



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATORIA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

06-100763

**SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION**

**TITULO: EMULSIONES DE ACEITES EN AGUA MICROFLUIDIZADAS Y
COMPOSICIONES DE LAS VACUNAS.**

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC

DIRECCIÓN: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 E.U.A

A61K 39/39 , 39/12

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 05 de octubre de 2006

P2006/000215

OLARTE RAISBECK



06/215
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-100763-00000-0000
Fec: 2005-10-05 16:54:40 Dep. 2020 NUECREACIONES
Trá. 11 PATENTE Y
Eje: 379 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folio: 173

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

05-100-06

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC

Dirección: Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/000804

Fecha Marzo 24, 2005

Publicación Internacional No. WO 2005/097181

Fecha Octubre 20, 2005

6

Título (54) EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA MICROFLUIDIZADAS Y
COMPOSICIONES DE LAS VACUNAS.

Clasificación Internacional (51) A61K 39/39, 39/12, 39/02

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Abril 5, 2004

(31) Número de Solicitud

60/559.677

9

Comprobante de pago No. 06 - 74.980

Fecha Septiembre 28, 2006

10

ANEXOS

☒

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

☐

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

☒

Poderes, si fuere el caso. Ver expediente No. 06-051.744 Adjunto copia simple

☐

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

☐

Declaraciones.

☒

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

☒

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

☒

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

☒

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

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

☐

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

☐

Arte final 12 x 12.

☐

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

☐

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

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LISTA DE INVENTORES PCT/IB2005/000804

PAUL JOSEPH DOMINOWSKI
13812 South Kellogg School Road,
Hickory Corners, Michigan 49060
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

PAMELA KAY KLOSE
66 Quailcrest Road, East Lyme,
Connecticut 06333,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

RICHARD LEE KREBS
27004 Ranch Road, Ashland,
Nebraska 68003
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

RAMASAMY MANNAR MANNAN
5275 Snowbird Court,
Kalamazoo, Michigan 49009
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-100763- 00000-0000
Fec: 2006-10-05 16:54:40 Dep. 2080 NUECREACIONES
Tm. 11 PATENTEYU
Ere: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folio: 173

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 74,980
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISDEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	56710006	27/09/2006	3,048,000.00

***** 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

SOM. CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por **PFIZER PRODUCTS, INC.**, a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por **Grover F. Fuller, Jr.** el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de **Grover F. Fuller, Jr.**, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por **Susan Z. Killian**, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mí el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRES RUEDA IGLESIAS
C. G. C. C.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No. 0138 del 11 de febrero de 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRÉS RIVERA ISLEBAS
C. C. E. 11.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES / INGLES - ESPAÑOL
RECONOCIMIENTO NOTARIO DE FEBRERO 11, 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

7

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Fue firmado por: Norman Goodman

3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado

4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

Se certificó:

5. En Nueva York, Nueva York

6. El 22 de noviembre de 2005

7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York

8. Bajo el Número NYC-10404952A

9. Aparece Sello del Estado de Nueva York

10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C.C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
BOGOTÁ, COLOMBIA, 11 de febrero de 2006
SECRETARÍA DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other Intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

PFIZER PRODUCTS INC.,

Signature/Firma:

By:

Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In-Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

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

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

of legal age and domiciled in

Grover F. Fuller, Jr.

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street

City New York

State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of **PFIZER PRODUCTS INC.**

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

3. That **PFIZER PRODUCTS INC.**, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

4. Que con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

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

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

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

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan E. Kilham



SUSAN E. KILHAM
Notary Public, State of New York
No. 0038316371
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
Subscribed and sworn to before me
this 1st day of Nov. 2005
Susan E. Kilham

State of New York
County of New York, }

467518

Page 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Section 2 Sullivan
whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

FEE PAID \$3.00

FILED 1944 JUN 2 2005

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 October 2005 (20.10.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/097181 A1

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 39/39. (74) Agent: FULLER, Grover, F., Jr.; Pfizer Inc., 201 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).
39/12, 39/02
- (21) International Application Number: PCT/IB2005/000804
- (22) International Filing Date: 24 March 2005 (24.03.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/559,677 5 April 2004 (05.04.2004) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER PRODUCTS INC. [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): DOMINOWSKI, Paul, Joseph [US/US]; 13812 South Kellogg School Road, Hickory Corners, MI 49060 (US). KLOSE, Pamela, Kay [US/US]; 66 Quailcrest Road, East Lyme, CT 06333 (US). KREBS, Richard, Lee [US/US]; 27004 Ranch Road, Ashland, NE 68003 (US). MANNAN, Ramasamy, Mannar [US/US]; 5275 Snowbird Court, Kalamazoo, MI 49009 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

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

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

WO 2005/097181 A1

Microfluidized Oil-In-Water Emulsions and Vaccine Compositions

FIELD OF INVENTION

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

BACKGROUND OF THE INVENTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

16

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

Another approach to improve FCA was based on the notion that replacing the mineral oil with a biocompatible oil would help eliminate the reactions associated with FCA at the injection site. It was also believed that the emulsion should be oil-in-water rather than water-in-oil, because the latter produces a long-lasting depot at the injection site. Hilleman et al. described an oil-based adjuvant "Adjuvant 65", consisting of 86% peanut oil, 10% Arlacel A as emulsifier and 4% aluminum monostearate as stabilizer. Hilleman, 1968, Prog. Med. Virol. 8: 131-182; Hilleman and Beale, 1983, in New Approaches to Vaccine Development (Eds. Bell, R. and Torrigiani, G.), Schwabe, Basel. In humans, Adjuvant 65 was safe and potent but exhibited less adjuvanticity than IFA. Nevertheless, the use of Adjuvant 65 was discontinued due to reactogenicity for man with certain lots of vaccine and reduction in adjuvanticity when a purified or synthetic emulsifier was used in place of Arlacel A. U.S. Patents 5,718,904 and 5,690,842 teach that the mineral oil in the oil-in-water emulsion can be replaced with metabolizable oil for the purpose of improving the safety profile.

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

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

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

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

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

A number of submicron oil-in-water adjuvant formulations have been described in the literature. U.S. Patent 5,376,369 teaches a submicron oil-in-water emulsion adjuvant formulation known as Syntax Adjuvant Formulation (SAF). SAF contains squalene or squalane as the oil component, an emulsion-forming amount of Pluronic L121 (polyoxy-propylene-polyoxyethylene) block polymer and an immunopotentiating amount of muramyl dipeptide. Squalene is a linear hydrocarbon precursor of cholesterol found in many tissues, notably in the livers of sharks and other fishes. Squalane is prepared by hydrogenation of squalene and is fully saturated. Both squalene and squalane can be metabolized and have a good record of toxicological studies. Squalene or squalane emulsions have been used in human cancer vaccines with mild side effects and a desirable efficacy. See, e.g., Anthony C. Allison, 1999, Squalene and Squalane emulsions as adjuvants, *Methods* 19:87-93.

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

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

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

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

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

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

SUMMARY OF THE INVENTION

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

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

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

(2)

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

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

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

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

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

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

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

It has also been surprisingly discovered that a saponin and a sterol, when combined in solution, associate with each other to form complexes in the form of helical micelles. According to the present invention, these helical micelle complexes have immunostimulating activities and are especially useful as adjuvants in vaccine compositions.

Accordingly, the present invention provides vaccine compositions containing a saponin and a sterol, wherein the saponin and the sterol form complexes in the form of helical micelles. The present invention also provides compositions containing a saponin, a sterol and an antigen, wherein the saponin and the sterol form complexes in the form of helical micelles, and wherein the antigen is admixed with but not incorporated within the helical micelles.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

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

Figure 2 depicts the process for preparation of microfluidized vaccine compositions containing intrinsically incorporated antigen. The various vaccine components are added to the addition vessel and transferred to the pre-emulsion blending unit for mixing through simple mechanical means. Subsequently, the emulsion is passed through a microfluidizer and is collected in the post-microfluidization chamber.

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

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

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

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

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

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

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

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

Figure 11 is an electron microscopy photograph showing helical micelles formed with long with Quil A micelles and cholesterol crystals.

Figure 12 is an electron microscopy photograph showing helical immunogenic complexes formed by Quil A and cholesterol on the surface of the BVD Type I antigen.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

It has been unexpectedly discovered by the present inventors that microfluidization of vaccine formulations adjuvanted with an oil-in-water emulsion comprised of a mixture of lecithin and mineral oil not only improves the physical appearance of the vaccine formulations, but also enhances the immunizing effects of the vaccine formulations. Microfluidized vaccine formulations are also characterized by an improved safety profile.

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

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

Submicron Oil-In-Water Emulsions

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

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

By "submicron" is meant that the droplets are of a size of less than 1 μm (micron) and the average or mean oil droplet size is less than 1 μm . Preferably, the mean droplet size of the

emulsion is less than 0.8 μm ; more preferably, less than 0.5 μm ; and even more preferably, less than 0.4 μm , or about 0.1-0.3 μm .

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

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

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

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

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

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

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

Surfactants suitable for use in the present emulsions include natural biologically compatible surfactants and non-natural synthetic surfactants. Biologically compatible surfactants include phospholipid compounds or a mixture of phospholipids. Preferred phospholipids are phosphatidylcholines (lecithin), such as soy or egg lecithin. Lecithin can be obtained as a mixture of phosphatides and triglycerides by water-washing crude vegetable oils, and separating and drying the resulting hydrated gums. A refined product can be obtained by

fractionating the mixture for acetone insoluble phospholipids and glycolipids remaining after removal of the triglycerides and vegetable oil by acetone washing. Alternatively, lecithin can be obtained from various commercial sources. Other suitable phospholipids include phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, phosphatidic acid, cardiolipin, and phosphatidylethanolamine. The phospholipids may be isolated from natural sources or conventionally synthesized.

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

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

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

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

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

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

The phrase "immunostimulatory molecules", as used herein, refers to those molecules that enhance the protective immune response induced by an antigenic component in vaccine compositions. Suitable immunostimulatory materials include bacterial cell wall components, e.g., derivatives of N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine such as murabutide, threonyl-MDP and muramyl tripeptide; saponin glycosides and derivatives thereof, e.g., Quil A, QS 21

and GPI-0100; cholesterol; and quaternary ammonium compounds, e.g., dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA) and N,N-dioctadecyl-N,N-bis(2-hydroxyethyl)propanediamine ("avridine").

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

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

Saponin can be isolated from the bark of *Quillaja saponaria*. Saponin has long been known as an immunostimulator. Dalsgaard, K., "Evaluation of its adjuvant activity with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease", *Acta. Vet. Scand.* 69: 1-40 1978. Crude extracts of plants containing saponin enhanced potency of foot and mouth disease vaccines. However, the crude extracts were associated with adverse side effects when used in vaccines. Subsequently, Dalsgaard partially purified the adjuvant active component from saponin by dialysis, ion exchange and gel filtration chromatography. Dalsgaard, K. et al., "Saponin adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines", *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 44: 243-254 1974. An adjuvant active component purified in this way is known as "Quil A." On a weight basis Quil A showed increased potency and exhibited reduced local reactions when compared to crude saponin. Quil A is widely used in veterinary vaccines.

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

U.S. Patent 6,080,725 teaches the methods of making and using saponin-lipophile conjugate. In this saponin-lipophile conjugate, a lipophile moiety such as lipid, fatty acid, polyethylene glycol or terpene is covalently attached to a non-acylated or desacylated triterpene saponin via a carboxy group present on the 3-O-glucuronic acid of the triterpene saponin. The attachment of a lipophilic moiety to the 3-O-glucuronic acid of a saponin such as

Quillaia desacylsaponin, lucyoside P, or saponin from *Gypsophila saponaria* and *Acanthophyllum* enhances their adjuvant effects on humoral and cell-mediated immunity. Additionally, the attachment of a lipophile moiety to the 3-O-glucuronic acid residue of non- or desacylsaponin yields a saponin analog that is easier to purify, less toxic, chemically more stable, and possesses equal or better adjuvant properties than the original saponin.

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

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

U.S. Patent 5,951,988 teaches adjuvant formulation containing quaternary ammonium salts such as DDA in conjunction with an oil component. This formulation is useful in conjunction with known immunological substances, e.g., viral or bacterial antigens in a vaccine composition, in order to enhance the immunogenic response. The composition is also useful without an incorporated antigen as nonspecific immunostimulatory formulation.

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

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

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

Methods of Preparing Submicron Oil-In-Water Emulsions

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

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

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

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

Droplet size can be determined by a variety of methods known in the art, e.g., laser diffraction, by use of commercially available sizing instruments. The size may vary depending on the type of surfactant used, the ratio of surfactant to oil, operating pressure, temperature, and the like. The skilled artisan can determine the desired combination of these parameters to obtain emulsions with desired droplet size without undue experimentation. The droplets of the emulsions of the present invention are less than 1 μm in diameter, preferably with a mean droplet size of less than 0.8 μm , and more preferably with a mean droplet size less than 0.5 μm , and even more preferably with a mean droplet size of less than 0.3 μm .

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

Vaccine Compositions Containing Antigens Incorporated in Submicron Oil-In-Water Emulsions

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

According to the present invention, the antigen can be combined with the emulsion extrinsically, or preferably, intrinsically. The term "intrinsically" refers to the process wherein

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

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

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

A "protective immune response" is defined as any immune response, either antibody or cell mediated immune response, or both, occurring in the animal that either prevents or detectably reduces the occurrence, or eliminates or detectably reduces the severity, or detectably slows the rate of progression, of the disorder or disease caused by the antigen or a pathogen containing the antigen.

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

The amount of the antigen should be such that the antigen which, in combination with the oil-in-water emulsion, is effective to induce a protective immune response in an animal.

The precise amount of an antigen to be effective depends on the nature, activity and purity of the antigen, and can be determined by one skilled in the art.

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

In addition to the antigen(s) and the oil-in-water emulsion, the vaccine composition can include other components which are appropriate and desirable, such as preservatives, osmotic agents, bioadhesive molecules, and immunostimulatory molecules (e.g., Quil A, cholesterol, GPI-0100, dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA)), as described hereinabove in connection with the oil-in-water emulsion.

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

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

In another preferred embodiment, the present invention provides a vaccine composition which includes a Leptospira antigen and at least one of a BVDV type I or BVDV type II antigen in an oil-in-water emulsion. The antigens, preferably in the form of inactivated cell or viral preparation, are incorporated intrinsically in the oil-in-water emulsion having droplets of a size of less than 1 μm , preferably with a mean droplet size of less than 0.8 μm , more preferably less than 0.5 μm , and even more preferably with a mean droplet size of about 0.5 μm . The

submicron oil-in-water emulsion preferably is composed of an AMPHIGEN formulation (i.e., a formulation which contains light mineral oil, lecithin, TWEEN® 80, and SPAN® 80). The vaccine composition preferably also includes one or more immunostimulatory molecules selected from Quil-A, cholesterol, DDA, GPI-100 and aluminum hydroxide (AlOH).

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

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

Methods of Preparing Vaccine Compositions

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

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

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

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

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

In a preferred embodiment of the present invention, the DRAKEOL® lecithin oil solution, which contains 25 % lecithin in light mineral oil, is combined and mixed with surfactants TWEEN® 80 and SPAN® 80 and saline solution to form a mixture that contains 40% light mineral oil, lecithin, 0.18% TWEEN® 80, and 0.08% SPAN® 80. The mixture is then emulsified with a Ross® (Hauppauge, NY 11788) emulsifier at approximately 3400 rpm to form an emulsion product, which is also referred to as an "AMPHIGEN® formulation" or "AMPHIGEN® solution". Subsequently, the desired antigen(s) are combined with the AMPHIGEN® solution and any other appropriate components (e.g., immunostimulatory molecules) with the aid of an emulsifier, e.g., a Ross homogenizer, to form an oil-in-water emulsion containing the antigen(s). Such emulsion is passed once through a Microfluidizer operating at about 10000 $\pm$ 500 psi. The microfluidized oil-in-water emulsion has droplets of a size of less than 1 μm , with the mean droplet size of about 0.25 μm .

In another preferred embodiment, prior to combining an oil-in-water emulsion (e.g., an AMPHIGEN® formulation) with a desired antigen(s), the antigen(s) is combined with a saponin glycoside, e.g., Quil A, to form a mixture. This antigen(s)-saponin mixture is subjected to homogenization, e.g., in a homogenization vessel. A sterol, e.g., cholesterol, is then added to the homogenized antigen(s)-saponin mixture. The mixture containing the antigen(s), saponin and sterol is then subjected to further homogenization. The homogenized antigen(s)-saponin-sterol mixture is then combined with an oil-in-water emulsion (e.g., an AMPHIGEN® formulation) with the aid of a homogenizer, for example. The homogenized oil-in-water emulsion containing the antigen(s), saponin and sterol is then subjected to high pressure homogenization, such as microfluidization.

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

28

In still another embodiment, the present invention provides vaccine compositions which contain an antigen encapsulated in microparticles (or "microencapsulated antigen"), where the microencapsulated antigen is extrinsically incorporated into a submicron oil-in-water emulsion described hereinabove.

Methods for absorbing or entrapping antigens in particulate carriers are known in the art. See, e.g., *Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications* (Justin Hanes, Masatoshi Chiba and Robert Langer. Polymer microspheres for vaccine delivery. In: *Vaccine design. The subunit and adjuvant approach*. Eds. Michael F. Powell and Mark J. Newman, 1995 Plenum Press, New York and London). Particulate carriers can present multiple copies of a selected antigen to the immune system in an animal subject and promote trapping and retention of antigens in local lymph nodes. The particles can be phagocytosed by macrophages and can enhance antigen presentation through cytokine release. Particulate carriers have also been described in the art and include, e.g., those derived from polymethyl methacrylate polymers, as well as those derived from poly(lactides) and poly(lactide-co-glycolides), known as PLG. Polymethyl methacrylate polymers are non-biodegradable while PLG particles can be biodegrade by random non-enzymatic hydrolysis of ester bonds to lactic and glycolic acids which are excreted along normal metabolic pathways.

Biodegradable microspheres have also used to achieve controlled release of vaccines. For example, a continuous release of antigen over a prolonged period can be achieved. Depending upon the molecular weight of the polymer and the ratio of lactic to glycolic acid in the polymer, a PLGA polymer can have a hydrolysis rate from a few days or weeks to several months or a year. A slow, controlled release may result in the formation of high levels of antibodies similar to those observed after multiple injections. Alternatively, a pulsatile release of vaccine antigens can be achieved by selecting polymers with different rates of hydrolysis. The rate of hydrolysis of a polymer typically depends upon the molecular weight of the polymer and the ratio of lactic to glycolic acid in the polymer. Microparticles made from two or more different polymers with varying rates of antigen release provide pulsatile releases of antigens and mimics multiple-dose regimes of vaccination.

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

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

Complexes Formed by a Saponin and Sterol

In one embodiment, the present invention provides compositions containing a saponin and a sterol, wherein the saponin and the sterol form complexes in the form of helical micelles. According to the present invention, these complexes have immunostimulating activities.

By "immunostimulating" is meant that the complexes can enhance the immune response induced by an antigenic component, or that the complexes can induce an immune response independent of a separate antigenic component.

In accordance with the present invention, a preferred saponin for use in a composition of the present invention is Quil A.

Preferred sterols for use in the adjuvant compositions of the present invention include beta-sitosterol, stigmasterol, ergosterol, ergocalciferol and cholesterol. These sterols are well known in the art, for example cholesterol is disclosed in the Merck Index, 11th Edn., page 341, as a naturally occurring sterol found in animal fat. Most preferably the sterol is cholesterol.

The ratio of saponin:sterol in the composition is typically on the order of 1:100 to 5:1 weight to weight. Preferably, the ratio is 1:1.

In another embodiment, the present invention provides vaccine compositions containing a saponin, a sterol and an antigen, wherein the saponin and the sterol form complexes in the form of helical micelles, and wherein the antigen is admixed with but not incorporated within the helical micelles.

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

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

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

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

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

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

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

EXAMPLE 3**Secondary Blending by Microfluidization**

Figure 2 illustrates the process used for the secondary blending through microfluidization. The microfluidizer was steam sterilized. First the auxiliary processing module chamber was installed in the unit and the blank chamber was installed on the second chamber position. The vessel containing the fully adjuvanted BVD vaccine prepared as described in the Example 2 was connected to the microfluidizer by attaching a transfer line from the supply vessel drain valve to the microfluidizer inlet. Nitrogen gas was connected to the supply vessel air filter inlet and the vessel pressure setting was adjusted to 20 +/- 5 PSI. Collection vessel drain valve was connected to the transfer line from the microfluidizer outlet.

After making all the necessary connections, the valves were opened and microfluidization was initiated at an operating pressure of 10,000 +/- 500 PSI. The entire content of the vaccine was passed through the microfluidizer one time and was collected in the post-microfluidization chamber. This preparation was aliquoted into 2mL doses and represents the microfluidized AMPHIGEN® formulation-based BVD vaccine.

EXAMPLE 4

Preparation of a Vaccine Composition through Bench Blend.

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

EXAMPLE 5

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

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

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

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

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

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

The final composition of both the control and microfluidized preparations was as follow: BVD type I with a post-inactivation ELISA titer of 2535 RU/ dose for gp53, BVD Type II with a post-inactivation ELISA titer of 3290 RU/dose for gp53, Quil-A at the concentration of 1.25 mg/dose, cholesterol at the concentration of 1.25 mg/dose, the AMPHIGEN® formulation at the final concentration of 2.5%, and thimerosal at the final concentration of 0.009%. The vaccine dose was 5 ml.

EXAMPLE 8**Long term Stability of Intrinsically Incorporated BVD Viral Antigens In the Microfluidized AMPHIGEN® formulation-Based Vaccine Preparation**

This experiment was carried out to determine the stability of the intrinsically incorporated antigen during the long storage. Killed BVD Type II viral antigen was intrinsically incorporated into the AMPHIGEN® formulation during microfluidization process to obtain microfluidized vaccine preparation (A907505). Three other vaccine preparations containing the same antigen in non-microfluidized AMPHIGEN® formulation (A904369, A904370, and A904371) served as the control. In the non-microfluidized preparations, the antigen was mixed

with AMPHIGEN® formulation and mixed through blending using a Ross homogenizer. All four vaccine preparations were stored at 4°C for two years. At different points during the storage (0, 6, 12 or 24 months), all four formulations were used to vaccinate three months old cows.

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

EXAMPLE 9

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

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

As shown in Figure 6, the results indicate that there was a steep rise in the rectal temperature in about 24 hours following vaccination in those animals vaccinated with either a single or double dose of the non-microfluidized vaccine formulation. However, in the animals vaccinated with microfluidized forms of vaccine, the rise in rectal temperature following the vaccination was only minimal and significantly lower than in the animals vaccinated with the non-microfluidized formulation (Figure 6).

EXAMPLE 10

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

The microfluidized and non-microfluidized vaccine preparations made as described in the Example 7 were used to vaccinate the cattle on day zero. The animals included in this study were cross-bred beef cattle. There were three animals in each of the placebo treatment groups (T01 and T02). There were six animals in each of the groups T03 through T06. The vaccine dose was 2 ml and the groups were vaccinated either with one or two doses of the vaccine on day zero. On day 0, test article was administered in the right neck. Animals

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

EXAMPLE 11

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

Formalin-inactivated *Leptospira hardjo-bovis* strain CSL was formulated in the appropriate adjuvant at direct counts of about 1.4×10^9 organisms/5 ml dose. Formalin-inactivated *Leptospira Pomona* strain T262 was formulated at about 2400 Nephelometric Units/5 ml dose. Nephelometric units were calculated based on nephelometric measurement of preprocessed fermentation fluid. BVD virus Type 1 was formulated at E2 Elisa titer of about 3000 Relative Units/5 ml dose. BVD virus Type 2 was formulated at E2 Elisa titer of about 3500 Relative Units/5 ml dose. The Relative Unit was calculated based on the E2 ELISA titer of pre-assembly post-inactivation bulk fluid. Both Quil-A and cholesterol were used at the concentration of 0.5 mg per dose. Thimerosal and the AMPHIGEN® formulation were used at the final concentration of 0.008% and 2.5%, respectively. Aluminum hydroxide (Rehydralgel LV) was used at the final concentration of 2.0%. When DDA was used as an immunomodulator, DDA was included within the AMPHIGEN® formulation. The AMPHIGEN® formulation (i.e., the 40% Drakeol-lecithin stock solution) contained 1.6 mg/ml of DDA and, when appropriately diluted, the final vaccine preparation contained 2.5% AMPHIGEN® formulation and 0.1 mg/ml of DDA.

