

COMPOSICIONES DE ADYUVANTE LIPOSOMAL

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/194,355, presentada el 20 de julio de 2015, cuyo contenido se incorpora en la presente mediante esta referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se encuentra en el campo de los adyuvantes de vacunas.

ANTECEDENTES

- En el área de vacunología, se introducen antígenos en un hospedador de manera de estimular una respuesta inmunitaria al antígeno y, de este modo, al potencial patógeno. La inducción de una respuesta inmunitaria depende de muchos factores entre los cuales se cree que se encuentra la composición química, características y configuración del antígeno, la salud y competencia inmune del hospedador y la forma de suministro y administración del antígeno.

Una respuesta inmunitaria tiene muchas facetas, algunas de las cuales son presentadas por las células del sistema inmune (p. ej., células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y células plasmáticas). Las células del sistema

inmune participan en la respuesta inmunitaria mediante la interacción con antígenos u otras células del sistema inmune, la liberación de citocinas y la reactividad con esas citocinas. La respuesta inmunitaria adaptativa (adquirida) se divide de manera conveniente (pero arbitraria) en dos categorías principales: humoral y mediada por células. El componente humoral de la respuesta inmunitaria incluye la producción de anticuerpos específicos para el antígeno. El componente mediado por células incluye la generación de hipersensibilidad de tipo retardada y células T efectoras citotóxicas específicas del antígeno.

Los adyuvantes son sustancias usadas para potenciar una respuesta inmunitaria al usarse junto con el antígeno. El uso de un adyuvante en un protocolo de vacunación puede, por ejemplo, provocar una respuesta inmunitaria más rápida o mayor de la que provocaría el antígeno solo. Además, los adyuvantes pueden usarse para dirigir la respuesta inmunitaria a vías inmunológicas específicas y para servir como vehículo de administración del antígeno.

Los liposomas y formulaciones liposomales son ejemplos de adyuvantes. Típicamente los liposomas pueden cargarse con uno o más antígenos y/u otros compuestos inmunomoduladores o los liposomas en sí mismos pueden servir como adyuvantes independientes. Los antígenos y/u otros compuestos

inmunoestimulantes pueden encapsularse en el interior del liposoma y/o pueden unirse al liposoma o incorporarse en la bicapa lipídica.

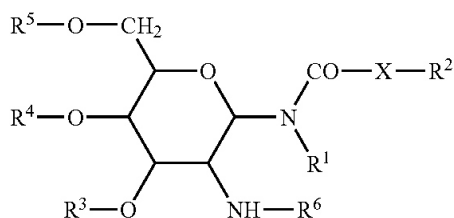
Los factores que influyen en el hecho de que un liposoma dado sea adecuado como vehículo de suministro en la presentación de un sistema dado siguen siendo poco claros. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de vehículos de suministro que proporcionen una mejor eficacia. Tal administración mejorada es particular para el suministro de moléculas que estimulan y/o provocan una respuesta inmunitaria, por ejemplo, antígenos e inmunomoduladores.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a adyuvantes para mejorar el desempeño de una vacuna.

En determinados aspectos, la invención proporciona un liposoma que comprende una membrana de bicapa lipídica externa y un compartimiento interno, la membrana de bicapa lipídica externa comprende: un compuesto de amonio cuaternario; un esteroide; un fosfolípido y un glicolípido de

Fórmula I:



Fórmula I

donde, R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno, o un radical alquilo saturado con hasta 20 átomos de carbono; X es $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$ o $-\text{NH}-$; R^2 es hidrógeno o un radical alquilo saturado o insaturado con hasta 20 átomos de carbono; R^3 , R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, $-\text{SO}_4^{2-}$, $-\text{PO}_4^{2-}$, $-\text{COalquiloC}_{1-10}$; R^6 es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxiprolilo, L-isoleucilo, L-leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitinilo, L-fenialanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o los D-isómeros de estos.

En determinadas modalidades, el compuesto de amonio cuaternario es DDA, el esteroles es colesterol, el fosfolípido es lecitina y el glicolípido es N-(2-deoxi-2-L-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida o un acetato de esta.

En determinadas modalidades, el liposoma está esencialmente libre de saponina.

En determinadas modalidades, el liposoma comprende además un oligonucleótido inmunoestimulante seleccionado del grupo que consiste en un ribonucleótido inmunoestimulante, un oligodesoxirribonucleótido CpG y una combinación de estos En algunas modalidades, el liposoma está libre de

oligodesoxirribonucleótido CpG.

En algunas modalidades, el oligonucleótido inmunoestimulante se incorpora en el compartimiento interno del liposoma. En otras modalidades, el oligonucleótido inmunoestimulante se
5 asocia con la superficie exterior del liposoma.

En algunas modalidades, dicho oligonucleótido inmunoestimulante comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14.

En determinados aspectos, la invención proporciona una
10 formulación adyuvante que comprende los liposomas tal como se describe en la presente.

En determinadas modalidades, la formulación adyuvante está esencialmente libre de saponina. En determinadas modalidades, la formulación adyuvante está esencialmente libre de
15 oligodesoxirribonucleótido CpG.

En determinados aspectos, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de un componente antigénico y una formulación adyuvante tal como se describe en la presente.

20 En determinadas modalidades, la composición de vacuna está esencialmente libre de saponina.

En determinadas modalidades, la composición de vacuna está esencialmente libre de CpG. En determinadas modalidades, el componente antigénico de la composición de vacuna

esencialmente libre de CpG contiene un virus (-)ARNcs.

En determinadas modalidades, el virus (-)ARNcs es un virus de la gripe. En algunas modalidades, el virus de la gripe es un
5 virus de la gripe porcina.

En determinadas modalidades, el componente antigénico se incorpora en el compartimiento interno del liposoma.

El componente antigénico, en modalidades seleccionadas adecuadas para el ganado, puede incluir virus inactivados
10 BVDV-1 y/o BVDV-2 (y BHV-1). En otras modalidades, particularmente adecuadas para aves de corral, el componente antigénico incluye profilina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones:

15 Los términos «alrededor de» o «aproximadamente», cuando se usa en conexión con una variable numérica medible, hacen referencia al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del
20 intervalo de confianza de 95 % para la media) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, cualquiera sea mayor, a menos que «alrededor de» se use en referencia a intervalos de tiempo en semanas donde «alrededor de 3 semanas» es 17 a 25 días y alrededor de 2 a alrededor de 4 semanas es 10 a 40

días.

La expresión «acompañado de fiebre» se refiere a un aumento en la temperatura del animal vacunado al día de la
5 vacunación. En el caso de los bovinos, el término se refiere al a temperatura rectal mayor que 103.5 °F.

El término «antígeno», en combinación con la especie, se refiere a patógenos que provocan enfermedad infecciosa en dicha especie o a los componentes de estos patógenos. Por lo
10 tanto, por ejemplo, «antígenos bovinos» se refiere a los patógenos capaces de provocar enfermedad infecciosa en bovinos o a los componentes de estos patógenos.

La expresión «consiste esencialmente en» y similares, como se aplican a los liposomas y formulaciones adyuvantes de la
15 presente invención, se refiere a composiciones que no contienen agentes adyuvantes o inmunomoduladores adicionales en las cantidades en las que dicho agente ejerce efectos adyuvantes o inmunomoduladores medibles.

Las expresiones «esencialmente libre de saponina»,
20 «sustancialmente libre de saponina» y similares se refieren a una composición que no contiene saponina en las cantidades en las que la saponina ejerce efectos adyuvantes o inmunomoduladores medibles. En determinadas modalidades, las composiciones esencialmente libres de saponina contienen

saponina en la cantidad insuficiente para provocar una respuesta inmunitaria sistémica, como fiebre. En determinadas modalidades, las composiciones esencialmente libres de saponina no contienen saponina o contienen saponina en el
5 límite de detección o debajo de este.

De manera similar, los términos «esencialmente libre de desoxirribonucleótido CpG», «sustancialmente libre de desoxirribonucleótido CpG» y similares se refieren a una composición que no contiene desoxirribonucleótido CpG en las
10 cantidades en las que el desoxirribonucleótido CpG ejerce efectos adyuvantes o inmunomoduladores medibles. En determinadas modalidades, las composiciones esencialmente libres de desoxirribonucleótido CpG no contienen desoxirribonucleótido CpG o contienen desoxirribonucleótido
15 CpG en el límite de detección o debajo de este. Las expresiones «esencialmente libre de desoxirribonucleótido CpG», «sustancialmente libre de desoxirribonucleótido CpG» y similares excluyen específicamente a las vacunas en las que el desoxirribonucleótido CpG está naturalmente presente en el
20 antígeno.

La expresión «molécula inmunoestimulante» hace referencia a una molécula que mejora una respuesta inmunitaria.

El término «liposoma» hace referencia a una partícula esférica microscópica formada por una bicapa lipídica que

encierra un compartimiento acuoso.

La expresión «administración parenteral» hace referencia a la introducción de una sustancia, como una vacuna, en el cuerpo
5 de un sujeto mediante una vía que no incluye el tracto digestivo. La administración parenteral incluye la administración subcutánea, intramuscular, transcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraocular e intravenosa.

