Results showed that all calves were negative prior to vaccination. By D20, after a single vaccination, eight of the ten vaccinates had sero-converted while all control calves remained negative from D0 to D20. The ELISA results are summarized as follows:

Groups	ELISA (log10)	D0	D7	D14	D21	D28
Vaccinated	Mean	< 0.78	1.11	1.70	1.86	4.00
	Std deviation	0.00	0.65	0.90	0.84	0.26
Control	Mean	< 0.78	< 0.78	< 0.78	< 0.78	1.39
	Standard deviation	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00

Challenge Protocol: All calves were challenged on day 20 by intra-tracheal administration of a 30 ml challenge containing about 9.2 log10 CFU/ml (colony forming unit per milliliter) of *Mannheimia haemolytica* A1 strain. The challenge was repeated 24 hours later. From the day of challenge to the end of the study, all calves were examined daily for general clinical signs including respiratory distress. Signs monitored included general condition, anorexia, rectal temperature, nasal discharge, cough, respiratory rate, and dyspnea.

45

Global clinical scores were calculated according to the following formula and the partial scores given in the table:

Global clinical score = $\sum (\text{partial score} \times \text{coefficient})/14$

	0	1	2	Coefficient
General condition	Normal	Depression	Prostration	×2
Food	Normal	Reduce	Anorexia	×3
Cough	No	Intense, occasional	Weak, frequent	×1
Nasal discharge	No	Serous	Muco-purulent	×2
Respiratory rate	<35/min	35-50/min	>50/min	×3
Rectal temperature	<39.5°C	39.5°C-40.5°C	>40.5°C	×3

For dead animals, the maximum individual daily clinical score of 2 was applied

The lung lesion scores (expressed in percentages) were also determined for each calf by using the following formula:

Lung lesion score = $\sum (\text{surface of the lesion on a lobe/surface of the whole lobe} \times 100 \times \text{LRM})$

Wherein LRM is the lung relative mass, with a value of:

- 0.11 for the right cranial lobe and the right medial cranial lobe
- 0.07 for the right medial caudal lobe
- 0.35 for the right caudal lobe
- 0.05 for the left cranial lobe
- 0.06 for the left medial lobe
- 0.32 for the left caudal lobe, and
- 0.04 for the azygos lobe.

Results of challenge: Global clinical scores for each group, presented in the following table, showed that the vaccinated group demonstrated a significant reduction in global clinical scores as compared to untreated controls (p=0.046, ANOVA).

		D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	Cumulated score
Vaccinated	Mean	0.0	0.7	0.7	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5	4.0
	Standard deviation	0.1	0.4	0.5	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	4.5
Control	Mean	0.1	0.9	1.1	1.0	1.1	1.2	1.2	1.3	8.0
	Standard deviation	0.1	0.5	0.6	0.8	0.9	0.8	0.8	0.7	4.5

All animals that succumbed to the challenge presented with 60% or more of their lungs affected. There was a statistical tendency ($p=0.08$) of vaccinated animals to have fewer lung lesions than those in the control group. The number of animals per group having more than a third of their lungs affected was 2/10 (20%) for the vaccinates and 7/10 (70%) for the control animals. The number of animals having more than a third of their lungs affected was significantly lower ($p=0.03$, Fischer's Exact Test, one tailed) in the vaccinated group. Results of the lung lesion scores are summarized in the following table:

Individual percentage of lung lesions in vaccinates	74.8*	Individual percentage of lung lesions in controls	64.5*
	10.6		7.0
	10.1		78.6*
	10.5		63.1*
	66.4*		44.7
	6.2		60.9
	6.9		48.2
	32.9		0.8
	25.4		59.5*
	8.0		32.9
Mean +/- std deviation	25.2 +/- 25.5	Mean +/- std deviation	46.0 +/- 25.5

* animals that succumbed to the challenge

There was a highly significant ($p < 0.001$) and strong correlation ($R^2 = 0.86$) between global clinical scores and the percentage of lung lesions. Although all vaccinated animals exhibited a slight hyperthermia following vaccination, no other general reaction to vaccination was observed. Strong local reactions were observed after vaccination, but rapidly reduced to a very acceptable size and significant lesions were observed at necropsy. These results demonstrate the safety of the vaccine adjuvanted with the LF2 emulsion.

The results of this experiment, showing that both the average clinical scores and lung lesion scores were significantly reduced in vaccinates as compared to controls, demonstrate that a single injection of the *Mannheimia haemolytica* vaccine adjuvanted with LF2 emulsion protects naïve calves against a *Mannheimia haemolytica* challenge.

Having thus described in detail preferred embodiments of the present invention, it is to be understood that the invention defined by the above paragraphs is not to be limited to particular details set forth in the above description as many apparent variations thereof are possible without departing from the spirit or scope of the present invention.

What is claimed is:

1. A vaccine composition comprising an injectable oil-in-water (O/W) emulsion, comprising:
 - (i) an aqueous solution containing at least one immunogen;
 - (ii) a mineral oil;
 - (iii) a non-ionic lipophilic surfactant;
 - (iv) a non-ionic hydrophilic surfactant having a high hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value between 13 and 40; and
 - (v) a non-ionic hydrophilic surfactant having a low hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value between 9 and 13.
2. The composition of claim 1, wherein the high HLB non-ionic hydrophilic surfactant is present at a concentration of 0.1 to 1.5% expressed as a weight by volume of emulsion (w/v).
3. The composition of claim 2, wherein the percentage of the surfactants is from about 4% to about 6% weight/volume.
4. The composition of claim 1, wherein the low HLB non-ionic hydrophilic surfactant is present at a concentration of 1% to 8% expressed as a weight by volume of emulsion (w/v).
5. The composition of claim 1, wherein the non-ionic lipophilic surfactant is present at a concentration of 0.1% to 2.5% expressed as a weight by volume of emulsion (w/v).
6. The composition of claim 1, wherein the mineral oil is present at a concentration of 20% to 40% (v/v).
7. The composition of claim 1, wherein the emulsion has a phase inversion temperature (PIT) of between 33 to 66 °C.
8. The composition of claim 1, wherein the low HLB non-ionic hydrophilic surfactant is selected from the group consisting of ethoxylated fatty acid triesters of sorbitan, ethoxylated fatty acid diesters of sorbitan, ethoxylated fatty acid monoesters of

sorbitan, ethoxylated fatty alcohols, ethoxylated fatty acids ethoxylated castor oil and combinations thereof.

9. The composition of claim 8, wherein the ester of said ethoxylated fatty acid ester is selected from the group consisting of oleate, palmitate, stearate, isostearate, laurate and combinations thereof.
10. The composition of claim 1, wherein the non-ionic lipophilic surfactant is selected from the group consisting of fatty acid esters of sorbitan, fatty acid esters of mannide, di-ethoxylated fatty acid esters of mannide, tri-ethoxylated fatty acid esters of mannide, tetra-ethoxylated fatty acid esters of mannide and combinations thereof.
11. The composition of claim 10, wherein the ester of the fatty acid esters is selected from the group consisting of oleate, palmitate, stearate, isostearate, laurate and combinations thereof.
12. The composition of claim 1, wherein the high HLB non-ionic hydrophilic surfactant is selected from the group consisting of ethoxylated fatty acid monoesters of sorbitan, ethoxylated fatty alcohols, ethoxylated fatty acids, non-ionic block-copolymer, and combinations thereof.
13. The composition of claim 12, wherein the ethoxylated monoester of sorbitan is selected from the group consisting of ethoxylated sorbitan monolaurate, ethoxylated sorbitan monopalmitate, ethoxylated sorbitan monostearate, ethoxylated sorbitan monooleate, and combinations thereof.
14. The composition of claim 1, wherein the mineral oil is selected from the group consisting of paraffin oil, squalane, pristane, polyisobutene oil, hydrogenated polyisobutene oil, polydecene oil, polyisoprene oil, polyisopropene oil and combinations thereof.
15. The composition of claim 1 which comprises a paraffin oil, a sorbitan fatty acid monoester as a non-ionic lipophilic surfactant, an ethoxylated fatty acid triester of

sorbitan as a low HLB non-ionic hydrophilic surfactant and a non-ionic block-copolymer as a high HLB non-ionic hydrophilic surfactant.

16. The composition of claim 15, wherein the sorbitan fatty acid monoester is a sorbitan monooleate, the ethoxylated fatty acid triester of sorbitan is an ethoxylated trioleate of sorbitan and the non-ionic block-copolymer is a polyoxyethylene/polyoxypropylene polymer (POE-POP).
17. The composition of claim 16, wherein the paraffin oil is present at a concentration of 10% to 40%v/v, the sorbitan monooleate is present at a concentration of 0.2% to 1.5% w/v, the ethoxylated trioleate of sorbitan is present at a concentration of 2% to 5% w/v and the POE-POP is present at a concentration of 0.1% to 0.5%w/v.
18. The composition of claim 16, wherein the paraffin oil is present at a concentration of 29.3% v/v, the sorbitan monooleate is present at a concentration of 0.6% w/v, the ethoxylated trioleate of sorbitan is present at a concentration of 3.4% w/v and the POE-POP is present at a concentration of 0.25% w/v.
19. The composition of claim 1, wherein the immunogen is selected from the group consisting of an inactivated pathogen, an attenuated pathogen, a subunit, a recombinant expression vector, and a plasmid or combinations thereof.
20. The composition of claim 19, wherein the pathogen is selected from the group consisting of a virus, a bacterium, a fungus, protozoal parasite or combinations thereof.
21. The composition of claim 19, wherein the immunogen is an inactivated virus.
22. The composition of claim 21, wherein the immunogen is an inactivated porcine circovirus type 2 (PCV-2) virus.
23. The composition of claim 19, wherein the immunogen is an inactivated inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterium.

24. A method for inducing an immunological response in an animal against a pathogen comprising administering to said animal a vaccine composition according to claim 19.
25. A method according to claim 24, wherein the immunogen is selected from the group consisting of an inactivated pathogen, an attenuated pathogen, a subunit, a recombinant expression vector, and a plasmid or combinations thereof.
26. A method according to claim 25, wherein the immunogen is selected from the group consisting of an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterium, an inactivated d porcine circovirus type 2 (PCV-2) virus or combinations thereof.
27. A method according to claim 25, wherein the vaccine composition is administered as a one-shot regimen.
28. A method according to claim 24, wherein the animal is selected from the group consisting of cattle, pigs, horses, dogs, cats, chickens, ducks, and turkeys.
29. The method of claim 27, wherein the administration is intramuscular (IM), intradermal (ID) or subcutaneous (SC) injection.
30. The method of claim 29, wherein the administration is done with a needleless injector.

Figure 1

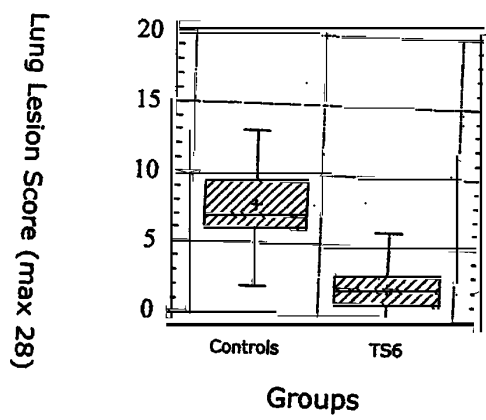
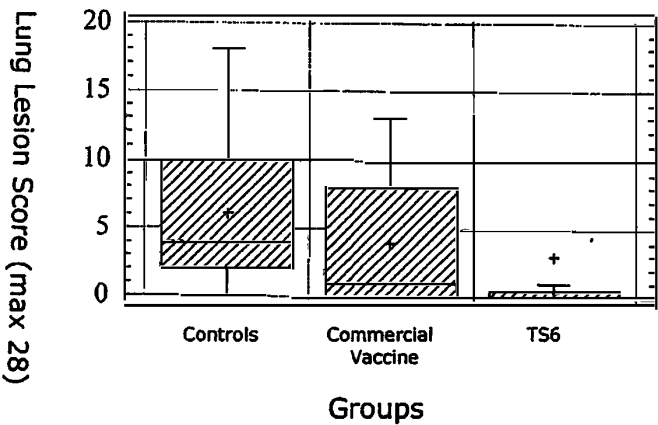


Figure 2



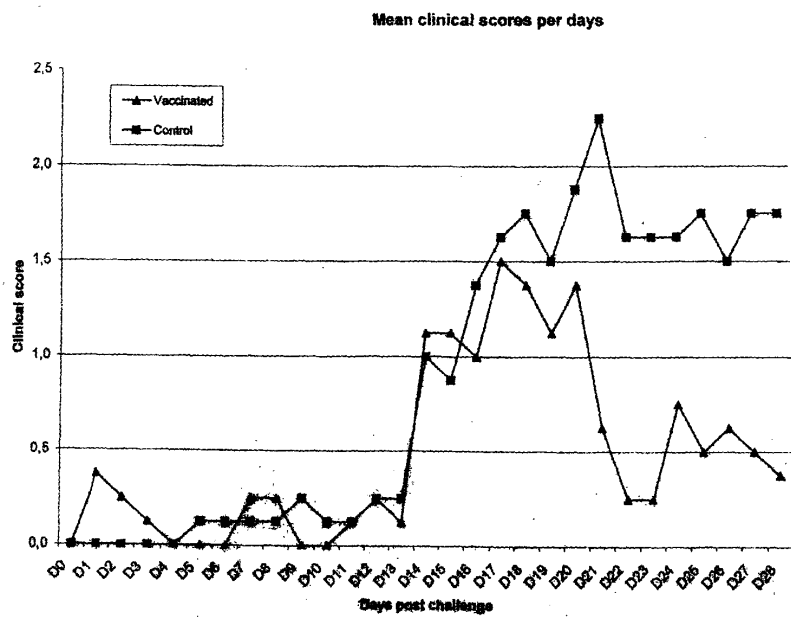
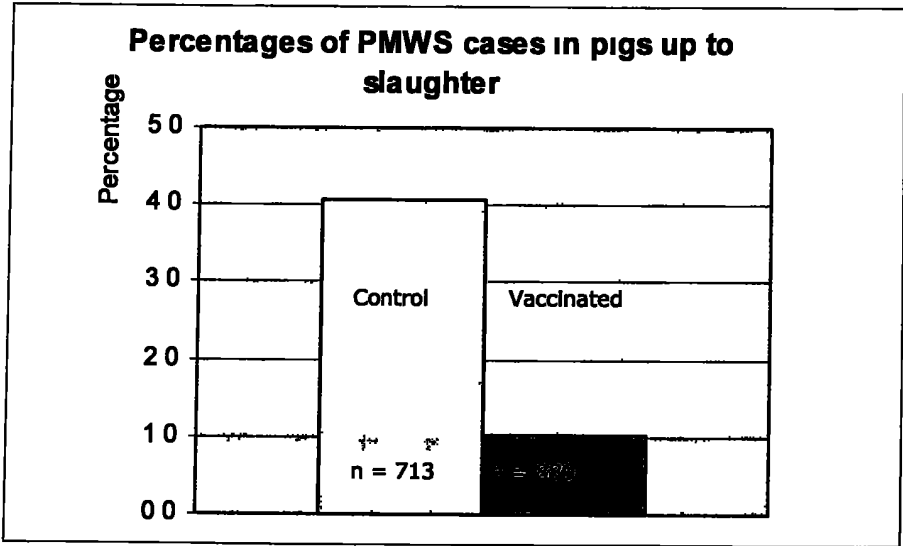


Figure 3

Figure 4



8

Nuevas Formulaciones de Vacunas

Esta aplicación reclama prioridad para la Aplicación US provisional No. 60/490,345 presentada el 24 de julio de 2003, el contenido de la cual es incorporado por referencia en su integridad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con emulsiones de aceite en agua, su uso como coadyuvantes y composiciones farmacéuticas, inmunológicas y de vacunas que las incluyen.