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

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

EXAMPLE 12

Preparation Of BVD Viral Vaccine For Challenge Studies

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

All the components were added to a Silverson homogenizer and blended for 15 minutes at 10,500 rpm and then microfluidized by passing through a 200 micron chamber with 10,000 psi. When the vaccine preparation contained aluminum hydroxide, the microfluidization was carried out without aluminum hydroxide. After the microfluidization was completed, aluminum hydroxide was added and mixed with a stir bar overnight at 4°C.

EXAMPLE 13

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

Table 1 - Treatment Groups

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

37

Table 1 shows the composition of the adjuvant formulations in the vaccine preparations tested in this study. The vaccine preparations were prepared as described in the Example 11. There were six animals in each group. About seven-month old beef cross-bred heifers were used in this study. Vaccination was done on Day 0 and Day 21 through subcutaneous route with 5 ml vaccine volume. Challenge was done with *L. hardjo-bovis* strain 203 from NADC (National agricultural Disease Center). Challenge was done during Days 57-59 with a 1-ml inoculum. Challenge was administered conjunctively in the eye and vaginally. The challenge material contained 5.0×10^8 leptospires/ml. Urine was collected weekly for lepto culture, FA and PCR. Kidney collection was made during Days 112 and 113.

Table 2 - Results of the Leptospira Challenge Study

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

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

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

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

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

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

EXAMPLE 14

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

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

Table 4 - Treatment Groups

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

A 5 ml dose of the challenge virus preparation (approximately 2.5 ml per nostril) was administered intranasally on Day 44 of the study. Noncytopathic BVD virus Type 2, isolate # 24515 (Ellis Strain), lot # 46325-70 was used in this study as the challenge strain. Retained samples of challenge material were titrated (two replicates per titration) at the time challenge

29

was initiated and immediately upon its completion. The mean live virus titer per 5 ml dose was $5.3 \log_{10}$ FAID₅₀/5 ml prior to challenge and $5.4 \log_{10}$ FAID₅₀/5 ml post challenge (FAID is equivalent to TCID₅₀).

Animals were monitored daily from Day -3 through Day 58. Clinical disease scores of 0, 1, 2, or 3, based on clinical signs attributable to BVD 2 Infection were made for each animal on Days 42 through 58. The scores on Day 44 were recorded prior to challenge. Blood samples (two 13 ml Serum Separation Tubes, SST) were collected from each animal on Days 0, 21, 35, 44, and 58 for determination of serum titers of BVD Type 1 and BVD Type 2 virus neutralization antibodies.

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

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

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

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

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

Serology

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

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

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

Treatment		BVDv Type 1 Geometric Mean SVN Titers on Study Day				
		0	21	35	44	58
T01	Saline	<2	<2	<2	<2	23.9
T02	Amphigen, Qul A	<2	39.1	19824.5	14018.2	27554.5
T03	Amphigen, 0.5 mg DDA, AI	<2	51.8	32204.8	22381.1	23170.4
T04	Amphigen, 0.5 mg DDA	<2	27.0	14512.4	8932.0	21998.2
T05	Amphigen, 1.0 mg DDA	<2	26.7	11585.2	8194.8	20882.0
T06	Amphigen, 2.0 mg DDA	<2	23.5	8778.7	6769.3	16961.1

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

Treatment		BVDv Type 1 Geometric Mean SVN Titers on Study Day				
		0	21	35	44	58
T01	Saline	<2	<2	<2	<2	522.0
T02	Amphigen, Quil A	<2	8.9	2272.4	2048.2	24833.6
T03	Amphigen, 0.5 mg DDA, AI	<2	9.5	3585.7	2702.2	20881.6
T04	Amphigen, 0.5 mg DDA	<2	4.1	1260.7	988.1	18496.2
T05	Amphigen, 1.0 mg DDA	<2	6.4	1388.8	1453.9	30047.8
T06	Amphigen, 2.0 mg DDA	<2	7.7	1673.2	1428.9	16384.0

Table 7. BVD Virus Isolation Following Challenge

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

82

Table 8. Clinical Signs Of BVD Disease Following Challenge

Treatment		Frequency (%) with Disease	Frequency (%) Observations with Clinical Sign of BVD Disease				Total Obs.
			0	1	2	3	
T01	Saline	9/10 (90.0)	75 (48)	63 (37.5)	29 (17.3)	1 (0.6)	168
T02	Amphigen, Qull A	1/10 (10.0)	105 (61.8)	63 (37.1)	2 (1.2)	0 (0)	170
T03	Amphigen, 0.5 mg DDA, AI	2/10 (20.0)	99 (58.2)	67 (39.4)	4 (2.4)	0 (0)	170
T04	Amphigen, 0.5 mg DDA	0/10 (0.0)	118 (69.4)	52 (30.6)	0 (0)	0 (0)	170
T05	Amphigen, 1.0 mg DDA	0/10 (0.0)	101 (59.4)	66 (40.6)	0 (0)	0 (0)	170
T06	Amphigen, 2.0 mg DDA	0/10 (0.0)	104 (61.2)	66 (38.8)	0 (0)	0 (0)	170

Table 9. Leukopenia Following Challenge

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

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

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

Virus Isolation

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

Clinical Disease

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

Leukopenia

As shown in Table 15, during the challenge period (Days 44 through 58), all ten animals in the control (T01) were leukemic (a 40% reduction in white blood cell count from pre-challenge baseline, Days 42-44). The frequency of animals with leukemia was six, two, four, three and two of the ten animals in each of the groups administered with the ITAs (T02, T03,

44

T04, T05 and T06, respectively). The difference between the control and the group administered with vaccine which was adjuvanted with the AMPHIGEN® formulation at 0.5 mg/dose and aluminum hydroxide (T03) was statistically significant ($P \leq 0.05$). The least squares mean number of days of leukemia was significantly greater (7.8 days) for the control as compared to the groups administered with the ITAs (0.2 to 1.2 days).

EXAMPLE 15

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

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

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

Treatment		Geometric mean SVN titer				
		0	21	35	43	57
T01	Saline	<2	<2	<2	<2	35.5
T02	Amphigen, Quil A	<2	98.7	20171.0	12203.4	44782.4
T03	Amphigen, 2 mg GPI-0100, AIOH	<2	84.6	10998.5	7383.2	25709.2
T04	Amphigen, 2 mg GPI-0100	<2	106.0	18179.2	8933.2	28526.2
T05	Amphigen, 3 mg GPI-0100	<2	62.9	15024.3	8780.1	19824.4
T06	Amphigen, 5 mg GPI-0100	<2	71.1	12203.3	7512.0	18670.2

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

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

Table 13. BVD Virus Isolation Following Challenge

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

Table 14. Clinical Signs of BVD Disease Following Challenge

Treatment		Frequency (%) with Disease	Frequency (%) Observations with Clinical Disease Score of			Total Obs.
			0	1	2	
T01	Saline	5/10 (50.0)	103 (80.6)	55 (32.4)	12 (7.1)	170
T02	Amphigen, Quil A	5/10 (50.0)	115 (67.6)	48 (28.2)	7 (4.1)	170
T03	Amphigen, 2 mg GPI-0100, AIOH	0/10 (0.0)	128 (75.3)	42 (24.7)	0 (0)	170
T04	Amphigen, 2 mg GPI-0100	0/10 (0.0)	124 (72.9)	46 (27.1)	0 (0)	170
T05	Amphigen, 3 mg GPI-0100	0/10 (0.0)	104 (61.2)	68 (38.8)	0 (0)	170
T06	Amphigen, 5mg GPI-0100	0/10 (0.0)	128 (75.3)	42 (24.7)	0 (0)	170

Table 15. Leukopenia Following Challenge

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

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

EXAMPLE 16

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

12

Three grams of Trehalose (Fluka) was added to water to get a stock of 333mg/ml of Trehalose solution. Recombinant PauA antigen solubilized in 0.8% SDS solution (SDS/rPauA) was added to Trehalose solution to get a final concentration of 494 µg rPauA/ml. In the next step 10 grams of polylactide glycolic acid (PLG- Resomer RE 503H, Boehringer Ingelheim) was dissolved in 200 ml Methylene Chloride (MeCl₂). The resulting PLG/MeCl₂ solution was combined with the SDS-rPauA/trehalose solution prepared in the first step. The combined solution was subjected to microfluidization using (Microfluidizer from Microfluidics Model M110EH) and the microfluidized preparation was spray dried using (Temco Spray Dryer Model SD-05). The spray dried material was collected using a 500 micron screen.

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

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

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

40

EXAMPLE 17**Preparation Of Microfluidized Vaccine Formulation Containing Both Bacterial Whole Cell Antigen And Recombinant Protein Antigen In Oil-In-Water Emulsion**

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

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

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

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

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

da

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

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

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

The results shown in Table 16 indicate that microfluidization of AMPHIGEN® formulation-based vaccine preparations does not cause any significant inactivation of the vaccine preparation.

Table 16. Analysis Of Viricidal Activities Of Microfluidized Vaccines

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

A=Cholesterol added at 650 ml/min

B=Cholesterol added at 28 ml/min

C=Cholesterol added at 5 ml/min

M200=Microfluidized with 200 micron screen

M75=Microfluidized with 75 micron screen

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

A value above 0.7 is an indication of viricidal effect.

50

EXAMPLE 20**Preparation of a Microfluidized AMPHIGEN® Formulation**

An AMPHIGEN® formulation was prepared by combining the DRAKEOL lecithin oil solution (light mineral oil with 25 % lecithin) and TWEEN 80 (with the final concentration of 0.18%) and Span 80 (with the final concentration of 0.08%) with mixing for 8-22 hours at 38 ± 1 °C. The oil mixture was then added to saline with the aid of a Ross® (Hauppauge, NY 11788) emulsifier at approximately 3400 rpm. Subsequently the mixture was passed once through a microfluidizer with a 200 μ m interaction chamber at 4500 ± 500 psi. Figure 10 A and 10B show the stability of the microfluidized AMPHIGEN® formulation. Particle size distribution, as measured by laser diffraction, at the starting, initial time point (Figure 10A) was nearly identical to the particle size distribution after 22 months of 4°C storage (Figure 10B).

Example 21**Electron Microscopic Analysis Of
The Quil A - Cholesterol Immunogenic Complex**

In order to determine the nature of the immunogenic complex formed by Quil A and cholesterol, a mixture of these two components was made either in the presence or absence of an antigen.

In a beaker containing 50 ml of KR-Hals buffer, BVD Type I antigen was added while stirring the solution with a magnetic bar. Afterwards, a concentrated stock solution of Quil A (50 mg/ml) was added drop wise while stirring the solution to achieve a final concentration of 50 μ g/ml. The addition of Quil A was followed by the addition of a stock solution of cholesterol in ethanol (18 mg/ml) to the final concentration of 50 μ g/ml.

In a second beaker, Quil A and cholesterol were added in the same way to the buffer of 50 ml without any BVD Type I antigen.

For transmission electron microscopy, 10 μ l of each sample was adsorbed onto 400 mesh copper grids with a formvar/carbon support platform (Electron Microscopy Sciences, Inc., Fort Washington, PA). The samples were negatively stained using 10 μ l of filtered 2% phosphotungstic acid, pH 5.2 as a contrast agent. The samples were examined using a JEOL 1230 Transmission electron Microscope (JEOL Inc., Tokyo, Japan) at 80 kV accelerating voltage. Digital imaging was performed on a Gatan BioScan 782 camera. Film microscopy was done on 4489 EM film and printed to Kodabrome II RC F3 paper (Eastman Kodak Company, Rochester, NY.)

In the solution containing only cholesterol and Quil A without any BVD Type I antigen, helical micelles were detected along with Quil A micelles and cholesterol crystals (Figure 11). The helical micelles were intertwined and appeared like a mesh. In the sample containing the BVD Type I antigen, the helical micelles were found to encircle randomly certain dense areas (Figure 12). The dense areas represent the BVD Type 1 antigen and the helical immunogenic

complex resulting from the association of Qull A and cholesterol is found adsorbed on the surface of the BVD Type I antigen.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A vaccine comprising a saponin glycoside, a sterol and an antigen, wherein said saponin glycoside and said sterol associate with each other to form complexes in the form of helical micelles, and wherein said antigen is in admixture with, but not integrated within, said helical micelles.
2. The vaccine composition of claim 1, further comprising a veterinarily-acceptable carrier.
3. The vaccine composition of claim 2, wherein said veterinarily-acceptable carrier is an oil-in-water emulsion.
4. The vaccine composition of claim 1, wherein said saponin glycoside is a triterpenoid.
5. The vaccine composition of claim 4, wherein said triterpenoid is Quil A.
6. The vaccine composition of claim 1, wherein said sterol is cholesterol.
7. The vaccine composition of claim 1, wherein said antigen comprises a viral antigen, a bacterial antigen, or a combination thereof.
8. The vaccine composition of claim 7, wherein said antigen comprises a BVDV type 1 or type 2 antigen.

FIG. 1

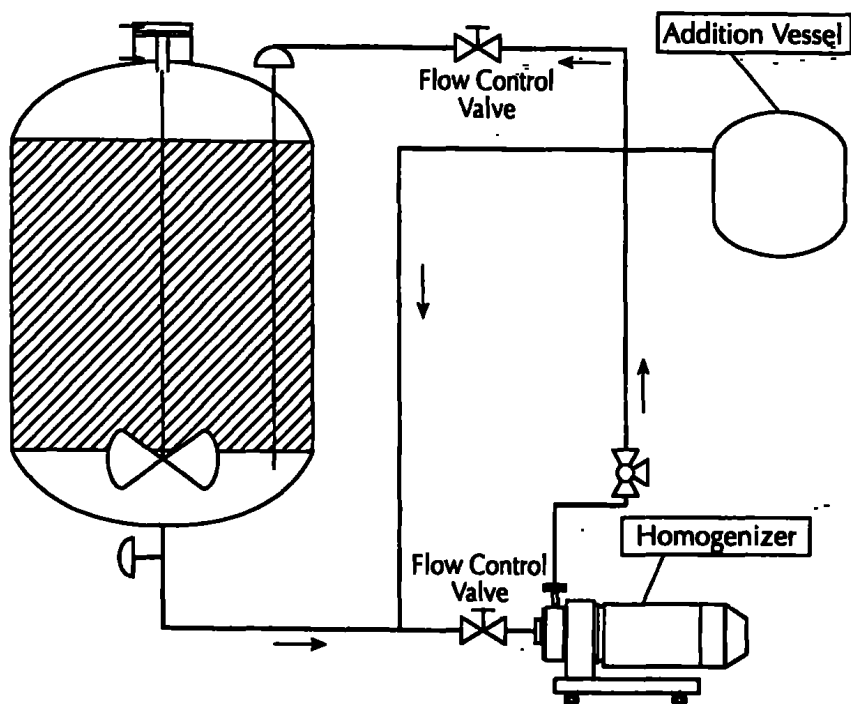
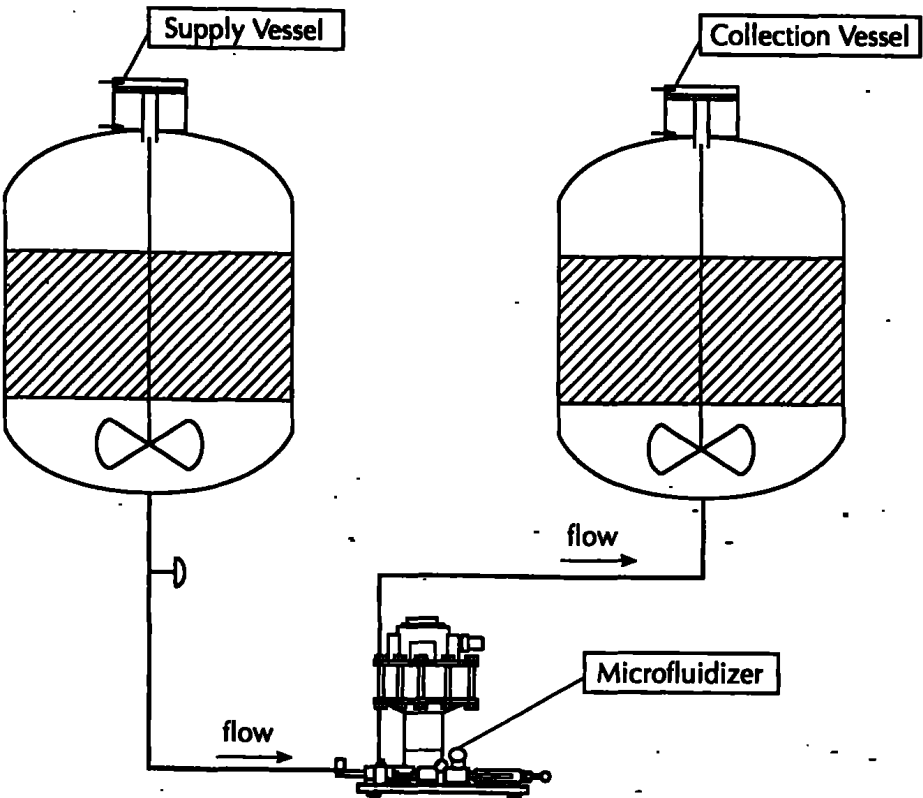
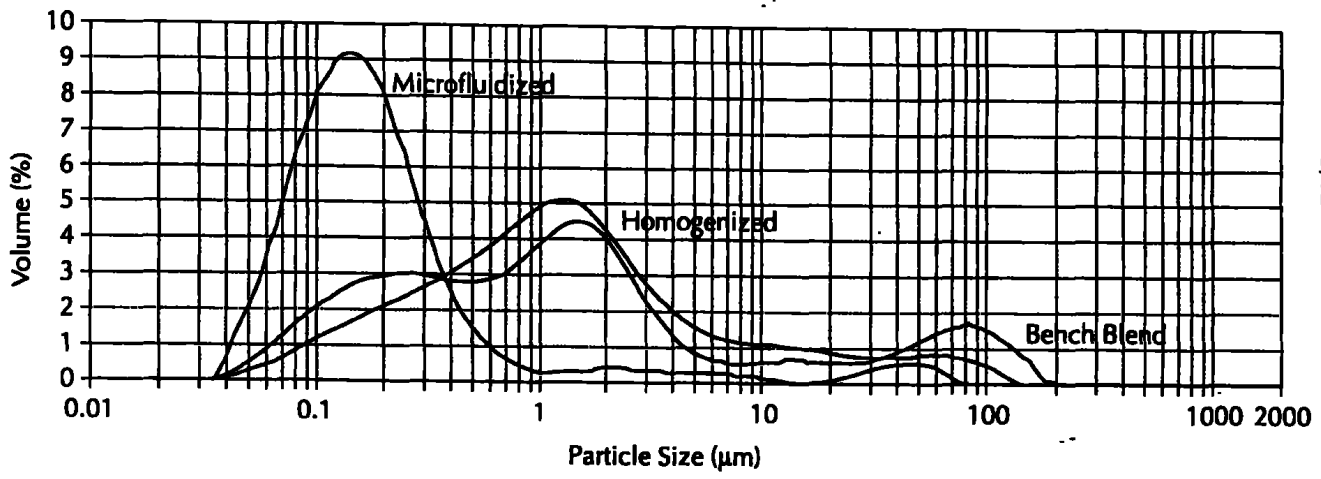


FIG. 2



3/12

FIG. 3



4/12

FIG. 4



FIG. 5

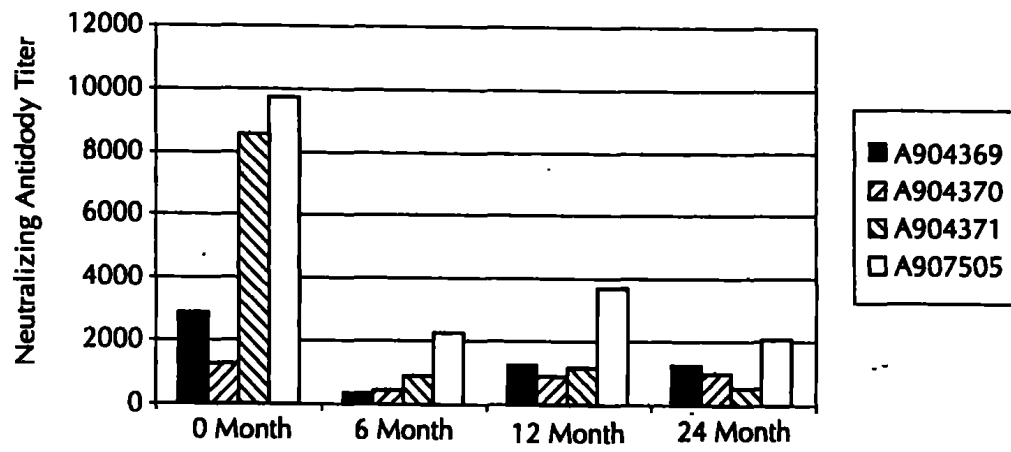
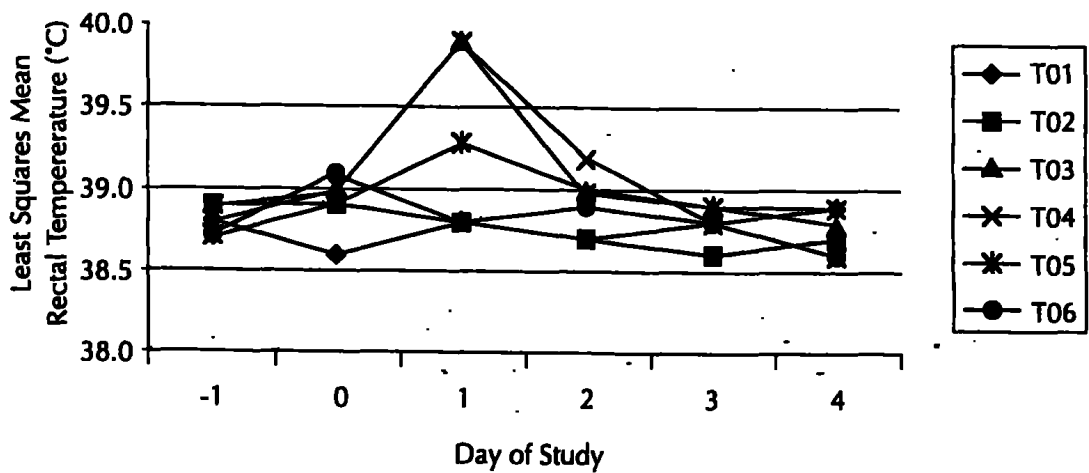