Las expresiones «cantidad terapéuticamente eficaz» y
10 «cantidad eficaz» hacen referencia a una cantidad de un antígeno o vacuna que induciría una respuesta inmunitaria en un sujeto que recibe el antígeno o vacuna que es adecuada para prevenir o reducir las señales y síntomas de enfermedad, incluyendo efectos adversos para la salud o complicaciones de
15 esta, provocados por la infección con un patógeno, como un virus o bacteria. Se puede inducir la inmunidad humoral o inmunidad mediada por células o ambas. La inmunogenicidad y eficacia de una vacuna en un animal se puede evaluar, p. ej., indirectamente mediante la medición de las titulaciones de
20 anticuerpo, ensayos de proliferación de linfocitos, ensayos ELISPOT de IFN gamma, ensayos de linfocitos T citotóxicos o directamente mediante el control de las señales y síntomas luego de la exposición a una cepa de tipo salvaje. La inmunidad protectora que otorga una vacuna puede evaluarse

mediendo, p. ej., la reducción de los síntomas clínicos como mortalidad, morbilidad, fiebre, viremia, impacto en la patología clínica, condición física global y salud global y desempeño del sujeto. La cantidad de una vacuna que es
5 terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del adyuvante particular usado, el antígeno particular usado o la afección del sujeto y puede determinarlo un experto en la técnica.

La invención proporciona, en parte, liposomas que contienen
10 un compartimiento interno y una membrana externa. Los liposomas pueden tener un tamaño de partícula promedio entre 50 y 500 nm. En determinadas modalidades no taxativas, el tamaño de partícula promedio de los liposomas es de 100-500 nm, o 150-450 nm, o 150-250 nm, o 300-400 nm, o 250-300 nm.
15 En determinadas modalidades, la membrana comprende un compuesto de amina cuaternaria, un fosfolípido, un esterol y un glicolípido. En determinadas modalidades, el liposoma está esencialmente libre de saponina.

En determinadas modalidades, la membrana externa consiste
20 esencialmente o consiste en el compuesto de amina cuaternaria, el fosfolípido, el esterol y el glicolípido. En otras modalidades, el compartimiento externo del liposoma no contiene ningún oligonucleótido inmunoestimulante y/u otros compuestos inmunomoduladores. Por lo tanto, en tales

modalidades, el liposoma consiste esencialmente en, o
consiste en el compartimiento interno que consiste
esencialmente en o consiste en un vehículo acuoso
inmunológicamente inerte, dicho compartimiento interno está
5 rodeado por la membrana externa que consiste esencialmente en
o consiste en el compuesto de amina cuaternaria, el
fosfolípido, el esteroles y el glicolípido.

Los compuestos de amina cuaternaria son compuestos a base de
amonio con cuatro grupos hidrocarburo. En la práctica, los
10 grupos hidrocarburo están generalmente limitados a grupos
alquilo o arilo. En un conjunto de modalidades, los
compuestos de amina cuaternaria están compuestos de cadenas
de cuatro alquilos, dos de los cuales son alquilos C10-C20 y
los otros dos son alquilos C1-C4. En determinadas
15 modalidades, la amina cuaternaria es cloruro, bromuro de
dimetildioctadecilamonio (DDA) u otro contraíón
farmacéuticamente aceptable.

Los esteroides comparten un núcleo químico común, que es una
estructura de anillo esteroide, con un grupo hidroxilo (OH),
20 frecuentemente unido a carbono-3. La cadena de hidrocarburo
del sustituyente de ácido graso tiene diferentes longitudes,
frecuentemente de 16 a 20 átomos de carbono y puede ser
saturada o insaturada. Los esteroides comúnmente contienen uno
o más enlaces dobles en la estructura del anillo y también

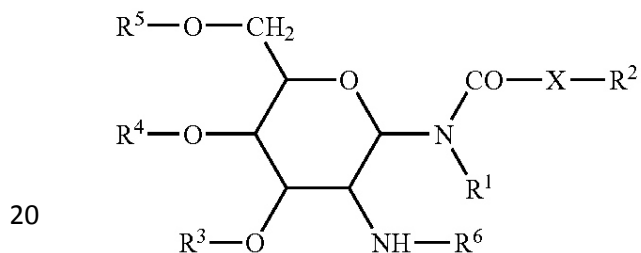
una variedad de sustituyentes unidos a los anillos. Los esteroides y sus ésteres de ácido graso son esencialmente insolubles en agua. Por lo tanto, en vista de estas similitudes químicas, es probable que los esteroides que

5 comparten este núcleo químico tengan propiedades similares al usarse en las composiciones de vacuna de la presente invención. Los esteroides se conocen en la técnica y se pueden comprar comercialmente. Por ejemplo, el colesterol se describe en el índice Merck, 12a ed., p. 369. Los esteroides

10 adecuados incluyen, de modo no taxativo, β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol.

Los glicolípidos adecuados son generalmente aquellos que activan la respuesta de Th2. Los glicolípidos incluyen, de modo no taxativo, los comprendidos en la Fórmula I y que se

15 describen generalmente en la publicación de patente estadounidense 20070196384 (Ramasamy et ál).



Fórmula I

En la estructura de la Fórmula I, R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno, o un radical alquilo saturado con hasta 20 átomos de carbono; X es $-CH_2-$, $-O-$ o $-NH-$; R^2 es

hidrógeno o un radical alquilo saturado o insaturado con hasta 20 átomos de carbono; R^3 , R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, $-\text{SO}_4^{2-}$, $-\text{PO}_4^{2-}$, $-\text{COalquiloC}_{1-10}$; R^6 es L-alanilo, L-alfa-aminobutilo, L-arginilo, L-asparginilo, L-aspartilo, L-cisteinilo, L-glutamilo, L-glicilo, L-histidilo, L-hidroxiprolilo, L-isoleucilo, L-leucilo, L-lisilo, L-metionilo, L-ornitino, L-fenialanilo, L-prolilo, L-serilo, L-treonilo, L-tirosilo, L-triptofanilo y L-valilo o los D-isómeros de estos.

Ejemplos de un glicolípido son, de modo no taxativo, N-(2-deoxi-2-L-leucilamino- β -D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida (BayR[®]1005 o R1005) o una sal (p. ej., un acetato) de esta.

La lecitina se puede obtener como una mezcla de fosfatidas y triglicéridos mediante el lavado con agua de aceites vegetales crudos y la separación y secado de las gomas hidratadas resultantes. Un producto refinado puede obtenerse fraccionando la mezcla para detectar glicolípidos y fosfolípidos insolubles en acetona que quedan luego de separar los triglicéridos y el aceite vegetal con un lavado con acetona. De manera alternativa, la lecitina se puede obtener de varias fuentes comerciales.

Otros fosfolípidos adecuados incluyen fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina,

acilfosfatidiletanolamina, difosfatidilglicerol,
lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, ácido
fosfatídico, cardiolipina y fosfatidiletanolamina. Los
fosfolípidos pueden aislarse de fuentes naturales o
5 sintetizarse convencionalmente.

Los liposomas como se describen en la presente permiten
relaciones flexibles de los elementos de la membrana externa.
En determinadas modalidades, las relaciones en peso del
compuesto de amonio cuaternario: el esterol: el fosfolípido:
10 el glicolípido son 1: 0.75-1.25: 1.5-2.5: 1.5-2.5,
respectivamente. En determinadas modalidades, las relaciones
en peso del compuesto de amonio cuaternario: el esterol: el
fosfolípido: el glicolípido son 1: 1: 2: 2.

En otras modalidades, el peso total del compuesto de amonio
15 cuaternario y el esterol es de alrededor de la mitad (p. ej.,
40%, 45%, 50%, 55%, 60%) del peso total del glicolípido y el
fosfolípido, con la condición de que el compuesto de amonio
cuaternario comprenda al menos alrededor de 5% p/p del peso
total de estos cuatro compuestos (el compuesto de amonio
20 cuaternario, el esterol, el fosfolípido y el glicolípido) y
el glicolípido sea al menos alrededor de 20% p/p del peso
total de estos cuatro compuestos.

En determinadas modalidades, el peso total del compuesto de
amonio cuaternario y el esterol es de alrededor 10-40% (p.

ej., alrededor de 10%, alrededor de 15%, alrededor de 20%, alrededor de 25%, alrededor de 30%, alrededor de 33.3%, alrededor de 35%, alrededor de 40%) del peso total del glicolípido y el fosfolípido, con la condición de que el compuesto de amonio cuaternario comprenda al menos alrededor de 5% p/p del peso total de estos cuatro compuestos (el compuesto de amonio cuaternario, el estero1, el fosfolípido y el glicolípido) y el glicolípido sea al menos alrededor de 20% p/p del peso total de estos cuatro compuestos.

10 En determinadas modalidades, una cantidad inmunológicamente eficaz de los liposomas de la presente invención se puede administrar como adyuvante. En algunas modalidades, la invención proporciona una combinación de vacuna que comprende la cantidad inmunológicamente eficaz de la composición adyuvante y el componente antigénico, como se describe en más
15 detalle a continuación.

El peso de la especie del cliente en última instancia determina la dosis de la composición adyuvante de la presente invención.