DESCRIPCION DE LAS ARTES RELACIONADAS

El uso de coadyuvantes en las vacunas es bien conocido. Un coadyuvante es una composición, que cuando se combina con un antígeno de vacuna, incrementa la respuesta inmune del antígeno de vacuna en comparación con la respuesta inducida por el antígeno de vacuna solamente. Entre las estrategias que promueven la inmunogenicidad de los antígenos están aquellas que resultan en particulados de antígenos de vacuna, aquellas que polimerizan y emulsifican los antígenos de vacuna, métodos de encapsulamiento de los antígenos de vacuna, métodos para incrementar las respuestas de citokina innata del receptor y métodos que dirigen los antígenos de vacuna a células de antígenos. (Nossal, 1999, In: Fundamental Immunology. Paul (Ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.; Vogel and Powell, 1995, In. Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach. Powell and Newman (Eds.), Plenum Press, NY, N.Y. p.141) Debido al papel esencial que los coadyuvantes juegan en el mejoramiento de la inmunogenicidad de los antígenos de vacuna, el uso de coadyuvantes en la formulación de vacunas se ha dado virtualmente en todas partes (Nossal, 1999,

supra; Vogel and Powell, 1995, supra; ver también la publicación PCT WO 97/18837, cuyas enseñanzas son incorporadas aquí por referencia). Los coadyuvantes convencionales, bien conocidos en el arte, son de naturaleza diversa. Ellos pueden, por ejemplo, consistir de una sal inorgánica insoluble en agua, liposomas, micelas o emulsiones, por ejemplo el Coadyuvante de Freund. Otros coadyuvantes pueden ser encontrados en Vogel y Powell, 1995, denominado *supra*. Aunque no hay un mecanismo simple de la acción de un coadyuvante, una característica esencial es su habilidad para incrementar significativamente la respuesta inmune de un antígeno de vacuna en comparación con la respuesta inducida por el antígeno de vacuna solamente. (Nossal, 1999, supra; Vogel and Powell, 1995, supra). En este sentido, algunos coadyuvantes son más efectivos aumentando la respuestas inmunes humorales; otros son mas efectivos incrementando la respuestas inmunes mediadas por células (Vogel and Powell, 1995, supra); y todavía otro grupo de coadyuvantes incrementan ambos las respuestas inmune humorales y las mediadas por células contra los antígenos (Vogel and Powell, 1995, supra).

Generalmente, las emulsiones usadas en la formulación de vacunas comprenden una mezcla de aceite, solución acuosa y surfactantes. Algunas emulsiones incorporan un surfactante lipofílico tal como Span 80® y un surfactante hidrofílico como Tween 80®. Estas emulsiones pueden también contener compuestos tales como lecitina o saponina que es conocido que tienen propiedades iónicas surfactantes.

Sin embargo, problemas de estabilidad pueden ser observados con las emulsiones usadas como coadyuvantes de vacuna, en particular durante transporte y almacenamiento. Esto es particularmente cierto cuando estos compuestos contienen inmunógenos concentrados, especialmente inmunógenos concentrados no purificados. Típicamente, este es el caso con coadyuvantes

usados en vacunas inactivadas (sacrificadas). Este problema es aún mas significativo con composiciones de vacunas multivalentes debido a que los inmunógenos están mas concentrados en el mismo volumen de diluyente.

Otro problema con el uso de coadyuvantes esta ligado al riesgo de eventos adversos tales como toxicidad o inflamación local en el sitio de la inyección. Por ejemplo, una respuesta inflamatoria local y/o granuloma puede resultar después de la inyección. Para limitar tal reacción adversa, surfactantes y otros componentes pueden ser reducidos en la emulsión; sin embargo, la reducción puede luego resultar en un decrecimiento de la estabilidad de la vacuna. Hay en consecuencia, una necesidad por coadyuvantes novedosos y composiciones de vacunas que contengan tales coadyuvantes, con mayor seguridad y estabilidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

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

Otra incorporación de la presente invención provee una estable, segura y fácilmente administrable, en particular inyectable, emulsión (O/W) que actúa como un vehículo para el suministro de una composición farmacéutica que incluye al menos un ingrediente activo que puede ser, mas específicamente un inmunógeno.

Todavía otra incorporación de la presente invención provee una composición inmunogénica o vacuna estable, segura que incluye una emulsión O/W.

Una incorporación adicional de la presente invención provee un método de preparar una vacuna usando un coadyuvante de la presente invención; la vacuna así obtenida; y métodos de usarla

Todavía otra incorporación de la presente invención provee un equipo que incluye un inmunógeno u otra composición farmacéutica en un primera ampollita, y un coadyuvante hecho de acuerdo a la presente invención en un segunda ampollita, con el coadyuvante diseñado para ser mezclado con el inmunógeno u otro producto antes de su uso.

En otra incorporación preferida, la presente invención provee una emulsión W/O inyectable que comprende:

- (1) Una solución acuosa que contiene un inmúnogeno;
- (2) Un aceite mineral;
- (3) Un surfactante lipofílico no-iónico;
- (4) Un surfactante hidrofílico no-iónico que tiene un bajo valor de HLB el cual incluye diésteres de ácido graso etoxilado de sorbitan (generalmente tienen valores de HLB entre 11 y 13).

En otra incorporación preferida, la presente invención provee una emulsión W/O inyectable que comprende:

- (1) Una solución acuosa que contiene un inmúnogeno;
- (2) Un surfactante hidrofílico no-iónico que tiene un alto valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) mayor de 13 y menor de 40, en particular $HLB \geq 13.5$, y preferiblemente $HLB \geq 14$.
- (3) Un aceite mineral;
- (4) Un surfactante lipofílico no-iónico;

(5) Un surfactante hidrofílico no-iónico que tiene un bajo valor de HLB (valores de HLB de 9 a cerca de 13)..

En todavía otra incorporación preferida, la presente invención provee una composición de vacuna que incluye una emulsión novedosa que contiene al menos un inmunógeno adecuado para extraer forzar una respuesta inmunológica en un vacunado. La invención provee además composiciones en las cuales la emulsión actúa como un coadyuvante para incrementar la respuesta inmune inducida por un inmunógeno, en particular, para incrementar, la respuesta celular, la respuesta humoral o preferiblemente ambas.

En otra incorporación preferida, la presente invención provee un método de preparar la vacuna donde un inmunógeno, especialmente un inmunógeno en forma liofilizada o en solución acuosa, es mezclado con un coadyuvante de la presente invención. El inmunógeno puede ser seleccionado de un grupo consistente de: patógenos inactivados, patógenos atenuados, antígenos sub-unidad, vectores de expresión recombinados que incluyen plásmidos, y similares. El patógeno puede ser en origen bacterial, viral, protozario o fungo o el inmunógeno puede constituir una antitoxina.

En otra incorporación preferida, la presente invención provee un método de inducir una respuesta inmune en un vacunado contra un patógeno que comprende administrar la vacuna de la presente invención al vacunado.

En otra incorporación preferida, la presente invención provee un equipo que comprende al menos dos ampollas, en una primera ampolla un inmunógeno, especialmente un inmunógeno en forma liofilizada o en solución en un medio acuoso, y en una segunda ampolla un coadyuvante o emulsión de acuerdo a la presente invención.

Se hace notar que en esta exposición y particularmente en las reivindicaciones, términos tales como "comprende" , "comprendido", "comprendiendo" y similares tienen el significado atribuido a tales términos en la Ley de Patentes US, es decir, ella puede significar "incluye", "incluido", "incluyendo" y similares; y que términos tales como "consistiendo esencialmente de " y "consiste esencialmente de" tienen el significado asignado a ellos por la Ley de Patentes US, es decir, ellos permiten elementos no recitados explícitamente, pero excluyen elementos que son encontrados en el arte previo o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras incorporaciones son expuestas o son obvias o involucradas por, las siguientes descripciones detalladas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Una completa y capacitadora exposición de la presente invención, incluyendo el mejor modo de ella, para alguien de experiencia normal en el arte, es dada de manera particular en el resto de la especificación, incluyendo las referencias a las figura acompañantes, donde:

Figura 1 ilustra las calificaciones de lesiones del pulmón de cerditos expuestos 28 días después de vacunación de acuerdo al ejemplo 3. El valor medio es mostrado por una cruz, el cuartil mas bajo y el cuartil superior por una caja, la mediana estadística por una línea horizontal en la caja, el valor máximo al mínimo por una línea vertical.

Figura 2 ilustra las calificaciones de lesiones del pulmón de cerditos expuestos 20 días después de vacunación de acuerdo al ejemplo 4. El valor medio es mostrado por una cruz, el cuartil mas bajo y el cuartil superior por una caja, la mediana

estadística por una línea horizontal en la caja, el valor máximo al mínimo por una línea vertical.

Figura 3 proporciona un grafico que ilustra la progresión de una enfermedad clínica como se ejemplifica por una calificación clínica siguiendo una exposición de acuerdo con el ejemplo 6.

Figura 4 ilustra los resultados de una prueba de eficacia en terreno donde cerditos (n=998 cerdas) nacidos de cerdas vacunadas, una vez, antes de dar a luz con una vacuna PCV-2 preparada de acuerdo a la presente composición muestra una reducción significativa en mortalidad (75% de disminución) debido al síndrome de desgaste multisistémico postdestete (PMWS) en comparación con cerdas de control (n=713) nacidas de cerdas no vacunadas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Otros objetos, rasgos y aspectos de la presentes invención son expuestos en, o son obvios de, la siguiente descripción detallada. Debe ser entendido por alguien con habilidades normales en el arte que la presente discusión es una descripción de incorporaciones de ejemplo únicamente y que no se pretende limitar los aspectos mas amplios de la presente invención, los cuales están incorporados en la construcción de los ejemplos. De hecho, será aparente para aquellos hábiles en el arte que varias modificaciones y variaciones pueden ser realizadas en la presente invención sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención. Por ejemplo, rasgos ilustrados o descritos como parte de una incorporación pueden ser usados en otra incorporación para obtener todavía otra incorporación adicional. Es pretendido que la presente invención cubra tales modificaciones y variaciones dentro de los alcances de la las reivindicaciones anexas y sus equivalentes. Los contenidos de todas las referencias, patentes publicadas, y patentes citadas a través de la presente aplicación son en consecuencia incorporadas por referencia en su integridad.

Por conveniencia, ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos, y reivindicaciones anexas, son recogidos aquí.

Como se emplea aquí, el término "animal" incluye todos los animales vertebrados incluidos los humanos. El también incluye una animal individual en todas sus etapas de desarrollo, incluyendo las etapas embrionarias y fetal. En particular, el termino "animal vertebrado" incluye, pero no se limita a, humanos, caninos (es decir perros), felinos (es decir, gatos); equinos (es decir, caballos), bovinos (es decir, ganado) porcino (es decir, cerdos), así como las aviarias. El termino "aviano" como se emplea aquí se refiere a cualquier especie o subespecie de la clase taxonómica *ava*, tales como, pero no limitada a, pollos (criadores, engorde y ponedoras) pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, pericos, pinzones, aguilas, miras y ratities, incluyendo los avestruces, emus y cassowary

Como se emplea aquí, el término "cerdo" o "cerdito" significa un animal de origen porcino, mientras que "cerda" se refiere a la hembra de edad reproductiva y capacidad.

Como se emplea aquí, el término "virulento" significa un aislado que conserva su habilidad para ser infeccioso en una animal anfitrión.

Como se emplea aquí, el término "vacuna inactivada" significa una vacuna que contiene una organismo infeccioso o patógeno que ya no es capaz de replicarse o crecer. El patógeno puede ser en origen bacterial, viral, protozoario o fungal. La inactivación puede ser lograda por una variedad de métodos incluyendo congelación –deshielo, tratamiento químico (por ejemplo tratamiento con timerosal o formalina), sonicación, radiación, calor o cualquier otro medio convencional suficiente para prevenir la replicación del crecimiento de los organismos mientras mantiene su inmunogenicidad.

Como se emplea aquí, el término "inmunogenicidad" significa capaz de producir una respuesta inmune en un animal anfitrión contra un antígeno o antígenos. Esta respuesta inmune forma la base de la inmunidad protectora forzada por una vacuna contra un organismo infeccioso específico.

Como se emplea aquí, el término "respuesta inmune" se refiere a la respuesta forzada en un animal. Una respuesta inmune puede referirse a inmunidad celular (CMI); inmunidad humoral o puede envolver a ambas. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmune. Por ejemplo, una composición de vacuna de la presente invención puede específicamente inducir un incremento en la respuesta de interferon gamma.

Como se emplea aquí, el término "antígeno" o "inmunógeno" significa una sustancia que induce una respuesta inmune específica en un animal anfitrión. El antígeno puede comprender un organismo total, sacrificado, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinado que contiene un inserto con propiedades inmunológicas; un pedazo de fragmento de DNA capaz de inducir una respuesta inmune una vez presente en un animal anfitrión; una proteína, un polipéptido, un péptido, un epitopo, un haptén o cualquier combinación de ellos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede incluir una toxina o antitoxina.

Como se emplea aquí, el término "multivalente" significa una vacuna que contiene mas de un antígeno o de una misma especie (por ejemplo, diferentes aislados de *Mycoplasma hyopneumonia*) o de diferentes especies (por ejemplo aislados de ambas *Pasteurella hemolytica* y *Pasteurella multocida*) o una vacuna que contiene una combinación de antígenos de diferente género (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* y *Clostridium*).

Como se emplea aquí, el término "coadyuvante" significa una sustancia adicionada a una vacuna para incrementar la inmunogenicidad de la vacuna. El mecanismo de cómo un coadyuvante opera no es completamente conocido. Algunos coadyuvantes se cree que aumentan la respuesta inmune al liberar lentamente el antígeno, mientras que otros coadyuvantes son fuertemente inmunogénicos en sí mismos y se cree que funcionan sinérgicamente. Los coadyuvantes de vacunas incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de aceite y agua (por ejemplo, el coadyuvante completo de Freund y el coadyuvante incompleto de Freund), *Corynebacterium parvum*, Bacillus Calmette Guérin, hidróxido de aluminio, glucan, sulfato de dextran, óxido de hierro, alginato de sodio, coadyuvante Bacto, ciertos polímeros sintéticos tales como poli amino ácidos y copolímeros de amino ácidos, saponina, "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), "AVRIDINA" (N, N-dioctadecil-N', N'-bis(2-hidroxietil)-propanediamina), aceite parinado, dipéptido muramil y similares.