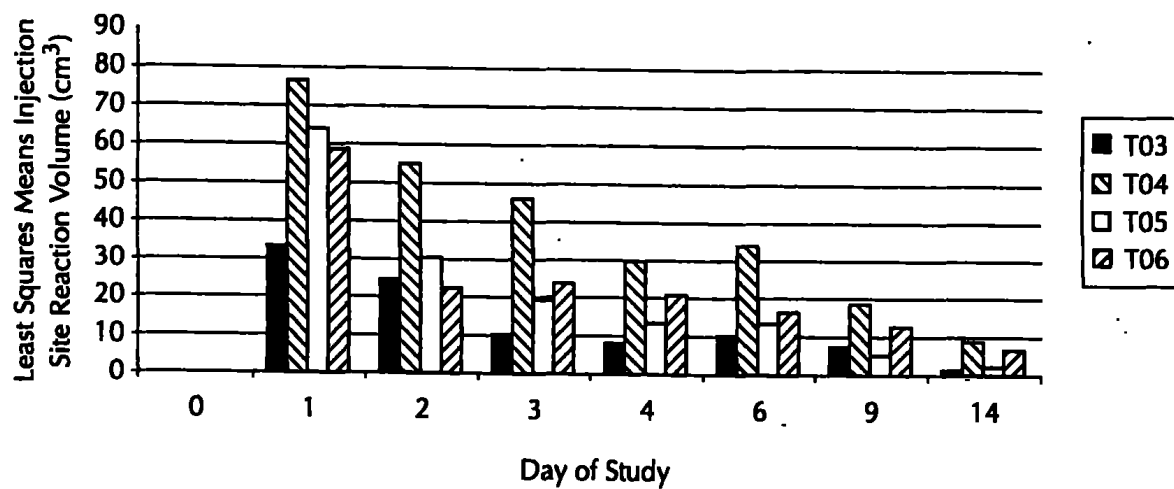
FIG. 6



6/12

[Signature]

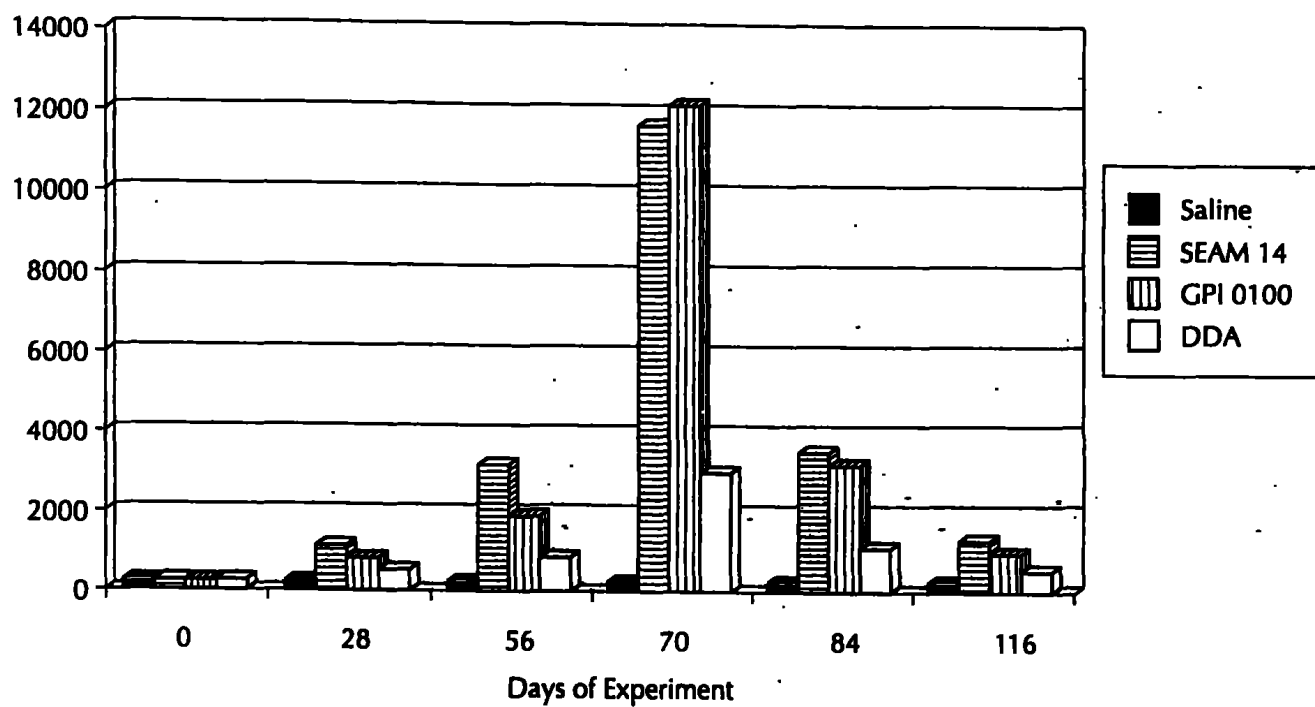
FIG. 7



7/12

[Signature]

FIG. 8



8/12

9/12

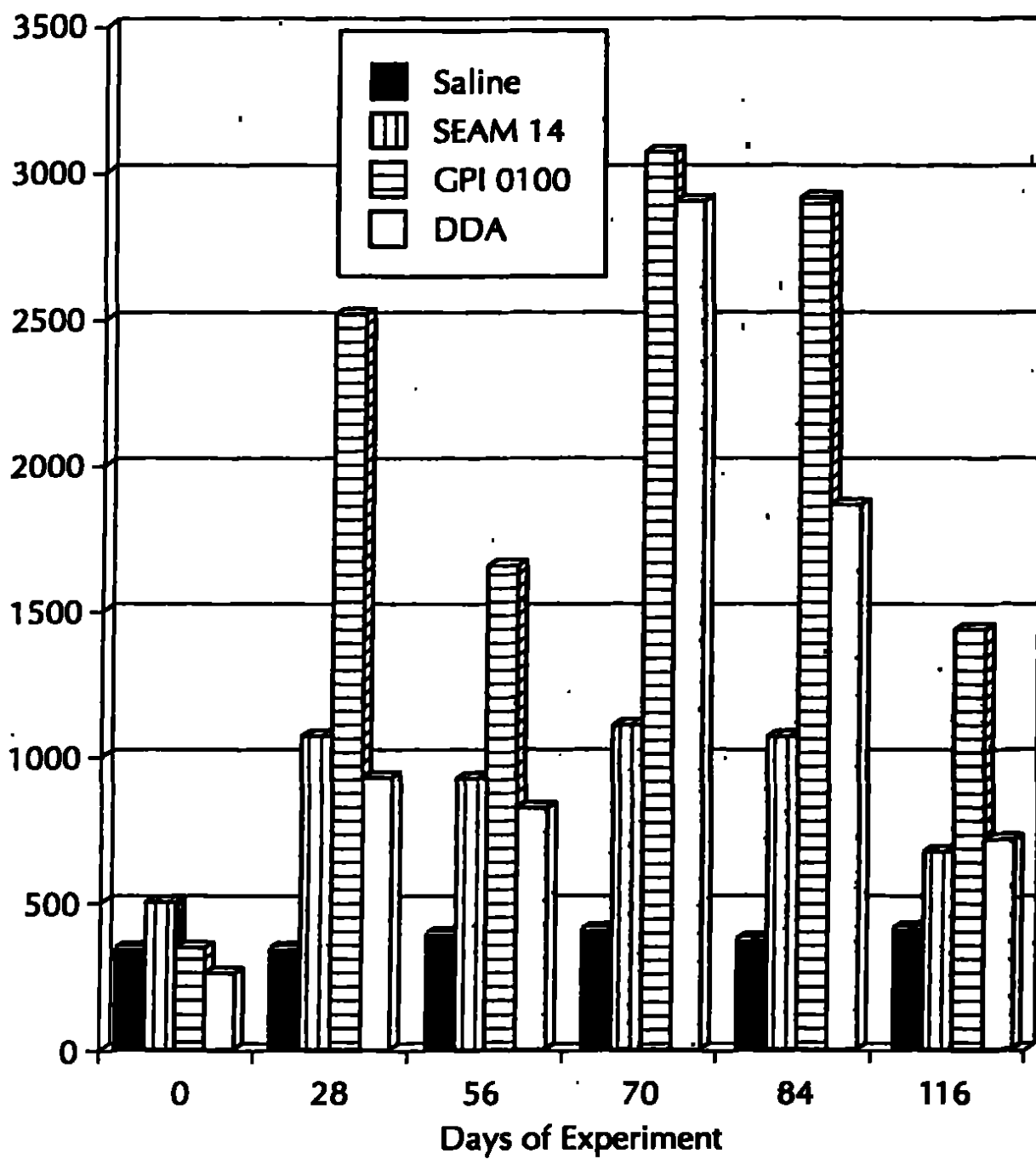
FIG. 9

FIG. 10A

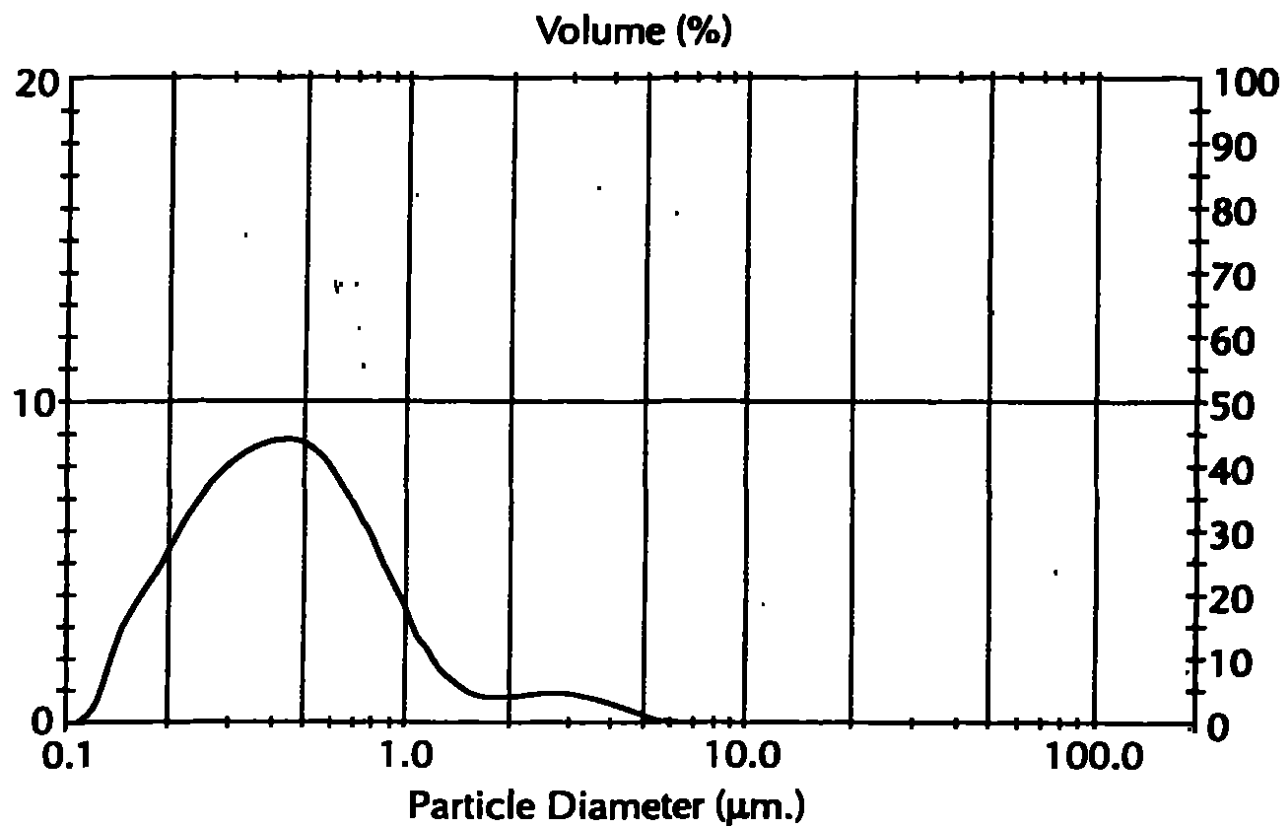
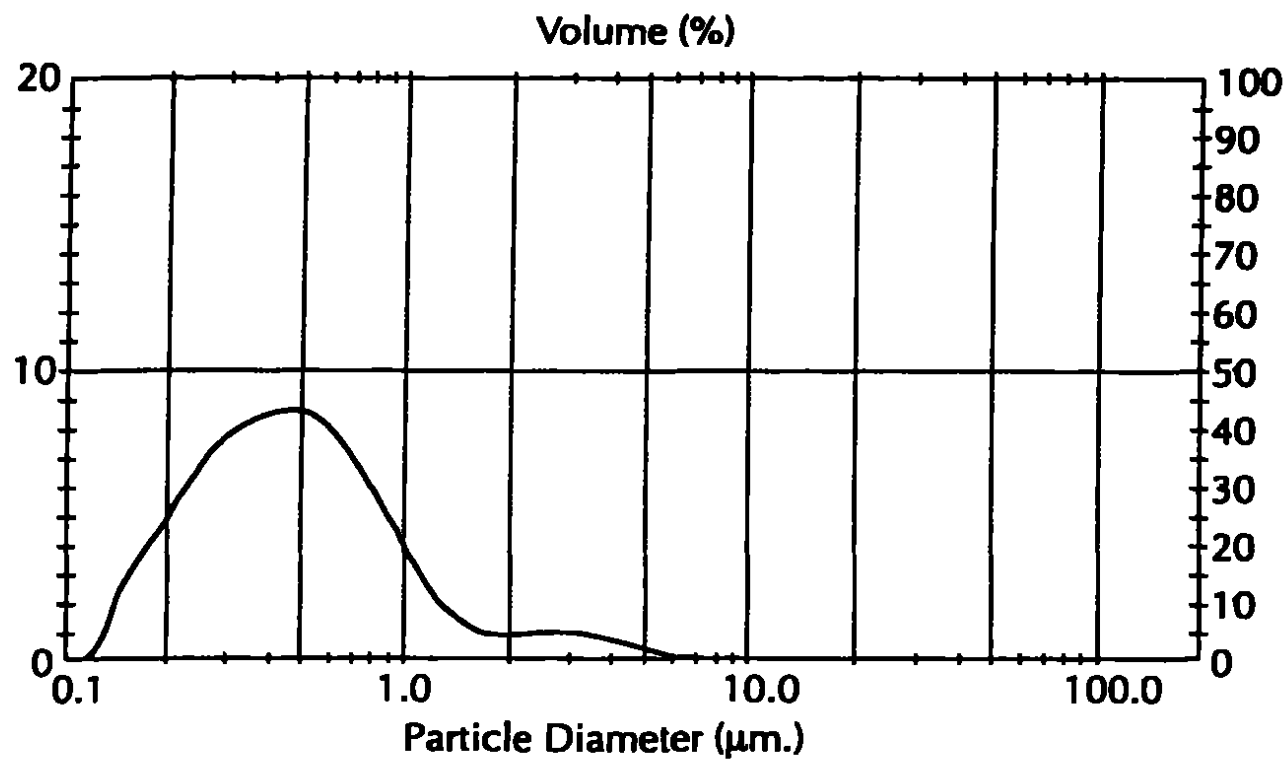


FIG. 10B



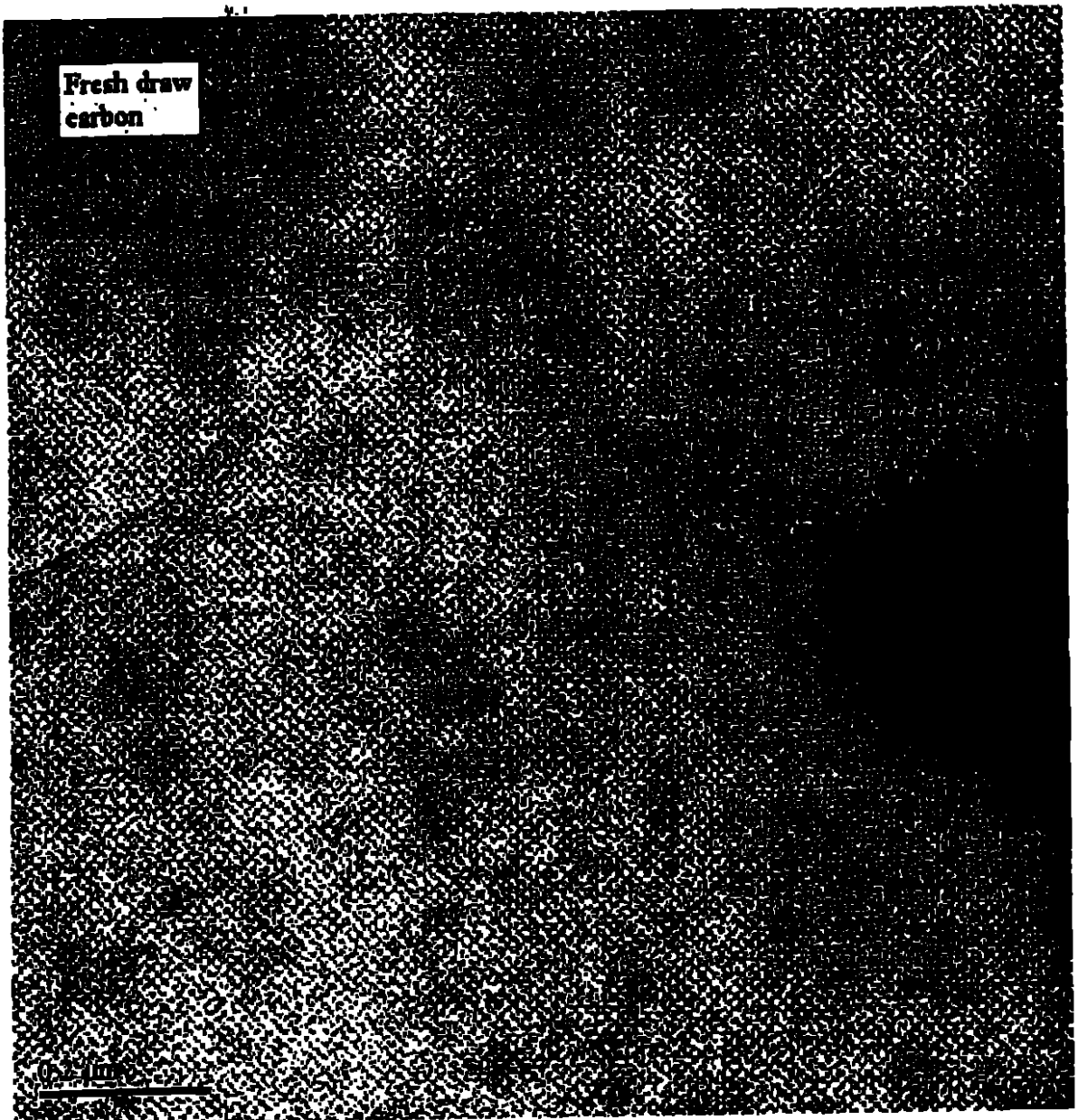
11/12

FIG. 11



12/12

FIG. 12



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/39 A61K39/12 A61K39/02

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, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/33739 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.; GARCON, NATHALIE, MARIE-JOSEPHE, C) 31 October 1996 (1996-10-31) abstract page 1, lines 3-6 page 1, lines 18-22 page 2, lines 1-3 page 2, line 34 - page 3, line 2 claims 1-3	1-7
X	US 2003/095974 A1 (GARCON NATHALIE ET AL) 22 May 2003 (2003-05-22) abstract paragraphs '0005!, '0023!, '0025!, '0026!, '0028!, '0029! claims 1,4,6,7,17	1-7

-/-

☒ 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 relating 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

5 July 2005

Date of mailing of the international search report

27/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-8040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noë, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2005/000804

66

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 679 354 A (MOREIN ET AL) 21 October 1997 (1997-10-21) abstract column 1, lines 46-62 column 2, lines 27-33 column 2, lines 43-45 claims 1-3,5-8	1,4-7
X	US 6 506 386 B1 (FRIEDE MARTIN ET AL) 14 January 2003 (2003-01-14) column 4, lines 13-16 column 4, lines 21-25 claims 1,5,7,12	1,4-7
P,X	WO 2004/087204 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; KLOSE, PAMELA, KAY; KRE) 14 October 2004 (2004-10-14) examples 2,3,13-15	1-8
P,X	WO 2004/067031 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; FRANTZ, JOSEPH, CLAUDE;) 12 August 2004 (2004-08-12) the whole document	1-8

INTERNATI NAL SEARCH REP RT

information on patent family members

International Application No

PCT/IB2005/000804

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9633739	A	31-10-1996	AP 771 A 07-10-1999
			AT 186842 T 15-12-1999
			AU 693022 B2 18-06-1998
			AU 5334596 A 18-11-1996
			AU 699213 B2 26-11-1998
			AU 6987398 A 23-07-1998
			BG 63491 B1 29-03-2002
			BG 101995 A 30-11-1998
			BR 9608199 A 18-05-1999
			CA 2217178 A1 31-10-1996
			CN 1515245 A 28-07-2004
			CN 1480214 A 10-03-2004
			CN 1182370 A ,C 20-05-1998
			CZ 9703379 A3 18-03-1998
			DE 69605296 D1 30-12-1999
			DE 69605296 T2 18-05-2000
			DK 822831 T3 01-05-2000
			EA 839 B1 24-04-2000
			WO 9633739 A1 31-10-1996
			EP 0822831 A1 11-02-1998
			EP 0884056 A1 16-12-1998
			EP 0955059 A2 10-11-1999
			ES 2140076 T3 16-02-2000
			GR 3031912 T3 29-02-2000
			HK 1009086 A1 27-10-2000
			HU 9801560 A2 28-10-1998
			IL 118004 A 30-11-1999
			JP 11504020 T 06-04-1999
			MA 23850 A1 31-12-1996
			NO 974859 A 21-10-1997
			NZ 305365 A 28-05-1999
			OA 10629 A 16-09-2002
			PL 322968 A1 02-03-1998
			RO 119068 B1 30-03-2004
			SI 822831 T1 29-02-2000
			SK 144297 A3 06-05-1998
			TR 9701252 T1 21-03-1998
			TW 515715 B 01-01-2003
			US 6846489 B1 25-01-2005
			US 2001053365 A1 20-12-2001
			ZA 9602612 A 29-08-1996
US 2003095974	A1	22-05-2003	AU 1145699 A 22-03-1999
			CA 2302554 A1 11-03-1999
			DE 69815692 D1 24-07-2003
			DE 69815692 T2 29-04-2004
			WO 9911241 A1 11-03-1999
			EP 1279401 A1 29-01-2003
			EP 1009382 A1 21-06-2000
			ES 2201551 T3 16-03-2004
			JP 2001514208 T 11-09-2001
US 5679354	A	21-10-1997	AT 109662 T 15-08-1994
			AU 632067 B2 17-12-1992
			AU 4337489 A 18-04-1990
			CA 1338888 C 04-02-1997
			DE 68917474 D1 15-09-1994
			DE 68917474 T2 16-03-1995

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB2005/000804

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5679354	A	DK 55891 A	29-05-1991
		EP 0436620 A1	17-07-1991
		ES 2029758 A6	01-09-1992
		HU 56722 A2	28-10-1991
		IE 65428 B1	01-11-1995
		JP 2501650 B2	29-05-1996
		JP 4501714 T	26-03-1992
		NO 911049 A	03-05-1991
		NZ 230747 A	26-05-1992
		PT 91856 A ,B	30-03-1990
		WO 9003184 A1	05-04-1990
		RU 2120302 C1	20-10-1998
		ZA 8907217 A	27-06-1990
US 6506386	B1 14-01-2003	AU 738965 B2	04-10-2001
		AU 5509999 A	28-02-2000
		CA 2339486 A1	17-02-2000
		EP 1102600 A2	30-05-2001
		JP 2002522397 T	23-07-2002
		WO 0007621 A2	17-02-2000
WO 2004087204	A 14-10-2004	WO 2004087204 A2	14-10-2004
		US 2004258701 A1	23-12-2004
WO 2004067031	A 12-08-2004	WO 2004067031 A1	12-08-2004
		US 2004185062 A1	23-09-2004
		US 2005089533 A1	28-04-2005

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

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las infecciones bacterianas, víricas, parásitas y micoplásmicas están ampliamente extendidas en los animales veterinarios tales como ganado vacuno, porcino y animales de compañía. Las enfermedades provocadas por
20 estos agentes infecciosos son a menudo resistentes a la terapia farmacéutica antimicrobiana, no dejando medios efectivos de tratamiento. En consecuencia, cada vez se usa más una estrategia de vacunación para controlar la enfermedad infecciosa en los animales veterinarios. Un patógeno infeccioso entero puede hacerse adecuado para usar en una formulación de vacuna tras
25 la inactivación química o manipulación genética apropiada. De forma

alternativa, puede expresarse una subunidad proteínica del patógeno en un sistema de expresión recombinante y purificarse para su uso en una formulación de vacuna.