20 En determinadas modalidades, adecuadas para ganado, caballos y cerdos adultos, una dosis contiene el equivalente de 1000-3000 µg del componente de membrana externa (es decir, el peso total del compuesto de amonio cuaternario, el estero1, el fosfolípido y el glicolípido) o el equivalente de 1000-2000

µg, o el equivalente de 1000-1500 µg, o el equivalente de 1300-1800 µg, o el equivalente de 1500-2000 µg.

El peso de la composición de liposoma puede no ser igual al peso del componente de membrana debido a la presencia del compartimiento interno que puede contener el oligonucleótido inmuoestimulante, el componente de antígeno, otros inmunomoduladores, etc. El uso de equivalentes del componente de membrana liposomal permite una dosificación uniforme. El régimen de dosificación establecido en la presente asegura que el ganado reciba al menos 200 µg del glicolípido y alrededor de 50 µg del compuesto de amonio cuaternario.

En determinadas modalidades adecuadas para ovejas y cabras, una dosis contiene el equivalente de 300-1000 µg del componente de membrana externa, p. ej., los equivalentes de 300-500 µg, o los equivalentes de 400-500 µg, o los equivalentes de 400-1000 µg, o los equivalentes de 500-1000 µg, o los equivalentes de 600-1000 µg, o los equivalentes de 600-800 µg.

En determinadas modalidades adecuadas para cerditos, perros y gatos, una dosis contiene el equivalente de 100-400 µg del componente de membrana externa o el equivalente de 100-200 µg, o el equivalente de 100-150 µg, o el equivalente de 130-180 µg, o el equivalente de 150-200 µg.

En determinadas modalidades adecuadas para aves de corral,

una dosis contiene el equivalente de 50-200 µg del componente de membrana externa, o el equivalente de 50-100 µg, o el equivalente de 50-75 µg, o el equivalente de 65-90 µg, o el equivalente de 75-100 µg, o el equivalente de 75-150 µg.

- 5 El compuesto interno del liposoma puede contener antígenos u otras moléculas inmunomoduladoras. En determinadas modalidades, tales moléculas inmunomoduladoras adecuadas para el compartimiento interno incluyen, de modo no taxativo, extractos de antígeno, subunidades, productos sintéticos, célula entera o virus.

En determinadas modalidades, los productos farmacéuticos activos pueden empaquetarse dentro de un liposoma.

Los inmunomoduladores que podrían empaquetarse también incluyen, de modo no taxativo, rmLT, MPLA, Alpha-Gal-Cer.

- 15 Toxina de cólera, LPS, ácidos lipoteicoicos, poly I:C, flagelina, cimosano, chitina y formas modificadas de chitina, beta-glucanos, avridina, inulina y formas modificadas de inulina, anhídridos etilen málicos, plurónicos como L121 y L141, agonista de CD40, agonista de TLR5 así como cualquier
- 20 agonista de TLR, GM-CSF.

En determinadas modalidades, los liposomas pueden llevar varias moléculas que podrían usarse como marcadores incluyendo, de modo no taxativo, OspA, OspC, pertactina y otras.

En determinadas modalidades, la composición adyuvante de la presente invención comprende además oligonucleótidos inmunoestimulantes como, por ejemplo, oligodesoxirribonucleótidos CpG u oligorribonucleótidos
5 inmunoestimulantes (ORN) o quimeras de estos. Ejemplos no taxativos adecuados de oligodesoxirribonucleótidos CpG se ilustran en las SEQ ID NO 1-10, ejemplos no taxativos adecuados de ORN se proporcionan en las SEQ ID NO 11-13 y un ejemplo no taxativo adecuado de un oligonucleótido
10 inmunoestimulante quimérico se proporciona en la SEQ ID NO: 14.

Estos oligonucleótidos inmunoestimulantes están, en algunas modalidades, presentes en el compartimiento interno del liposoma.

15 En determinadas modalidades, los oligonucleótidos inmunoestimulantes se asocian con la superficie exterior del liposoma. La asociación puede deberse a enlaces de hidrógeno, enlaces electroestáticos, enlaces lipofílicos, fuerzas de Van der Walls y similares.

20 En determinadas modalidades, el oligonucleótido inmunoestimulante con carga negativa está asociado con la superficie exterior del liposoma debido a la interacción con el átomo de nitrógeno cuaternario con carga positiva en el compuesto de amonio cuaternario.

Los oligodesoxirribonucleótidos CpG (también denominados desoxirribonucleótidos CpG u ODN CpG) son una clase recientemente descrita de agentes farmacoterapéuticos caracterizados por la presencia de un dinucleótido CG no metilado en contextos de secuencia base específicos (motivo CpG). (Hansel TT, Barnes PJ (eds): New Drugs for Asthma, Allergy and COPD. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2001, vol 31, pp 229-232, que se incorpora en la presente mediante referencia). Estos motivos de CpG no se ven en el ADN eucariota, en el que los dinucleótidos CG están suprimidos y, cuando están presentes, generalmente están metilados pero están presentes en ADN bacteriano al que le otorgan propiedades inmunoestimulantes.

En determinadas modalidades, los adyuvantes de la presente invención utilizan un denominado oligonucleótido inmunoestimulante de clase P, más preferentemente, oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P modificados, incluso más preferentemente, oligonucleótidos de clase P modificados con E. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P son oligodesoxirribonucleótido CpG caracterizados por la presencia de palíndromos, generalmente de 6-20 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos de clase P tienen la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en concatámeros ya sea in vitro y/o in vivo. Estos oligonucleótidos son, en

sentido estricto, de cadena simple pero la presencia de palíndromos permite la formación de concatámeros o posiblemente estructuras de tallo y bucle. La longitud total de los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P es de entre 19 y 100 nucleótidos, p. ej., 19-30 nucleótidos, 30-40 nucleótidos, 40-50 nucleótidos, 50-60 nucleótidos, 60-70 nucleótidos, 70-80 nucleótidos, 80-90 nucleótidos, 90-100 nucleótidos. En un aspecto de la invención, el oligonucleótido inmunoestimulante contiene el dominio de activación de TLR 5' y al menos dos regiones palindrómicas, una región palindrómica es una región palindrómica 5' de al menos 6 nucleótidos de longitud y conectado a una región palindrómica 3' de al menos 8 nucleótidos de longitud ya sea directamente o a través de un separador.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P pueden modificarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, modificación con J se refiere a nucleótidos modificados con yodo. La modificación con E se refiere a uno o más nucleótidos modificados con etilo. Por lo tanto, los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P son oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P donde al menos un nucleótido (preferentemente nucleótido 5') está etilado. Modificaciones adicionales incluyen la unión de 6-nitro-bencimidazol, O-metilación, modificación con proinil-dU,

modificación de inosina, unión de 2-bromovinilo (preferentemente a uridina).

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P también pueden contener un enlace entre nucleótidos modificado que
 5 incluye, de modo no taxativo, enlaces fosfodiéster y enlaces fosforotioato. Los oligonucleótidos de la presente invención pueden sintetizarse u obtenerse de fuentes comerciales.

Los oligonucleótidos de clase P y oligonucleótido de clase P modificados se describen adicionalmente en la solicitud PCT
 10 publicada n.º WO2008/068638, publicada el 12 de junio de 2008. Ejemplos no taxativos adecuados de oligonucleótidos inmunoestimulantes de clase P modificados se proporcionan a continuación (en las SEQ ID NO 1-10, «*» se refiere a un enlace fosforotioato y «_» se refiere a un enlace
 15 fosfodiéster). En las SEQ ID NO 11-14, todos los enlaces son enlaces fosfodiéster o fosforotioato.

SEQ ID NO: 1 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 3'

SEQ ID NO: 2 5' T*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G
 20 3'

SEQ ID NO: 3 5'
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G*T 3'

SEQ ID NO: 4 5'
 JU*C_G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3'

SEQ ID NO: 6 5' JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*
G*T 3'

5 SEQ ID NO: 7 5'

EU*C G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G 3'

SEQ ID NO: 8 5' JU*C_G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*
G*T 3'

SEQ ID NO: 9 5' JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*
G*T 3'

SEQ	ID	NO:	10	5'
T*C G*T*C G*A*C G*A*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*C*G 3'				

SEQ ID NO: 11 5'-UUGUUGUUGUUGUUGUUGUU-3'

SEQ ID NO: 12 5'-UUAUUUUAUUUUAUUUUAUU-3'

15 SEO ID NO: 13 5'-AAACGCUCAGCCAAAGCAG-3'

SEQ ID NO: 14 5'-dTdCdGdTdCdGdTdTdTdTrGrUrUrGrUrGrUdTdTdTdT-

3'

La dosis de oligonucleótidos inmunoestimulantes para usarse en las composiciones adyuvantes en última instancia depende de la especie deseada.

Por ejemplo, en determinadas modalidades adecuadas para ganado, ovejas o cerdos adultos, una dosis de la composición adyuvante de la presente invención comprendería entre alrededor de 50 y 400 μg (p. ej., 50-300, o 100-250 μg , o

alrededor de 50 a alrededor de 100 μg para cerdos adultos y alrededor de 100 a alrededor de 250 μg para ganado) del oligonucleótido inmunoestimulante.

En determinadas modalidades adecuadas para los animales de
5 compañía o cerditos, una dosis de la composición adyuvante de la presente invención comprendería entre alrededor de 5 y 100 μg (p. ej., 10-80 μg o 20-50 μg) del oligonucleótido inmunoestimulante.