Como se emplea aquí, el término "transportador farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables y se refieren a un vehículo fluido para contener los antígenos de vacuna que puede ser inyectado en el anfitrión sin efectos adversos. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en el arte, incluyen, pero no se limitan a, agua esterilizada, y soluciones salina, glucosa, dextrosa o amortiguadora. Los vehículos pueden incluir agentes auxiliares que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, estabilizadores (por ejemplo, azúcares y amino ácidos), preservativos, agentes humectantes, agentes emulsificadores, agentes amortiguadores de pH, aditivos incrementadores de viscosidad, colores y similares.

Como se emplea aquí, el término "composición de vacuna" incluye al menos un antígeno o inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inducir una respuesta inmune en un anfitrión. Las composiciones de vacuna

pueden ser administradas en dosificaciones y por técnicas bien conocidas a aquellos experimentados en las artes médicas y veterinarias, teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, especies y condiciones del animal receptor, y la vía de administración. La vía de administración puede ser percutánea, por administración a las mucosas (es decir, oral, nasal, anal, vaginal) o vía la ruta parenteral (intradermal, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). Las composiciones de vacuna pueden ser administradas solas, o pueden ser co-administradas o secuencialmente administradas con otros tratamientos o terapias. Las formas de administración pueden incluir suspensiones, jarabes o elixires, y preparación para administración parenteral, subcutánea, intradermal, intramuscular o administración intravenosa (por ejemplo, administración inyectable) tales como suspensiones esterilizadas o emulsiones. Las composiciones de vacuna pueden ser administradas como un spray o mezcladas en alimentos y/o agua, o suministradas en una mezcla con un vehículo aceptable diluyente, o excipiente tal como el agua esterilizada, solución fisiológica salina, glucosa o similares. La composición puede contener sustancias auxiliares como agentes humectantes y emulsificantes, agentes amortiguadores de pH, coadyuvantes, aditivos incrementadores de viscosidad o gelantes, preservativos, agentes saborizantes, colores y similares, dependiendo de la ruta de administración y la preparación deseada. Textos farmacéuticos estándar , tales como " Remington's Pharmaceutical Science" 1190 puede ser consultado para hacer preparaciones adecuadas, sin indebida experimentación .

La presente invención provee un novedoso coadyuvante de aceite en agua (O/W) o emulsión que incluye:

- (1) una solución acuosa que contiene un antígeno de vacuna o un inmúnógeno capaz de inducir una respuesta inmune en un receptor;

- (2) un surfactante no iónico hidrofílico que tiene un valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) mayor de 13 y menor de 40 ($HLB > 13$, particular $HLB \geq 13.5$, y preferiblemente $HLB \geq 14$);
- (3) un aceite mineral;
- (4) un surfactante lipofílico no iónico; y
- (5) un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB bajo (valor de HLB entre 9 y 13)

Las emulsiones preparadas de acuerdo a la presente invención están basadas en una combinación de al menos 3 surfactantes escogidos entre los miembros de tres grupos diferentes de surfactantes, y es posible usar uno o mas surfactantes que pertenezcan a cada grupo.

En una incorporación preferida, la concentración de surfactantes hidrofílicos no iónicos (5) en la emulsión (en la presente especificación esto significa que la emulsión final incluya todos los ingredientes a menos que se indique de otra manera) es de 1 % a 8 %, en particular de 1.5 % a 6 %, preferiblemente de 2 % a 5 %, mas preferiblemente de 2.5% a 4 %, expresado como un porcentaje en peso por volumen de la emulsión (w/v).

Este grupo de surfactantes comprende surfactantes hidrofílicos no iónicos que tienen un valor bajo de HLB (valor de HLB entre 9 y 13). Este grupo incluye pero no se limita a monoéster de ácido graso etoxilado de sorbitan (en particular 5 grupos extoxil)(por ejemplo monooleato de sorbitan etoxilado tal como Tween 81®, diéster de ácido graso etoxilado de sorbitan, triéster de ácido graso etoxilado de sorbitan (en particular 20 grupos extoxil) (por ejemplo, triolato de sorbitan etoxilado Tween 85®), triestereato de sorbitan etoxilado tal como Tween 65®, alcoholes grasos etoxilados (en particular 5-10 grupos etoxil) (por ejemplo, Brij 76®, Brij 56®, Brij 96®), ácidos grasos etoxilados (en particular 5-10 grupos etoxil)

(por ejemplo, Simulsol 2599®, Myrj 45®), aceite de ricino etoxilado (en particular 25-35 grupos etoxil) (por ejemplo, Arlatone 650®, Arlatone G®) y combinaciones de ellos.

Los diesteres de ácido graso etoxilado de sorbitan y los triesteres de ácido graso etoxilado de sorbitan son los preferidos, así como las combinaciones de ambas especies. El ácido graso es preferiblemente seleccionado de un grupo consistente en oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y la combinación de ellos. El triester de ácido graso etoxilado de sorbitan preferido incluye trioleato de sorbitan etoxilado tal como Twee 85®, o tristearato de sorbitan etoxilado tal como Tween 65®.

En una incorporación preferida, la concentración de surfactante hidrofílico no iónico (2) es generalmente de 0.1 % a 1.5 %, en particular de 0.2 % a 1.4 %, preferiblemente de 0.3 % a 1.3 %, mas preferiblemente de 0.4 % a 1.2 %, expresado como un porcentaje en peso por volumen de la emulsión (w/v).

El segundo grupo de surfactantes comprende surfactantes hidrofílicos no iónicos que tienen un alto valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) ($HLB > 13$, en particular $HLB \geq 13.5$, y preferiblemente $HLB \geq 14.9$). Este grupo comprende monoesteres de ácido graso etoxilado de sorbitan (en particular 20 grupos extoxil)(por ejemplo monolaurato de sorbitan etoxilado tal como Tween 20®, monopalmitato de sorbitan etoxilado tal como Tween 60®, monooleato de sorbitan etoxilado tal como Tween 80®, alcoholes grasos etoxilados (en particular 15-30 grupos etoxil) (por ejemplo, Brij 78®, Brij 98®, Brij 721®), ácidos grasos etoxilados (en particular 15-30 grupos etoxil) (por ejemplo, Myrj 49®, Myrj 51®, Myrj 52®, Myrj 53®), copolímero en bloque no iónicos (por ejemplo, polioxietileno/copolímero de polioxipropileno (POE-POP), 1 tal como Lutrol F127 , Lutrol F68®) y combinaciones de ellos.

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

El surfactante preferido (2) incluye monoésteres de ácido graso etoxilado de sorbitan, tal como esos descritos arriba.

En una incorporación preferida, la concentración de surfactante lipofílico no iónico (4) es de 0.1 % a 2.5 % , en particular de 0.2 % a 2 %, preferiblemente de 0.2 % a 1.5 %, más preferiblemente de 0.2 % a 1.2 %, expresado como porcentaje en peso por volumen de la emulsión (w/v).

Este grupo de surfactantes comprende ésteres de ácido graso de sorbitan (por ejemplo, monolaurato de sorbitan, como Span 20®, monopalmitato de sorbitan, tal como Span 40®, monoestearato de sorbitan, tal como Span 60®, triestearato de sorbitan, tal como Span 65®, monooleato de sorbitan, como Span 80®, triolato de sorbitan, como Span 85®, sorbitan monoisostearato, tal como Arlacel 987®, isostearato de sorbitan , tal como Crill 6®), ésteres de ácido graso de mannide (por ejemplo, Montanide 80®, monooleato de mannide (tal como Arlacel A®), dioleato de mannide, trioleato de mannide, tetraoleato de mannide), ésteres de ácido graso etoxilado de mannide (2,3 o 4 grupos etoxil) (por ejemplo, Montanide 888®, Montanide 103®, monooleato de mannide etoxilado, dioleato de mannide etoxilado, triolato de mannide etoxilado, tetraoleato de mannide etoxilado) y combinaciones de estos.

El ácido graso es preferiblemente seleccionado de un grupo consistente de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de estos.

Los surfactantes preferidos (4) incluye los esteres de ácido graso de sorbitan, en particular esos descritos arriba, y combinaciones de ellos.

Los surfactantes de la invención pueden tener ácidos grasos de origen animal o de vegetal. El cambio de un origen por el otro (por ejemplo Tween 80® animal a Tween 80® vegetal) puede ser hecho simplemente con solo ajustes menores en la formulación de la emulsión.

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

Generalmente, la emulsión de acuerdo a la invención puede tener una temperatura de inversión de fase (PIT) la cual es ≥ 33 °C, en particular varia de 33 °C a 65 °C, mas particularmente de 36 °C a 60 °C, preferiblemente de 37 °C a 55 °C, y mas preferiblemente de 38 °C a 50 °C.

El PIT es la temperatura a la cual la emulsión de agua en aceite cambia a emulsión de aceite en agua o de-fase (rompimiento de la emulsión y separación de las 2 fases). El valor PIT puede ser medido por varios medios, como por ejemplo por apariencia visual (por ejemplo, ver ejemplo 2) o por conductividad. La emulsión es colocada a una temperatura por debajo del PIT de la emulsión, por ejemplo de cerca de 25 °C en un baño de agua. La temperatura es progresivamente incrementada . El cambio del aspecto visual de la emulsión es observado en comparación con una emulsión de control, notando la fluidez, la viscosidad, las separación en las dos fases, el cambio del aspecto de la superficie debido a la migración de la fase aceitosa a la superficie. La temperatura para la cual este cambio de aspecto visual fue observado, es el valor PIT de la emulsión. Alternativamente, el PIT es determinado mediante un rápido paso del valor de

conductividad de cerca de 5-8 miliSiemens/centimetro (mS/cm) (emulsión de aceite en agua) a un valor de 0 mS/cm (emulsión de agua en aceite) medido por una sonda colocada dentro de la emulsión cerca de su superficie. La temperatura, para la cual la transición fue observada, es el valor PIT de la emulsión. Alguien de habilidades normales en el arte sería capaz de determinar combinaciones de surfactantes y aceite, incluyendo sus respectivas concentraciones, para producir emulsiones de acuerdo a la invención, y en particular emulsiones que tienen un valor PIT dentro de los rangos definidos arriba sin experimentación indebida.

En una incorporación particular de la presente invención, una emulsión como se describió aquí no contiene ningún surfactante iónico o cualquier componente conocido que tenga propiedades de surfactantes ionicos, tal como lecitina o saponina. Generalmente, las emulsiones de acuerdo a la presente invención pueden contener, en volumen por volumen de emulsión, de 3 % a 55 % de aceite, en particular de 5 % a 50 % de aceite, preferiblemente de 10 5 a 40 % de aceite y, mas preferiblemente; de 20 5 a 40 % de aceite. Por definición, los rangos de valores en la presente especificación incluyen siempre el limite del rango, a menos que se indique de otra manera.

El aceite usado puede ser aceite mineral incluyendo, pero no limitado a, aceite de parafina tal como aceite isoparafínico y/o aceite nafténico, squalano, pristano, aceite de poliisobutano, aceite de poliisobutano hidrogenado, aceite polideceno, aceite poliisopreno, aceite poliisopropeno y similares. Un aceite mineral ventajoso útil en la presente invención puede incluir un aceite que comprende una cadena de carbón recta o ramificada que tiene un número de átomos de carbón mayor de 15, preferiblemete de 15 a 32, y libre de compuestos aromáticos. Tales aceites pueden, por ejemplo, ser esos comercializados bajo el nombre " MARCOL 52®" o " MARCOL 82®" (producido por Esso, France) o "DRAKEOL 6VR®" (producido por Penreco, USA).

El aceite puede ser también una mezcla de aceites de al menos dos aceites seleccionados entre los aceites descritos aquí, y en cualquier proporción. La mezcla de aceites puede también incluir al menos un aceite seleccionado de entre los aceites descritos arriba y al menos un aceite vegetal, y este aceite vegetal representa de cerca de 0.1 % a cerca de 33% de la fase aceitosa, preferiblemente de cerca de 10 % a cerca de 25 % v/v. Estos aceites vegetales son aceites no saturados ricos en ácido oleico que son biodegradables y preferiblemente líquidos a temperatura de almacenamiento (cerca + 4 grados C) o al menos hace posible dar emulsiones que son líquidas a esta temperatura. Por ejemplo el aceite vegetal puede ser aceite de nueces molidas, aceite de nuez, aceite de girasol, aceite de soya, aceite de onagro y similares.

En una incorporación preferida, los surfactantes hidrofílicos (2) y (5) preferiblemente incluyen surfactantes que tienen la misma parte hidrofílica de las moléculas. Por ejemplo, se hace uso de esteres de ácido graso etoxilado de sorbitan para cada uno de los surfactantes hidrofílicos (2) y (5). Por ejemplo, si Tween 85® es escogido como surfactante hidrofílico no iónico que tiene un bajo valor de HLB, el surfactante hidrofílico no iónico que tiene un alto valor de HLB tendrá ventajosamente una parte hidrofílica constituida con sorbitan etoxilado, tal como Tween 80®.

Generalmente, la presente invención contempla el uso de una solución acuosa que comprende un vehículo veterinario adecuado o farmacéuticamente aceptable, excipiente, o diluyente que incluye, pero no se limita a, agua esterilizada, solución salina fisiológica, glucosa, solución amortiguadora y similares. El vehículo, excipiente, o diluyente puede, por ejemplo también incluir amino ácidos, péptidos, antioxidantes, bactericidas, compuestos bacteriostáticos. La solución acuosa es adicionada al aceite y el surfactante en cantidad para obtener el 100% del volumen de la emulsión de acuerdo a la invención.