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

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

Algunos adyuvantes tienen la capacidad de preservar la integridad de la configuración de un antígeno de forma que los antígenos puedan ser presentados de forma eficiente a las células efectoras inmunitarias apropiadas. Como resultado de esta conservación de la configuración del antígeno mediante la formulación del adyuvante, la vacuna tendría una vida útil en depósito mayor, como la que demuestran para los complejos inmunoestimuladores (ISCOM). Ozel M. y cols.; Quaternary Structure of the Immunoestimulating Complex (Iscom), *J. of Ultrastruc. and Molec. Struc. Res.* 102, 240-248 (1989).

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

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

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

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

Las emulsiones en aceite se han usado como adyuvante de vacunas durante mucho tiempo. Le Moignic y Pinoy encontraron en 1916 que una suspensión de *Salmonella typhimurium* inactivados en aceite de parafina aumentaba la respuesta inmunitaria. Subsiguientemente, en 1935 Ramon describió el aceite de almidón como una de las sustancias que aumentan la respuesta antitóxica al toxoide de la difteria. Sin embargo, las emulsiones en aceite no se hicieron populares hasta 1937 cuando Freund logró su formulación de adyuvante que hoy se conoce como Adyuvante Completo de Freund (FCA). El FCA es una emulsión de agua en aceite compuesta por aceite mineral

(parafina) mezclado con Mycobacteria inactivados y Arlacel A. Arlacel A es principalmente monooleato de manida y se usa como agente emulsionante. Aunque el FCA es excelente para inducir una respuesta de anticuerpos, provoca dolor fuerte, formación de abscesos, fiebre e inflamación granulomatosa. Para evitar estas reacciones secundarias indeseables, se desarrolló el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA). El IFA es similar al FCA en su composición a excepción de la ausencia de componentes de micobacteria. El IFA actúa mediante formulación en depot en la zona de la inyección y liberación lenta del antígeno estimulando las células productoras de anticuerpos.

Otra estrategia para mejorar el FCA se basó en la noción de que la sustitución del aceite de parafina por un aceite biocompatible ayudaría a eliminar las reacciones asociadas al FCA en la zona de la inyección. Se creía también que la emulsión debería ser una de aceite en agua en lugar de agua en aceite porque ésta produce un depot de larga duración en la zona de la inyección. Hilleman y cols. describieron un adyuvante con base de aceite "Adjuvant 65", que consistía en aceite de cacahuete al 86%, Arlacel A al 10% como emulsionante y monoestearato de aluminio al 4% como estabilizador. Hilleman, 1966, Prog. Med. Virol. 8: 131-182; Hilleman y Beale, 1983, en New Approaches to Vaccine Development (Editores Bell, R. y Torrigiani, G.), Schwabe, Basel. En los seres humanos, el uso de Adjuvant 65 era seguro y potente, pero mostraba menos capacidad adyuvante que el IFA. Sin embargo, se suspendió el uso de Adjuvant 65 debido a la capacidad reactógena en el hombre con ciertos lotes de vacunas y la reducción de la capacidad adyuvante cuando se usaba emulsionante purificado o sintético en lugar de Arlacel A. Las

patentes de Estados Unidos nº 5.718.904 y 5.690.942 enseñan que el aceite de parafina en la emulsión de aceite en agua puede sustituirse por aceite metabolizable con el fin de mejorar el perfil de seguridad.

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

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

Además de usar emulsionantes, también puede lograrse la estabilidad de la emulsión reduciendo el tamaño de la gota de la emulsión por medios mecánicos. Típicamente se han usado mezcladores de propelentes, rotores de turbina, molinos de coloides, homogeneizadores y aparatos de ultrasonidos para fabricar emulsiones. La microfluidización es otra forma de aumentar la homogeneidad del tamaño de la gota en la emulsión. La microfluidización puede producir una emulsión elegante, físicamente estable con un tamaño de las partículas consistente en el intervalo submicrométrico. Además de aumentar la estabilidad de la emulsión, el proceso de la microfluidización permite la filtración final que es una forma preferida de asegurar la esterilidad del producto final. Además, las partículas oleaginosas submicrométricas pueden pasar desde las zonas de inyección a los vasos linfáticos y después a los nódulos linfáticos de la cadena de drenaje, sangre y bazo. Esto reduce la probabilidad de establecer un depot oleaginoso en la zona de la inyección que puede producir inflamación local y una reacción significativa en la zona de la inyección.

Los microfluidizadores están ahora disponibles comercialmente. La formación de emulsiones se produce en un microfluidificador al interactuar dos chorros fluidizados a velocidades elevadas dentro de una cámara de interacción. El microfluidizador es aire o nitrógeno impulsado que puede operar con presiones internas por encima de 20.000 psi (137.900 kPa). La patente de Estados Unidos 4.908.154 enseña el uso de un microfluidizador para obtener emulsiones esencialmente libres de cualesquiera agentes emulsionantes.

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

5.376.369 describe un adyuvante de emulsión submicrométrica de aceite en agua que se conoce como Syntax Adjuvant Formulation (SAF). SAF contiene escualeno o escualano como componente oleaginoso, una cantidad de polímero de bloque Plurónico L121 (polioxipropileno y polioxietileno) que forma emulsiones y una cantidad inmunopotenciadora de muramil dipéptido. Escualeno es un precursor de colesterol hidrocarbonado lineal que se encuentra en muchos tejidos, de forma notable en el hígado de tiburones y otros peces. Escualano se prepara mediante hidrogenación de escualeno y está completamente saturado. Tanto escualeno como escualano pueden metabolizarse y tienen unos buenos antecedentes en estudios toxicológicos. Las emulsiones de escualeno y escualano se han usado en vacunas contra el cáncer en seres humanos con efectos secundarios leves y con una eficacia deseable. Véase, por ejemplo, Anthony C. Allison, 1999, Squalene and Squalane emulsions as adjuvants, *Methods* 19: 87-93.

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

La patente de Estados Unidos 5.961.970 describe otra emulsión submicrométrica más de aceite en agua para usar como adyuvante en vacunas. En la emulsión que se describe en esta patente, el componente hidrófobo se selecciona del grupo que consiste en un aceite triglicérido de

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

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

resultado una vacuna que es tanto segura como eficaz.

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

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

7A

seguridad mejorado.

SUMARIO DE LA INVENCION

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

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

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

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

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para preparar una emulsión submicrométrica de aceite en agua. De acuerdo con la presente invención, se mezclan los diversos componentes de la emulsión, incluyendo el aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente apropiado para usar en la emulsión. La mezcla se somete a un proceso de emulsionamiento primario para formar una emulsión de aceite en agua, que después se pasa por un microfluidizador para obtener una emulsión de aceite en agua de gotas con un diámetro inferior a 1 micrómetro, preferiblemente con un tamaño medio de las gotas inferior a 0,5 micrómetros.

Todavía en otra realización, la presente invención proporciona composiciones de las vacunas que contienen un antígeno y una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente. El antígeno se incorpora a la emulsión de forma extrínseca o intrínseca, preferiblemente de forma intrínseca.

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

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

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

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

También se ha encontrado sorprendentemente que una saponina y un estero, cuando se combinan en solución, se asocian entre si para formar complejos en forma de micelas helicoidales. De acuerdo con la presente invención, estos complejos de micelas helicoidales tienen actividades inmunoestimuladoras y son especialmente útiles como adyuvantes en composiciones de las vacunas.

En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones de las vacunas que contienen una saponina y un estero, en las que la saponina y el estero forman complejos en forma de micelas helicoidales. La presente invención proporciona también composiciones que contienen una saponina, un estero y un antígeno, en las que la saponina y el estero forman complejos en forma de micelas helicoidales y en las que el antígeno se mezcla pero no se incorpora a las micelas helicoidales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

La Figura 3 representa la distribución del tamaño de las gotas de la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizada, la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada y la preparación de vacuna mezclada en banco.

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

La Figura 5 representa una comparación de la estabilidad de los antígenos que se incorporan de forma intrínseca a la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidizada (A907505) y tres preparaciones de las vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidizadas de control (A904369, A904370 y A904371). Las cuatro preparaciones de las vacunas se almacenaron a 4°C durante dos años. En

momentos diferentes durante el almacenamiento (0, 6, 12 ó 24 meses), se usaron las cuatro formulaciones para vacunar vacas de tres meses de edad. La vacunación se realizó el Día 0 y 21 con 2 ml de una dosis de vacuna y se recogieron los sueros dos semanas después de la segunda vacunación. Se determinó la valoración de anticuerpos neutralizadores para el virus de BVD Tipo II en cada una de las muestras de suero. Los datos se presentan en términos de la media geométrica de 5 animales.

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

La Figura 7 representa la media de los mínimos cuadrados de los volúmenes de reacción en la zona de la inyección observados en el ganado tras la administración de vacunas microfluidifizadas y no microfluidifizadas. T03: Formulación no microfluidifizada – Dosis única; T04: Formulación no microfluidifizada – Dosis doble; T05: Formulación microfluidifizada – Dosis única; T06: Formulación microfluidifizada – Dosis doble.

La Figura 8 representa la media geométrica de las valoraciones de IgG para antígeno PauA recombinante de *Streptococcus uberis* tras la vacunación con las diversas formulaciones de las vacunas que contenían tanto antígeno PauA recombinante como antígeno de células enteras de *E. coli*.

La Figura 9 representa la media geométrica de las valoraciones de IgG

para antígeno de células enteras de *E. coli* de *Streptococcus uberis* tras la vacunación con las diversas formulaciones de las vacunas que contenían tanto antígeno PauA recombinante como antígeno de células enteras de *E. coli*.

La Figura 10A y 10B representan la distribución del tamaño de las partículas de una formulación de Amphigen microfluidificada al inicio de la producción (Figura 10A) y a los 22 meses tras la producción (Figura 10B).

La Figura 11 es una fotografía de microscopía electrónica que muestra micelas helicoidales formadas con micelas de Quil A y cristales de colesterol.

La Figura 12 es una fotografía de microscopía electrónica que muestra complejos inmunógenos helicoidales formados por Quil A y colesterol en la superficie del antígeno de BVD Tipo I.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los presentes inventores han descubierto de forma inesperada que la microfluidización de las formulaciones de las vacunas con adyuvantes de emulsión de aceite en agua compuestas por una mezcla de lecitina y aceite de parafina no sólo mejora el aspecto físico de las formulaciones de las vacunas, sino que también potencia los efectos inmunizadores de las formulaciones de las vacunas. Las formulaciones de vacunas microfluidizadas se caracterizan también por un perfil de seguridad mejorado.

Basándose en estos descubrimientos, la presente invención proporciona emulsiones submicrométricas de aceite en agua de utilidad como adyuvantes en las composiciones de las vacunas. Se proporcionan también procedimientos para preparar estas emulsiones submicrométricas de aceite en agua usando un microfluidizador. Además, la presente invención proporciona composiciones de las vacunas submicrométricas en las que un antígeno se combina con una

emulsión submicrométrica de aceite en agua. También se proporcionan los procedimientos para preparar tales composiciones de las vacunas. La presente invención proporciona además composiciones de las vacunas que contienen antígenos microencapsulados combinados con una emulsión submicrométrica de aceite en agua y procedimientos para preparar tales vacunas.

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

10 **Emulsiones submicrométricas de aceite en agua**

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

Las emulsiones submicrométricas de aceite en agua de la presente invención están compuestas por un aceite no metabolizable, al menos un tensioactivo y un componente acuoso, en las que el aceite está disperso en el componente acuoso con un tamaño medio de las gotas de aceite en el intervalo submicrométrico.

Por "submicrométrico" se quiere decir que las gotas son de un tamaño inferior a 1 μm (micrómetro) y el tamaño medio de las gotas de aceite es inferior a 1 μm . Preferiblemente, el tamaño medio de las gotas de la emulsión es inferior a 0,8 μm ; más preferiblemente inferior a 0,5 μm ; e incluso más

preferiblemente inferior a $0,4\ \mu\text{m}$ o aproximadamente $0,1\text{-}0,3\ \mu\text{m}$.

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

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

Los términos "animal" y "sujeto animal" tal como se usan en la presente memoria se refieren a todos los animales no humanos, incluyendo ganado bovino, ovino y porcino por ejemplo.

Los aceites no metabolizables adecuados para usar en las emulsiones
15 de la presente invención incluyen alcanos, alquenos, alquinos y sus ácidos y alcoholes correspondientes, sus éteres y ésteres, y sus mezclas. Preferiblemente, los compuestos individuales del aceite son compuestos hidrocarbonados ligeros, es decir, los componentes de ese tipo tienen de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite puede prepararse sintéticamente o purificarse
20 a partir de productos de petróleo. Los aceites preferidos no metabolizables para usar en las emulsiones de la presente invención incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas por ejemplo.

El término "aceite de parafina" se refiere a una mezcla de hidrocarburos líquidos que se obtienen a partir de vaselina mediante una técnica de
25 destilación. El término es sinónimo de "parafina líquida", "vaselina líquida" y

"aceite de parafina blanco". El término se pretende que incluya también "aceite de parafina fluido", es decir, aceite que se obtiene de forma similar mediante destilación de vaselina pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que la vaselina. Véase, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pa.; Mack Publishing Company, 1990, páginas 788 y 1323). El aceite de parafina puede obtenerse en diversas fuentes comerciales, por ejemplo J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). El aceite de parafina preferido es el aceite de parafina fluido disponible comercialmente con el nombre de DRAKEOL®.

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

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

20 Tensioactivos adecuados para usar en las presentes emulsiones incluyen tensioactivos biológicamente compatibles naturales y tensioactivos sintéticos no naturales. Los tensioactivos biológicamente compatibles incluyen compuestos de fosfolípidos o una mezcla de fosfolípidos. Fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolinas (lecitina), tales como lecitina de soja o de huevo. La lecitina puede obtenerse en forma de mezcla de fosfátidos y triglicéridos
25 lavando aceites vegetales crudos con agua, y separando y desecando las

gomas hidratadas resultantes. Un producto refinado puede obtenerse fraccionando la mezcla para obtener los fosfolípidos y glucolípidos insolubles en acetona que quedan después de eliminar los triglicéridos y el aceite vegetal lavando con acetona. De forma alternativa, puede obtenerse lecitina en
5 diversas fuentes comerciales. Otros fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse convencionalmente.

Tensioactivos sintéticos no naturales adecuados para usar en las
10 emulsiones submicrométricas de la presente invención incluyen tensioactivos no iónicos con base de sorbitan, por ejemplo tensioactivos de sorbitan sustituidos con ácidos grasos (disponibles comercialmente con el nombre SPAN® o ARLACEL®), ésteres de ácidos grasos de sorbitol polietoxilado (TWEEN®), ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos de fuentes tales como
15 aceite de ricino (EMULFOR); ácido graso polietoxilado (por ejemplo ácido esteárico disponible con el nombre de SIMULSOL M-53), polímero de isooctilfenol polietoxilado y formaldehído (TYLOXAPOL), éteres de alcoholes grasos de polioxietileno (BRIJ®); éteres de polioxietileno nonfenilo (TRITON® N), éteres de polioxietilenoisooctilfenilo (TRITON® X). Tensioactivos sintéticos
20 preferidos son los tensioactivos disponibles con el nombre de SPAN® y TWEEN®.

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

En general el tensioactivo, o la combinación de tensioactivos, si se usan
25 dos o mas tensioactivos, está presente en la emulsión en una cantidad de

0,01% a 10% en volumen, preferiblemente de 0,1% a 6,0%, más preferiblemente de 0,2% a 5,0%.

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

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

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

La frase "moléculas inmunoestimuladoras" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a las moléculas que potencian la respuesta inmunitaria protectora inducida por un componente antígeno en las composiciones de las vacunas. Los materiales inmunoestimuladores

adecuados incluyen componentes de la pared celular bacteriana, por ejemplo derivados de N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina tales como murabutida, treonil-MDP y muramil tripéptido; glucósidos de saponina y sus derivados, por ejemplo Quil A, QS 21 y GPI-0100; colesterol y compuestos de amonio cuaternario, por ejemplo bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) y N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina ("avridina").

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

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

La saponina puede aislarse de la corteza de *Quillaja saponaria*. La saponina ha sido conocida desde hace mucho como inmunoestimulador. Dalsgaard, K., "Evaluation of its adjuvant activity with special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease", *Acta Vet. Scand.* 69: 1-40 1978. Los extractos brutos de plantas que contenían saponinas mejoraron la potencia de las vacunas contra la glosopeda. Sin embargo, los extractos brutos se asociaron a efectos secundarios adversos cuando se usaron en vacunas. Subsiguientemente, Dalsgaard purificó parcialmente el componente activo del adyuvante de saponina mediante diálisis, intercambio de iones y cromatografía por filtración en gel. Dalsgaard, K.

y cols. "Saponin Adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Morina with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines", *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 44: 243-254 1974. Un componente activo de adyuvante purificado de esta forma se conoce como "Quil A". En base al peso, Quil A
 5 demostró una potencia aumentada y mostró reacciones locales reducidas cuando se comparó con saponina bruta. Quil A se usa éxtensamente en vacunas veterinarias.

El análisis ulterior de Quil A mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) reveló una mezcla heterogénea de saponinas muy similares
 10 y condujo al descubrimiento de QS21 que era un adyuvante potente con una toxicidad reducida o mínima. Kensil C.R. y cols., "Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex", *J. Immunol.* 146: 431-437, 1991. Al contrario que la mayoría de los otros inmunoestimuladores, QS21 es soluble en agua y puede usarse en
 15 vacunas con o sin formulaciones de tipo emulsión. Se ha demostrado que QS21 provoca una respuesta de tipo Th1 en ratones estimulando la producción de anticuerpos IgG2 e IgG2b e indujo CD8 + CTL (MHC clase I) específico de antígeno en respuesta a antígenos subunitarios. Los estudios clínicos en seres humanos han demostrado su capacidad como adyuvante con un perfil
 20 toxicológico aceptable. Kensil, C.R. y cols., "Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. In Vaccine Design: the subunit and Adjuvant Approach," Editores Powell, M.F. y Newman, M.J. Plenum Publishing Corporation, New York 1995, páginas 525-541.

La patente de Estados Unidos 6.080.725 enseña los procedimientos
 25 para preparar y usar conjugado de saponina y lipófilo. En este conjugado de

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

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

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

La patente de Estados Unidos 5.951.988 enseña una formulación de adyuvante que contiene sales de amonio cuaternario tales como DDA junto con un componente oleaginoso. Esta formulación es útil junto con sustancias inmunológicas conocidas, por ejemplo antígenos víricos o bacterianos en una

composición de vacuna, para potenciar la respuesta inmunógena. La composición es también útil sin un antígeno incorporado como formulación inmunoestimuladora no específica.

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

En una realización preferida, la presente invención proporciona una emulsión submicrométrica de aceite en agua de utilidad como adyuvante de vacunas, que se compone de una formulación de AMPHIGEN®, con gotas de un tamaño inferior a 1 μm y un tamaño medio de las gotas de aproximadamente 0,25 μm .

El término "formulación de AMPHIGEN®" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una solución formada mezclando una solución de aceite de lecitina DRAKEOL® (Hydronics, Lincoln, NE) con solución salina en presencia de TWEEN® 80 y SPAN® 80. Una formulación típica de AMPHIGEN® contiene aceite de parafina fluido al 40% en volumen (v/v), aproximadamente 25% p/v de lecitina, aproximadamente 0,18% en volumen (v/v) de TWEEN 80 y aproximadamente 0,08% en volumen (v/v) de Span 80.

Procedimientos para preparar emulsiones submicrométricas de aceite en agua

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos

para preparar las emulsiones submicrométricas de aceite en agua que se describen anteriormente.

De acuerdo con la presente Invención, los diversos componentes de la emulsión, incluyendo el aceite, uno o más tensioactivos, un componente acuoso y cualquier otro componente adecuado para usar en la emulsión se combinan y mezclan entre si.

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

La emulsión así formada se somete después a microfluidificación para llevar el tamaño de las gotas al intervalo submicrométrico. La microfluidificación puede lograrse usando un microfluidizador comercial tal como el número de modelo 110Y disponible en Microfluidics, Newton, Mass; el modelo 30CD de Gaulin (Gaulin, Inc., Everett, Mass.); y Rainnie Minilab tipo 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy Inc., Hudson, Wis.). Estos microfluidizadores operan forzando los fluidos a través de pequeñas aperturas a presión elevada, de tal forma que los dos chorros de fluido interactúan a velocidades elevadas en una cámara de interacción para formar emulsiones con gotas de un tamaño submicrométrico.

El tamaño de la gota puede determinarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, difracción por láser,

usando instrumentos de medición disponibles comercialmente. El tamaño puede variar dependiendo del tipo de tensioactivo usado, la relación entre tensioactivo y aceite, la presión a la que se trabaje, la temperatura y similares. El experto en la técnica puede determinar la combinación deseada de estos parámetros para obtener emulsiones con el tamaño de las gotas deseado sin experimentación excesiva. Las gotas de las emulsiones de la presente invención tienen un diámetro inferior a 1 μm , preferiblemente un tamaño medio de las gotas inferior a 0,8 μm , y más preferiblemente un tamaño medio de las gotas inferior a 0,5 μm , e incluso más preferiblemente un tamaño medio de las gotas inferior a 0,3 μm .

En una realización preferida de la presente invención, la solución oleaginosa de lecitina DRAKEOL, que está disponible comercialmente de Hydronics (Lincoln, NE) y contiene lecitina al 25% en aceite de parafina fluido, se combina y mezcla con solución salina así como con los tensioactivos TWEEN® 80 y SPAN® 80 para formar una "solución de AMPHIGEN®" o "formulación de AMPHIGEN®". La solución de AMPHIGEN® se emulsiona después con un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm para formar una emulsión de agua en aceite. Subsiguientemente la emulsión se hace pasar una vez a través de un Microfluidizador que trabaja a 4500 ± 500 psi ($31.027,5 \text{ kPa} \pm 3.447,5 \text{ kPa}$). La emulsión de aceite en agua tiene gotas de un tamaño inferior a 1 μm , con un tamaño medio de las gotas de aproximadamente 0,25 μm .

Composiciones de las vacunas que contienen antígenos incorporados en emulsiones submicrométricas de aceite en agua

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones de

las vacunas que contienen un antígeno(s) y una emulsión submicrométrica de aceite en agua descrita anteriormente. Estas composiciones de las vacunas se caracterizan porque tienen un efecto inmunógeno potenciado y un aspecto físico mejorado (por ejemplo no se observa separación de fases después de un periodo de almacenamiento largo). Además, las composiciones de las vacunas de la presente invención son seguras para la administración a animales.

De acuerdo con la presente invención, el antígeno puede combinarse con la emulsión de forma extrínseca o, preferiblemente, de forma intrínseca. El término "intrínseco" se refiere al procedimiento en el que el antígeno se combina con los componentes de la emulsión antes de la etapa de microfluidización. El término "extrínseco" se refiere al procedimiento en el que el antígeno se añade a la emulsión después de que la emulsión ha sido microfluidizada. El antígeno añadido de forma extrínseca puede ser antígeno libre o puede estar encapsulado en micropartículas tal como se describe con más detalle más adelante.

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

El término "inmunógeno" tal como se usa en relación con un antígeno se refiere a la capacidad del antígeno de provocar una respuesta inmunitaria en un animal contra el antígeno. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria celular mediada primordialmente por linfocitos T citotóxicos, o una respuesta inmunitaria humoral mediada primordialmente por

linfocitos T cooperadores, que a su vez activan linfocitos B que provocan la producción de anticuerpos.