En determinadas modalidades adecuadas para las aves de
10 corral, una dosis de la composición adyuvante de la presente invención sería entre alrededor de 0.1 y 5 μg (p. ej., 0.5-3 μg o 0.9-1.1 μg) del oligonucleótido inmunoestimulante.

Los métodos para hacer liposomas son conocidos en la técnica. Brevemente, los componentes del liposoma se disuelven y
15 mezclan en un solvente orgánico, p. ej., cloruro de metileno y luego el solvente se retira secando para proporcionar una película. La película se rehidrata luego usando un medio acuoso (p. ej., agua o un amortiguador) que opcionalmente contiene compuestos que se deben incorporar en el
20 compartimiento interno de los liposomas. En modalidades diferentes, los compuestos pueden incluir oligonucleótidos inmunoestimulantes, otros inmunomoduladores y/o el componente de antígeno.

El paso de rehidratación es seguido de sonicación y/o

extrusión para reducir el tamaño de las vesículas formadas durante el paso de rehidratación.

Hay dos técnicas principales de sonicación: sonicación de sonda/punta y sonicación de baño. La sonicación de sonda/punta tiene una entrada de energía alta que provoca una generación de calor considerable, por lo que necesita el uso de un baño de hielo para mantener la temperatura de la dispersión liposomal para evitar la degradación lipídica. De manera alternativa, la energía ultrasónica puede otorgarse indirectamente a la suspensión de liposoma usando un sonicador de baño, donde es más fácil controlar la temperatura pero la pérdida de energía es comparativamente alta. La sonicación generalmente proporciona vesículas pequeñas (~10 nm) que se fusionan espontáneamente con el tiempo para aliviar la tensión de la alta curvatura de membrana.

El método de extrusión implica pasar la suspensión de liposomas a través de una membrana con un tamaño de poro definido. Este método es ventajoso porque el tamaño de poro definido fomenta la homogeneidad del tamaño de partículas dentro de la población de liposomas, pese a que la extrusión a una temperatura menor que la transición lipídica puede ser difícil debido a la rigidez de la membrana. Las suspensiones de liposomas se extruyen frecuentemente múltiples veces para

lograr una baja polidispersidad en el producto final.

Puede ser conveniente preparar una preparación de liposomas estable al almacenamiento. En determinadas modalidades, esta preparación de liposomas estable al almacenamiento se crea
5 mediante liofilización. Brevemente, la película seca descrita anteriormente se rehidrata en un amortiguador acuoso que contiene un crioprotector y lioprotector como sucrosa, trehalosa o una combinación de estos. En otras modalidades, el crioprotector y lioprotector se agregan luego del paso de
10 rehidratación. Luego la preparación rehidratada se liofiliza usando métodos conocidos en la técnica. La preparación liofilizada resultante es estable al almacenamiento. En el momento deseado, se puede volver a hidratar con un amortiguador adecuado.

15 Pueden agregarse inmunomoduladores adicionales incluyendo, de modo no taxativo, los oligonucleótidos inmunoestimulantes y uno o más antígenos ya sea antes del liofilizado o en el momento de la preparación final.

En determinadas modalidades, los antígenos se mezclan con la
20 formulación liposomal luego de que los liposomas de la presente invención se reconstituyen. En otras modalidades, los liposomas, los inmunomoduladores adicionales y el componente antigénico se preparan y secan juntos.

En determinadas modalidades, los compuestos

inmunoestimulantes adicionales están presentes en las composiciones de la presente invención. Estos compuestos inmunoestimulantes adicionales pueden estar presentes en el compartimiento interno de los liposomas y/o asociados con la superficie exterior de los liposomas y/o independientemente de los liposomas, en las composiciones adyuvantes de la presente invención.

Ejemplos no taxativos adecuados de estos compuestos inmunoestimulantes adicionales incluyen, de modo no taxativo, varias clases de adyuvantes como sales minerales, p. ej., alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio; agentes tensioactivos y micropartículas, p. ej., tensioactivos de polímero de bloque no iónico, virosomas, saponinas (p. ej., Quil A, QS-21 y GPI-0100), proteosomas, complejos inmunoestimulantes, cocleatos, piridina, vitamina A, vitamina E; productos bacterianos como el sistema de adyuvante RIBI (Ribi Inc.), esqueleto de la pared celular de *Mycobacterium phlei* (Detox[®]), muramil dipéptidos (MDP) y tripéptidos (MTP), monofosforil lípido A (MPLA), *Bacillus Calmete-Guerin* (BCG), enterotoxinas de *E. coli* lábiles al calor, toxina de cólera, trehalosa dimicolato, citocinas y hormonas, p. ej., interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18), factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos, dehidroepiandrosterona, 1,25-dihidroxi

- vitamina D₃; polianiones, p. ej., dextrano; poliacrílicos (p. ej., polimetilmetacrilato, CARBOPOL®934P); portadores p. ej., toxoide tétano, toxoide difteria, subunidad B de toxina de cólera, enterotoxina lábil al calor mutante de E. coli enterotoxigénico (rmLT), proteínas de choque de calor; emulsiones de aceite en agua p. ej., AMPHIGEN® (Hydronics, EUA); portadores policatiónicos (p. ej., DEAE dextrano o QAE dextrano) y emulsiones de agua en aceite como, p. ej., adyuvantes completo e incompleto de Freund.
- 10 Otros inmunomoduladores adecuados incluyen Alpha-Gal-Cer. LPS, ácidos lipoteicoicos, poly I:C, flagelina, cimosano, chitina y formas modificadas de chitina, beta-glucanos, avridina, inulina y formas modificadas de inulina, anhídridos etilen málicos, plurónicos como L121 y L141, agonista de
- 15 CD40, agonista de TLR5 así como cualquier agonista de TLR.

Antígenos y enfermedades

- En determinadas modalidades, la composición adyuvante liposomal de la presente invención puede combinarse con un componente antigénico formando así la composición de vacuna
- 20 de la presente invención. El componente antigénico de las vacunas de la presente invención puede estar presente en el compartimiento interno de los liposomas y/o asociado con la superficie exterior de los liposomas y/o independientemente de los liposomas.

En determinadas modalidades, la composición de vacuna está sustancialmente libre de saponina. En modalidades adicionales, la composición de vacuna está esencialmente libre de desoxirribonucleótido CpG.

- 5 Las modalidades donde la composición de vacuna está esencialmente libre de desoxirribonucleótido CpG se prefieren si el antígeno en la vacuna contiene secuencias de virus de ARNcs entero (ya sea un virus (+)ARNcs o un virus (-)ARNcs) que son inmunoestimulantes pese a que se dirigen a TLR7/8.
- 10 Estas secuencias estimulantes de TLR 7/8 incluyen secuencias ARNcs ricas en polyU o GU. Heil F, Hemmi H. et ál., 2004. *Science* 303(5663):1526-9. Diebold SS., Kaisho T. et ál., 2004. *Science* 303(5663):1529-31.

Los virus que contienen tales secuencias incluyen, de modo no

15 taxativo, diferentes virus de gripe (p. ej., virus de la gripe bovina, virus de la gripe canina, virus de la gripe equina, virus de la gripe porcina y similares). En modalidades particularmente preferidas, el componente antigénico de vacuna esencialmente libre de ODN CpG contiene

20 virus de la gripe.

Un componente antigénico puede incluir, en diferentes ejemplos de modalidades, antígenos bovinos, antígenos caprinos, antígenos porcinos, antígenos de aves de corral, antígenos equinos, antígenos caninos, antígenos equinos y

antígenos felinos.

- Los antígenos pueden ser cualquiera de una amplia variedad de sustancias capaces de producir una respuesta inmunitaria deseada en un sujeto incluyendo, de modo no taxativo, uno o
- 5 más de virus (inactivados, atenuados y modificados vivos), bacterias, parásitos, nucleótidos (incluyendo, de modo no taxativo, antígenos basados en ácido nucleico, p. ej., vacunas de ADN o vacunas de ARNm), polinucleótidos, péptidos, polipéptidos, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos,
- 10 extractos de proteínas, células (incluyendo células tumorales), tejidos, polisacáridos, carbohidratos, ácidos grasos, ácido lipoteicoico, peptidoglicanos, lípidos o glicolípidos, individualmente o en cualquier combinación de estos.
- 15 Los antígenos usados con los adyuvantes de la invención también incluyen fragmentos inmunogénicos de nucleótidos, polinucleótidos, péptidos, polipéptidos, que se pueden aislar de los organismos a los que se hace referencia en la presente, o fabricados química o biológicamente.
- 20 Las cepas virales vivas, modificadas vivas y atenuadas virales que no causan enfermedades en un sujeto se aislaron en una forma no virulenta o se atenuaron usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo el pasaje serial en una línea celular adecuada o exposición a luz ultravioleta o un

mutágeno químico. Las cepas virales inactivadas o destruidas son las que se inactivaron por métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo el tratamiento con formalina, beta-propiolactona (BPL), peróxidos, etilenimina
5 binaria (BEI), radiación de esterilización, calor u otros métodos similares.