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

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

El HLB puede tener un valor cuyo rango es de 0 (para la molécula mas lipofílica) a 20 (para la molécula mas hidrofílica) . De acuerdo a la composición química del surfactante (especialmente por ejemplo la adición de grupos etoxil o de óxidos alkenos), esta estimación puede cambiar y el dominio y el dominio de los valores de HLB puede incrementar (por ejemplo, el Lutrol F68® tiene un HLB de 29) Con una mezcla de surfactante , el HLB de la mezcla es la adición del HLB de cada surfactante, balanceado por su razón de peso

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

En una incorporación de una emulsión hecha de acuerdo a la presente invención, el valor final HLB de la emulsión es de cerca de 9 a cerca de 12, preferiblemente de cerca de 9.5 a cerca de 11.5 y mas preferiblemente de cerca de 10 a cerca de 11.5

La presente invención contempla una emulsión que incluye un aceite de parafina (en particular a una concentración de cerca de 10 % a cerca de 40 % preferiblemente de cerca de 10 % a cerca de 40% expresado en volumen por volumen de la emulsión (v/v); un monoéster de ácido graso de sorbitan (como un surfactante lipofílico no iónico), un triéster de ácido graso etoxilado de sorbitan (como un surfactante no iónico que tiene un valor bajo de HLB); y un monoéster de ácido graso etoxilado de sorbitan (como un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un alto valor de HLB). En particular el monoéster de ácido graso de sorbitan es un monoaleato de sorbitan (en particular a la concentración de 0.2 % a 1.5 % ,

preferiblemente de 0.2 % a 1.2 % expresado como peso por volumen de emulsión (w/v)), el triéster de ácido graso etoxilado de sorbitan es un triolato etoxilado de sorbitan (en particular a concentraciones de 2 % a 5 %, preferiblemente de 2.5 % a 4 % (w/v)) . y el monoéster de ácido graso etoxilado de sorbitan es un monooleato de sorbitan etoxilado (en particular en concentraciones de 0.3 % a 1.3 %, preferiblemente de 0.4 % a 1.2 % w/v). Por ejemplo la emulsión incluye el aceite de parafina a cerca del 29.3 % en volumen por volumen de emulsión, el monoaleato de sorbitan a 0.6 % en peso por volumen de emulsión, el triolato etoxilado de sorbitan a 3.4 % en peso por volumen de emulsión, y el monooleato de sorbitan etoxilado a 0.75 % en peso por volumen de emulsión.

En una segunda incorporación de acuerdo a la presente invención, la emulsión incluye un aceite de parafina (en particular a una concentración de 10 % a 40%, preferiblemente de 20% a 40 % (v/v), un monoéster de ácido graso de sorbitan (como un surfactante no iónico), un triéster de ácido graso etoxilado de sorbitan (como un surfactante no iónico lipofílico), un triéster de ácido graso etoxilado de sorbitan (como un surfactante no iónico hidrofílico que tiene un bajo valor de HLB), y un copolímero en bloque no iónico (como un surfactante hidrofílico no iónico que tiene un valor de HLB alto). En particular el monoéster de ácido graso de sorbitan es un monoaleato de sorbitan (en particular a concentraciones de 0.2 % a 1.5 %, preferiblemente de 0.2 % a 1.2 % w/v), el triéster de ácido graso etoxilado de sorbitan es un triolato etoxilado de sorbitan (en particular a concentraciones de 2 % a 5 %, preferiblemente de 2.5 % a 4 % w/v) y el bloque de copolímero no iónico es un polímero de polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP) (en particular a concentraciones de 0.1 % a 0.5 %, preferiblemente de 0.2 % a 0.4 % w/v). Por ejemplo la emulsión incluye el aceite de parafina a cerca del 29.3 % v/v, el monooleato de sorbitan a 0.6% w/v, el triolato etoxilado de sorbitan a 3.4 % w/v, y el monooleato etoxilado de sorbitan a .25 % w/v.

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

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

Una emulsión de acuerdo a esta incorporación comprende diésteres de ácido graso etoxilado de sorbitan que puede contener hasta 20 grupos etoxi. Los ácidos grasos pueden ser de origen animal o vegetal y pueden ser seleccionados de un grupo consistente de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de ellos. En una incorporación el ácido graso etoxilado es preferiblemente oleato. Los otros ingredientes, así como las propiedades generales de la emulsión tal como el PIT, pueden tener las mismas características que las de esos descritos arriba.

Preferiblemente, el surfactante (4) incluye diésteres de ácido graso etoxilado de sorbitan, tales como diolato de sorbitan etoxilado, distearato de sorbitan etoxilado o diisostearato de sorbitan etoxilado, diplamitato de sorbitan etoxilado; dilaurato de sorbitan etoxilado y combinaciones de ellos.

Opcionalmente otros compuestos pueden ser adicionados como coadyuvantes a la emulsión, incluidos, pero no limitados a, alum; oligonucleotidos CpG (ODN), en particular ODN 2006, 2007, 2059 o 20135 (Pontarollo R.A et al., Vet immunol. Immunopath, 2002, 84: 43-59; Wernette C.M et al., Vet immunol. Immunopath,

2003, 92: 89-113); poliA-poliU ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, 6:03); bromuro de imetildiocadecilamonio (DDA) ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", edited by Michael F. Powell and Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, volume 6: 157); N,N-diocadecil-N', N'-bis(2-hidroxietyl)propanodiamina (tal como Avridine®) (Ibid, p 148), carbomer, chitosan (ver Patente US serie No 5,980,912 por ejemplo).

La presente invención también provee un método para hacer la composición de vacuna o la composición inmunológica que comprende al menos un antígeno o unmunógeno y un coadyuvante o emulsión hecha de acuerdo a la presente invención. El inmunógeno puede ser incorporado durante la preparación de la emulsión o, en una incorporación alternativa, el inmunógeno puede ser adicionado a la emulsión mas tarde como, por ejemplo, justo antes de usarse.

La cantidad total de solución acuosa usada puede estar presente en la emulsión producida primero. O puede ser que solo una parte de esta solución acuosa se usada para preparar la emulsión, y la cantidad remanente de la solución acuosa es adicionada después de la incorporación del inmunógeno. El inmunógeno o antígeno puede estar en una forma liofilizada o presente en otra forma sólida apropiada y luego mezclado con la emulsión o, alternativamente, el antígeno puede estar en solución , en particular en solución acuosa , y esta solución mezclada con la emulsión.

Los surfactantes son preferiblemente adicionados a o el aceite o la solución acuosa de acuerdo a su solubilidad. Por ejemplo, los surfactantes lipofílicos no iónicos son adicionados al aceite de acuerdo a la invención mientras que los surfactantes no iónicos hidrofílicos que tienen un alto valor de HLB son adicionados a la solución acuosa.

La emulsificación puede ser preparada de acuerdo a los métodos convencionales conocidos para alguien con habilidades normales en el arte. Por ejemplo, en una incorporación de la presente invención, la emulsión puede ser preparada a una temperatura por debajo del PIT de la emulsión, en particular a temperatura ambiente, por ejemplo, a cerca de 25 °C. La fase acuosa y la fase aceitosa son mezcladas por agitación mecánica, por ejemplo, con una turbina equipada con un estator-rotor capaz de producir una alta fuerza de corte. Preferiblemente la agitación empieza a una baja velocidad de rotación y lentamente se incrementa en relación a la adición progresiva generalmente de la solución acuosa al aceite. Preferiblemente la solución acuosa es progresivamente adicionada al aceite. La razón de aceite/solución acuosa puede ser adaptada para producir una emulsión de agua en aceite (W/O), por ejemplo, a una concentración de cerca del 40 % a cerca del 55 % de aceite (v/v). Cuando la agitación es suspendida, la emulsión cambia progresivamente de una emulsión O/W (inversión de fase). Después de la inversión y si es necesario, la emulsión es diluida por adición de una solución acuosa para obtener la concentración deseada de aceite en la emulsión final. La emulsión puede ser almacenada a cerca de 5 °C.

En otra incorporación, la emulsión puede ser preparada a una temperatura mas alta que la del PIT de la emulsión. En un primer paso, la fase acuosa y la fase aceitosa son mezcladas entre si a una temperatura mas alta que la del PIT de la emulsión. Preferiblemente la fase acuosa es progresivamente adicionada al aceite. La relación de aceite/solución acuosa puede ser adaptada para obtener una emulsión agua en aceite (W/O), por ejemplo a una concentración de cerca de 40 % a cerca de 55 % de aceite (v/v). La emulsificación puede ser realizada por agitación con una baja o sin fuerza cortante, por ejemplo, con un mezclador estático o una hélice marina o con una turbina a muy baja velocidad de rotación. La emulsión obtenida es una emulsión de agua en aceite (W/O). En un segundo paso, la emulsión es enfriada progresivamente por debajo del PIT. Durante este

paso, la emulsión cambia a una emulsión O/W (inversión de fase). Después de la inversión si se necesita, la emulsión es diluida por adición de una solución acuosa para obtener la concentración deseada de aceite en la emulsión final. La emulsión puede ser almacenada a cerca de 5 °C.

El tamaño de las gotas en la emulsión puede ser de cerca de 100 nm a cerca de 500 nm. La emulsión puede ser usada., por ejemplo, como un coadyuvante para formular una vacuna o una composición farmacéutica. La emulsión también puede ser usada como un solvente para disolver un producto seco, especialmente un producto liofilizado que contenga, por ejemplo, microorganismos atenuados o vectores recombinados vivos,

En una incorporación particular, una pre-emulsión es producida con solo una parte de la solución acuosa. Esta pre-emulsión puede ser diluida por adición de una suspensión de un ingrediente activo tal como una droga o un inmunógeno, preferiblemente un inmunógenos, para obtener la composición final. Alternativamente, la emulsión puede ser diluida con una solución acuosa y usada para disolver un producto seco tal como un producto liofilizado.

El inmunógeno o antígeno adecuado para usar en la presente invención puede ser seleccionado de un grupo consistente de patógenos inactivos, patógenos atenuados, subunidades inmunogénicas (es decir, proteínas, polipéptidos, péptidos, epitopos, haptens), o vectores de expresión recombinados, incluyendo plásmidos que tienen insertos inmunogenéticos. En una incorporación de la presente invención, el inmunógeno es un microorganismo inactivado o sacrificado. En otra incorporación de la invención, la composición de vacuna incluye un inmunógeno seleccionado de un grupo de patógenos aviares que incluyen, pero no se limitan a, *Salmonella typhimurim*, *Salmonella enteriditis*. Virus de bronquitis infecciosa (IBV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus del síndrome

de calda de huevo (EDS), virus de enfermedad Bursal infecciosa (IBDV), virus de influenza aviar y similares, y combinaciones de ellos.

Alternativamente la composición de vacuna incluye un inmunógeno seleccionado de un patógeno felino tal como, pero no limitado a, virus herpes felino (FHV), virus de rabia, y similares y combinaciones de ellos.

En todavía otra incorporación, una composición de vacuna de la presente invención incluye un inmunógeno seleccionado de un patógeno canino que incluye, pero no se limita a, virus de rabia, virus herpes canino (CHV), parvo virus canino (CPV), virus corona de canino. *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Borrelia burgdorferi* y similares o combinaciones de ellos.

En todavía otra incorporación de la invención, la composición incluye un inmunógeno seleccionado de un patógeno equino, tal como virus herpes equino (tipo 1 o tipo 4), virus de influenza equina, tetano, virus de nilo de occidente y similares o combinaciones de ellos.

En todavía otra incorporación de la invención la composición incluye un inmunógeno seleccionado de un patógeno bovino, tal como virus de rabia, rotavirus bovino, virus de parainfluenza tipo 3 (bPIV-3), coronavirus bovino, virus de diarrea viral bovina (BVDV), virus de enfermedad de boca y pie (FMDV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), virus Rinotraqueitis bovino (IRB), *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* y similares o combinaciones de ellos.

En aun otra incorporación de la presente invención, la composición incluye un inmunógeno seleccionado de un patógeno porcino tal como, pero no limitado a,

75. 80

virus de influenza swine (SIV), circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino, virus de pseudorabia (PRV), parvovirus porcino (PPV), FMDV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* y similares y combinaciones de ellas.

Una incorporación preferida de la invención provee una composición de vacuna que incluye al menos un inmunógeno y una emulsión en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunógenos incluyen virus, bacterias, hongos y similares y pueden ser producidos por métodos de cultivo in-vitro usando un medio de cultivo apropiado o líneas de células anfitrionas y métodos convencionales bien conocidos a aquellos de habilidades normales en el arte. Por ejemplo, PRRS puede ser cultivado en la línea de células apropiada, tal como la línea de células MA-104 (ver Patente US serie No 5,587,164; 5,866,401; 5,840,563; 6,252,404 entre otras). En una forma similar, PCV-2 puede ser cultivado usando línea de células PK-15 (ver Patente US serie No 6,391,314); SIV puede ser cultivado sobre óvulos (Patente US serie No 6,048,537); y *Mycoplasma hyopneumoniae* puede ser cultivado en un medio de cultivo adecuado (US serie Nos 5,968,525; US 5,338,543; Ross R.F et al; Am J. Vet. Res., 1984, 45: 1899:1905)

Para obtener un inmunológico inactivado, o composición de vacuna, el patógeno es preferiblemente inactivado después de cultivarlo y, opcionalmente, sometido a clarificación por medio de un tratamiento químico usando, por ejemplo, formalina o formaldehído, beta-propiolactona, etilenoimina, etilenoimina binaria (BEI), timerosal y similares, y/o un tratamiento físico (por ejemplo tratamiento de calor o sonicación). Los métodos para inactivación son bien conocidos a aquellos con experiencia en el arte. Por ejemplo, el virus PRRS puede ser inactivado por tratamiento de beta-propiolactona (Plana-Duran et al.; Vet. Microbil; 1997, 55: 361-

370) o por tratamiento BEI (Patente US serie No 6,048,537); la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* puede ser inactivada por tratamiento de formaldehído (Ross R.F. supra), por tratamiento de BEI o etilenoimina (ver WO 91/18627) , o por tratamiento de timerosal (Patente US serie Nos. 5,968, 525 y 5,338,543).

El patógeno inactivado puede ser concentrado por técnicas de concentración convencionales, en particular por ultrafiltración, y/o purificado por medios de purificación convencionales, en particular usando técnicas de cromatografía que incluyen, pero no se limitan a, gel-filtración, ultracentrifugación o un gradiente de sucrosa, o precipitación selectiva, en particular en la presencia de polietileno glicol (PEG).

Los inmunógenos útiles en las composiciones de vacunas de acuerdo a la presente invención también incluyen vectores de expresión. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión recombinados en vivo tales como un vector polinucleotido o un plásmido (EP-A2-1001025; Chaudhuri P. Res. Vet Sci. 2001, 70: 255-6), vectores de virus tales como, pero no limitados a, vectores adenovirus, vectores poxvirus tales como fowlpox (Patente US serie Nos 5,174,993; 5,505,941; y %,766,599) o vectores canarypox (patente Us serie No 5,756,103) o vectores bacterianos (*Escherichia coli* o *Salmonella sp.*)

La presente invención también incorpora la formulación de una composición inmunológica multivalente o combinación de compuestos de vacuna. Por ejemplo, antígenos útiles en una bacterina bovina de combinación preparada de acuerdo a la presente invención de la presente invención incluye, pero no se limita a, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella sp.*, particularmente *P. multocida* y *P. haemolytica*, *Haemophilus sp.* particularmente *H. Somnus*, *Clostridium sp.*, *Salmonella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *E. Coli* y similares.

21

La presente invención provee adicionalmente métodos para inmunizar contra, o para prevenir o reducir los síntomas causados por, infección de un animal con un organismo patogénico (por ejemplo, infección por un virus, bacteria hongo o parásito protozoario) El método de la presente invención es útil en animales vertebrados que incluyen, pero no se limitan a, humanos, caninos (es decir, perros), felinos (es decir, gatos); equinos (es decir, caballos) ; bovinos (es decir, ganado) y porcinos (es decir, cerdos), así como aviarios incluidos, pero no limitados a pollos, pavos, gansos, codornices, faisanes, loras, pinzones, águilas, miras y ratites (avestruz, emu, cassowary y similares).