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

- Los antígenos que pueden incluirse en la composición de vacuna de la presente invención incluyen antígenos preparados a partir de bacterias patógenas tales como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Manheimia hemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma galanaceum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridia* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Campylobacter* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovars, *Leptospira* spp.; hongos patógenos tales como *Candida*; protozoos tales como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp.; helmintos tales como *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Fasciola*, ya sea en forma de una preparación de células enteras inactivadas o parciales o en forma de moléculas antigénicas obtenidas por purificación convencional de proteínas, técnicas de ingeniería genética o síntesis química. Antígenos adicionales incluyen virus patógenos tales como virus del herpes bovino 1, 3, 6, virus de

diarrea vírica bovina (BVDV) tipos 1 y 2, virus de la pseudogripe bovina, virus sincitial respiratorio bovino, virus de leucosis bovino, virus de rinderpest, virus de la glosopeda, rabia, virus de la fiebre porcina, virus de la fiebre porcina africana, parvovirus porcino, virus PRRS, circovirus porcino, virus de la gripe, 5 virus de enfermedad vesicular porcino, virus de fiebre de Tychen, virus pseudorrábico, ya sea en forma de una preparación de virus enteros inactivados o parciales, o en forma de moléculas antigénicas obtenidas por purificación convencional de proteínas, técnicas de ingeniería genética o síntesis química.

10 La cantidad del antígeno debe ser tal que el antígeno, combinado con la emulsión de aceite en agua, sea efectivo para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un animal. La cantidad precisa para que un antígeno sea efectivo depende de la naturaleza, actividad y pureza del antígeno y puede ser determinada por los expertos en la técnica.

15 La cantidad de emulsión de aceite en agua presente en las composiciones de las vacunas debe ser suficiente para potenciar la capacidad inmunógena del (de los) antígeno(s) en las composiciones de las vacunas. Cuando sea deseable y apropiado, pueden añadirse cantidades adicionales de tensioactivo(s) o tensioactivo(s) adicional(es) a la composición de la vacuna 20 además del (de los) tensioactivo(s) proporcionados por la emulsión de aceite en agua. De forma general, el componente oleaginoso está presente en el volumen final de una composición de vacuna en una cantidad de 1,0% a 20% en volumen; preferiblemente en una cantidad de 1,0% a 10%; más preferiblemente en una cantidad de 2,0% a 5,0%. El tensioactivo, o la 25 combinación de tensioactivos si se usan dos o más tensioactivos, está presente

en el volumen final de una composición de vacuna en una cantidad de 0,1% a 20% en volumen, preferiblemente 0,15% a 10%, más preferiblemente 0,2% a 6,0%.

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

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

En una realización preferida, la presente invención proporciona una
20 composición de vacuna que incluye al menos uno de un antígeno de BVDV tipo I o BVDV tipo II, que se incorpora de forma intrínseca a un emulsión de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño inferior a 1 μm , preferiblemente de un tamaño medio de las gotas inferior a 0,8 μm , más preferiblemente inferior a 0,5 μm , e incluso más preferiblemente de un tamaño medio de las gotas de
25 aproximadamente 0,5 μm . El antígeno de BVDV tipo I y/o II está

preferiblemente en forma de una preparación vírica inactivada. La emulsión submicrométrica de aceite en agua preferiblemente está compuesta por una formulación de AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite de parafina fluido, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna
5 preferiblemente incluye también Quil A, colesterol y timerosol.

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

20 Todavía en otra realización preferida, la presente invención proporciona una composición de vacuna que incluye al menos un agente bacteriano, por ejemplo la proteína PauA de *Streptococcus uberis* recombinante o una preparación de células de *E. coli* o una combinación de ambas en una emulsión de aceite en agua. El/los antígeno(s) se combina(n) de forma intrínseca con la
25 emulsión submicrométrica de aceite en agua que tiene gotas de un tamaño

inferior a 1 μm , preferiblemente de un tamaño medio de las gotas inferior a 0,8 μm , más preferiblemente inferior a 0,5 μm , e incluso más preferiblemente de un tamaño medio de las gotas de aproximadamente 0,25 μm . La emulsión submicrométrica de aceite en agua preferiblemente está compuesta por una formulación de AMPHIGEN® (es decir, una formulación que contiene aceite de parafina fluido, lecitina, TWEEN® 80 y SPAN® 80). La composición de vacuna preferiblemente incluye también una o más moléculas inmunoestimuladoras que se seleccionan de Quil-A, DDA, GPI-100.

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

Procedimientos para preparar composiciones de las vacunas

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

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

El antígeno puede combinarse con los diversos componentes de la

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

15 La emulsión que contiene el antígeno se somete después a microfluidificación para llevar el tamaño de las gotas al intervalo submicrométrico. La microfluidificación puede lograrse usando un microfluidizador comercial tal como el número de modelo 110Y disponible en Microfluidics, Newton, Mass; el modelo 30CD de Gaulin (Gaulin, Inc., Everett,
20 Mass.); y Rainnie Minilab tipo 8.30H (Miro Atomizer Food and Dairy Inc., Hudson, Wis.).

El tamaño de la gota puede determinarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, difracción de rayos láser, usando instrumentos de medición disponibles comercialmente. El tamaño
25 puede variar dependiendo del tipo de tensioactivo usado, la relación entre

tensioactivo y aceite, la presión a la que se trabaje, la temperatura y similares. Se puede determinar una combinación deseada de estos parámetros para obtener emulsiones con un tamaño de las gotas deseado. Las gotas de aceite de las emulsiones de la presente invención son inferiores a 1 μm de diámetro.

- 5 Preferiblemente el tamaño medio de las gotas es inferior a 0,8 μm . Más preferiblemente, el tamaño medio de las gotas es inferior a 0,5 μm . Incluso más preferiblemente, el tamaño medio de las gotas está entre 0,1 μm y 0,3 μm .

En una realización preferida de la presente invención, la solución oleaginosa de lecitina DRAKEOL®, que contiene lecitina al 25% en aceite de parafina fluido, se combina y mezcla con los tensioactivos TWEEN® 80 y SPAN® 80 y solución salina para formar una mezcla que contiene aceite de parafina fluido al 40%, TWEEN® 80 al 0,18% y SPAN® 80 al 0,08%. La mezcla se emulsiona después con un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm para formar un producto emulsionado que se
10 denomina también "formulación de AMPHIGEN®" o "solución de AMPHIGEN®". Subsiguientemente, el/los antígeno(s) deseado(s) se combinan con la solución de AMPHIGEN® y cualesquiera otros componentes adecuados (por ejemplo moléculas inmunoestimuladoras) con ayuda de un emulsionador, por ejemplo, homogenizador Ross, para formar una emulsión de agua en aceite
15 que contiene el/los antígeno(s). Tal emulsión se hace pasar una vez a través de un Microfluidizador que trabaja a 1000 ± 500 psi ($6895 \pm 3447,5$ pKa) . La emulsión de aceite en agua tiene gotas de un tamaño inferior a 1 μm , con un tamaño medio de las gotas de aproximadamente 0,25 μm .

En otra realización preferida, antes de combinar una emulsión de aceite
25 en agua (por ejemplo una formulación de AMPHIGEN®) con un(os) antígeno(s)

deseado(s), el/los antígeno(s) se combina(n) con un glucósido de saponina, por ejemplo Quil A, formando una mezcla. Esta mezcla de antígeno(s) y saponina se somete a homogenización, por ejemplo, en un recipiente de homogenización. Después se añade un esterol, por ejemplo, colesterol, a la
5 mezcla homogenizada de antígeno(s) y saponina. Después, la mezcla que contiene el/los antígeno(s), la saponina y el esterol se vuelve a someter a homogenización. Después, la mezcla de antígeno(s), saponina y esterol homogenizada se combina con una emulsión de aceite en agua (por ejemplo una formulación de AMPHIGEN®) con ayuda de un homogenizador, por
10 ejemplo. Después, la emulsión de aceite en agua que contiene el/los antígeno(s), la saponina y el esterol se somete a homogenización a presión elevada, tal como microfluidización.

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

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

Los procedimientos para absorber o atrapar antígenos en vehículos particulados son notorios en la técnica. Véase por ejemplo Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications (Justin Hanes, Masatoshi Chiba y Robert Langer. Polymer microspheres for vaccine delivery. En: Vaccine design.
25 The subunit and adjuvant approach. Editores Michael F. Powell y Mark J.

Newman, 1995 Plenum Press, Nueva York y Londres). Los vehículos particulados pueden presentar copias múltiples de un antígeno seleccionado al sistema inmunitario en un sujeto animal y promover la captura y retención de antígenos en los nódulos linfáticos locales. Las partículas pueden ser fagocitadas por macrófagos y pueden potenciar la presentación de los antígenos a través de la liberación de citoquinas. También se han descrito en la técnica vehículos particulados e incluyen por ejemplo los que se derivan de polímeros de polimetacrilato de metilo, así como los que se derivan de poli(láctidas) y poli(láctida-co-glucólidas), que se conocen como PLG. Los polímeros de polimetilmetacrilato no son biodegradables mientras que las partículas de PLG pueden ser biodegradables por hidrólisis aleatoria no enzimática de enlaces éster hacia ácidos láctico y glucólico que se excretan por rutas metabólicas normales.

También se han usado microesferas biodegradables para lograr la liberación controlada de vacunas. Por ejemplo puede lograrse una liberación continuada de antígeno durante un periodo prolongado. Dependiendo del peso molecular del polímero y de la relación entre ácido láctico y glucólico en el polímero, un polímero de PLGA puede tener una velocidad de hidrólisis desde unos pocos días o semanas hasta varios meses o un año. Una liberación lenta y controlada puede provocar la formación de niveles elevados de anticuerpos similares a los que se observan tras inyecciones múltiples. De forma alternativa, puede lograrse una liberación pulsátil de antígenos de las vacunas seleccionando polímeros con diferentes velocidades de hidrólisis. La velocidad de hidrólisis de un polímero típicamente depende del peso molecular del polímero y la relación entre ácido láctico y ácido glucólico en el polímero. Las

micropartículas que están formadas por dos o más polímeros diferentes con velocidades variables de liberación de antígenos proporcionan liberaciones pulsátiles de antígenos e imitan las pautas de vacunación de dosis múltiples.

De acuerdo con la presente invención, un antígeno, incluyendo
5 cualquiera de los que se describen anteriormente, puede absorberse sobre un vehículo polimérico particulado, preferiblemente un polímero de PLG, usando cualquier procedimiento conocido en la técnica (tal como el que se ejemplifica en el Ejemplo 17) para formar una preparación de antígeno microencapsulado. La preparación de antígeno microencapsulado se mezcla después y se
10 dispersa en una emulsión submicrométrica de aceite en agua, emulsión que ha sido descrita anteriormente, para formar la composición de vacuna.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una composición de vacuna que contiene un antígeno encapsulado en un polímero de PLG, en la que el antígeno microencapsulado está disperso de forma
15 extrínseca en una emulsión de aceite en agua microfluidificada que está compuesta por aceite de parafina fluido, lecitina, TWEEN80, SPAN80 y solución salina y tiene un tamaño medio de las gotas inferior a 1,0 μm .

Complejos formados por una saponina y un esteroi

En una realización, la presente invención proporciona composiciones
20 que contienen una saponina y un esteroi, en las que la saponina y el esteroi forman complejos en forma de micelas helicoidales. De acuerdo con la presente invención, estos complejos tienen actividades inmunoestimuladoras.

Por "inmunoestimulador" se quiere decir que los complejos pueden potenciar la respuesta inmunitaria inducida por un componente antígeno o que
25 los complejos pueden inducir una respuesta inmunitaria independiente de un

767

107

componente antígeno aparte.

De acuerdo con la presente invención, una saponina preferida para usar en una composición de la presente invención es Quil A.

5 Esteroles preferidos para usar en las composiciones de adyuvantes de la presente invención incluyen beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. Estos esteroides son notorios en la técnica, por ejemplo, el colesterol se describe en Merck Index, 11ª Edición, página 341, como un esteroide natural que se encuentra en la grasa animal. Más preferiblemente el esteroide es colesterol.

10 La relación entre la saponina y el esteroide en la composición es típicamente del orden de 1:100 a 5:1 en peso. Preferiblemente, la relación es 1:1.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones de vacunas que contienen una saponina, un esteroide y un antígeno, en las que la saponina y esteroide forman complejos en forma de micelas helicoidales y en las que el antígeno se mezcla pero no se incorpora a las micelas helicoidales.

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

EJEMPLO 1

Preparación de una formulación de AMPHIGEN®

Se preparó una formulación de AMPHIGEN® por un procedimiento en dos etapas. En la primera etapa se mezclaron 80 litros de solución en aceite de 25 lecitina Drakeol, 116 litros de solución salina de Toxoide de ténanos, 1,2 litros

de SPAN 80, y 2,8 litros de Tween 80 y se emulsionaron usando un emulsionador Ross. La solución resultante en aceite de lecitina Drakeol contenía lecitina de soja al 25% y aceite de parafina al 75%. El producto emulsionado se hizo recircular por el emulsionador Ross durante un mínimo de 5 volúmenes o un mínimo de 10 minutos. El producto emulsionado se almacenó a 2-7°C durante un máximo de 24 horas para procesamiento adicional. La emulsión del tanque del emulsionador Ross se transfirió a un homogenizador Gaulin y se homogenizó durante 20 minutos a una presión de 4500 psi (3.102,75 kPa). La solución en aceite de lecitina Drakeol al 40% (en lo sucesivo "formulación de AMPHIGEN®" o "solución de AMPHIGEN®") se dispensó después en envases de carboxi polipropileno estériles. La distribución se realizó dentro de una campana de distribución de clase 100 localizada en un ambiente controlado de clase 10.000. Los envases se almacenaron a 2-7°C. Esta formulación de AMPHIGEN® se usó en los experimentos que se describen a continuación a no ser que se indique lo contrario.

EJEMPLO 2

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

El aparato usado para este procedimiento de homogenización se muestra en la Figura 1. Usando técnica aséptica o válvulas cruzadas de vapor, se unió un frasco que contenía un antígeno de BVD Tipo I (una preparación vírica de BVD Tipo I inactivado) al puerto de la parte inferior del recipiente de mezclado. Después de completar la transferencia del volumen requerido del antígeno de BVD Tipo I, se sustituyó el frasco de BVD Tipo I por el envase que contenía una preparación vírica de BVD Tipo II (una preparación vírica de BVD

Tipo II inactivado). Después de completar la transferencia de la cantidad requerida de un antígeno de BVD Tipo II, se unió el homogenizador Ross al recipiente portátil y se inició la recirculación a las máximas RPM (3300 rpm). La agitación del recipiente se mantuvo a velocidad media.

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

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

EJEMPLO 3

Mezclado secundario por microfluidización

La Figura 2 ilustra el procedimiento usado para la mezcla secundaria
25 mediante microfluidización. El microfluidizador se esterilizó al vapor. Primero se

instaló la cámara del módulo de procesamiento auxiliar en la unidad y se instaló la cámara del blanco en la segunda posición de la cámara. Se conectó el recipiente que contenía la vacuna de BVD con todos los adyuvantes preparada tal como se describe en el Ejemplo 2 al microfluidizador uniendo una línea de transferencia desde la válvula de drenado del recipiente de suministro a la admisión del microfluidizador. Se conectó gas nitrógeno a la admisión del filtro de aire del recipiente de suministro y se ajustó la presión de recipiente a 20 +/- 5 psi (137,9 +/- 34,475 kPa). La válvula de drenaje del recipiente colector se conectó a la línea de transferencia de la salida del microfluidizador. Después de realizar todas las conexiones necesarias, se abrieron las válvulas y se inició la microfluidización con una presión de apertura de 10.000 +/- 500 psi (6895 +/- 3447,5 kPa). El contenido completo de la vacuna se pasó a través del microfluidizador una vez y se recogió en la cámara post-microfluidización. Esta preparación se dividió en dosis alícuotas de 2 ml y representa la vacuna de BVD con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidificada.

EJEMPLO 4

Preparación de una composición de vacuna mediante mezclado en banco

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

EJEMPLO 5

Comparación de la distribución de tamaño de las gotas entre las preparaciones de las vacunas con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidificada y microfluidificada

5 La vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidificada preparada tal como se describe en el Ejemplo 2, la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidificada preparada tal como se describe en el Ejemplo 3 y la preparación preparada por mezcla en banco tal como se describe en el Ejemplo 4 se usaron para comparar el tamaño de las gotas de
10 las preparaciones de las vacunas. Se añadieron 2 ml de la muestra de cada una de las preparaciones a un difractor láser Malvern 2000 y se determinó la distribución del tamaño de las gotas. Como se muestra en la Figura 3, los resultados indican que la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidificada tenía el volumen máximo de partícula alrededor
15 de 0,1 micrómetros mientras que la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidificada tenía el volumen máximo de distribución de partículas alrededor de 1 micrómetro.

EJEMPLO 6

Reducción de la separación de las fases de las vacunas.

20 Se compararon tres preparaciones de las vacunas diferentes: la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® no microfluidificada preparada tal como se describe en el Ejemplo 2, la vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidificada preparada tal como se describe en el Ejemplo 3 y la vacuna preparada por mezcla en banco tal como se describe en el Ejemplo
25 4, para determinar sus propiedades de separación de fases después de

almacenamiento prolongado. Todas estas preparaciones se dejaron reposar a 4°C durante aproximadamente un mes y la separación de fases se controló considerando la aparición de una capa cremosa en la parte superior de las preparaciones de las vacunas. Tal como se muestra en la Figura 4, no se produjo separación de fases en la preparación con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidificada cuando se comparó con las otras dos preparaciones.

EJEMPLO 7

Preparación de vacuna para ganado vacuno microfluidificada y no microfluidificada contra el virus de la diarrea vírica bovina

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

La composición final de las preparaciones control y microfluidificada era la siguiente: BVD tipo I con una valoración en ELISA tras la inactivación de 2535 UR/dosis para gp53, BVD Tipo II con una valoración en ELISA tras la inactivación de 3290 UR/dosis para gp53, Quil-A con una concentración de 1,25 mg/dosis, colesterol con una concentración de 1,25 mg/dosis, la formulación de AMPHIGEN® con una concentración final de 2,5% y timerosol

con una concentración final de 0,009%. La dosis de la vacuna era de 5 ml.

EJEMPLO 8

Estabilidad a largo plazo de antígenos víricos de BVD incorporados de forma intrínseca a la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidificada

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

Los días 0 y 21 se vacunaron vacas de tres meses de edad por vía subcutánea con una formulación de vacuna de 2 ml. El suero de los animales vacunados se extrajo el día 35 y se midió la respuesta serológica a la vacuna valorando los anticuerpos mediante un ELISA de BVDV-E2. Tal como se muestra en la Figura 5, la preparación de vacuna microfluidificada mostró una valoración de anticuerpos más elevada en todos los tiempos analizados (0, 6, 12 y 24 meses), lo que sugiere que la estabilidad de la preparación de antígeno

no se pierde durante la incorporación intrínseca del antígeno durante el procedimiento de microfluidificación. Además, se encontró también de forma sorprendente que la preparación de vacuna microfluidificada indujo una respuesta inmunitaria potenciada en todos los tiempos.

5

EJEMPLO 9

Reducción del aumento de temperatura rectal inducida por la vacuna tras la microfluidización

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

Como se muestra en la Figura 6, los resultados indican que se produjo un aumento brusco en la temperatura rectal aproximadamente en las 24 horas posteriores a la vacunación en los animales vacunados con una dosis única o doble de la formulación de vacuna no microfluidificada. Sin embargo, en los animales vacunados con formas microfluidificadas de la vacuna, el aumento de la temperatura rectal tras la vacunación fue mínimo y significativamente menor que en los animales vacunados con la formulación no microfluidificada (Figura 6).

EJEMPLO 10

El volumen de reacción en la zona de la inyección se resolvió más rápido

cuando se vacunó con formulaciones de las vacunas microfluidificadas

Se usaron las preparaciones de las vacunas microfluidificadas y no microfluidificadas preparadas tal como se describe en el Ejemplo 7 para vacunar el ganado vacuno el día cero. Los animales incluidos en este estudio eran ganado vacuno híbrido de carne. Había tres animales en cada uno de los grupos de tratamiento con placebo (T01 y T02). Había seis animales en cada uno de los grupos T03 a T06. La dosis de vacuna era de 2 ml y los grupos se vacunaron con una o dos dosis de la vacuna el día cero. En día 0, se administró el artículo de experimentación en el lado derecho del cuello. Los animales que recibieron la dosis doble (4 ml) del artículo de experimentación (T02, T03 y T06) recibieron la dosis doble completa en forma de inyección única en un lado. La observación de las zonas de inyección, incluyendo la estimación de la zona de reacción en la zona de la inyección se realizó en el lado derecho del cuello desde el Día 0 hasta el Día 4 inclusive, y los Días 6, 9 y 14. El Día 0 se observaron las zonas de inyección antes de la administración de los artículos de experimentación. Los grupos vacunados con una o dos dosis del placebo no mostraron aumento significativo del volumen de reacción en la zona de la inyección y por lo tanto esos datos no se muestran en la Figura 7. En el caso de la formulación de vacuna no microfluidificada, se produjo un aumento proporcional del volumen de reacción en la zona de la inyección entre la vacunación con una dosis y con dos dosis. Por otra parte, en el caso de la formulación de vacuna microfluidificada, aunque la dosis única indujo un volumen de reacción mayor en la zona de la inyección, la inyección con la segunda dosis no provocó un aumento adicional. Sin embargo, en el caso de los animales a los que se les inyectó la formulación de vacuna microfluidificada,

el volumen de reacción en la zona de la inyección se resolvió con una velocidad mayor comparada con la de los animales a los que se les inyectó una formulación de vacuna no microfluidificada. Estos resultados se muestran en la Figura 7.

5

EJEMPLO 11

**Preparación de una vacuna con base de formulación de AMPHIGEN®
microfluidificada**

**Preparaciones con antígenos víricos BVD y Leptospira incorporados de
forma intrínseca y moléculas inmunoestimuladoras tales como Quil A y**

10

DDA

Se formuló *Leptospira hardjo-bovis* de la cepa CSL inactivado en formalina con el adyuvante apropiado con recuentos directos de aproximadamente $1,4 \times 10^9$ organismos/dosis de 5 ml. La cepa de *Leptospira Pomona T262* inactivada en formalina se formuló a aproximadamente 2400 unidades nefalómeras/dosis de 5 ml. Las unidades nefalómeras se calcularon basándose en la medición nefalométrica de fluido de fermentación procesado previamente. El virus BVD Tipo 1 se formuló con una valoración en Elisa E2 de aproximadamente 3000 unidades relativas/dosis de 5 ml. El virus BVD Tipo 2 se formuló con una valoración en ELISA E2 de aproximadamente 3500 unidades relativas/dosis de 5 ml. La unidad relativa se calculó basándose en la valoración en ELISA E2 de fluido granel tras la inactivación antes del ensamblado. Se usaron tanto Quil-A como colesterol con una concentración de 0,5 mg por dosis. Se usaron timerosol y la formulación de AMPHIGEN® con concentraciones finales de 0,009% y 2,5% respectivamente. Se usó hidróxido de aluminio (Rehydrigel LV) con una concentración final de 2,0%. Cuando se

25

usó DDA como inmunomodulador, DDA se incluyó en la formulación de AMPHIGEN®. La formulación de AMPHIGEN® (es decir, la solución madre de Drakeol-lecitina al 40%) contenía 1,6 mg/ml de DDA y, cuando se diluía de forma apropiada, la preparación de vacuna final contenía 2,5% de formulación de AMPHIGEN® y 0,1 mg/ml de DDA.

En la preparación de diferentes formulaciones de las vacunas se añadieron fracciones de BVD, Leptos, Quil-A, colesterol, timerosol, la formulación de AMPHIGEN® y solución salina como diluyente a un homogenizador Silverson y se mezclaron durante 15 minutos a 10.000 ± 500 rpm. Después se microfluidizaron los componentes con un tamiz de 200 micrómetros a 10.000 psi (68.950 kPa).