Dos o más antígenos pueden combinarse para producir una composición polivalente que puede proteger a un sujeto contra una amplia variedad de enfermedades provocadas por patógenos.
10 Actualmente, los fabricantes comerciales de vacunas, así como los usuarios finales, prefieren los productos de vacuna polivalente. Si bien los adyuvantes convencionales se limitan frecuentemente en la variedad de antígenos con los que se pueden usar de manera eficaz (ya sea monovalente o
15 polivalentemente), los adyuvantes descritos en la presente pueden usarse de manera eficaz con una amplia gama de antígenos, tanto monovalente como polivalentemente. Por lo tanto, los antígenos descritos en la presente pueden combinarse en una única composición que comprende los
20 adyuvantes descritos en la presente.

Ejemplos de bacterias que pueden usarse como antígenos con las composiciones adyuvantes descritas en la presente incluyen, de modo no taxativo *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*,

Aeromonas hydrophila, Alicyclobacillus acidocaldarius,
 Arhaeglobus fulgidus, Bacillus pumilus, Bacillus
 stearothermophilus, Bacillus subtilis, Bacillus
 thermocatenulatus, Bordetella bronchiseptica, Burkholderia
 5 cepacia, Burkholderia glumae, Campylobacter coli,
 Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Campylobacter
 hyointestinalis, Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis,
 Chlamydophila spp., Chromobacterium viscosum, Erysipelothrix
 rhusiopathiae, Listeria monocytogenes, Ehrlichia canis,
 10 Escherichia coli, Haemophilus gripee, Haemophilus somnus,
 Helicobacter suis, Lawsonia intracellularis, Legionella
 pneumophila, Moraxella sp., Mycobacterium bovis, Mycoplasma
 hyopneumoniae, Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC,
 Clostridium perfringens, Odoribacter denticanis, Pasteurella
 15 (Mannheimia) haemolytica, Pasteurella multocida, Photorhabdus
 luminescens, Porphyromonas gulae, Porphyromonas gingivalis,
 Porphyromonas salivosa, Propionibacterium acnes, Proteus
 vulgaris, Pseudomonas wisconsinensis, Pseudomonas aeruginosa,
 Pseudomonas fluorescens C9, Pseudomonas fluorescens SIKW1,
 20 Pseudomonas fragi, Pseudomonas luteola, Pseudomonas
 oleovorans, Pseudomonas sp B11-1, Alcaliges eutrophus,
 Psychrobacter immobilis, Rickettsia prowazekii, Rickettsia
 rickettsii, Salmonella enterica all serovars, incluyendo por
 ejemplo: Salmonella enterica Typhimurium, Salmonella enterica

Bongori, *Salmonella enterica* Dublin, , *Salmonella enterica* Choleraesuis, y *Salmonella enterica* Newport, *Serratia marcescens*, *Spirulina platensis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*,
5 *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Syechocystis* sp., *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema phagedenis*, *Treponema*
10 *refringens*, *Treponema vincentii*, *Treponema palladium*, *Trueperella pyogenes* y la especie *Leptospira*, como los patógenos conocidos *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira borgpetersenii* *hardjo-bovis*, *Leptospira borgpetersenii* *hardjo-prajitno*,
15 *Leptospira interrogans*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona* y *Leptospira bratislava* y combinaciones de estos.

En las composiciones adyuvantes se pueden usar tanto virus inactivados como virus atenuados. Algunos ejemplos de virus
20 que pueden usarse como antígenos incluyen, de modo no taxativo, herpesvirus aviar, herpesvirus bovino, herpesvirus canino, herpesvirus equino, virus de rinotraqueítis felina viral, virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus ovino, herpesvirus porcino, virus de la diarrea epidémica porcina

(PEDv), virus de la pseudorabia, paramixovirus aviar, virus sincitial respiratorio bovino, virus del moquillo canino, virus de la paragripe canina, adenovirus canino, parvovirus canino, virus de la paragripe bovina 3, paragripe ovina 3, 5 virus de la peste bovina, virus de la enfermedad de frontera, virus de la diarrea viral bovina (BVDV), BVDV tipo I, BVDV tipo II, virus de la fiebre porcina clásica, virus de la leucosis aviar, virus de la inmunodeficiencia bovina, virus de la leucemia bovina, tuberculosis bovina, virus de la 10 anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la leucemia felina (FeLV), virus de enfermedad de Newcastle, virus de la neumonía progresiva ovina, virus del adenocarcinoma pulmonar, coronavirus canino (CCV), CCV pantrópico, coronavirus respiratorio canino, 15 coronavirus bovino, Calicivirus felino, coronavirus entérico felino, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la encefalomiелitis de hemaglutinina porcina, parvovirus porcino, Circovirus porcino (PCV) tipo I, PCV tipo II, virus del síndrome reproductivo y 20 respiratorio porcino (PRRS), virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus del pavo, virus de la fiebre efímera bovina, rabia, Rotavirus, virus de estomatitis vesicular, lentivirus, gripe aviar, rinovirus, virus de la gripe equina, virus de la gripe porcina, virus de la gripe

canina, virus de la gripe felina, virus de la gripe humana, virus de la encefalitis equina oriental (EEE, por sus siglas en inglés), virus de la encefalitis equina venezolana, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano, virus de varicela zoster, virus de la hepatitis B, rinovirus y virus del sarampión y combinaciones de estos.

Ejemplos de antígenos peptídicos incluyen Bordetella bronchiseptica p68, GnRH, péptidos IgE, Fel d1 y antígenos cancerígenos y combinaciones de estos. Ejemplos de otros antígenos incluyen nucleótidos, carbohidratos, lípidos, glicolípidos, péptidos, ácidos grasos, ácido lipoteicoico y teicoico y peptidoglicanos y combinaciones de estos.

Ejemplos de parásitos que se pueden usar como antígenos con las composiciones adyuvantes descritas en la presente incluyen, de modo no taxativo, Anaplasma, Fasciola hepatica (tremátodo hepático), Coccidia, Eimeria spp., Neospora caninum, Toxoplasma gondii, Giardia, Dirofilaria (gusanos del corazón), Ancylostoma (anquilostoma), Cooperia, Haemonchus contortus (lombriz grande del cuajo), Ostertagia ostertagi (gusano del estómago), Dictyocaulus viviparous (gusano del pulmón), Trypanosoma spp., Leishmania spp., Trichomonas spp., Cryptosporidium parvum, Babesia, Schistosoma, Taenia,

Strongyloides, Ascaris, Trichinella, Sarcocystis, Hammondia e Isopora y combinaciones de estos. También se contemplan parásitos externos incluyendo, de modo no taxativo, garrapatas, incluyendo las especies Ixodes, Rhipicephalus, Dermacentor, Amblyomma, Boophilus, Hyalomma y Haemaphysalis y combinaciones de estos.

La cantidad de antígeno usado para inducir una respuesta inmunitaria variará considerablemente dependiendo del antígeno usado, el sujeto y el nivel de respuesta deseado y se puede determinar por un experto en la técnica. Para las vacunas que contienen virus vivos modificados o virus atenuados, una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno generalmente varía de alrededor de 10^2 de dosis infecciosa del cultivo tisular (TCID₅₀) a alrededor de 10^{10} TCID₅₀, inclusive. Para muchos de estos virus, una dosis terapéuticamente eficaz se encuentra generalmente en el intervalo de alrededor de 10^2 TCID₅₀ a alrededor de 10^8 TCID₅₀, inclusive. En algunas modalidades, los intervalos de dosis terapéuticamente eficaces son alrededor de 10^3 TCID₅₀ a alrededor de 10^6 TCID₅₀, inclusive. En algunas otras modalidades, los intervalos de dosis terapéuticamente eficaces son alrededor de 10^4 TCID₅₀ a alrededor de 10^5 TCID₅₀, inclusive.

Para las vacunas que contienen virus inactivados, una

cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno es generalmente al menos alrededor de 100 unidades relativas por dosis y frecuentemente en el intervalo de 1,000 a alrededor de 4,500 unidades relativas por dosis, inclusive. En otras

5 modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno se encuentra en un intervalo de alrededor de 250 a alrededor de 4,000 unidades relativas por dosis, inclusive, de alrededor de 500 a alrededor de 3,000 unidades relativas por dosis, inclusive, de alrededor de 750 a alrededor de 2,000

10 unidades relativas por dosis, inclusive, o de alrededor de 1,000 a alrededor de 1,500 unidades relativas por dosis, inclusive.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de antígeno en vacunas que contienen virus inactivados también puede medirse en

15 términos de potencia relativa (RP, por sus siglas en inglés) por mL. Una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra frecuentemente en el intervalo de alrededor de 0.1 a alrededor de 50 RP por mL, inclusive. En otras modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno se encuentra

20 en un intervalo de alrededor de 0.5 a alrededor de 30 RP por mL, inclusive, de alrededor de 1 a alrededor de 25 RP por mL, inclusive, de alrededor de 2 a alrededor de 20 RP por mL, inclusive, de alrededor de 3 a alrededor de 15 RP por mL, inclusive, o de alrededor de 5 a alrededor de 10 RP por mL,

inclusive.