En un aspecto particular de la invención, estos métodos consisten en la vacunación de hembras preñadas antes del parto mediante la administración de la composición de vacuna preparada de acuerdo a la invención. Estos métodos además incluyen la inducción de anticuerpos protectores forzados por el protocolo de vacunación y la transferencia de estos anticuerpos protectores de las hembras preñadas a sus retoños. La transferencia de tales anticuerpos maternos protege subsecuentemente a los retoños de la enfermedad.

La dosificación de la composición de vacuna preparada de acuerdo a la presente invención dependerá de la especie, raza, edad, tamaño, historia de vacunación y estado de salud de los animales a ser vacunados. Otros factores como la concentración de antígeno, de componentes adicionales de la vacuna y la vía de administración (por ejemplo, subcutánea, intradermal, oral, intramuscular) también impactará la dosificación efectiva. La dosificación de vacuna a ser administrada es fácilmente determinable basado en la concentración de antígeno de la vacuna, la ruta de administración, y la edad y condición del animal a ser vacunado. Cada cochada de antígeno puede ser calibrada individualmente. Alternativamente, ensayos de inmunogenicidad metódicos de diferentes dosis, así como estudios de LD50 y otros procedimientos de selección pueden ser usados para determinar la

dosis efectiva para una composición de vacuna de acuerdo a la presente invención sin experimentación indebida. De los ejemplos siguientes, será muy aparente cuales dosis aproximadas y que volumen aproximado sería apropiado para usar en las composiciones de vacuna descritas aquí. El factor crítico es que la dosificación provea al menos un efecto protector parcial contra una infección natural, como se evidencia por una reducción en la mortalidad y morbilidad asociada con infecciones naturales. El volumen apropiado de la misma manera es fácilmente identificado por cualquiera con habilidades normales en el arte. Por ejemplo, en especies aviares el volumen de dosis puede ir de 0.1 ml a cerca de 0.5 ml y, ventajosamente, de cerca de 0.3 ml a cerca de 0.5 ml. Para especies canina, felina y equina, el volumen de una dosis puede ser de cerca de 0.2 ml a cerca de 3.0 ml, ventajosamente de cerca de 0.3 ml a cerca de 2.0 ml, y mas ventajosamente de cerca de 0.2 ml a cerca de 1.0 ml. Para especies bovina y porcina, el volumen de una dosis puede ser de cerca de 0.2 ml a cerca de 5.0 ml, ventajosamente de cerca de 0.3 ml a cerca de 3.0 ml, y mas ventajosamente de cerca de 0.5 ml a cerca de 2.0 ml.

La vacunación repetida puede ser preferida a intervalos de tiempo para aumentar la respuesta inmune inicialmente o cuando un largo período de tiempo ha transcurrido desde la última dosis. En una incorporación de la presente invención, la composición de vacuna es administrada como una inyección parenteral (es decir, subcutánea, intradermal o intramuscular. La composición puede ser administrada como una dosis o, en incorporaciones alternativas, administrada en dosis repetidas de cerca de dos a cerca de cinco dosis dadas en intervalos de cerca de dos a cerca de seis semanas, preferiblemente de cerca de dos a cerca de cinco semanas. Sin embargo, alguien con experiencia en el arte reconocerá que el numero de dosis y el intervalo de tiempo entre vacunaciones depende de numerosos factores que incluyen, pero no se limitan a, la edad del animal vacunado; la condición del animal; la vía de administración; la cantidad de

antígeno por dosis y similares. Para la vacunación inicial, el periodo generalmente será mayor de una semana y preferiblemente será entre dos y cinco semanas. Para animales vacunados previamente, una vacunación de refuerzo, antes o durante gestación, a un intervalo anual aproximadamente puede ser realizada.

La presente invención también contempla la administración de una composición de vacuna usando un inyector sin aguja tal como Pigjet®, Avijet®, Dermojet® o Biojector® (Biject, Oregon USA). Una persona de habilidades normales en el arte será capaz de ajustar la especificación del inyector como sea necesario con relación a factores tales como especie del animal a ser vacunado; la edad y el peso del animal, y similares sin experimentación indebida.

En una incorporación de la presente invención, el método incluye una única administración de la composición de vacuna formulada con una emulsión de acuerdo a la invención. Por ejemplo, en una incorporación, la composición de vacuna es una vacuna de *Mycoplasma Hyoneumoniae* inactivado, mientras que una incorporación alternativa provee una vacuna que incluye virus PCV-2 inactivos. Otras composiciones inmunológicas o vacunas son adecuadas para usar en un régimen de dosis única incluidas, pero no limitadas a , PRSS inactivado y SIV. En particular, para la vacuna de *Mycoplasma Hyoneumoniae*, la dosis única puede ser administrada entre el nacimiento y el sacrificio del cerdo, en particular entre los 3 a 56 días de edad, preferiblemente entre 10 y cerca de 35 días de edad, mas preferiblemente entre 15 y cerca de 30 días de edad. La vacuna puede ser administrada también en presencia de anticuerpos pre-existentes.

La invención se relaciona además con el método para tratar el anfitrión, es decir, un animal, lo que comprende administrar al anfitrión la composición farmacéutica preparada de acuerdo a la invención y que incluye al menos un inmunógeno seleccionado de un grupo consistente de proteínas o péptidos, anticuerpos,

alergenos, CpG ODN, factores de crecimiento, citokinas, o antibióticos, y en particular CpG ODN o citokinas. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser usadas para mejorar el desempeño en crecimiento de animales como pollos, cerdos o vacas.

La presente invención se relaciona además con un kit que incluye una primera ampolla que contiene un ingrediente como un inmunógeno o composición farmacéutica, y en una segunda ampolla, una emulsión preparada de acuerdo a la presente invención. El inmunógeno puede estar en forma liofilizada o en forma seca o en una solución acuosa como se describió aquí.

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

Ejemplo 1: Método de Manufactura de la Emulsión

La emulsión es producida en dos pasos como se describe a continuación:

Primer Paso: Un emulsificador Silverson rotor – estator de alto corte (tipo L4RT con una cabeza desintegradora con un diámetro de 10 mm) fue usado para producir las formulaciones. Para producir una emulsión, un volumen de la fase aceitosa fue emulsificado a 25 °C con un volumen de fase acuosa # 1. La fase acuosa fue adicionada a la fase aceitosa bajo agitación 5.000 rpm (rotaciones por minuto) por 1 minuto. La velocidad de rotación fue progresivamente incrementada con el aumento del volumen a 8.300 rpm durante 1 minuto. Durante este paso la emulsión fue una emulsión de agua en aceite. Para la emulsión TS6, la composición de la fase fue la siguiente:

Fase aceitosa (120 ml)

- Monooleato de sorbitan (Span 80®) :1.8% w/v
- Triolato de sorbitan (20 OE)(Tween 85®) :10.2 % w/v
- Aceite de parafina (Marcol 82®) : 88.0% v/v

Fase Acuosa # 1 (120 ml)

- 20% (w/v) de solución de monooleato de sorbitan (20 OE)(Tween 80®): 11.25% w/v
- Solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8): 85.75 % v/v
- Mercurotiolato de sodio (Thiomersal®) 1 % en agua : 1.5 % v/v

El monooleato de sorbitan (Span 80®) y el triolato de sorbitan (20 OE)(Tween 85®) fueron introducidos en la fase aceitosa. El monooleato de sorbitan (Span 80®) no fue miscible en el aceite de parafina. Una solución 20% (w/v) de Tween 80® fue preparada en la misma amortiguadora de la vacuna, por ejemplo; en solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8). El mercurotiolato de sodio actúa como un preservativo y no es esencial para la emulsión.

Cuando la agitación se suspendió, la emulsión cambio a una emulsión de aceite en agua. La emulsión fue colocada en una cámara fría a 5 °C por al menos 4 horas. En esta etapa, la emulsión era una pre-emulsión que contenía 50% de fase aceitosa.

Segundo Paso La fase acuosa # 2 fue preparada con 120 ml de solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8) con inmunógenos (inmunógeno de *Mycoplasma Hyoneumoniae* inactivado. P inmunógeno PCV-2, como describió *infra*) La pre-emulsión preparada como en el primer paso fue enfriada a cerca de 5 °C, diluida por la adición de la mitad del volumen de la fase acuosa # 2 a la misma temperatura, y mezclada por rotación de una barra magnética por 1 minuto. La concentración final de surfactante en la emulsión TS6 fue 4.75 % (w/v).

87
22

Como se prepara aquí, las vacunas TS6 son estables por al menos un año a 5 °C. Usando el mismo método de preparación, otras emulsiones pueden ser obtenidas como se describe abajo.

Emulsión TS7

La emulsión TS7 es una emulsión O/W que contiene 33% de un fase aceitosa. La fase aceitosa (120 ml) contiene 88% v/v de Marcol 82®, 1.8 % w/v de Span 80® y 10.2 % w/v de Tween 85®. La fase acuosa # 1 (120 ml) contiene 97.75 % v/v de solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8), 1 % de Thiomersal® en agua 1.5 % v/v y 0.75 % de Lutrol F127®. La fase acuosa # 2 (120 ml) esta constituida con solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8), que opcionalmente contiene inmunógenos. La concentración final de surfactante en la emulsión TS7 es 4.25 % w/v.

Emulsión TS8

La emulsión TS8 es una emulsión O/W que contiene 50% de un fase aceitosa. La fase aceitosa (160 ml) contiene 92% v/v de Marcol 82®, 1.8 % w/v de Span 80® y 6.2 % w/v de Brij 96®. La fase acuosa # 1 (160 ml) contiene 98.5 % v/v de solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8), 1 % de Thiomersal® en agua 1.0 % v/v y 0.5 % de Lutrol F127®, que opcionalmente contiene inmunógenos. La concentración final de surfactante en la emulsión TS8 es 4.25 % w/v.

Emulsión TS9

La emulsión TS9 es una emulsión O/W que contiene 10% de un fase aceitosa. La fase aceitosa (120 ml) contiene 60% v/v de Marcol 82®, 17.2 % w/v de Span 40® y 22.8 % w/v de Arlatone 650®. La fase acuosa # 1 (160 ml) contiene 97.5 % v/v de solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M

33 78

(pH 7.8), y 2.5 % w/v de Tween 20®. La fase acuosa # 2 fue preparada con 400 ml de solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M pH 7.8, que opcionalmente contiene inmunógenos. 100 ml de la pre-emulsión fueron diluidos con 400 ml de la fase acuosa # 2 para obtener la emulsión TS9. La concentración final de surfactante en la emulsión TS9 es 4.25 % w/v.

Ejemplo 2: Determinación de la Fase de Inversión Temperatura (PIT) de una emulsión

10 ml de emulsión TS6 fueron colocados en un tubo de vidrio en un baño de agua a una temperatura de cerca de 25 °C . La emulsión TS6 fue una emulsión homogénea blanca. La temperatura en el baño de agua fue progresivamente incrementada. Los cambios en la emulsión fueron visualmente observados (la emulsión se convirtió en dos fase separadas debido a la migración de la fase aceitosa café-amarilla hacia la superficie). Este cambio es característico del rompimiento de la emulsión. La temperatura a la cual este cambio es observado es el valor PIT de la emulsión. Para la emulsión TS6, el PIT fue 40 – 45 °C, mientras que el PIT para emulsión TS7 fue 40 – 49 °C.

Ejemplo 3: Composición de Vacuna de *Mycoplasma hyopneumoniae* y Exposición Heteróloga

Materiales y Métodos La vacuna fue formulada con emulsión TS6 preparada como se describió en el Ejemplo 1, una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado BQ14 (Kobisch M. et al. Ann. Inst. Pasteur Immunol., 1987, 138: 963-705) en una concentración de 8.7 log₁₀ CCU (unidad de cambio de color) por ml de vacuna. Veintidos (22) cerditos, de tres semanas de nacidos y que tenían anticuerpos maternos (nacidos de cerdas seropositivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*) fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos. Un grupo de 10 (10) cerditos fue vacunado en el día 0 con 2 ml de la vacuna por inyección

intramuscular, mientras que el grupo de control de doce (12) cerditos no fue vacunado.

A intervalos seleccionados durante el experimento (días 0,27, 42 y 56), frotis nasales fueron tomados de los cerditos en ambos grupos y los anticuerpos secretores anti-BQ14 determinados mediante ELISA. En el día 27, los cerditos fueron sangrados y células mononucleares de sangre periferal (PBMN) fueron obtenidas para determinar niveles de IFN γ en la sangre periferal. A los 28 días, todos los cerditos fueron expuestos intranasalmente con una solución que contenia 6.6 log₁₀ CCU/ml de cepa *Mycoplasma hyopneumoniae* Mp88c (cepa aislada de un cerdo enfermo en Dinamarca y cultivada como lo describe Kobish and Friis in *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* 1996, 15:1559-1605) con aproximadamente 5 mL siendo aplicados en cada fosa. La exposición fue repetida 24 horas más tarde. Los cerdos fueron sacrificados y los pulmones recogidos para su necropsia. Las calificaciones de los pulmones fueron determinadas estimando el área superficial (expresada en porcentaje del toda la superficie del lóbulo) de la lesión de cada uno de los siete lóbulos pulmonares. Las calificaciones fueron asignadas de la siguiente manera:

Superficie de lóbulo de pulmón lesionado	Calificación
0%	0
1 – 25 %	1
26 – 50 %	2
51 – 75 %	3
> 75 %	4

Una calificación total fue calculada sumando las calificaciones obtenidas para los lóbulos individuales de cada pulmón, resultando en una calificación máxima por animal de 28.

35 90

Resultados: Los cerdos vacunados con la formulación de vacuna TS6 exhibieron una fuerte respuesta celular, que fue significativamente mas alta que en el grupo de control, como se demuestra por el número de manchas secretando IFN γ de 5×10^5 P células mononucleares de sangre periferal (PBMN). Los cerdos del grupo vacunado promediaron 129 manchas (desviación estándar 25) en comparación con 11 (desviación estándar 5) en los controles no vacunados

Grupos	Numero de manchas por 5×10^5 PBMNCs
Compuesto de vacuna TS6	139 (25)
Controles no tratados	11(5)

Los niveles de anticuerpos secretores anti-BQ14 en los vacunados y los controles son resumidos en la siguiente tabla, con resultados que muestran que los cerdos vacunados tenian niveles significativamente más altos de anticuerpos secretores dos o tres semanas después de la exposición, en comparación con los grupos no tratados:

Grupos	Anticuerpos secretores Anti-BQ14 (valores de densidad optima (OD)			
	D0 (antes de vacunación	D27 (antes de las pruebas de exposición	D42 (14 días después de la exposición)	D56 (28 días después de la exposición)
TS 6	0.026 $\pm$ 0.001	0.033 $\pm$ 0.002	0.201 $\pm$ 0.089	0.264 $\pm$ 0.043
Controles	0.030 $\pm$ 0.001	0.031 $\pm$ 0.001	0.107 $\pm$ 0.028	0.075 $\pm$ 0.011

Haciendo referencia ahora a la figura 1, los animales vacunados con la composición de vacuna TS6 exhibieron una calificación de pulmón de 2.1 ± 1.9 (promedio $\pm$ desviación estándar) en comparación con los controles no tratados con una calificación de pulmón de 7.8 ± 4.1 . Estos resultados muestran una

reducción significativa en las lesiones de pulmón para los cerdos vacunados con la composición de vacuna en comparación con los controles no vacunados.