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

EJEMPLO 12

Preparación de vacuna de virus BVD para estudios de exposición

La preparación de vacuna que se usó en este experimento contenía antígenos del virus BVD Tipo 1 y el virus BVD Tipo 2. Se usó antígeno BVD1-5960 con una valoración por ELISA postinactivación de 2535 UR/dosis para gp53. Se usó el antígeno BVD2-890 con una valoración por ELISA postinactivación de 3290 UR/dosis para gp53. Se usaron Quil-A y colesterol a una concentración de 0,5 mg/ml. Se usaron timersol y la formulación de AMPHIGEN® con una concentración final de 0,009% y 2,5% respectivamente. Cuando se usó DDA como inmunomodulador, se incluyó DDA en la formulación

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

Todos los componentes se añadieron a un homogenizador Silverson y
se mezclaron durante 15 minutos a 10.500 rpm y después se microfluidizaron
10 pasándolos por una cámara de 200 micrómetros con 10.000 psi (68.950 kPa).
Cuando la formulación de la vacuna contenía hidróxido de aluminio, la
microfluidificación se llevó a cabo sin hidróxido de aluminio. Cuando se
completó la microfluidificación, se añadió hidróxido de aluminio y se mezcló con
una barra de agitación hasta la mañana siguiente a 4°C.

15 **Ejemplo 13**

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

Tabla 1 – Grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	Composición del adyuvante
T01	Solución salina
T02	Quil-A, colesterol y la formulación de AMPHIGEN® (QAC)
T03	Quil-A, colesterol, la formulación de AMPHIGEN® y AIOH (QAC-AIOH)
T04	DDA, colesterol y la formulación de AMPHIGEN® (DDA)

T05	DDA, colesterol, la formulación de AMPHIGEN® y AIOH (DDA-AIOH)
-----	--

La Tabla 1 muestra la composición de las formulaciones de adyuvante de las preparaciones de las vacunas que se experimentan en este estudio. Las preparaciones de las vacunas se prepararon tal como se describe en el

5 Ejemplo 11. Había seis animales en cada grupo. En este estudio se usaron novillos híbridos de carne de aproximadamente siete meses de edad. La vacunación se realizó el Día 0 y el Día 21 por vía subcutánea con un volumen de vacuna de 5 ml. La exposición se realizó con L. hardjo-bovis cepa 203 del NADC (Nacional Agricultural Disease Center). La exposición se realizó durante

10 los días 57-59 con un inóculo de 1 ml. La exposición se administró por vía de la conjuntiva ocular y por vía vaginal. El material de exposición contenía $5,0 \times 10^6$ leptóspiros/ml. La orina se recogió semanalmente para realizar un cultivo de leptospira, FA y PCR. Los riñones se realizó extrajeran durante los Días 112 y 113.

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

Tratamiento	Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez para Leptospira en orina y riñón por cultivo	Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez para Leptospira en orina y riñón por FA	Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez para Leptospira en orina y riñón por PCR	Porcentaje de terneros con resultado positivo alguna vez para Leptospira en orina y riñón en todos los ensayos
Solución salina	100	83,3	83,3	100

770

120

QAC	0	0	0	0
QAC/AIOH	0	50,0	0	50,0
DDA	0	0	0	0
DDA/AIOH	0	33,3	16,7	50,0

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

Los resultados que se muestran en la Tabla 2 indican que la duración de la presencia en la orina en todos los grupos vacunados fue significativamente más corta basándose en los tres ensayos. En lo que se refiere a la colonización urinaria y renal, las eficacias de las formulaciones que contenían QAC y DDA sin AIOH fueron comparables. El AIOH no mejoró e incluso redujo las eficacias de las vacunas que contenían QAC o DDA en este estudio de exposición.

**Tabla 3 – Intervalo de valoración de la aglutinación microscópica
el día de valoración con media geométrica máxima antes de la exposición
(Día 35)**

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

5 Se detectaron respuestas serológicas contra ambos antígenos de
Leptospira de la formulación de vacuna en los animales vacunados y la
respuesta máxima se observó el Día 35. No existió correlación entre la
respuesta serológica y la protección contra la exposición. La presencia de gel
de aluminio en la formulación de la vacuna redujo el nivel de protección aunque
10 la respuesta serológica fue potenciada por la presencia de gel de aluminio en la
vacuna.

EJEMPLO 14

**Provocación de respuesta inmunitaria al antígeno vírico de BVD y
Protección contra la exposición al virus BVD Tipo 2 tras
15 la inmunización con una preparación de vacuna microfluidificada que
 contenía formulación de AMPHIGEN® y DDA.**

En este experimento se usaron terneras seronegativas de cuatro a siete
meses de edad. Había seis grupos diferentes y cada grupo tenía diez animales
(Tabla 4). El Día 0 y el Día 21 cada animal recibió una dosis subcutánea de 2

122

ml de la vacuna o placebo en el lateral del cuello aproximadamente a medio camino entre la escápula y la cabeza.

Tabla 4 – Grupos de tratamiento

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

5 Se administró una dosis de 5 ml de la preparación de exposición del virus (aproximadamente 2,5 ml por fosa) por vía intranasal el día 44 del estudio. En este estudio se usó virus BVD Tipo 2, cepa aislada nº 24515 (Cepa Ellis), lote nº 46325-70 no citopático como cepa de exposición. Se valoraron las muestras retenidas de material de exposición (dos repeticiones por valoración)

10 en el momento del inicio de la exposición e inmediatamente después de completarlo. La valoración media de virus vivos por dosis de 5 ml era de 5,3 log₁₀ FAID₅₀/5 ml antes de la exposición y 5,4 log₁₀ IDAD₅₀/5 ml tras la exposición (FAID es equivalente a TCID₅₀).

Se controló a los animales todos los días desde el Día 3 al día 58. Se

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

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

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

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

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

Tal como se muestra en las Tablas 5 y 6, los grupos que se vacunaban con vacunas que contenían antígenos víricos de BVD junto con la formulación de AMPHIGEN®, Quil A o DDA y microfluidificadas, se seroconvirtieron con valoraciones de neutralización de virus en suero significativas para los virus BVD Tipo 1 y BVD Tipo 2. En esos grupos se produjo también una reducción significativa del porcentaje de animales que mostraban viremia tras la

exposición, mientras que en el grupo de control el 100% de los animales mostraban viremia (Tabla 7). Además, en los grupos vacunados la frecuencia de la enfermedad se redujo también de forma significativa (Tabla 8). De forma similar, el porcentaje de animales que mostraban leucopenia se redujo también en los grupos vacunados y la reducción de la leucopenia fue más significativa en el grupo que contenía DDA que en el grupo que contenía Quil A (Tabla 9). En el grupo de control se produjo un descenso significativo de la subida de peso comparada con los grupos vacunados. (Tabla 10).

Serología

10 Antes de la vacunación el Día 0, todos los animales del estudio eran seronegativos ($SVN < 1:2$) para anticuerpos contra virus de BVD Tipos 1 y 2 (no se muestran los datos). Catorce días tras la segunda vacunación (Día 35) todos los animales a los que se administró placebo (T01) seguían siendo seronegativos para anticuerpos contra el virus BVD Tipos 1 y 2; y todos los
15 animales vacunados con los ITA (Antígeno en experimentación de investigación) (T02, T03, T04, T05 y T06) eran seropositivos ($SVN \geq 1:8$) para anticuerpos contra el virus BVD, Tipos 1 y 2. Un animal al que se le administró la vacuna con adyuvante de la formulación de AMPHIGEN® a 2 mg/dosis de DDA tenía una valoración de SVN de 3 para anticuerpos contra el virus BVD
20 Tipo 2 el Día 35 (Tabla 11 y 12).

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

eran seropositivos para anticuerpos contra los virus BVD Tipos 1 y 2.

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

Tratamiento		Media geométrica de las valoraciones de SVN para el virus BVD Tipo 1 el Día del estudio				
		0	21	35	44	58
T01	Solución salina	<2	<2	<2	<2	23,9
T02	Amphigen, Quil A	<2	39,1	19824,5	14018,2	27554,5
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	<2	51,8	32204,8	22381,1	23170,4
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA"	<2	27,0	14512,4	8932,0	21996,2
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	<2	26,7	11585,2	8194,6	20882,0
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	<2	23,5	8778,7	6769,3	16961,1

126

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

Tratamiento		Media geométrica de las valoraciones de SVN para el virus BVD Tipo 1 el Día del estudio				
		0	21	35	44	58
T01	Solución salina	<2	<2	<2	<2	522,0
T02	Amphigen, Quil A	<2	8,9	2272,4	2048,2	24833,6
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	<2	9,5	3585,7	2702,2	20881,8
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	<2	4,1	1280,7	989,1	18496,2
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	<2	6,4	1398,8	1453,9	30047,8
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	<2	7,7	1673,2	1428,9	16384,0

Tabla 7. Aislamiento de virus BVD tras la exposición

Tratamiento		Aislamiento de virus BVD		
		Días del estudio	Frecuencia (%) de animales con viremia	Media de los MC de los días de viremia
T01	Solución salina	47 a 58	10/10 (100,0)	10,4
T02	Amphigen, Quil A	50 a 53	1/10 (10,0)	0,4
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA,	---	0/10 (0,0)	0,0

	AI			
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	48, 50 a 52, 57	3/10 (30,0)	0,5
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	49 a 51	2/10 (20,0)	0,4
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	48 a 52	2/10 (20,0)	0,5

Tabla 8. Signos clínicos de enfermedad por BVD tras la exposición

Tratamiento		Frecuencia (%) con enfermedad	Frecuencia (%) observaciones con signos clínicos de enfermedad por BVD				Total Obs.
			0	1	2	3	
T01	Solución salina.	9/10 (90,0)	75 (48)	63 (37,5)	29 (17,3)	1 (0,6)	168
T02	Amphigen, Quil A	1/10 (10,0)	105 (61,8)	63 (37,1)	2 (1,2)	0 (0)	170
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, AI	2/10 (20,0)	99 (58,2)	67 (39,4)	4 (2,4)	0 (0)	170
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	0/10 (0,0)	118 (69,4)	52 (30,6)	0 (0)	0 (0)	170
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	0/10 (0,0)	101 (59,4)	69 (40,6)	0 (0)	0 (0)	170
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	0/10 (0,0)	104 (61,2)	66 (38,8)	0 (0)	0 (0)	170

Tabla 9. Leucopenia tras la exposición

Tratamiento		Leucopenia	
		Frecuencia (%) de animales leucémicos	Meda de los MC de los días de leucemia
T01	Solución salina	10/10 (100,0)	7,8
T02	Amphigen, Quil A	6/10 (60,0)	1,2
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	2/10 (20,0)	0,2
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	4/10 (40,0)	0,8
T05	Amphigen, 1,0 mg de DDA	3/10 (30,0)	0,9
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	2/10 (30,0)	0,5

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

Tratamiento		Peso corporal medio (lb.) el Día del estudio				Subida de peso (lb)
		-1	43	50	58	
T01	Solución salina	378,0	484,9	491,0	476,9	98,9
T02	Amphigen, Quil A	428,0	526,5	546,7	579,0	151,0
T03	Amphigen, 0,5 mg de DDA, Al	410,5	514,4	534,2	579,0	168,5
T04	Amphigen, 0,5 mg de DDA	373,7	472,3	492,6	538,1	164,4
T05	Amphigen,	358,9	451,4	478,9	507,1	148,2

	1,0 mg de DDA					
T06	Amphigen, 2,0 mg de DDA	408,	513,3	533,9	580,3	151,8

Aislamiento de virus

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

Enfermedad Clínica

Se consideraba que los animales con puntuaciones de señales clínicas de 2 ó 3 demostraban signos de enfermedad por BVD. Tal como se muestra en 15 la Tabla 14, la frecuencia de los animales con signos clínicos de enfermedad por virus BVD era nueve de diez en el control (T01) y uno, dos, cero y cero de diez en cada uno de los grupos a los que se les administraron los ITA (T02, T03, T04, T05 y T06 respectivamente). La diferencia entre el control y los 20 grupos a los que se les administraron los ITA era estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Leucopenia

Tal como se muestra en la Tabla 15, durante el periodo de exposición

(Días 44 a 58), los diez animales del control (T01) sufrían leucemia (una reducción del 40% en la leucocitometría comparada con la inicial antes de la exposición, Días 42-44). La frecuencia de animales con leucemia era seis, dos, cuatro, tres y dos de los diez animales de cada uno de los grupos a los que se les administraron los ITA (T02, T03, T04, T05 y T06 respectivamente). La diferencia entre el control y los grupos a los que se administró la vacuna que tenía la formulación de AMPHIGEN® como adyuvante a 0,5 mg/dosis e hidróxido de aluminio (T03) era estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$). La media de los mínimos cuadrados del número de días de leucemia era significativamente mayor (7,8 días) para el control comparado con los grupos a los que se les administraron los ITA (0,2 a 1,2 días).

EJEMPLO 15

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

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

enfermedad en los terneros vacunados con la preparación de vacuna con base de formulación de AMPHIGEN® microfluidificada que contenía GPI-0100.

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

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

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

Tratamiento		Media geométrica de las valoraciones de SVN para el virus BVD Tipo 1 el Día del estudio				
		0	21	35	44	58
T01	Solución salina	<2	<2	<2	<2	14,7
T02	Amphigen, Qull A	<2	12,9	2312,0	1692,5	1663,4
T03	Amphigen, 2 mg de GPI- 0100, AIOH	<2	13,2	1663,5	1116,8	1562,3
T04	Amphigen, 2 mg de GPI- 0100	<2	20,5	2610,23	1978,2	2478,7
T05	Amphigen, 3 mg de GPI- 0100	<2	11,4	1752,8	1305,2	2435,4
T06	Amphigen, 5 mg de GPI- 0100	<2	12,0	3158,4	2120,2	1845,6

Tabla 13. Aislamiento de virus BVD tras la exposición

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

Tabla 14. Signos clínicos de enfermedad por BVD tras la exposición

Tratamiento		Frecuencia (%) con enfermedad	Frecuencia (%) observaciones con una puntuación de enfermedad clínica de			Total Obs.
			0	1	2	
T01	Solución salina	5/10 (50,0)	103 (60,6)	55 (32,4)	12 (7,1)	170
T02	Amphigen, Quil A	5/10 (50,0)	115 (67,6)	48 (28,2)	7 (4,1)	170
T03	Amphigen, 2 mg de GPI- 0100, AIOH	0/10 (0,0)	128 (75,3)	42 (24,7)	0 (0)	170
T04	Amphigen, 2 mg de GPI- 0100	0/10 (0,0)	124 (72,9)	46 (27,1)	0 (0)	170
T05	Amphigen, 3 mg de GPI- 0100	0/10 (0,0)	104 (61,2)	66 (38,8)	0 (0)	170
T06	Amphigen, 5 mg de GPI- 0100	0/10 (0,0)	128 (75,3)	42 (24,7)	0 (0)	170

(35)

Tabla 15. Leucopenia tras la exposición

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

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

10

EJEMPLO 16

Preparación de vacuna que contiene antígeno microencapsulado en emulsión microfluidificada de aceite en agua

Se añadieron tres gramos de Trehalose (Fluka) a agua para obtener una solución madre de 333 mg/ml de solución de Trehalose. Se añadió antígeno

PauA recombinante solubilizado en solución de SDS al 0,8% (SDS/rPauA) a la solución de Trehalose para obtener una concentración final de 494 µg de rPauA/ml. En la siguiente etapa, se disolvieron 10 gramos de ácido polilactidaglucólico (PLG-Resomer RE 503H, Boehringer Ingelheim) en 200 ml de cloruro de metileno (MeCl₂). La solución resultante de PLG/MeCl₂ se combinó con la solución de SDS-rPauA/trehalose preparada en la primera etapa. La solución combinada se sometió a microfluidización usando Microfluidizer (de Microfluidics Modelo M110EH) y la preparación microfluidificada se desecó por pulverización usando Temco Spray Dryer (Modelo SD-5). El material desecado por pulverización se recogió usando un tamiz de 500 micrómetros.

La concentración de rPauA en este material desecado por pulverización se cuantificó usando un análisis por transferencia Western. Se disolvió 1,04 mg de material desecado por pulverización en 50 µl de acetona y se centrifugó a 13,200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante. Las fracciones de sobrenadante y de sedimento se desecaron en una campana de seguridad biológica durante 2,5 horas. Se resuspendió el sedimento en 47,43 µl de solución de muestra (25 µl de tampón de muestra + 10 µl de agente reductor + 65 µl de agua). La fracción de sobrenadante desecado se resuspendió con 20 µl de solución de muestra. En el análisis Western se usó PauA purificado como patrón para cuantificar el contenido de rPauA del material desecado por pulverización.

Se preparó una solución madre de manitol al 20% disolviendo 100 gramos de manitol (Sigma) en 500 ml de agua para inyectables (WFI). La solución se calentó a 40°C con placa calefactora/agitador y se enfrió a 30°C. La

solución se esterilizó por filtración con un filtro estéril de 0,22 micrómetros (Millipore). Se preparó una solución de carboximetilcelulosa al 2,5% disolviendo 12,5 gramos de carboximetilcelulosa (Sigma) en 500 ml de WFI y se mezcló hasta la mañana siguiente a 4°C. La solución se esterilizó en autoclave a 5 121°C.

El polvo resultante de la desecación por pulverización se reconstituyó en una solución que contenía manitol al 5%, carboximetilcelulosa al 0,3% y timerosal 1:5000. La solución final se introdujo en viales en alícuotas de 3 ml y se liofilizó usando un Lyophilizer (USIFROID). El polvo liofilizado representa el 10 rPauA microencapsulado. El antígeno de subunidad proteica microencapsulado se resuspendió en 2 ml de emulsión de aceite en agua microfluidificada que contenía una formulación de AMPHIGEN® (tal como la emulsión microfluidificada que se describe en el Ejemplo 20) y se usa como vacuna.

EJEMPLO 17

15 **Preparación de una formulación de vacuna microfluidificada que contiene tanto antígeno bacteriano de células enteras como antígeno de proteína recombinante en emulsión de aceite en agua**

Se formularon dos preparaciones de las vacunas que contenían tanto proteína PauA recombinante de *Streptococcus uberis* como células bacterianas 20 de *Escherichia coli*, se añadieron de forma intrínseca a emulsiones de aceite en agua tal como se describe en los Ejemplos 2 y 3. El antígeno PauA recombinante estaba a una concentración de 100 µg por dosis y las células de *E. coli* daban un recuento final de 4×10^9 por dosis. Las composiciones de los adyuvantes en emulsión de las dos formulaciones de las vacunas se muestran 25 en la Tabla 16.

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

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

EJEMPLO 18

5 Respuesta inmunitaria a la vacuna microfluidificada que contiene la emulsión de aceite en agua con rPauA y agentes bacterianos de células enteras

En este experimento se usaron vacas lecheras maduras. Los animales estaban al final de su primera o segunda lactancia en el momento de la admisión. Se administraron por vía subcutánea 2 ml de cada formulación de vacuna tres veces, una en el momento de secado (D - 0), 28 días después (D = 28) y de nuevo 4 a 10 días después del parto (C + 4 – C+10). La primera y tercera dosis se administraron en el lado izquierdo del cuello y la segunda se administró en el lado derecho del cuello. Se extrajo sangre antes de cada

vacunación y aproximadamente 14 días y 32 días tras la tercera vacunación. Las valoraciones de anticuerpos contra E. coli y el antígeno rPauA se determinaron mediante ELISA. Como se muestra en la Figura 8, los resultados indican que la valoración de anticuerpos para rPauA era superior en el grupo
5 vacunado con la formulación de vacuna que contiene GPI-0100 como inmunoestimulante y era máxima el día 70 tras la vacunación inicial. La valoración de anticuerpos para el antígeno contra E. coli se muestra en la Figura 9. La valoración de anticuerpos contra antígeno de E. coli era comparable en ambas formulaciones de las vacunas, aunque la presencia de
10 GPI-0100 como Inmunoestimulante indujo una valoración de anticuerpos relativamente mayor comparada con la formulación con DDA como inmunoestimulante.

EJEMPLO 19

**Análisis de actividad viricida de las preparaciones de las vacunas con
15 base de formulación de AMPHIGEN® microfluidificada**

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

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

Los resultados que se muestran en la Tabla 17 indican que la
25 microfluidización de las preparaciones de las vacunas con base de formulación

de AMPHIGEN® no provoca una inactivación significativa de la preparación de la vacuna.

Tabla 16. Análisis de actividades viricidas de las vacunas microfluidificadas

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

5

A = colesterol añadido a 650 ml/minuto

B = colesterol añadido a 28 ml/minuto

C = colesterol añadido a 5 ml/minuto

M200 = microfluidificada con tamiz de 200 micrómetros

10

M75 = microfluidificada con tamiz de 75 micrómetros

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

Un valor por encima de 0,7 indica un efecto viricida.

EJEMPLO 20

Preparación de una formulación de AMPHIGEN® microfluidificada

Se preparó una formulación de AMPHIGEN® combinando solución de aceite de lecitina DRAKEOL (aceite de parafina fluido con lecitina al 25%) y
5 TWEEN 80 (con una concentración final de 0,18%) y Span 80 (con una concentración final de 0,08%) mezclando durante 8-22 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. La mezcla de aceite se añadió después a solución salina con ayuda de un emulsionador Ross® (Hauppauge, NY 11788) aproximadamente a 3400 rpm. Subsiguientemente la mezcla se pasó una vez por un microfluidizador con una
10 cámara de Interacción a 4500 ± 500 psi ($31.027,5$ kPa $\pm$ $3.447,5$ kPa). Las Figuras 10 A y 10 B muestran la estabilidad de la formulación de AMPHIGEN® microfluidificada. La distribución del tamaño de las partículas, medida por difracción de rayos láser, al inicio (Figura 10A) era casi idéntico a la distribución del tamaño de las partículas después de 22 meses de
15 almacenamiento a 4°C (Figura 10B).

EJEMPLO 21

Análisis por microscopía electrónica del complejo Inmunógeno de Quil A y colesterol

Para determinar la naturaleza del complejo Inmunógeno formado por
20 Quil A y colesterol, se preparó una mezcla de estos dos componentes o en presencia o en ausencia de un antígeno.

En un matraz que contenía 50 ml de tampón de HR-Hals, se añadió antígeno de BVD Tipo I mientras se agitaba la solución con una barra magnética. Después, se añadió una solución madre concentrada de Quil A (50
25 mg/ml) gota a gota mientras se agitaba la solución alcanzando una

concentración final de 50 µg/ml. La adición de Quil A se siguió con de la adición de una solución madre de colesterol en etanol (18 mg/ml) hasta una concentración final de 50 µg/ml.

En un segundo matraz, se añadieron Quil A y colesterol del mismo modo
5 al tampón de 50 ml sin antígeno de BVD Tipo I.

Para la microscopia de transmisión electrónica, se adsorbieron 10 µl de cada muestra sobre rejillas de cobre de 400 mesh con una plataforma de soporte de formvar y carbono (Electron Microscopy Sciences, Inc., Fort Washington, PA). Las muestras se tiñeron negativamente usando 10 µl de
10 ácido fosfotúngstico al 2% filtrado, a pH 5,2 como agente de contraste. Las muestras se examinaron usando un microscopio de transmisión electrónica JEOL 1230 (JEOL Inc., Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 80 kV. La obtención de imágenes digitales se realizó con una cámara Gatan BioScan 792. La microscopia en película se realizó en película 4489 EM y se imprimió
15 en papel Kodabrome II RC F3 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY.).

En la solución que sólo contenía colesterol y Quil A sin antígeno de BVD Tipo I, se detectaron micelas helicoidales junto con micelas de Quil A y cristales de colesterol (Figura 11). Las micelas helicoidales estaban entrecruzadas y tenían aspecto de malla. En la muestra que contenía el antígeno de BVD Tipo I,
20 se observó que las micelas helicoidales aleatoriamente rodeaban ciertas áreas densas (Figura 12). Las áreas densas representan el antígeno de BVD Tipo I y el complejo Inmunógeno helicoidal que se produce por la asociación de Quil A y colesterol se encuentra adsorbido sobre la superficie del antígeno de BVD Tipo I.