La cantidad de células para un antígeno bacteriano administrado en una vacuna varía de alrededor de 1×10^6 a alrededor de 5×10^{10} unidades formadoras de colonias (CFU, por sus siglas en inglés) por dosis, inclusive. En otras modalidades, la cantidad de células varía de alrededor de 1×10^7 a 5×10^{10} CFU/dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^8 a 5×10^{10} CFU/dosis, inclusive. En todavía otras modalidades, la cantidad de células varía de alrededor de 1×10^2 a 5×10^{10} CFU/dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^4 a 5×10^9 CFU/dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^5 a 5×10^9 CFU/dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^6 a 5×10^9 CFU/dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^6 a 5×10^8 CFU/dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^7 a 5×10^9 CFU/dosis, inclusive.

La cantidad de células para un antígeno parasitario administrado en una vacuna varía de alrededor de 1×10^2 a alrededor de 1×10^{10} por dosis, inclusive. En otras modalidades, la cantidad de células varía de alrededor de 1×10^3 a alrededor de 1×10^9 por dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^4 a alrededor de 1×10^8 por dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^5 a alrededor de 1×10^7 por dosis, inclusive, o de alrededor de 1×10^6 a alrededor de 1×10^8 por dosis, inclusive.

Excipientes

La formulación de adyuvante y/o las composiciones de vacuna pueden incluir un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente, «portador farmacéuticamente aceptable» incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retardan la adsorción y similares. El o los portadores deben ser «aceptables» en el sentido de que sean compatibles con los otros componentes de las composiciones y no perjudiciales para el sujeto. Típicamente, los portadores serán estériles y libres de pirógenos y se seleccionarán en función del modo de administración que se quiere usar. Los expertos en la técnica saben que las formulaciones preferidas para el portador farmacéuticamente aceptable que comprende las composiciones son aquellos portadores farmacéuticos aprobados en las regulaciones aplicables promulgadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (US) o la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, o una agencia gubernamental equivalente en un país fuera de Estados Unidos. Por lo tanto, el portador farmacéuticamente aceptado para la producción comercial de las composiciones es un portador que ya está aprobado o será aprobado por la agencia gubernamental apropiada en EUA o un país extranjero.

Administración de las composiciones

Los tamaños de dosis de las composiciones típicamente variarán de alrededor de 1 mL a alrededor de 5 mL, inclusive, dependiendo del sujeto y el antígeno. Por ejemplo, para un
5 canino o felino, típicamente se usa una dosis de alrededor de 1 mL, mientras que en el ganado típicamente se usa una dosis de alrededor de 2-5 mL. Sin embargo, estos adyuvantes también se pueden formular en microdosis, donde se pueden usar dosis de alrededor de 100 µL.

10 Las vías de administración de las composiciones adyuvantes incluyen la administración parenteral, oral, oronasal, intranasal, intratraqueal, subcutánea, intramuscular, transcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraocular, intravenosa e in ovo. Se puede usar cualquier dispositivo
15 adecuado para administrar las composiciones incluyendo jeringas, cuentagotas, dispositivos de inyección sin aguja, parches y similares. La vía y el dispositivo seleccionados para usarse dependerá de la composición de adyuvante, el antígeno y el sujeto y estos son conocidos por el experto en
20 la técnica.

Uso de las composiciones

Las formulaciones adyuvantes descritas en la presente son fáciles de fabricar y estables por al menos 18 meses a 4 °C. Las formulaciones pueden ser estables, por ejemplo, por

alrededor de 18 meses o alrededor de 18 a alrededor de 24 meses a 4 °C. En otra modalidad, las formulaciones son estables por al menos alrededor de 24 meses a 4 °C. Los procedimientos de evaluación acelerados también indican que
5 las formulaciones descritas en la presente son estables por al menos dos semanas a 37 °C, lo que corresponde a alrededor de 24 meses a 4 °C.

Las composiciones adyuvantes descritas en la presente pueden administrarse de manera segura y eficaz a un amplio rango de
10 sujetos. Se ha descubierto de manera sorprendente que las composiciones adyuvantes descritas en la presente demuestran mejoras en la seguridad en comparación con otras composiciones adyuvantes.

Los siguientes ejemplos se presentan como modalidades
15 ilustrativas pero no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la invención. Muchos cambios, variaciones, modificaciones y otros usos y aplicaciones de esta invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

EJEMPLOS

20 *Ejemplo 1 - Caracterización de liposomas*

Los liposomas DCRL (que contienen **DDA**, **Colesterol**, Bay®**R1005** y **Lecitina**) se ajustaron a una concentración final de 50, 50, 100 y 100 µg/mL de DDA, colesterol, R1005 y lecitina de soja, respectivamente.

Los compuestos se agregaron a un matraz de fondo redondo de 250 mL y se llenaron a un volumen final de 5 mL con cloroformo de grado anhidro (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, Reino Unido) usando 1 mL de puntas de pipeta Solvent Safe™ (Sigma-Aldrich). El solvente se retiró usando un evaporador giratorio (Büchi, Flawil, Swiza) a 55 °C al vacío (KNF Neuberger, Witney, Oxfordshire, Reino Unido) durante 1 hora hasta que se formó una película de lípidos blanca y seca. Los liposomas se rehidrataron con agua doble destilada (ddH₂O) de un purificador de agua Option 3 modificado internamente que incluye ósmosis inversa para una pureza ultra alta (ELGA LabWater, Wycombe, Buckinghamshire, Reino Unido) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS; Sigma-Aldrich) reconstituida de comprimidos con ddH₂O.

Luego de la rehidratación, los liposomas se manipularon con puntas de pipeta de orificio de 1 mL de ancho (VWR, Lutterworth, Leicestershire, Reino Unido) para reducir los cortes. Luego, la suspensión de liposomas se sometió a sonicación en un baño (Sarose Scientific Instruments, Perivale, Middlesex, Reino Unido) durante 1 hora y/o se extruyó hasta 3 veces a través de una membrana grabada con rastro de nucleoporo Whatman® de policarbonato de 100 nm (Sigma-Aldrich) usando una mini celda de extrusión equipada con dos jeringas de 1 mL. La membrana de policarbonato se

flanqueó con soportes de filtro de 10 mm.

Los liposomas DCRL sometidos a sonicación (1.14 μm de diámetro promedio) fueron considerablemente mayores (5.44 veces) que los liposomas extruidos. La sonicación seguida de
5 extrusión no afectó considerablemente el tamaño de las vesículas en comparación con las muestras extruidas (209.6 nm). La polidispersidad de los liposomas extruidos fue 2.10 veces menor que la de los liposomas sometidos a sonicación. Una combinación de sonicación y extrusión aumentó
10 considerablemente la polidispersidad de DCRL 1.42 veces en comparación con los liposomas extruidos.

Para evaluar la estabilidad coloidal de los liposomas en solución acuosa, los liposomas DCRL hidratados en ddH₂O se evaluaron durante 4 semanas. Cabe destacar que un equivalente
15 aproximadamente termodinámico de 2 años a 4 °C es el almacenamiento durante 4 semanas a 37 °C, motivando así la evaluación de la estabilidad del producto tanto a 4 como a 37 °C. Tanto los liposomas DCRL vacíos («-ODN») como los liposomas DCRL cargados con un ejemplo de oligonucleótido ODN
20 CpG inmunoestimulante («+ODN») se evaluaron para determinar el efecto de los ácidos nucleicos aniónicos en la estabilidad coloidal liposomal catiónica. En este caso, ODN se cargó mediante la rehidratación de la película de lípidos con una solución de ddH₂O y ODN. El tamaño y la polidispersidad de

los liposomas DCRL hidratados en ddH₂O (177 nm, 0.24) fue estadísticamente similar a los de aquellos hidratados en PBS (210 nm, 0.17).

A 4 °C, los liposomas DCRL +/-ODN se sometieron a aumentos insignificantes de 1.10 y 1.01 veces del diámetro luego de 28 días, respectivamente. Los liposomas que contenían ODN (liposomas +ODN) (417 nm) fueron considerablemente mayores que los liposomas que carecían de ODN (liposomas -ODN) (177 nm). De manera similar, la polidispersidad se redujo modestamente 1.08 y 1.03 veces para los liposomas +/-ODN luego de 28 días, respectivamente, pese a que la polidispersidad el día 28 fue significativamente mayor en los liposomas +ODN (1.23 veces) en comparación con sus equivalentes -ODN.

Por el contrario, el comportamiento de agregación de los liposomas se observó luego de 28 días al almacenarse a 37 °C. Los liposomas +/-ODN se sometieron a aumentos significativos de 3.24 y 2.00 veces en el diámetro luego de 28 días, respectivamente, pero se estabilizaron luego del día 21. Si bien los liposomas +ODN eran más grandes (1.46 veces el día 28) que los liposomas -ODN debido a la compensación de carga mediada por ODN y la pérdida de estabilidad coloidal, las tendencias de estabilidad con el tiempo fueron cualitativamente similares. Sin embargo, la desestabilización

de los liposomas +ODN ocurrió luego del día 7, mientras que en los liposomas -ODN, la estabilidad se mantuvo hasta después del día 14. Además, las polidispersidades de los liposomas +/-ODN fueron estadísticamente similares luego de 5 28 días, habiéndose sometido a reducciones significativas en la polidispersidad de 1.92 y 1.50 veces, respectivamente, en comparación con las vesículas el día 0.

Estos resultados sugieren la necesidad de desarrollar tecnologías para conservar el liposoma y también sugieren que 10 las técnicas de sonicación y/o extrusión más potentes que resulten en un tamaño de liposoma inicialmente menor pueden compensar la agregación inicial de liposomas.