Ejemplo 4 Duración de la Protección Contra una *Exposición Heteróloga a Mycoplasma hyopneumoniae*

Materiales y Métodos: Treinta y ocho (38) cerditos, de tres semanas de nacidos con anticuerpos maternos (nacidos de cerdas que fueron seropositivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*) fueron aleatoriamente asignadas a tres grupos de la siguiente manera:

Grupo 1 (12 cerditos) fueron vacunados por una vía intramuscular en el día 0 con 2 ml de la composición de vacuna descrita en el Ejemplo 3.

Grupo 2 (12 cerditos) fueron vacunados por una vía intramuscular en el día 0 con 2 ml de una vacuna inactivada de *Mycoplasma hyopneumoniae* comercial.

Grupo 3 (14 cerditos) sirvió como un control no vacunado.

Todos los cerditos fueron expuestos intranasalmente 20 semanas después de la vacunación con cerca de 5 ml/por fosa nasal de la cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* Mp88c (6.6 log₁₀ CCU/ml) como se describió arriba. La exposición

Fue repetida 24 horas más tarde: Se recogió sangre de todos los grupos y células mononucleares de sangre periférica (PBMN) se obtuvieron para determinar los niveles de IFN γ como se describió arriba. Los anticuerpos de suero anti-BQ14 IgA e IgG1 fueron determinados en el día 138 para cada grupo. Luego de la necropsia, las calificaciones de pulmón (promedio $\pm$ desviación estándar) fueron calculadas como se describió en el Ejemplo 3 anterior.

Resultados Haciendo referencia a la Figura 2, los cerditos del Grupo 1 vacunados con la composición de vacuna TS6 mostraron una calificación de pulmón de 0.4 ± 0.9 , una reducción estadísticamente significativa en relación con las calificaciones de pulmón de los cerditos vacunados con la vacuna comercial (4.0 ± 5.9) o los controles no vacunados (6.1 ± 5.8)

Los resultados promedios ($\pm$ la desviación estándar) de los anticuerpos anti-BQ14 IgA e IgG1 circulando en el suero recogido de cada grupo en el día 138 son resumidos de la siguiente manera:

Grupos	Anti-BQ14 IgG (concentración)	Anti-BQ14 IgA
Vacuna TS6	4.38 ± 0.14	$.56 \pm 0.06$
Vacuna comercial	3.09 ± 0.11	0.09 ± 0.01
Controles	2.73 ± 0.08	0.09 ± 0.01

La siguiente tabla resumen los valores promedio ($\pm$ la desviación estándar) en el número de manchas para 5×10^5 células mononucleares de sangre periferal (PBMN) que secretan interferon gamma IFN γ en la sangre periferal.

Grupos	D28	D138	D152
Vacuna TS6	81 ± 20	9 ± 2	28 ± 7
Vacuna comercial	5 ± 2	3 ± 1	8 ± 1
Controles	6 ± 3	2 ± 2	$11 \pm 8^*$

*Si un cerdito que muestra un anormalmente alto número de manchas (109) es eliminado, la media del grupo de contro es 4 ± 1

Como se esperaba cuando se usa una vacuna inactivada, la frecuencia de anti-BQ14 IFN γ que secretan células-T detectable a los 128 días después de la vacunación fue mucho más baja que en el día 28. De forma interesante, la mayoría de los cerdos vacunados con TS6 fueron todavía positivos en el día 138

sugiriendo que la respuesta celular fue mantenida en este grupo. La frecuencia de anti-BQ14 IFN γ que secretan células-T que circulaban en el día 152(13 días después de la exposición) fue muy diferente en los tres grupos. El grupo vacunado con TS6 desarrollo una respuesta celular muy alta en oposición al resto de los grupos. Este resultado sugiere que la exposición hace eficientemente recordar a memoria inmune inducida por la vacuna TS6.

Ejemplo 5: Resultados de serología después de la administración de una vacuna PCV-2 coadyuvada con la emulsión TS6

Materiales y Métodos Dieciséis (16) cerditos SPF, de 4 a 5 días de nacidos, fueron aleatoriamente asignados a 2 grupos de la siguiente manera: un grupo de 8 cerditos fue vacunado dos veces mediante inyecciones intramusculares en los días 0 y 21 con 2 ml de la vacuna que contenía PCV-2 inactivado (cepa imp1010) a 7.55log10 CCID₅₀ por dosis (grupo vacunado), mientras que el grupo de control de 8 cerditos no fue vacunado. Todos los cerditos fueron intranasalmente expuestos en el día 35 con PCV-2 cepa Imp1010-48285 (depositada en el EACC, bajo el número de acceso V98011608) que contenía cerca de 5.5 log10 CCID₅₀ por ml con aproximadamente 5 mL siendo aplicados por cada fosa nasal. Ambos estudios con ELISA y seroneutralización fueron realizados y las calificaciones clínicas determinadas para cada cerdito de la siguiente manera:

Calificación	0	1	2
Postración	No	Moderada	Alta
Dispnea	No	Moderada	Alta
Anemia(color de la piel del cerdito)	Rosada	Blanca	Amarilla
Tos	No	Si	
Anorexia	No	Si	
Vomito	No	Si	
Temperatura rectal	T < 40°C	39.9 °C<T<41 °C	T > 40.9 °C

Ganancia de peso durante la semana n es superior a la ganancia de peso en la semana n-1	Si	No but > 100g/día	No but < 101 g/día
Muerte	No	Si*	

* En caso de muerte, la calificación usada es el valor correspondiente al día anterior a la muerte.

Luego de la necropsia, una calificación de lesión fue calculada así:

Calificación	0	1	2	3
Corpulencia	Normal	Delgado	Muy delgado	Raquitico
Aspecto del cadáver	Normal	Blanco	Amarillo	
Mucosa	Normal	Blanco	Amarillo	
Tejido conectivo subcutáneo	Normal	Brillante	Amarillo	
Ganglios linfáticos superficiales	Normal	1 gordo y/o blanco y/o congestionado	> 1 gordo y/o blanco y/o congestionado	> 1 muy gordo y/o blanco y/o congestionado
Descarga torácica	No	Cavidad torácica brillante	Presencia visible	
Corazón	Sin lesión	Lesión		
Pulmón	Sin lesión	Lesión		
Pleura	Sin Lesión	Lesión pequeña	Lesión grande	
Ganglio linfático mediastinal	Normal	1 gordo y/o blanco y/o congestionado	> 1 gordo y/o blanco y/o congestionado	> 1 muy gordo y/o blanco y/o congestionado
Cavidad abdominal	Normal	Brillante	Líquidos ascites visibles	
Peritoneo	Sin lesión	Lesión		
Estomago	Sin lesión	Lesión	Úlcera	
Intestino pequeño	Sin lesión	Lesión		
Ganglio linfático	Normal	1 gordo y/o blanco y/o	> 1 gordo y/o blanco y/o	> 1 muy gordo y/o blanco y/o

mesenterico		congestionado	congestionado	congestionado
Placas de peyers	No visibles	Visibles solo en un segmento del intestino	Visibles en numerosos segmentos del intestino	Visibles en numerosos segmentos del intestino y muy importantes
Hígado	Sin lesión	Lesión		
Riñones	Sin lesión	Lesión		
Vejiga	Sin lesión	Lesión		

Resultados Los resultados de la serología realizados por ELISA y seroneutralización a los 30 y 63 días muestran a los cerditos vacunados con mas altos niveles que los vistos en los controles no tratados. La tabla de abajo resume los resultados de aislamiento de virus PCV-2 de frotis fecales y tejido ganglionico así como calificaciones clínicas y de lesiones promedio de los grupos vacunados y de control. Los resultados muestran mas altos niveles de ambos anticuerpos circulantes y SN en los vacunados en comparación a los controles. Las calificaciones clínicas y las lesiones pulmonares son significativamente reducidas en los cerditos vacunados también. La evolución de las calificaciones clínicas después de exposición es mostrada en la Figura 3.

Grupos	Vacunados	Controles
Serología ELISA a D30 (log10)	4.1 ± 0.70	2.8 ± 0.50
Serología ELISA a D63 (log10)	5.2 ± 0.28	3.4 ± 0.67
Serología SN a D30 (log10)	3.4 ± 0.25	1.6 ± 0.23
Serología SN a D63 (log10)	3.7± 0.31	2.2 ± 0.53
PCV-2 en excremento (% de positivos)	40	61

PCV-2 en ganglios mediastinal (% de positivos)	25	100
Calificación clínica	14	31
Calificación de lesión	9.8	18.8

Ejemplo 7: Resultados de Eficacia en campo luego de vacunaciones de una dosis con una vacuna de PCV-2 inactivada con un TS6 coadyuvante

Composición de vacuna. El coadyuvante TS6 fue preparado como se describe en el Ejemplo 1. El virus PCV-2 fue desarrollado en células PK/15 y la multiplicación viral llevada a cabo como se describe en la Patente US serie No 6,517,843 (Ellis et al. el contenido de la cual y por lo cual es aquí incorporado en su integridad). Brevemente, al final del cultivo viral, las células infectadas son cosechadas, disueltas y la cosecha viral inactivada con métodos convencionales. Por ejemplo, la inactivación puede ser realizada con 0.1 % etilenoimina por 18 horas a +37 grados C; con 0.5 % beta-propiolactona durante 24 horas a +28 grados C; o con 0.2 % y 0.1 % beta-propiolactona por 24 horas a +4 grados C. Si la concentración de virus antes de la inactivación fue inadecuada, la suspensión viral fue concentrada por ultrafiltración usando una membrana con un corte 150 – 300 kDa. La suspensión viral inactivada fue almacenada a +5 grados C antes de preparar la vacuna. El contenido de antígeno de la vacuna fue fijado en 2.1 log 10 unidades de antígeno por dosis. Basado en este contenido, la actividad de la vacuna determinada a través de la cuantificación del ingrediente activo en el producto final mediante el método de ELISA fue arbitrariamente establecida en un mínimo de 100 unidades ELISA por dosis.

Protocolo de Vacunación Para probar la eficacia de la composición de vacuna bajo condiciones de campo, fue seleccionada una finca que típicamente exhibe los brotes endémicos del síndrome de desgaste multisistémico postdestete (PMWS) provocadas por la infección de PCV-e en los cerditos. Las cerdas fueron divididas en dos grupos las del vacunado recibieron una inyección intramuscular (dosis de

2 ml) de la vacuna inactivada de PCV-2 coadyuvada de TS6 dos o tres semanas antes de dar a luz. El segundo grupo no fue vacunado y sirvió como control. Las cerdas dieron a luz y los cerditos del grupo vacunado (n=889) y los de las cerdas de control (n=713) fueron monitoreados hasta el momento de sacrificio.

Resultados La Figura 4 muestra un grafico que ilustra los porcentajes de casos de PMWS en los cerditos hasta el momento del sacrificio. Como se puede ver en el gráfico, hubo un 75 % de reducción en el número de casos de PMWS en los cerditos nacidos de cerdas vacunadas en comparación al número de casos en cerditos del grupo no vacunado. Estos resultados muestran una disminución significativa en la enfermedad clínica asociada con la infección con PCV-2 y demuestra la factibilidad de vacunar cerdas un poco antes de dar a luz con una vacuna de PCV-2 inactivada coadyuvada con TS6 para prevenir la mortalidad y morbilidad asociada con la infección de PCV-2 en los cerditos. Estos resultados demuestran además que una significativa reducción de PMWS entre los cerditos en condiciones reales de campo puede ser alcanzada usando solo una dosis de la composición de vacuna de acuerdo a la presente invención.

Ejemplo 8: Emulsión LF2

Usando el método descrito arriba en el Ejemplo 1, una emulsión de aceite en agua O/W que contiene una fase de emulsión aceitosa del 10% y denominada como LF2 fue preparada. La fase aceitosa (100 ml) contenía 88 % v/v de Marcol®, 1.8 % w/v de Span 80® y 10.2 % de Tween 85® w/v. La fase acuosa # 1 (100 ml) contiene 88.5 % v/v de solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8) y 20% (w/v) de solución de Tween 80® 11.5 % w/v. La fase acuosa # 2 (400 ml) esta constituida con solución amortiguadora isotónica de fosfato disódico y monopotásico 0.02M (pH 7.8), que opcionalmente contiene inmunógenos. 100 ml de la pre-emulsión fueron diluidos con 400 ml de la fase

acuosa # 2 para obtener la emulsión LF2. La concentración final de surfactante en la emulsión LF2 fue 1.43 % w/v. El PIT de la emulsión LF2 fue > 45 °C, determinada por conductividad.

Ejemplo 9: Análisis de serología después de la administración de un vacuna de Influenza de cerdo coadyuvada con emulsión LF2

Materiales y Métodos: Quince (15) cerditos, de cerca de 10 semanas de nacidos fueron aleatoriamente distribuidos en tres grupos. El grupo uno (vacunado) tenía 5 cerditos vacunados dos veces (en el día 0 y el día 28) con 2 ml de una vacuna de influenza swine recombinada a 7.7 log10 CCID₅₀ por dosis mediante inyecciones intramusculares.. Esta vacuna de vector de expresión recombinado contenía un vector canarypox codificando y expresando nucleoproteína (NP) y haemaglutina (HA) de un virus de influenza de cerdo H1N1, El segundo grupo de 5 cerditos fue vacunado dos veces (mediante inyecciones intramusculares en el día 0 y el día 28) con 2 ml de una vacuna de influenza swine recombinada (a 7.7 log10 CCID₅₀ por dosis) coadyuvada con la emulsión LF2 (grupo vacunado LF2). Cinco cerditos fueron dejados sin vacunar (grupo de control). Muestras de sangre fueron tomadas a D0, D14, D28 , D42 y D56 luego de la vacunación para determinar concentraciones de inhibición de haemaglutina (HI).

Resultados Como se resume en la tabla siguiente, todos los vacunados mostraron una significativa respuesta de anticuerpos flu anti-cerdo desde los 42 a los 56 días después de vacunados (ANOVA, p<0.0001) en comparación con los controles no tratados. Sin embargo, los cerdos vacunados con la vacuna coadyuvada LF2 mostraron un significativo incremento en la respuesta de anticuerpos del día 42 al 56 después de vacunación en comparación con los cerdos que recibieron la vacuna recombinada no coadyuvada (ANOVA, p<0.0001).