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

REIVINDICACIONES

5

1. Una vacuna que comprende un glucósido de saponina, un estero1 y un antígeno, en la que dicho glucósido de saponina y dicho estero1 se asocian entre si para formar complejos en forma de micelas helicoidales y en la que dicho antígeno está mezclado, pero no integrado, en dichas micelas
10 helicoidales.

2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que además comprende un vehículo veterinariamente aceptable.

15 3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que dicho vehículo veterinariamente aceptable es una emulsión de aceite en agua.

4. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho glucósido de saponina es un triterpenoide.

20

5. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en la que dicho triterpenoide es Quil A.

6. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho estero1
25 es colesterol.

7. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho antígeno comprende un agente vírico, un agente bacteriano o una combinación de los mismos.
- 5 8. La composición de vacuna de la reivindicación 7, en la que dicho antígeno comprende un antígeno de BVDV tipo 1 o tipo 2.

RESUMEN

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

Figura 1

Mezclado primario mediante homogenización por mezclado ultrarrápido de la vacuna Cattlemaster Plus

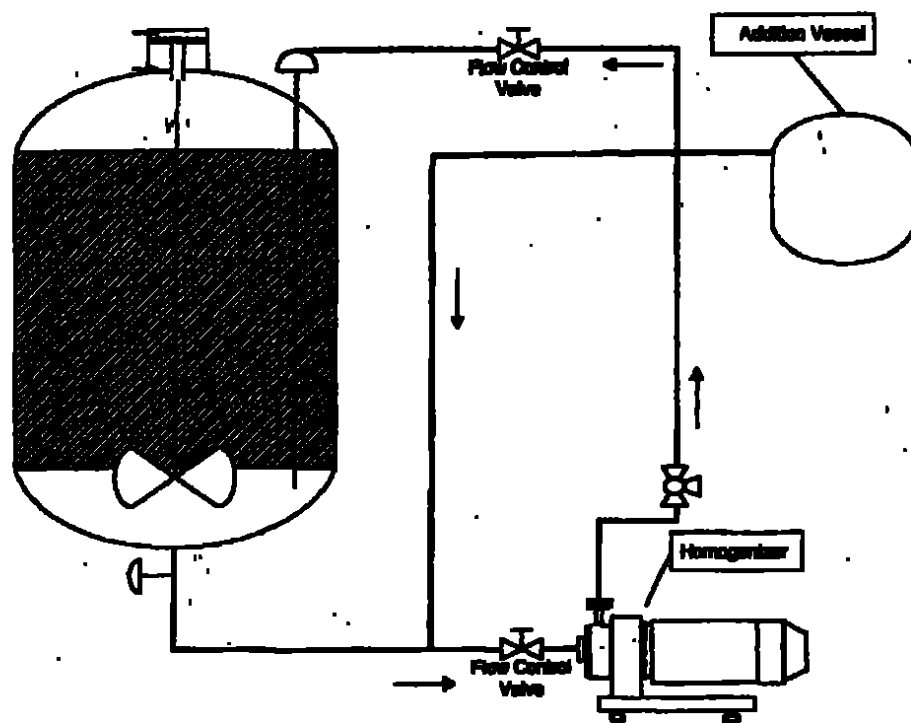
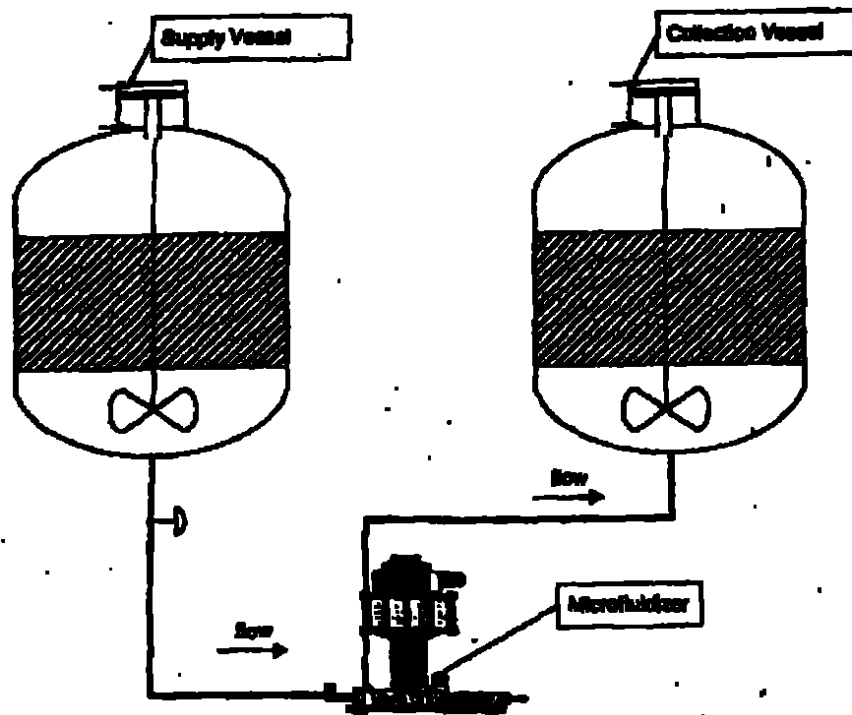


Figura 2
Mezclado secundario mediante microfluidización de la vacuna
Cattlemaster Plus

5



148

Figura 3

Distribución del tamaño de las partículas entre las mezclas

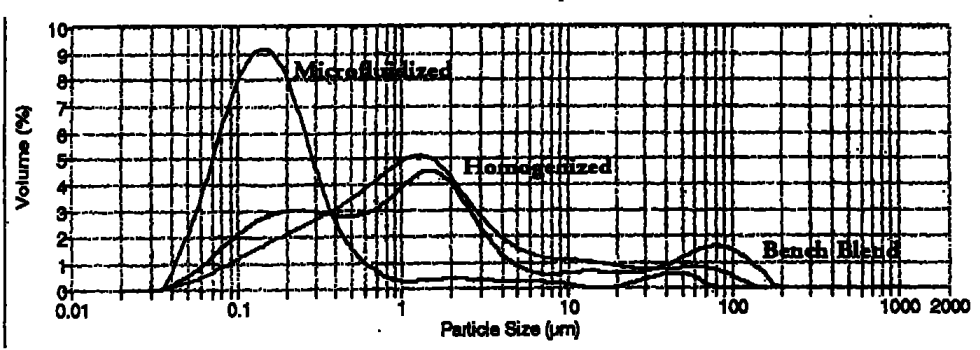


Figura 4
Tres modos de dispersión

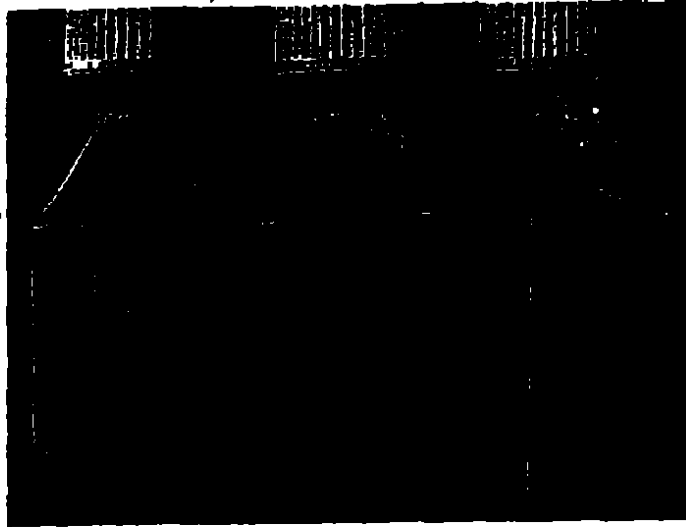
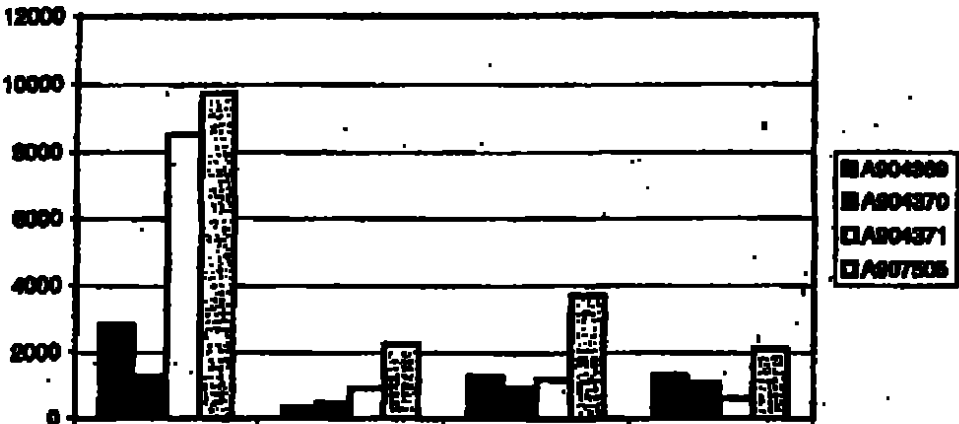


Figura 5
Media geométrica de serología contra BVD Tipo II



(5)

Figura 6
Media de los mínimos cuadrados de las temperaturas rectales del ganado
antes y tras la administración de los artículos de experimentación

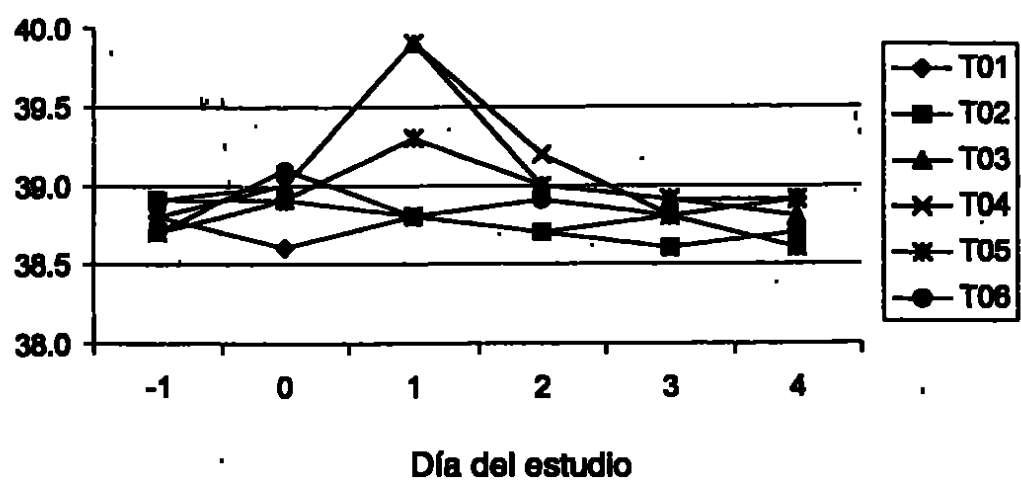


Figura 7

Media de los mínimos cuadrados de los volúmenes de las reacciones en las zonas de inyección observados en el ganado tras la administración de los artículos de experimentación

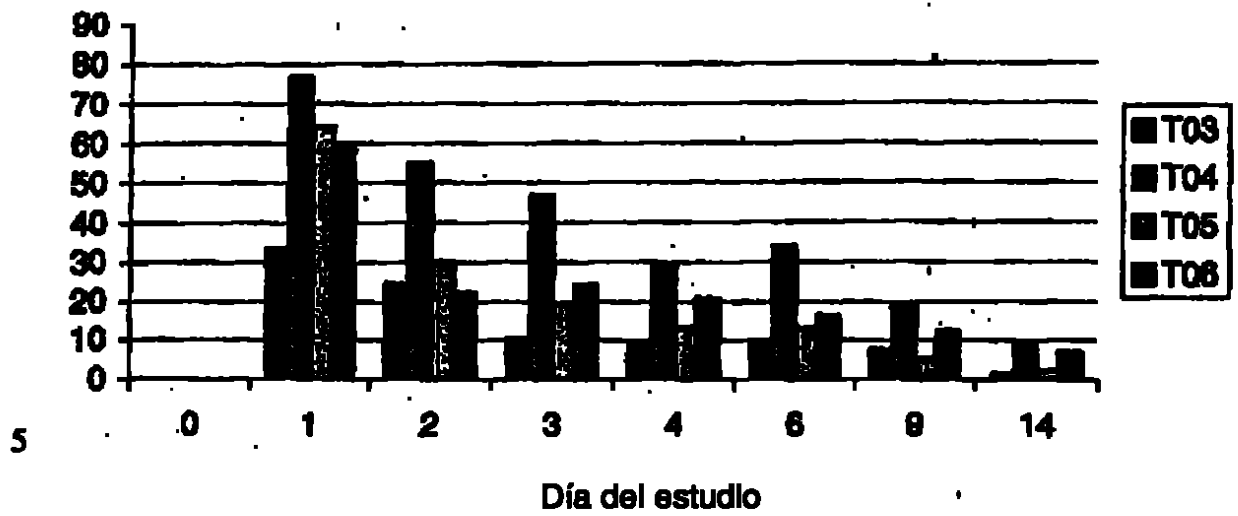


Figura 8

Media geométrica de valoraciones de IgG - rPauA

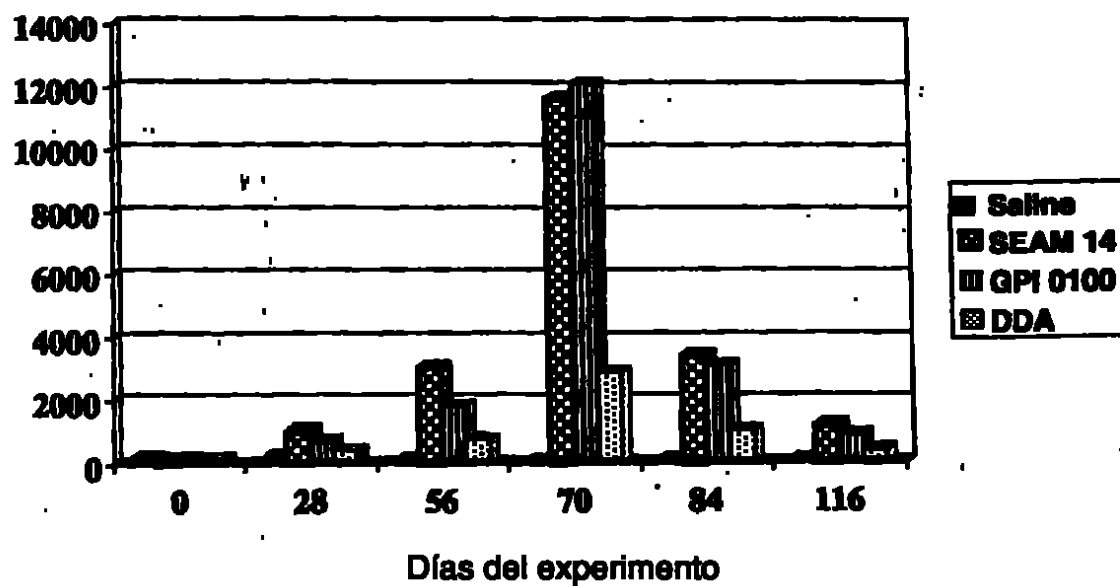
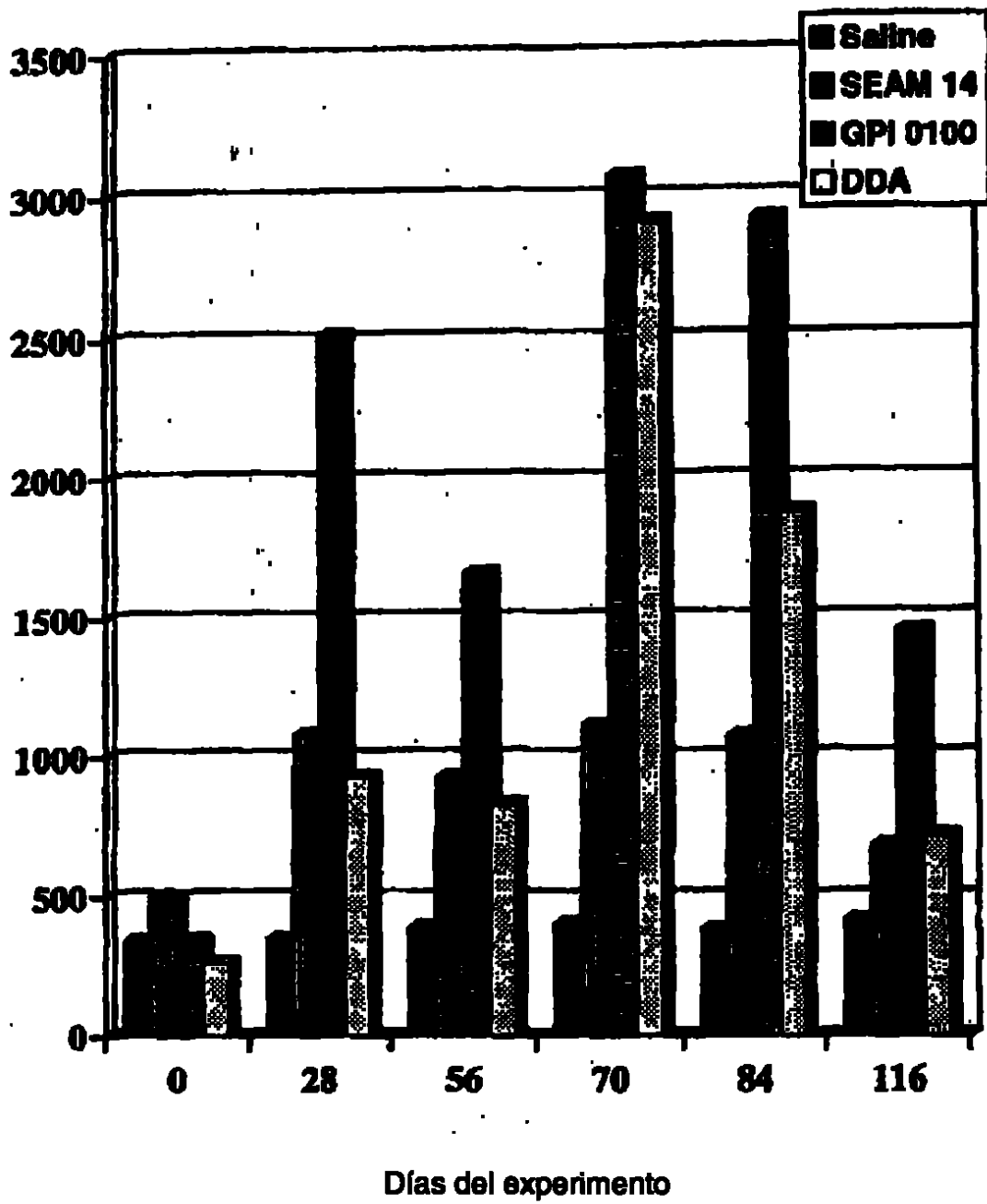