Se compararon los tamaños de los liposomas preparados usando microfluidización (Microfluidics Corp., Modelo 110EH) y 15 sonicación. Cuando el paso de sonicación fue reemplazado por microfluidización, la formulación proporcionó liposomas con un diámetro promedio de alrededor de 59 nm.

Estos resultados demuestran que los liposomas preparados usando microfluidización pueden minimizar la agregación de 20 los liposomas que posiblemente podría ser provocada por la adición de ODN u ORN.

Ejemplo 2 - Estabilidad de los liposomas liofilizados

La liofilización se llevó a cabo usando un liofilizador Dura-Stop (SP Scientific, Ipswich, Suffolk, Reino Unido). Las

muestras se llenaron en viales de liofilización de vidrio tubulares de tipo I de 10 mL (Schott, Stafford, Staffordshire, Reino Unido) antes de la liofilización. Los parámetros del ciclo de liofilización fueron los siguientes:

5 Las muestras se congelaron durante 30 minutos a 5 °C, 30 minutos a -5 °C y 60 minutos a -40 °C, todos a una velocidad de aumento de 1.00 °C/min. El secado inicial se llevó a cabo durante 59 minutos a -37 °C, 59 minutos a -28 °C, 59 minutos a -23 °C y 552 minutos a -21 °C, todos a una velocidad de
10 aumento de 0.50 °C/min. El secado secundario se llevó a cabo a 20 °C durante 360 minutos a una velocidad de aumento de 0.10 °C/min. Todos los secados se llevaron a cabo con una presión de cámara de 57 mTorr. Se llevó a cabo un ciclo de secado primario alterno a 57 mTorr durante 59 minutos a -38
15 °C, 59 minutos a -38 °C, 59 minutos a -37 °C y 552 minutos a -35 °C, todos a una velocidad de aumento de 0.50 °C/min. Las muestras liofilizadas se sellaron con tapones de liofilización de goma de butilo de grado farmacéutico de 14 mm (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, Reino
20 Unido) y Parafilm M[®] (Sigma-Aldrich).

Los lioprotectores D-manitol, D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa, sucrosa, D-(+)-trehalosa dihidrato (Sigma-Aldrich) o D(+)-manosa (Acros Organics) se solubilizaron en ddH₂O o PBS y se agregaron a una suspensión de liposomas a una concentración

final de 2-4% p/v antes de la liofilización como se indica.

En ausencia de azúcares, los liposomas rehidratados en ddH₂O y PBS constituían ~210 nm antes de la liofilización. Sin lioprotectores, la liofilización aumentó el tamaño de los liposomas 3.55 y 6.05 veces en las muestras rehidratadas en ddH₂O y PBS, respectivamente. Los liposomas DCRL rehidratados en ddH₂O o PBS no sufrieron cambios significativos en el tamaño luego de la adición de 3% de sucrosa, 4% de manitol o una combinación, lo que demuestra que la agregación observada después de la liofilización no fue provocada directamente por la adición de uno o más lioprotectores.

Para los liposomas rehidratados en PBS, el tamaño de los liposomas aumentó significativamente (2.00 veces) solo en las muestras sin lioprotector después del ciclo de congelado. Sin embargo, luego del ciclo de liofilización completo, el tamaño de los liposomas aumentó significativamente 6.05, 3.03, 5.15 y 4.13 veces para las muestras sin lioprotector, con 3% de sucrosa, con 4% de manitol y con una combinación, respectivamente. De manera similar, la polidispersidad aumentó significativamente 2.61, 2.61, 2.85 y 2.79 veces para DCRL sin lioprotector, con 3% de sucrosa, con 4% de manitol y con una combinación, respectivamente, en comparación con los controles liofilizados previamente.

Para los liposomas rehidratados en ddH₂O, el tamaño de

vesículas después del ciclo de congelado aumentó significativamente en comparación con los controles previos a la liofilización 17.90 y 11.45 veces para los liposomas sin lioprotectores y con 4% de manitol, respectivamente, mientras
5 que los liposomas con 3% de sucrosa o una combinación de 3% de sucrosa y 4% de manitol sufrió cambios insignificantes. Luego del ciclo de liofilización completo, los tamaños de los liposomas cambiaron un poco, 3.55, 0.88, 3.48 y 1.47 veces para las muestras sin lioprotector, con 3% de sucrosa, con 4%
10 de manitol y con una combinación, respectivamente.

Estos hallazgos demuestran que los liposomas rehidratados en ddH₂O tienen mejor estabilidad coloidal en comparación con los rehidratados en PBS como lo demuestra el tamaño de vesículas que no cambió después de la liofilización y que 3%
15 de sucrosa puede ser un lioprotector más ideal para otorgar buena estabilidad coloidal.

Para lograr la optimización de un esquema de liofilización para liposomas DCRL rehidratados con ddH₂O, se evaluó el efecto de 6 lioprotectores de azúcar conocidos
20 (individualmente y en combinación) a 2% p/v en el tamaño de vesículas y la polidispersidad.

Sucrosa, glucosa, manitol, trehaolosa, fructosa y manosa se evaluaron como lioprotectores. Solo 2% de manitol como lioprotector aumentó significativamente el tamaño de

vesículas (39.66 veces) y la polidispersidad (2.95 veces).

Sin embargo, mientras que la liofilización con todos los otros azúcares no resultó en un cambio apreciable en el tamaño, los productos lioprotegidos con glucosa, fructosa y/o manosa colapsaron en capas compactas e impermeables de azúcar y liposomas, que fueron difíciles de rehidratar. Conforme a la literatura, los liposomas lioprotegidos con sucrosa o trehalosa evitaron el cambio en el tamaño de partículas y resultaron en una torta que se podía reconstituir en una dispersión liposomal con buena estabilidad coloidal.

DCRL también se liofilizó con combinaciones de azúcares. Este estudio reveló que solo 2% de sucrosa, 2% de trehalosa y 2% de sucrosa/2% de trehalosa soportaron una buena estabilidad coloidal después de la liofilización y lograron una estructura de torta farmacéuticamente elegante. Sin embargo, la combinación de 2% de sucrosa/2% de trehalosa no pareció ser ventajosa en términos de la estabilidad del tamaño de los liposomas y la polidispersidad en comparación con la lioprotección con 2% de sucrosa o 2% de trehalosa solo.

20 *Ejemplo 3 -Vacuna IBR/ BVDV*

Se ha informado que el adyuvante Quil A provoca una respuesta inmunitaria sistémica frecuentemente acompañada de fiebre transitoria. Se cree que esta fiebre está asociada con una caída en el rendimiento de la leche en las vacas lactantes.

El objetivo de este estudio era evaluar los efectos de los liposomas libres de saponina en la respuesta inmunitaria provocada por los liposomas y los posibles efectos secundarios provocados por los adyuvantes.

5 Se usaron terneros machos Holstein de ocho meses de edad para este estudio. Los potenciales animales de prueba se analizaron serológicamente y los que tenían titulaciones de neutralización de suero (SN, por sus siglas en inglés) <1:2 para BVDV-1 y BVDV-2 cumplían con los requisitos para
10 registrarse en el estudio. Además, los animales no estaban constantemente infectados (PI, por sus siglas en inglés) con BVDV como se determinó por biopsia de punzón de oreja e inmunohistoquímica. Los animales se alojaron en un ambiente con temperatura y humedad controladas y recibieron alimento y
15 agua a demanda.

La aclimatación comenzó alrededor de una semana antes del día de estudio 0. Los terneros recibieron DRAXXIN[®] y DECTOMAX[®] antes del envío.

Los animales de prueba moribundos, lesionados o que murieron
20 debido a condiciones no relacionadas con la investigación se excluyeron del estudio y los análisis de datos relevantes. Los animales moribundos se sometieron a eutanasia.

Los animales se vacunaron los días cero y 28 por administración subcutánea de 2 ml de las vacunas como se

resume en la Tabla 1.

Tabla 1

	Grupo	N	VACUNACIÓN	
			Vacuna	Adyuvante (por dosis)
5	T01	9	Solución salina	Ninguno
10	T02	9	Adyuvante que contiene Quil A +mBVDV $\frac{1}{2}$ +mIBR	Quil A (250 μ g), Colesterol (250 μ g), DDA (100 μ g), CARBOPOL® (0.0375% v/v), BAYR1005® acetato (1,000 μ g), CpG (SEQ ID NO: 8, 65% de homogeneidad, 100 μ g)
15	T03	9	DCRL+mBVDV $\frac{1}{2}$ +mIBR	Liposomas que contienen colesterol (250 μ g), DDA (250 μ g), R1005 acetato (500 μ g), lecitina (500 μ g)
	T04	9	DCRL-ORN (bajo) +mBVDV $\frac{1}{2}$ +mIBR	Liposomas DCRL como en T03, 25 μ g ORN.
20	T05	9	DCRL+CpG+ORN +mBVDV $\frac{1}{2}$ +mIBR	Liposomas DCRL como en T03, 100 μ g ORN (SEQ ID NO: 11, con enlaces fosforotioato), CpG (SEQ ID NO: 8, 65% de homogeneidad).
	T06	9	DCRL-ORN (alto) +mBVDV $\frac{1}{2}$ +mIBR	Liposomas DCRL como en T03, 100 μ g SEQ ID NO: 11, con enlaces fosforotioato
	T07	6	Adyuvante que contiene Quil A +BVDV1 r-gp53	Adyuvante como en T02

El día 49, los animales se expusieron al virus de la diarrea viral bovina no citopática tipo 2 (cepa 24515). Cada animal recibió aproximadamente 4.88 Log₁₀TCID₅₀ por dosis en 5 ml administrado intranasalmente (2.5 ml por narina) usando un atomizador de gas comprimido.