Grupos	HI(log10)	D0	D14	D28	D42	D56
--------	-----------	----	-----	-----	-----	-----

Vacunados	Promedio	0.9	0.9	0.9	1.2	1.2
	Des. Esta.	0.00	0.00	0.00	.37	.21
Vacunados LF2	Promedio	0.9	0.9	0.9	2.04	1.92
	Des. Esta	0.00	0.00	0.00	0.33	.16
Controles	Promedio	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
	Des. Esta	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Como se demuestra por estos resultados, el efecto del coadyuvante de la emulsión LF2 permite que la vacuna induzca una mas alta respuesta de anticuerpos contra el virus de flu de cerdo, en comparación con la vacuna sin coadyuvante.

Ejemplo 10: Protección inducida por una vacuna *Mannheimia haemolytica* coadyuvada con la emulsión LF2

Materiales y Métodos veinte (20) ternero, de cinco meses de edad, negativos o con una concentración de anticuerpos leucotoxinos de *Mannheimia haemolytica* fueron aleatoriamente distribuidos en dos grupos de 10 terneros. Una emulsión LF2 fue preparada como en el Ejemplo 8 de arriba y una vacuna formulada incluyendo *Mannheimia haemolytica* inactivada (cepa A1) a aproximadamente 60 a 70 unidades ELISA (que corresponde a cerca de 0.34 mL a 1.1 mL de cultivo de bacteria no-concentrado crudo) por dosis de vacuna y coadyuvada con emulsión LF2. Un grupo de 10 terneros fue vacunado en los días 0 con 2 ml de la composición de vacuna LF2 por inyección subcutánea, mientras que el grupo de control de 10 terneros no fue vacunado. Desde el día de la vacunación (D0) hasta el día de la exposición (D20), todos los terneros vacunados fueron regularmente examinados para reacciones generales y locales a la vacuna. Los exámenes clinicos incluyeron una evaluación de reacciones sistémicas (tales como apatía, anorexia, polipnea, salivación, temblor), registro de temperatura rectal, y

mediciones de reacciones locales en los sitios de inyección. Ninguno de los terneros presentaron reacciones sistémicas a la vacunación. Las temperaturas rectales (en °C, promedio $\pm$ desviación estándar) son resumidas en la siguiente tabla mostraron un trasiente y una ligera fase de hipertermia fue observada en el grupo vacunado, con un pico dentro de las 24 horas después de la vacunación.

	D0	D0+4h	D1	D2	D3	D7	D14	D20
Vacunado	39.3 $\pm$ 0.3	39.6 $\pm$ 0.4	39.5 $\pm$ 0.3	39.2 $\pm$ 0.3	39.0 $\pm$ 0.2	39.0 $\pm$ 0.2	39.1 $\pm$ 0.3	38.7 $\pm$ 0.3
Control	39.3 $\pm$ 0.3	39.3 $\pm$ 0.3	39.1 $\pm$ 0.2	39.1 $\pm$ 0.2	38.9 $\pm$ 0.2	39.0 $\pm$ 0.2	38.9 $\pm$ 0.1	38.7 $\pm$ 0.3

Las reacciones locales en los terneros vacunados (medidas como el área de superficie en cm2, promedio $\pm$ desviación estándar) mostraron un fuerte reacción local que aparecía aproximadamente 24 a 48 horas después de la vacunación en todos los animales vacunados y luego decrecía rápidamente al tamaño de aproximadamente 3 cm2 por el D14. Estas reacciones habían prácticamente desaparecido por el D20. Las reacciones son resumidas de la siguiente manera.

	D0	D0+4h	D1	D2	D3	D7	D14	D20
Vacunado	0.9 $\pm$ 0.4	9.2 $\pm$ 12.4	71.3 $\pm$ 25.8	72.5 $\pm$ 29.3	56.9 $\pm$ 18.0	15.9 $\pm$ 8.0	2.6 $\pm$ 2.6	2.0 $\pm$ 1.2

Muestras de sangre fueron obtenidas de todos los animales en varios intervalos (D0, D7, D14, D20, y D28) y los niveles de anticuerpos contra *Mannheimia haemolytica* A1 leucotoxina determinados por ELISA (concentración en log10 OD50). Los resultados mostraron que todos los terneros fueron negativos antes de la vacunación . Por el día D20, después de una única vacunación , ocho de los 10

vacunados tenían sero-convertido mientras que todos los terneros de control permanecían negativos de D0 a D20. Los resultados de ELISA se resumen así:

Grupos	ELISA (log10)	D0	D7	D14	D21	D28
Vacunados	Promedio	<0.78	1.11	1.70	1.86	4.00
	Des. Esta.	0.00	0.65	0.90	.84	.26
Control	Promedio	<0.78	<.78	<.78	<.78	1.39
	Des. Esta	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00

Protocolo de Exposición Todos los terneros fueron expuestos en el día 20 por administración intra-traqueal a 30 ml que contenían cerca de 9.2 log 10 CFU/ml (unidades que forman la colonia por mililitro) de *Mannheimia haemolytica* cepa A1 La exposición fue repetida 24 horas mas tarde. Desde el día de la exposición hasta el final del estudio, todos los terneros fueron examinados diariamente por signos clínicos generales incluyendo desarreglos respiratorios. Las señales monitoreadas incluyeron condiciones generales, anorexia, temperatura rectal, descarga nasal, tos, tasa de respiración y dispnea.

Las calificaciones clínicas globales fueron calculadas de acuerdo a la siguiente formula y los resultados parciales son dados en la tabla:

Calificación clínica global = Σ (calificación parcial x coeficiente)/14

	0	1	2	Coeficiente
Condición General	Normal	Depresión	Postración	X2
Alimentación	Normal	Reducido	Anorexia	X3
Tos	No	Intenso,	Débil,	X1

		ocasional	frecuente	
Descarga nasal	No	Serosa	Muco-purulenta	X2
Tasa respiratoria	< 35/min	35-50 /min	> 50/min	X3
Temperatura rectal	<39.5 °C	39.5°C-40.5 °C	>40.5 °C	X3

Para los animales muertos, la calificación clínica diaria individual máxima de 2 fue aplicado.

Las calificaciones de las lesiones del pulmón (expresadas en porcentajes) fueron también determinadas para cada ternero usando la siguiente formula:

Calificación de la lesión del pulmón = Σ (superficie de la lesión en un lóbulo/superficie de todo el lóbulo x 100 x LRM)

Donde LRM es una masa relativa de pulmón con un valor de:

0.11 para el lóbulo derecho cranial y el lóbulo cranial nedial derecho

0.07 para el lóbulo caudal medial derecho

0.35 para el lóbulo caudal derecho

0.05 para el lóbulo medial izquierdo

0.06 para el lóbulo medial izquierdo

0.32 para el lóbulo caudal izquierdo, y

0.04 para el lóbulo azygos

Resultados de la exposición Las calificaciones clínicas globales de cada grupo, presentadas en la siguiente tabla, muestran que el grupo vacunado demostró una significativa reducción en las calificaciones clínicas globales en comparación con los controles no tratados (p= 0.046, ANOVA)

		D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	Acumulado
Vacunado	Promedio	0.0	0.7	0.7	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5	4.0
	Des.	0.1	0.4	0.5	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	4.5
	Esta									
Contro	Promedio	0.1	0.9	1.1	1.0	1.1	1.2	1.2	1.3	8.0
	Des.	0.1	0.5	0.6	0.8	0.9	0.8	0.8	0.7	4.5
	Esta									

Todos los animales que sucumbieron a la exposición se presentaron con el 60% o mas de su pulmón afectado. Hubo una tendencia estadística ($p=0.08$) de los animales vacunados a tener menores lesiones de pulmón que aquellos del grupo de control. El número de animales por grupo que tuvo mas de un tercio de sus pulmones afectados fue 2/10 (20%) para los vacunados y 7/10 (70 %) para los animales de control. El número de animales que tuvo mas de un tercio de sus pulmones afectados fue significativamente menos ($p=0.03$, Ensayo Exacto de Fischer, uno-atada) en el grupo vacunado. Los resultados de las calificaciones de las lesiones de pulmón se resumen en la tabla siguiente:

Porcentaje individual de lesiones de pulmón en los vacunados	74.8*	Porcentaje individual de lesiones de pulmón en los controles	64.5*
	10.6		7.0
	10.1		78.6*
	10.5		63.1*
	66.4*		44.7
	6.2		60.9
	6.9		48.2
	32.9		0.8
	25.4		59.5*
	8.0		32.9

Promedio ± Desv.	25.2 ± 25.5	Promedio ± Desv.	46.0 ± 25.5
Estándar		Estándar	

* animales que sucumbieron en la exposición.

Hubo una significativamente alta ($p < 0.001$) y una fuerte correlación ($R^2 = 0.86$) entre las calificaciones clínicas globales y el porcentaje de lesiones de pulmón. Aunque todos los animales vacunados exhibieron una ligera hipertermia luego de la vacunación, ninguna otra reacción a la vacunación fue observada. Fuertes reacciones locales fueron observadas después de la vacunación, pero rápidamente reducidas a un tamaño muy aceptable y lesiones significativas fueron observadas en la necropsia. Estos resultados demostraron la seguridad de la vacuna coadyuvada con emulsión LF2.

Los resultados de este experimento, mostraron que ambas las calificaciones clínicas promedio y las calificaciones de las lesiones de pulmón fueron significativamente reducidas en los vacunados respecto de los controles, demostraron que una única inyección de la vacuna *Mannheimia haemolytica* coadyuvada con emulsión LF2 protege a los terneros contra la exposición a la *Mannheimia haemolytica*.

Habiendo así descrito en detalle incorporaciones preferidas de la presente invención, debe ser entendido que la invención definida por los párrafos anteriores no está limitada a los detalles particulares establecidos en las descripciones previas y que muchas variaciones aparentes de ellas son posibles son apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención.

58
205
105

L que es reivindicado es

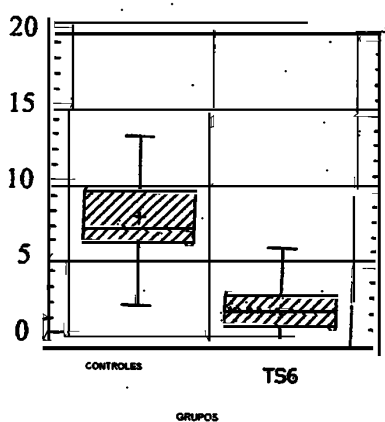
1. Una composición de vacuna que incluye una emulsión aceite en agua (O/W) inyetable que incluye:
 - (i) Una solución acuosa que contiene al menos un inmúnogeno;
 - (ii) Un aceite mineral;
 - (iii) Un surfactante lipofílico no-iónico;
 - (iv) Un surfactante hidrofílico no-iónico que tiene un alto valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) entre 13 y 40; y
 - (v) Un surfactante hidrofílico no-iónico que tiene un bajo valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) entre 9 y 13.
2. La composición de la reivindicación 1, donde el alto HLB surfactante hidrofílico-lipofílico esta presente en una concentración de 0.1 a 1.5 % expresado como peso por volumen de la emulsión (w/v)
3. La composición de la reivindicación 2, donde el porcentaje de surfactantes es de cerca de 4% a cerca de 6 % peso/volumen
4. La composición de la reivindicación 1, donde el bajo HLB surfactante hidrofílico-lipofílico esta presente en una concentración de 1% a 8 % expresado como peso por volumen de la emulsión (w/v)
5. La composición de la reivindicación 1, donde el no iónico hidrofílico surfactante esta presente en una concentración de 0.1% a 2.5 % expresado como peso por volumen de la emulsión (w/v).
6. La composición de la reivindicación 1, donde el aceite mineral esta presente en una concentración de 20 % a 40% (v/v)

7. La composición de la reivindicación 1, donde la emulsión tiene una temperatura de inversión de fase (PIT) de entre 33 a 66 °C.
8. La composición de la reivindicación 1, donde el bajo HLB no iónico hidrofílico surfactante es seleccionado de un grupo consistente de triésteres de ácido graso etoxilado de sorbitan, diésteres de ácido graso etoxilado de sorbitan, monoésteres de ácido graso etoxilado de sorbitan, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, aceite de ricino etoxilado y combinaciones de ellos.
9. La composición de la reivindicación 8, donde el ester del dicho ester de ácido graso etoxilado es seleccionado de un grupo consistente de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de ellos.
10. La composición de la reivindicación 1, donde el surfactante no iónico lipfílico es seleccionado de un grupo consistente de ésteres de ácido graso de sorbitan, ésteres de ácido graso de mannide, ésteres de ácido graso dietoxilados de mannide, ésteres de ácido graso trietoxilados de mannide, ésteres de ácido graso tetraetoxilados de mannide y combinaciones de ellos.
11. La composición de la reivindicación 10, donde el ester de los ésteres de ácido graso es seleccionado de un grupo consistente de oleato, palmitato, estearato, isostearato, laurato y combinaciones de ellos.
12. La composición de la reivindicación 1, donde el surfactante de alto HLB no iónico hidrofílico es seleccionado de un grupo consistente de monoésteres de ácido graso etoxilado de sorbitan, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, copolímeros en bloque no iónicos y combinaciones de ellos.

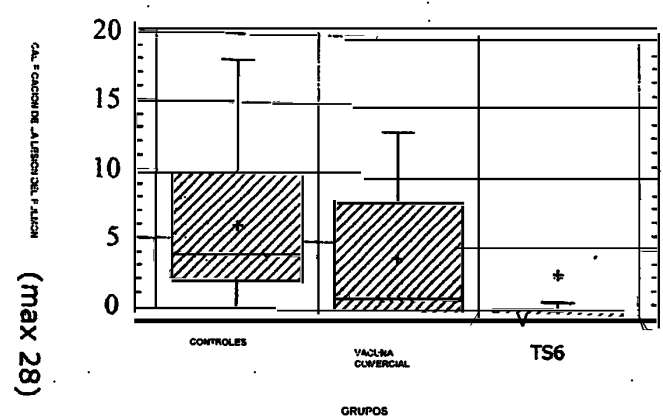
13. La composición de la reivindicación 12, donde el monoéster de ácido graso etoxilado de sorbitan, es seleccionado de un grupo consistente de monolaurato de sorbitan etoxilado, monopalmitato de sorbitan etoxilado, monoestearato de sorbitan etoxilado, monooleato de sorbitan etoxilado y combinaciones de ellos.
14. La composición de la reivindicación 1, donde el aceite mineral es seleccionado de un grupo consistente de aceite de parafina, esqualano, pristano, aceite poliisobutano, aceite de poliisobutano hidrogenado, aceite de polideceno, aceite de poliisopreno, aceite de poliisopropeno y combinaciones de ellos.
15. La composición de la reivindicación 1, la cual incluye aceite de parafina, monoéster de ácido graso de sorbitan como un surfactante lipofílico no iónico, un triéster de ácido graso etoxilado de sorbitan como un surfactante hidrofílico no iónico de bajo HLB y un copolímero en bloque como un surfactante hidrofílico no iónico de alto HLB.
16. La composición de la reivindicación 15, donde el monoéster de ácido graso de sorbitan es un monooleato de sorbitan, el triéster de ácido graso etoxilado de sorbitan es un triolato etoxilado de sorbitan y el copolímero en bloque no iónico es un polímero polioxietileno/polioxipropileno (POE-POP).
17. La composición de la reivindicación 16, donde el aceite de parafina esta presente en una concentración de 10 % a 40 % v/v, el monooleato de sorbitan esta presente en una concentración de 0.2 % a 1.5 % w/v, el triolato etoxilado de sorbitan esta presente en una concentración de 2% a 5 % w/v y el POE-PO esta presente en una concentración de 0.1 % a 0.5 % w/v.