Figura 9

Media geométrica de valoraciones de IgG – J5



155

Figura 10A
Formulación de Amphigen microfluidificada

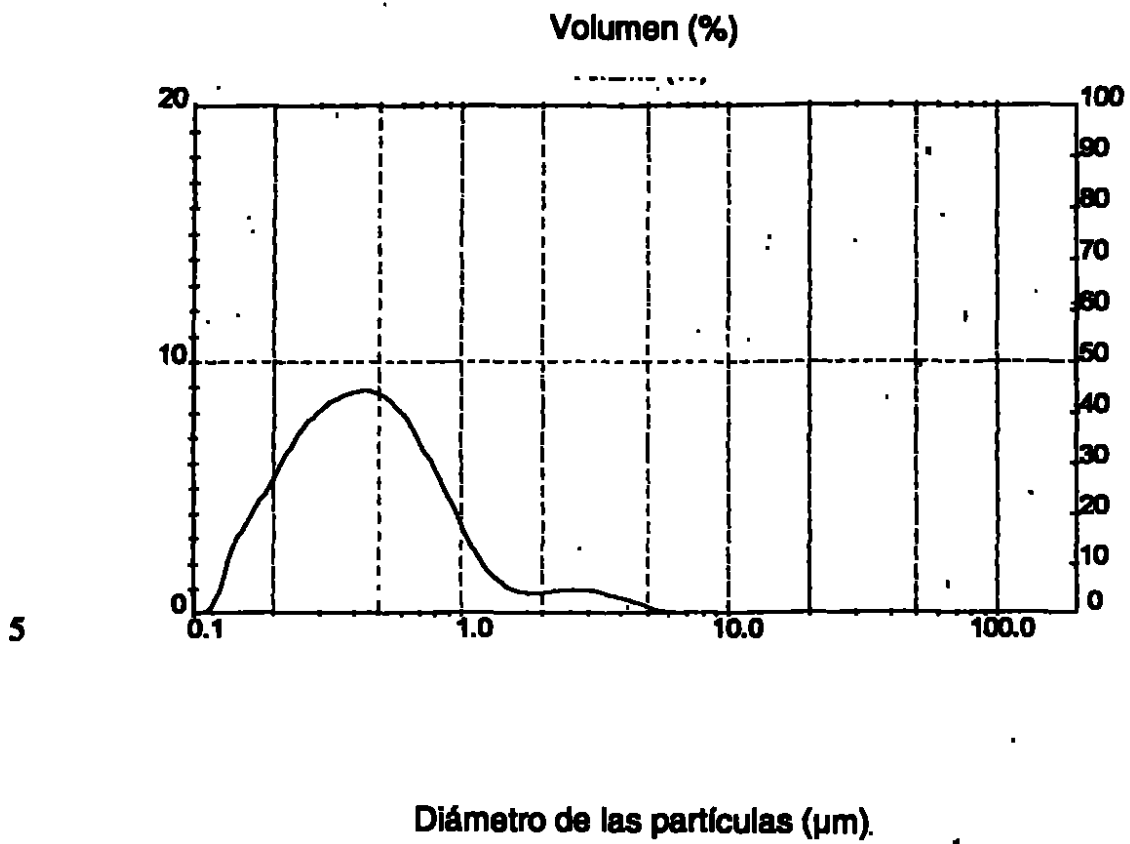


Figura 10B
Amphigen al 40% microfluidizado a los 22 meses

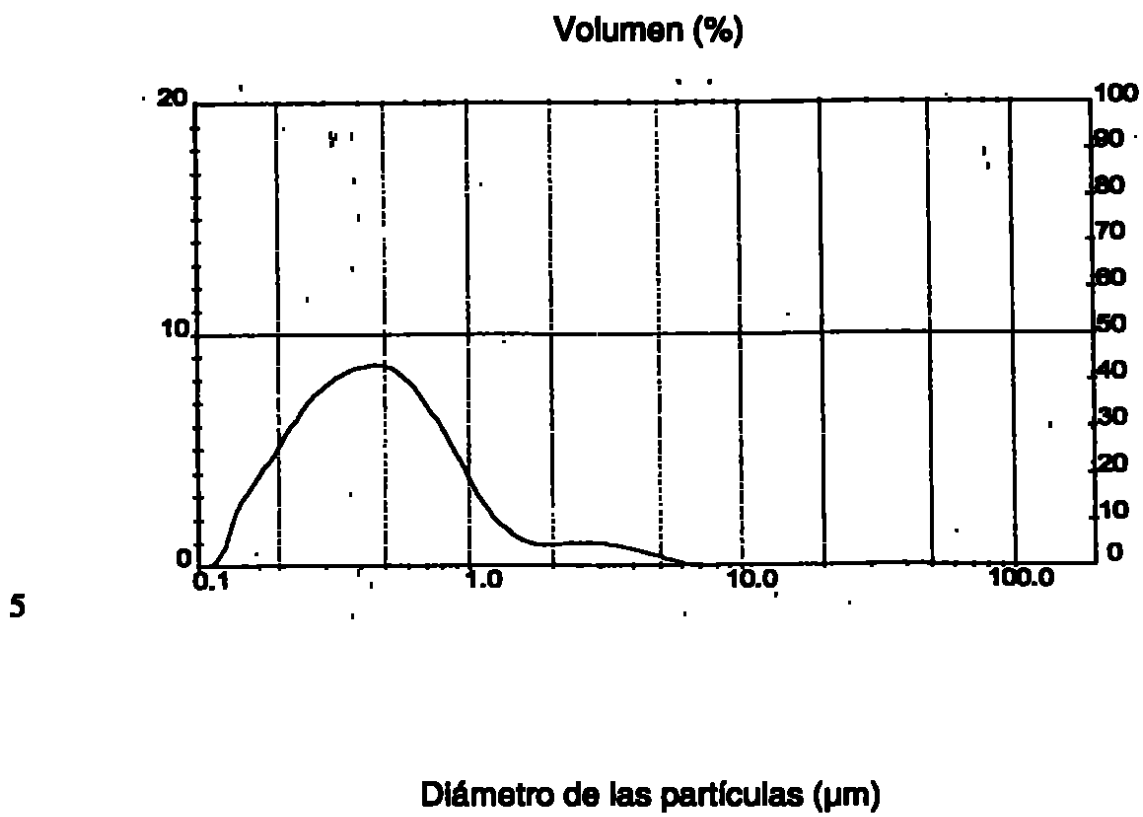


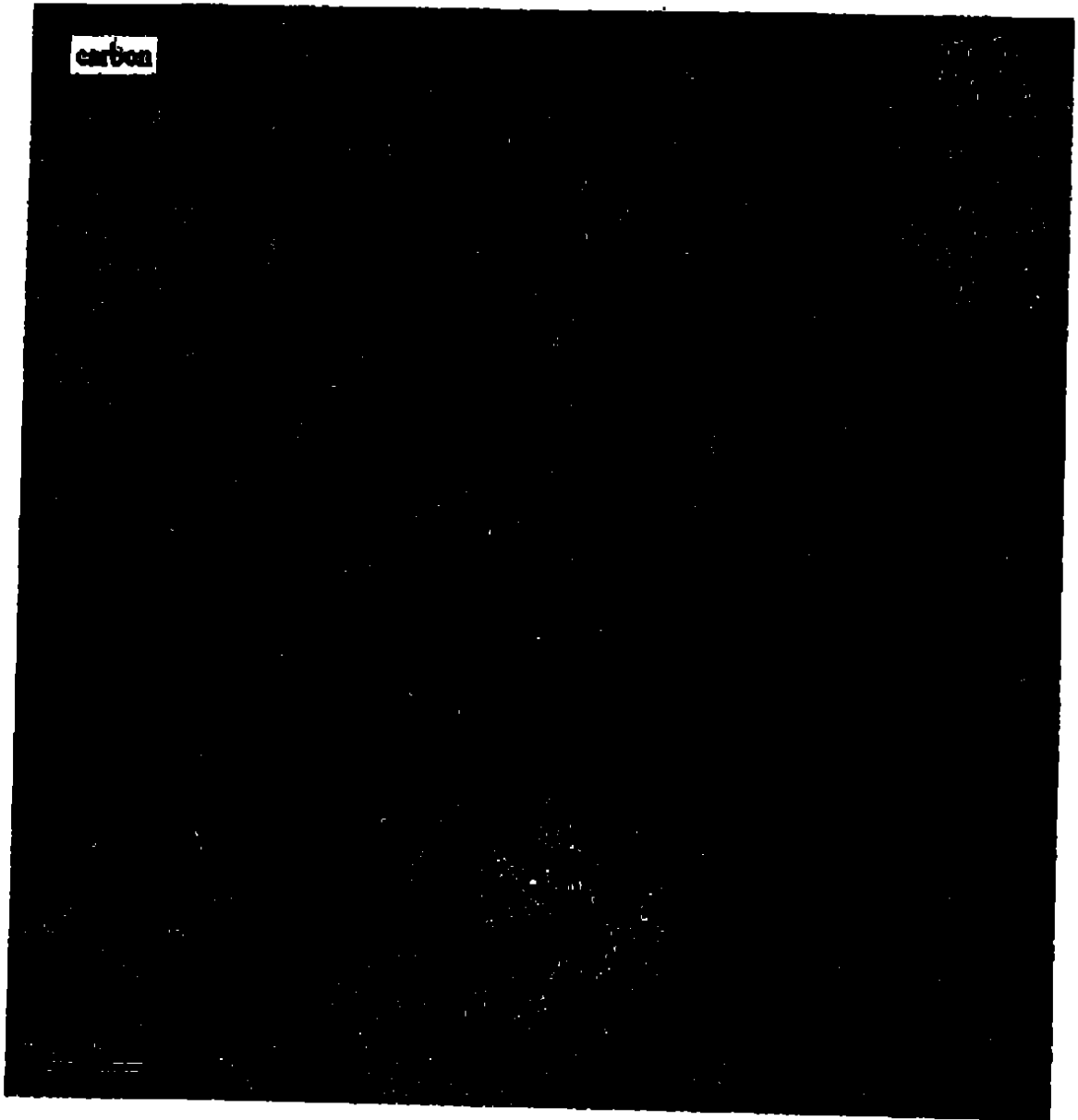
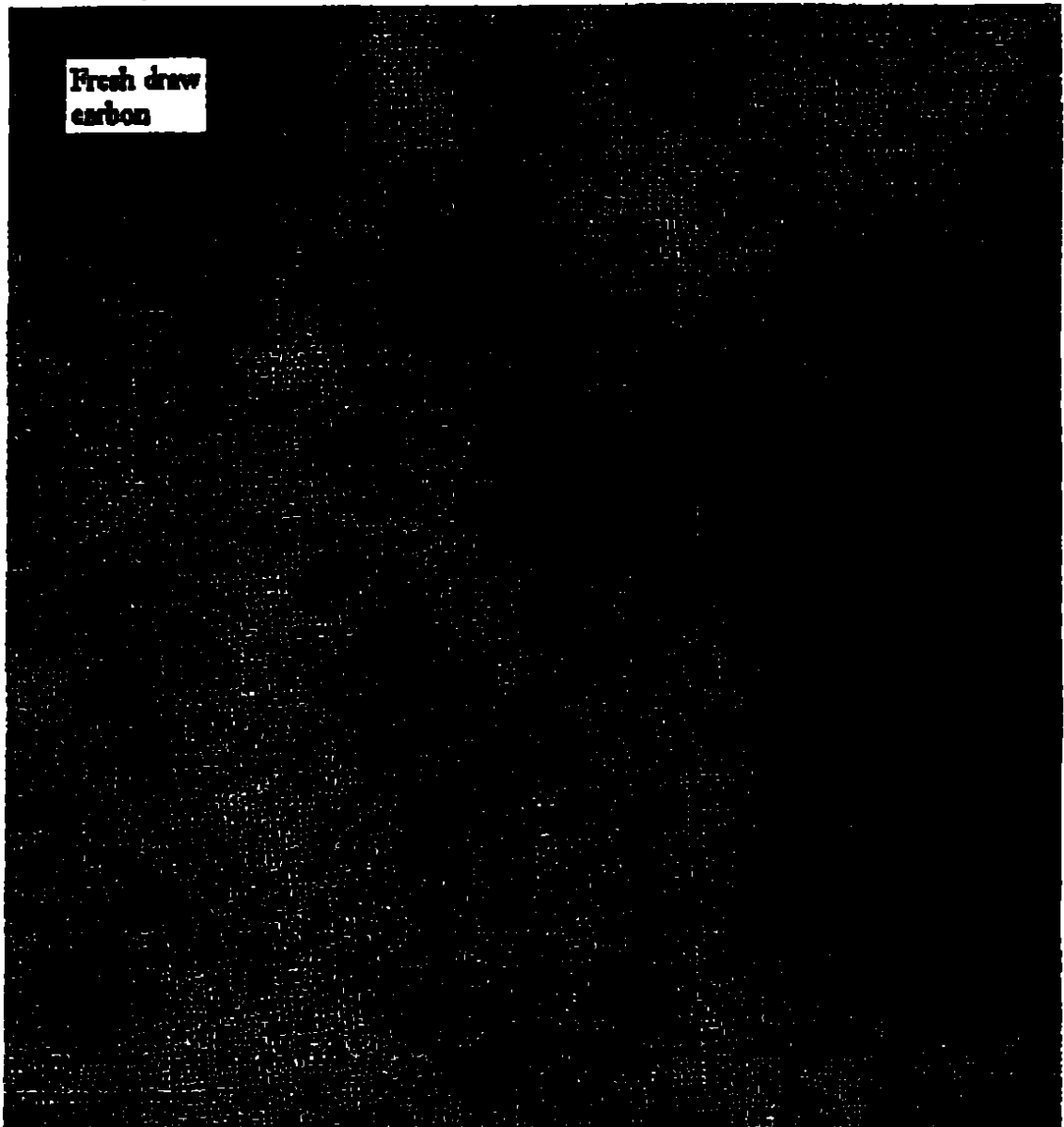
Figura 11

Figura 12

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL DE PATENTABILIDAD
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:

FULLER, Grover, F. Jr. et al.
Pfizer Inc.
201 Tabor Road Morris Plains,
NJ 07950
Estados Unidos de América.

Sello de Recibido 27 de mayo de 2006, MOPS IP GLBL. SRVS

Fecha de expedición: 22.03.2006

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32251A

Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/000804

Fecha de presentación internacional: 24.03.2005

Fecha de prioridad: 05.04.2004

Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC et. al.

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

4. RECORDATORIO

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39 (1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de

160

informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

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

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

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

Oficina de Patentes Europea P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas
Tel: +31 70 340-2040, Tx : 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340-3016

Funcionario Autorizado: de Haas, B
Tel: + 31 70 340-4738

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

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32251A

Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/000804

Fecha de presentación internacional: 24.03.2005

Fecha de prioridad: 05.04.2004

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: A61K 39/39, A61K 39/12, A61K 39/02

Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC et. al.

1. El reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Revisión Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y es transmitido al solicitante según el Artículo 36.
2. Este REPORTE consta de un total de 6 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.

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

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

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

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

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

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

Fecha de radicación de la demanda: 18.04.2005

Fecha de elaboración de este reporte: 22.03.2006

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

Oficina de Patentes Europea P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas
 Tel: +31 70 340-2040, Tx : 31 651 epo nl
 Fax: +31 70 340-3016

Funcionario Autorizado: Noë, V
 Tel: + 31 70 340-

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos*** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:

Descripción, Páginas

1 - 40 tal como se presentaron inicialmente

Reivindicaciones, Números

1 - 8 tal como se presentaron inicialmente

Dibujos, Hojas

1/12-12/12 tal como se presentaron inicialmente

☐ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) – ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

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

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

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

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

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

Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35 (2)
con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial:
anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones 8
	No:	Reivindicaciones 1-7
Nivel Inventivo (NI)	Si:	Reivindicaciones
	No:	Reivindicaciones 1-8
Aplicación Industrial (AI)	Si:	Reivindicaciones 1-8
	No:	Reivindicaciones

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada.

Recuadro No. VI. Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Regla 70.10)

y/o

2. Divulgaciones no escritas (Regla 70.9)

Ver hoja adjunta

Recuadro No. VIII	Observaciones relativas a la solicitud internacional.
--------------------------	--

Se formulan las observaciones siguientes sobre la claridad de las reivindicaciones, de la descripción y de los dibujos o sobre si las reivindicaciones se fundan totalmente en la descripción:

ver hoja adjunta

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL – HOJA ANEXA
Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/000804

Ítem V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; citas y explicaciones sustentando dicha declaración (Continuación)

1. CITAS

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 96/33739 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.; GARCON, NATHALIE, MARIE-JOSEPHE, C) 31 de octubre de 1996
D2: US 2003/095974 A1 (GARCON NATHALIE ET AL) 22 de mayo de 2003
D3: US-A-5 679 354 (MOREIN ET AL) 21 de octubre de 1997
D4: US-B1-6 506 386 (FRIEDE MARTIN ET AL) 14 de enero de 2003
D5: WO 2004/087204 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; KLOSE, PAMELA, KAY; KRE) 14 de octubre de 2004
D6: WO 2004/067031 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; FRANTZ, JOSEPH, CLAUDE;) 12 de agosto de 2004

2. NOVEDAD (Artículo 33(2) del PCT)

1. D1 divulga una composición de vacuna que comprende una saponina (QS21), un estero1 (colesterol) y un antígeno. El estero1 y la saponina forman un liposoma o una estructura ISCOM y podrá contener un vehículo de emulsión de aceite en agua (ver resumen; página 1, líneas 3-6 y 18-22; página 2, líneas 1-3; página 2, línea 34 – página 3, línea 2). En vista de D1, la materia de las reivindicaciones 1-7 no se considera novedosa.

2. D2 divulga una composición de vacuna que comprende una QS21 y colesterol en una emulsión de aceite en agua con dimensiones sub-micra como co-adyuvante y un antígeno mezclado entre sí (párrafos 5, 23, 25, 26, 28, 29 y reivindicaciones 1, 4, 6, 7, 17). En vista de D2, la materia de las reivindicaciones 1-7 no se considera novedosa.

3. D3 divulga una composición de vacuna que comprende un estero1 y un glicósido de saponina, ensamblado en una matriz (una estructura tipo iscom) y un antígeno el cual no está integrado en el co-adyuvante (ver resumen; columna 1, líneas 46-62; columna 2, líneas 27-33 y 43-45 y reivindicaciones 1-3 y 5-8). En vista de D3, la materia de las reivindicaciones 1, 4-7 no se considera novedosa.

4. D4 divulga una composición de vacuna que comprende una formulación co-adyuvante que comprende una saponina (QuilA) y un estero1 (colesterol) en la forma de un ISCOM y un antígeno (ver columna 4, líneas 13-16 y 21-25 y las reivindicaciones 1, 5, 7, 12). En vista de D4, la materia de las reivindicaciones 1, 4-7 no se considera novedosa.

5. La presente solicitud no cumple con el criterio establecido en el Artículo 33(2) del PCT puesto que la materia de las reivindicaciones 1-7 no es novedosa con respecto a los antecedentes tal como lo define la reglamentación (Regla 64(1)-(3) del PCT).

3. NIVEL INVENTIVO (Artículo 33(3) del PCT).

1. La reivindicación dependiente 8 no parece contener características adicionales las cuales, junto con las características de cualquier reivindicación al cual se refiere, poseen un nivel inventivo puesto que la escogencia entre un antígeno BDVD 1 ó 2 se considera obvia para aquella persona experta y es meramente una entre varias posibilidades obvias a partir de las cuales la persona experta escogería, según las circunstancias, sin el uso de capacidad inventiva, para así resolver el problema planteado.

2. La presente solicitud por lo tanto no cumple con el criterio establecido en el Artículo 33(3) del PCT y la materia de las reivindicaciones 1-8 no poseen nivel inventivo (Regla 65(1)(2) del PCT).

VI. Ciertos documentos citados (Continuación)

7. Ciertos documentos publicados

Solicitud No. Patente No.	Fecha de publicación (día/mes/año)	Fecha de presentación (día/mes/año)	Fecha de prioridad (día/mes/año)
WO2004/087204	14.10.2004	22.03.2004	04.04.2003
WO2004/067031	12.08.2004	15.01.2004	29.01.2003

1. Aunque D5 y D6 no son antecedentes dentro del marco de la Regla 64.1(b), parecen divulgar todas las características de las reivindicaciones 1-8. Estos documentos podrían entonces tomarse en consideración en la fase regional ante la EPO. Los antecedentes que pertenecen a la presente solicitud no estaban disponibles a la hora de establecer este primer concepto escrito. Por lo tanto, se base en la suposición que todas las reivindicaciones gozan de derechos de prioridad a partir de la fecha de presentación del documento de prioridad. Si más adelante se conoce que lo anterior no es correcto, los documentos D5 y D6 arriba mencionados citados en el reporte de búsqueda internacional podrían volverse relevantes para evaluar si la materia reivindicada satisface los criterios establecidos en el Artículo 33(1) del PCT.

VIII. Ciertas Observaciones (Continuación)

8. Parece ser, a partir de la descripción en su totalidad y en particular a partir de los ejemplos, que la presencia de una emulsión AMPHIGEN de aceite en agua de dimensiones sub-micra es una característica técnica esencial del presente invento. Sin embargo, esta característica técnica esencial no está presente en la reivindicación independiente 1. Por estas razones, la reivindicación carece de claridad según el Artículo 6 del PCT tomado junto con la Regla 6.3(b) del PCT (ver también Directrices de Evaluación Preliminar del PCT III.4.3).

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

FULLER, Grover F.Jr. et al.
PFIZER Inc
201 Tabor Road, Morris Plains,
New Jersey 07950
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

168.

RECEIVED
MAR 27 2006 *Im*
PCT
14078 IP 6131 GPVS

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)	22.03.2006
-------------------------------------	------------

Applicant's or agent's file reference
PC32251A

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/B2005/000804

International filing date (day/month/year)
24.03.2005

Priority date (day/month/year)
05.04.2004

Applicant
PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

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

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

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

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

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



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

Authorized Officer

de Haas, B

Tel. +31 70 340-4738



INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC32251A	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA416	
International application No. PCT/IB2005/000804	International filing date (day/month/year) 24.03.2005	Priority date (day/month/year) 05.04.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/39, A61K39/12, A61K39/02		
Applicant PFIZER PRODUCTS INC. et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report 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 Article 35(2) 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		
Date of submission of the demand 18.04.2005	Date of completion of this report 22.03.2006	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Authorized Officer Noë, V Telephone No. +31 70 340- 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

170
International application No.
PCT/IB2005/000804

Box No. I Basis of the report

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

Description, Pages

1-40 as originally filed

Claims, Numbers

1-8 as originally filed

Drawings, Sheets

1/12-12/12 as originally filed

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

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

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/000804

137

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	8
	No: Claims	1-7
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-8
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-8
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

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

V. Reasoned statement (Continuation)

1. CITATIONS

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 96/33739 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A; GARCON, NATHALIE, MARIE-JOSEPHE, C) 31 October 1996 (1996-10-31)
- D2: US 2003/095974 A1 (GARCON NATHALIE ET AL) 22 May 2003 (2003-05-22)
- D3: US-A-5 679 354 (MOREIN ET AL) 21 October 1997 (1997-10-21)
- D4: US-B1-6 506 386 (FRIEDE MARTIN ET AL) 14 January 2003 (2003-01-14)
- D5: WO 2004/087204 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; KLOSE, PAMELA, KAY; KRE) 14 October 2004 (2004-10-14)
- D6: WO 2004/067031 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; FRANTZ, JOSEPH, CLAUDE;) 12 August 2004 (2004-08-12)

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

- 1. D1 discloses a vaccine composition comprising a saponin (QS21), a sterol (cholesterol) and an antigen. The sterol and saponin form a liposome or an ISCOM structure and might contain oil in water emulsion carrier (see abstract; page 1, lines 3-6 and 18-22; page 2, lines 1-3; page 2, line 34 - page 3, line 2). In view of D1, the subject-matter of claims 1-7 is not considered to be novel.
- 2. D2 discloses a vaccine composition comprising as QS21 and cholesterol in a submicron oil in water emulsion as adjuvant and an antigen admixed thereto (paragraphs 5,23,25,26,28,29 and claims 1,4,6,7,17). In view of D2, the subject-matter of claims 1-7 is not considered to be novel.
- 3. D3 discloses a vaccine composition comprising a sterol and a saponin glycoside, assembled into a matrix (an iscom-like structure) and an antigen

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

International application No.

PCT/IB2005/000804

172
173
which is not integrated into the adjuvant (see abstract; column 1, lines 46-62; column 2, lines 27-33 and 43-45 and claims 1-3 and 5-8). In view of D3, the subject-matter of claims 1,4-7 is not considered to be novel.

4. D4 discloses a vaccine composition comprising an adjuvant formulation comprising a saponin (QuilA) and a sterol (cholesterol) in the form of an ISCOM and an antigen (see column 4, lines 13-16 and 21-25 and claims 1,5,7,12). In view of D4 the subject-matter of claims 1,4-7 is not considered to be novel.
5. The present application does not satisfy the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject-matter of claims 1-7 is not new in respect of prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).

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

1. Dependent claim 8 does not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which it refers, involve an inventive step because the choice of a BDVD 1 or 2 antigen is considered to be obvious for the skilled person and is merely one of several straightforward possibilities from which the skilled person would select, in accordance with circumstances, without the exercise of inventive skill, in order to solve the problem posed.
2. The present application does therefore not satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject-matter of claims 1-8 does not involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).

VI. Certain documents cited (Continuation)

7. Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
-----------------------------	--------------------------------------	---------------------------------	---

INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/IB2005/000804

WO2004/087204	14.10.2004	22.03.2004	04.04.2003
WO2004/067031	12.08.2004	15.01.2004	29.01.2003

1. Although D5 and D6 does not constitute prior art within the meaning of Rule 64.1(b), they appear to disclose all the features of claims 1-8. These documents might therefore be taken into consideration in the regional phase before the EPO. The priority documents pertaining to the present application were not available at the time of establishing this first written opinion. Hence, it is based on the assumption that all claims enjoy priority rights from the filing date of the priority document. If it later turns out that this is not correct, the above documents D5 and D6 cited in the international search report could become relevant to assess whether the claimed subject matter satisfy the criteria set forth in Art. 33(1) PCT.

VIII. Certain Observations (Continuation)

- 8 It appears from the description as a whole and in particular from the examples , that the presence of a **submicron oil-in water AMPHIGEN emulsion** is an essential technical feature of the present invention. This essential technical feature is however not present in independent claim 1. For these reasons claim lacks clarity according to Art. 6 PCT taken in combination with Rule 6.3 (b) PCT (see also PCT Preliminary Examination Guidelines III.4.3).

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

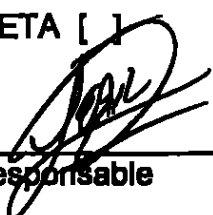
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha **05 OCT. 2006**

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

**PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

05 - Nov - 06

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC

Dirección: Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

3

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/000804

Fecha Marzo 24, 2005

Publicación Internacional No. WO 2005/097181

Fecha Octubre 20, 2005

6

**Título (54) EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA MICROFLUIDIZADAS Y
COMPOSICIONES DE LAS VACUNAS.**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/39, 39/12, 39/02

Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	<u>US</u>	<u>Abril 5, 2004</u>	<u>60/559,677</u>

9

Comprobante de pago No. 06 - 74.980

Fecha Septiembre 28, 2006

LISTA DE INVENT RES PCT/IB2005/000804

PAUL JOSEPH DOMINOWSKI
13812 South Kellogg School Road,
Hickory Corners, Michigan 49060
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

PAMELA KAY KLOSE
66 Quailcrest Road, East Lyme,
Connecticut 06333,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

RICHARD LEE KREBS
27004 Ranch Road, Ashland,
Nebraska 68003
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

RAMASAMY MANNAR MANNAN
5275 Snowbird Court,
Kalamazoo, Michigan 49009
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

+22
178

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

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende un glucósido de saponina, un esteroi y un antígeno, en la que dicho glucósido de saponina y dicho esteroi se asocian entre si para formar complejos en forma de micelas helicoidales y en la que dicho antígeno está mezclado, pero no integrado, en dichas micelas helicoidales.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que además comprende un vehículo veterinariamente aceptable.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que dicho vehículo veterinariamente aceptable es una emulsión de aceite en agua.
4. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho glucósido de saponina es un triterpenoide.
5. La composición de vacuna de la reivindicación 4, en la que dicho triterpenoide es Quil A.
6. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicho esteroi es colesterol.

178

179

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS INC

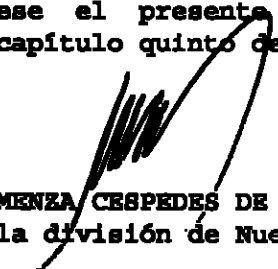
REFERENCIA	Radicación No.	6 100763
	Solicitud internacional	PCT/IB2005/000804
	Fecha inicio fase nacional	05/11/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	13895

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.

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.


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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 01 DIC. 2006 aalvarado