18. La composición de la reivindicación 16, donde el aceite de parafina esta presente en una concentración del 29.3 % v/v, el monooleato de sorbitan esta presente en una concentración del 0.6 % w/v, el triolato etoxilado de sorbitan esta presente en una concentración del 3.4 % w/v y el POE-PO esta presente en una concentración del .25 % w/v.
19. La composición de la reivindicación 1, donde el inmunógeno es seleccionado de un grupo consistente de un patógeno inactivado, un patógeno atenuado, una subunidad, un vector de expresión recombinado, y un plásmido o combinaciones de ellos.
20. La composición de la reivindicación 19, donde el patógeno es seleccionando de un grupo que contiene un virus, una bacteria, un hongo, un parasito protozoario o combinaciones de ellos.
21. La composición de la reivindicación 19, donde el inmunógeno es un virus inactivado.
22. La composición de la reivindicación 21, donde el inmunógeno es un virus circovirus porcino inactivado tipo 2 (PCV-2).
23. La composición de la reivindicación 19, donde el inmunógeno es una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada.
24. Un método para inducir una respuesta inmunológica en un animal contra un patógeno que incluye la administración a dicho animal de una composición de vacuna de acuerdo a la reivindicación 19.

- 109
25. Un método de acuerdo a la reivindicación 24, donde el inmunógeno es seleccionado de un grupo consistente de un patógeno inactivado, un patógeno atenuado, una subunidad, un vector de expresión recombinado, y un plásmido y combinaciones de ellos.
 26. Un método de acuerdo a la reivindicación 25, donde el inmunógeno es seleccionado de un grupo consistente de una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivada, un virus circovirus porcino inactivado tipo 2 (PCV-2).y combinaciones de ellos
 27. Un método de acuerdo a la reivindicación 25, donde la composición de vacuna es administrada en el régimen de una inyección.
 28. Un método de acuerdo a la reivindicación 24, donde el animal es seleccionado de un grupo consistente de ganado, cerdos, caballos, perros, gatos, pollos, patos y pavos.
 29. El método de la reivindicación 27, donde la administración es por inyección intramuscular (IM), intradermal (ID) o subcutánea (SC).
 30. El método de la reivindicación 29, donde la administración es hecha con inyector sin aguja.



EVALUACIÓN DE LA LESIÓN EN PALMARIS
(max 20)



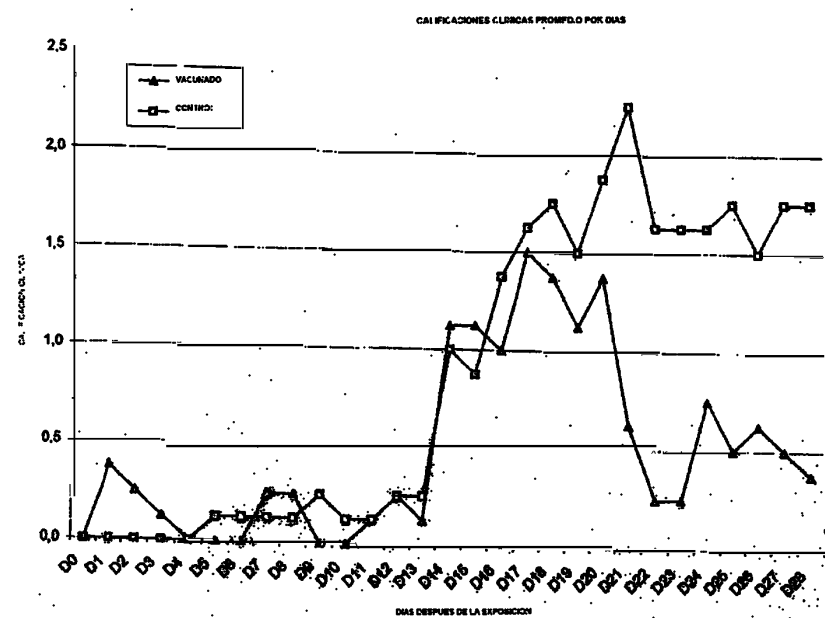
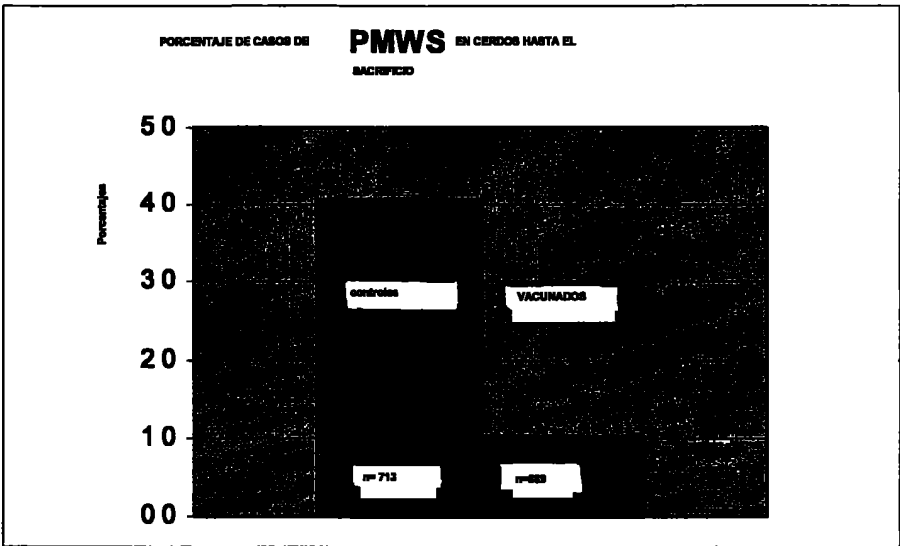


FIGURA No. 3

59/ 17

FIGURA No 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2004/024027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/39 A61K39/02 A61K39/102 A61K39/12

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR 1 562 758 A (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 11 April 1969 (1969-04-11) the whole document	1-30
Y	JUNG-MI LEE ET AL.: "Microemulsion formulation of cloxacin acid: solubility enhancement and pain reduction" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, vol. 54, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 43-49, XP008042059 the whole document	1-30
	-/-	



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.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 2005

Date of mailing of the international search report

12/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5018 Patentzen 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 851 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2004/024027

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GIZURARSON S ET AL: "Intranasal administration of diphtheria toxoid. Selecting antibody isotypes using formulations having various lipophilic characteristics" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 13, no. 7, 1995, pages 617-621, XP004057585 ISSN: 0264-410X the whole document	1-30
A	EP 1 095 662 A (SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES, S.E.) 2 May 2001 (2001-05-02) page 2, line 39 - page 5, line 6; examples 1,2	1-30
A	US 2003/125211 A1 (WOZNICA ZENON J ET AL) 3 July 2003 (2003-07-03) page 1, paragraph 9 - paragraph 10 page 1, paragraph 13 - page 2, paragraph 15 page 2, paragraph 17 page 2, paragraph 27 - paragraph 36	1-30
A	WO 02/074283 A1 (EXNER, HEINRICH) 26 September 2002 (2002-09-26) page 2, line 30 - page 5, line 29	1-30
A	WO 99/56776 A2 (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH, INC) 11 November 1999 (1999-11-11) page 2, line 12 - page 4, line 7; example 1	1-30
A	FR 2 824 269 A1 (SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES SEPI) 8 November 2002 (2002-11-08) page 2, line 27 - page 10, line 13; examples 1-3	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/024027

116

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 24-30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2004/024027

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 1562758	A	11-04-1969	GB 1143545 A MY 15071 A US 3579633 A	26-02-1969 31-12-1971 18-05-1971
EP 1095662	A	02-05-2001	FR 2800280 A1 EP 1095662 A1 JP 2001151697 A	04-05-2001 02-05-2001 05-06-2001
US 2003125211	A1	03-07-2003	US 2003104947 A1	05-06-2003
WO 02074283	A1	26-09-2002	DE 10113284 A1 DE 10291019 D2 EP 1372607 A1	02-10-2002 15-04-2004 02-01-2004
WO 9956776	A2	11-11-1999	AU 755445 B2 AU 3973799 A BR 9910269 A CA 2330610 A1 CN 1306438 T EP 1075276 A2 HU 0101804 A2 JP 2002513773 T NO 20005596 A NZ 508013 A US 6630161 B1 US 2003215497 A1 ZA 200006379 A	12-12-2002 23-11-1999 09-01-2001 11-11-1999 01-08-2001 14-02-2001 28-11-2001 14-05-2002 05-01-2001 29-08-2003 07-10-2003 20-11-2003 07-01-2002
FR 2824269	A1	08-11-2002	NONE	

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY **18**
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2004/024027

International filing date (day/month/year)
26.07.2004

Priority date (day/month/year)
24.07.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K39/39, A61K39/02, A61K39/102, A61K39/12

Applicant
MERIAL LIMITED

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 681 apo nl
Fax: +31 70 340 - 3018

Authorized Officer

Montero Lopez, B

Telephone No. +31 70 340-3739



- 119
1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation 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)).
 2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ in written format
 - ☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
 3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
 4. Additional comments:

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 24-30 with respect to industrial applicability

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 24-30 with respect to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-30
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-30
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-23
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Claims 24-30 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re item V**Reasoned statement with regard to novelty, Inventive step or Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following documents:

D1: FR-A-1 562 758 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 11 April 1969 (1969-04-11)

D2: JUNG-MI LEE ET AL.: "Microemulsion formulation of cloxacin acid: solubility enhancement and pain reduction" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, vol. 54, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 43-49, XP008042059

1. The underlying application relates to a vaccine composition comprising an injectable oil-in-water emulsion comprising:

- (i) an aqueous solution containing an immunogen
- (ii) a mineral oil.
- (iii) a non-ionic lipophilic surfactant
- (iv) a non-ionic hydrophilic surfactant having a HLB value of 13-40
- (v) a non-ionic hydrophilic surfactant having a HLB value of 9-13

2. Emulsions used in vaccine compositions comprise a mixture of oil, aqueous solution and surfactants, such as a mixture of a lipophilic and a hydrophilic surfactant (see page 1, last paragraph of the description). Document D1 discloses such a vaccine composition comprising:

- (i) an aqueous solution containing an antigen (Clostridium antigen)
- (ii) a mineral oil (paraffin)

- 123
- (iii) a non-ionic lipophilic surfactant (fatty acid esters of mannide) of HLB value of 2-8
(iii) a non-ionic hydrophilic surfactant (ethoxylated sorbitan monolaureate) of HLB value of 9-20.

3. In the light of the state of the art, the problem to be solved consists in the provision of an improved vaccine composition with improved stability and safety (see page 2, paragraph 1 of the description). The solution provided by the applicant consists in a composition according to claim 1 comprising two hydrophilic non-ionic surfactants, one with HLB 13-40 and another with HLB 9-13. However, these features have already been employed for the same purpose in a similar composition for administration of cloxenic acid, see document D2. This document (page 45, col. right, par. 2 -page 46, col. right, par. 1) describes several injectable oil-in-water emulsions comprising castor oil, and two hydrophilic non-ionic surfactants, namely Tween 20 (HLB 16.7) and Tween 85 (HLB 11). The composition of D2 is stable and induces less pain upon injection. It is also suggested that the formulation can be applied for other drugs that induce pain on injection (page 48, col. right, par. 2). It would be obvious to the person skilled in the art, namely when the same result is to be achieved, to apply these features with corresponding effect to a vaccine composition according to document D1, thereby arriving at the claimed composition. Therefore, the present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-30 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

4. For the assessment of the present claims 24-30 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as Industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VII

Certain defects in the International application

1. General statements in the description which imply that the extent of protection may be expanded in a not precisely defined way are not allowable. The applicant is therefore kindly requested to delete the expression "incorporated by reference" from

2. The references to U.S. Application Serial Nos. in the description should be replaced by the corresponding publication numbers when available or otherwise deleted.
3. Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in the documents D1 and D2 is not mentioned in the description, nor are these documents identified therein.

~~124~~
124

Re Item VIII

Certain observations on the International application

1. Claim 1 refers to a composition comprising a component of "high" HLB value (13-40) and a component of "low" HLB value (9-13). The relative terms "high" and "low" have no well-recognised meaning and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which they refer, in particular in view of the overlap of a HLB value of 13, which falls under the definition of both low and high. This renders the definition of the subject-matter of claim 1 unclear, Article 6 PCT.
2. The term "about" used in claim 3 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim unclear, Article 6 PCT.
3. The term "subunit" used in claims 19 and 25 does not have a clear meaning in the art and renders the scope of the claims unclear, Article 6 PCT.
4. The embodiments of the invention described on page 3, lines 3-10 and page 13, lines 17-25 do not fall within the scope of the claims, as the component with high HLB value is missing. This inconsistency between the claims and the description leads to doubt concerning the matter for which protection is sought, thereby rendering the claims unclear, Article 6 PCT.
5. The vague and imprecise statement in the description on page 35 implies that the subject-matter for which protection is sought may be different to that defined by the claims, thereby resulting in lack of clarity (Article 6 PCT) when used to interpret them.



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royni
Technologies S.A.
Desarrollo de Software y Servicios

125

Expediente No		06017807	No de Follo
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMANO CARTA X	1	
9	SOBRE BLANCO TAMANO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones:

contiene ante final

127
126

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 06017807 00000000 Folios: 127
Fecha (AMD): 2006-02-22 17:40:59
Tramite : 011 PCT-PATENT 376 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 12,148
FECHA : FEBRERO 14 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ENVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36494412	14/02/2006	28,080,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Qdo 14306-841-005-7

127 128

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 06817687 00000000 Folios: 127
Fecha (IMP): 2006-02-02 17:40:59
Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ()	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-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.	()	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()			
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()			
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:

Enero 22 de 2006

128
~~129~~

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
MERIAL LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	6 17807
	Solicitud internacional	US2004/024027
	Fecha inicio fase nacional	24/02/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	4313

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
3. Debe aclarar el nombre de la inventora GOUILLES-BLECHET, Stephanie, Marie-Catherine, por cuanto difiere en la publicación internacional y en el petitorio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

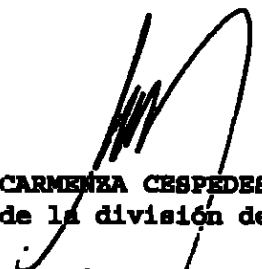
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

130
129

Radicación No.: 6 17807



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 21 ABR. 2006
jranos