En los grupos T02-T06, el componente antigénico contenía 4500RU/virus de BVDV $\frac{1}{2}$ modificado preinactivado e IBR modificado (8.0 log₁₀TCID₅₀).

Los animales se expusieron el día 48 con 5 ml de BVDV-2 cepa 24515 (4.88 Log₁₀TCID₅₀ por dosis) intranasalmente (2.5 ml por narina) usando un atomizador de gas comprimido.

Las medias de cuadrados mínimos y los intervalos de temperatura rectal después de la primera y segunda vacunaciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis de medias de cuadrados mínimos para temperaturas rectales en la fase de vacunación

Gru po	Período de tiempo, día									
	0	1	2	3	7	28	29	30	31	35
T01	102.4 a	102.0 ^a b	101.6 a	101 .6 ^a	102. 3 ^a	102.6 ^a b	101. 9 ^a	101.8 ^{ab}	101.9 ^b	101.8 ^a
T02	102.5 a	103.4 ^c	101.6 a	101 .6 ^a	102. 5 ^a	102.2 ^a b	103. 4 ^c	102.2 ^c	101.8 ^a b	102.1 ^b
T03	102.4 a	102.2 ^a b	101.7 a	101 .5 ^a	102. 2 ^a	102.4 ^a b	101. 9 ^a	102.0 ^{bc}	101.8 ^a b	101.9 ^a b

5

T04	102		102.	101.	101.	102.	102.	101.	101.8	101.	101.
	.5 ^a		0 ^{ab}	8 ^a	8 ^a	3 ^a	8 ^b	9 ^a	ab	8 ^{ab}	8 ^a
T05	102		101.	101.	101.	102.	102.	102.	101.8	101.	101.
	.2 ^a		8 ^a	6 ^a	7 ^a	0 ^a	4 ^{ab}	0 ^a	ab	8 ^{ab}	8 ^a
T06	102		102.	101.	101.	102.	102.	101.	101.6	101.	101.
	.1 ^a		0 ^{ab}	5 ^a	5 ^a	2 ^a	5 ^{ab}	8 ^a	ab	9 ^b	7 ^a
T07	102		102.	101.	101.	102.	102.	102.	101.5	101.	101.
	.3 ^a		4 ^b	7 ^a	5 ^a	1 ^a	0 ^a	5 ^b	a	6 ^a	8 ^a

10

Los valores con diferentes superíndices son
 15 significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Las temperaturas rectales de algunos sujetos de T02 y T07
 mostraron un aumento transitorio el día después de la primera
 y segunda vacunaciones. El aumento en las temperaturas
 rectales de los animales en el grupo T02 fue
 20 significativamente mayor ($P \leq 0.10$) que en los otros grupos
 (T01, T03, T04, T05, T06 y T07) para 1 día después de la
 primera vacunación.

Luego de la primera vacunación, cuatro de 9 animales en el
 Grupo T02 tuvieron temperaturas mayores que 103.5 °F (tres

tuvieron temperaturas mayores que 104.0 °F). Por el contrario, ningún animal en el grupo T05 tuvo temperaturas mayores que 102.5 °F un día después de la primera vacunación (no se muestran los datos).

- 5 Luego de la segunda vacunación, el aumento en las temperaturas rectales de T02 y T07 fue significativamente mayor ($P \leq 0.10$) que los controles y los vacunados (T03, T04, T05 y T06), sin embargo, las temperaturas rectales elevadas duraron poco (Tabla 2). Las respuestas individuales en el
- 10 grupo T02 variaron entre 101.1 y 104.5 °F. Cinco de nueve animales en el Grupo T02 tuvieron temperaturas mayores que 103.5 °F (y otro animal tuvo una temperatura de 103.5 °F) luego de la segunda vacunación. Solo tres de nueve animales en el grupo T02 tuvieron una temperatura menor que 103.5 °F
- 15 un día después de la segunda vacunación. Por el contrario, ninguna de las formulaciones de DCRL indujo una elevación de las temperaturas rectales a más de 103.7 °F. Las respuestas individuales en el Grupo T05 variaron de 101.4 a 102.6 °F (no se muestran los datos).
- 20 Se observó una reacción febril (>104.5 °F) en 8 de 8 animales en el grupo T01 después de la exposición; esto satisface los criterios de resultados de una exposición exitosa. Las temperaturas rectales de todos los grupos vacunados fueron significativamente menores ($P \leq 0.10$) el día 53 del estudio en

comparación con los controles (4 días después de la exposición) y hubo algunas diferencias los días posteriores (no se muestran los datos). En el grupo de control, en respuesta a la exposición, se observó una elevación bifásica
5 típica de la temperatura rectal.

La presencia de enfermedad BVDV clínica (un animal debía tener una puntuación de ≥ 2) después de la exposición se determinó de acuerdo con el siguiente sistema de puntuación:

0 - sin síntomas clínicos

10 1 - Los síntomas clínicos en conjunto no son específicos para la infección por BVD aguda. Los síntomas clínicos pueden incluir descarga nasal, respiración anormal y letargo leve.

 2 - Los síntomas clínicos en conjunto son de grado
15 moderado y específicos para la infección por BVD aguda. Los síntomas clínicos pueden incluir descarga nasal, respiración anormal, letargo, delgadez extrema, descarga ocular, hipersalivación, diarrea, deshidratación, cojera y/o reticencia a moverse.

20 3 - Los síntomas clínicos en conjunto son de grado grave y característicos de la infección por BVD aguda. Los síntomas clínicos pueden incluir descarga nasal, respiración anormal, letargo, delgadez extrema, descarga ocular, hipersalivación, diarrea, formación excesiva de hematomas,

deshidratación, posición yacente, cojera y/o reticencia a moverse.

No hubo diferencias significativas entre el grupo de control y los grupos vacunados.

5

Leucopenia

El resultado del estudio cumplió con los criterios para ser un estudio válido ya que el 100% de T01 (controles) tuvo leucopenia al usar $\geq 40\%$ de caída y 75% de los controles tuvo

10 <4000 células/ μ L. No hubo diferencias significativas entre la cantidad de animales que desarrollaron leucopenia $\geq 40\%$ de reducción en glóbulos blancos del antecedente después de la exposición en T01 en comparación con los grupos de tratamiento vacunados T02, T03, T04, T05, T06 y T07 ($P \leq 0.10$).

15 Sin embargo, la leucopenia clínica (<4000 células/ μ L) que es una definición más relevante se detectó en 6 de 8 (75%), 2 de 9 (22.2%), 1 de 8 (12.5%), 3 de 9 (33.3%), 4 de 9 (44.4%), 4 de 9 (44.4%) y 0 de 6 en T01, T02, T03, T04, T05, T06 y T07, respectivamente (Tabla 3). La duración de la leucopenia fue

20 significativamente mayor ($P \leq 0.10$) en el grupo T01 al usar una caída $\geq 40\%$ en comparación con todos los vacunados y significativamente mayor ($P \leq 0.10$) al usar <4000 μ L en comparación con los grupos vacunados T02, T03, T05, T06 y T07 (Tabla 4).

Tabla 3 Resumen de la fase de exposición a la leucopenia

5

Grupos	Leucopenia (caída del 40% o más)				Leucopenia (<4000 células por microlitro)			
	No		Sí		No		Sí	
	N	%	N	%	N	%	N	%
T01	0	0	8	100	2	25	6	75
T02	1	11.1	8	88.9	7	77.8	2	22.2
T03	2	25	6	75	7	87.5	1	12.5
T04	1	11.1	8	88.9	6	66.7	3	33.3
T05	0	0	9	100	5	55.6	4	44.4
T06	0	0	9	100	5	55.6	4	44.4
T07	2	33.3	4	66.7	6	66.7	0	0

10

15 **Tabla 4. Duración de la leucopenia**

20

5	Gru po	(caída del 40% o más)				<4000 células por microlitro			
		Medi a de LS en días	Error están dar	90%de CI Infer ior	90%de CI Superi or	Media de LS en días	Error estándar	90%de CI Inferi or	90%de CI Superior
10	T01	9.4 ^a	0.818	8	10.7	3.6 ^a	1.179	14	5.9
	T02	3.9 ^b c	0.771	2.6	5.2	0.7 ^{bc}	0.522	-0.2	1.6
	T03	3.0 ^b c	0.818	1.6	4.4	0.1 ^b	0.095	0	0.3
	T04	3.4 ^b c	0.771	2.2	4.7	0.7 ^{bc}	0.522	-0.2	1.6
	T05	4.4 ^b c	0.771	3.3	5.7	1.7 ^{ac}	0.799	0.2	3.2
15	T06	4.6 ^b	0.771	3.3	5.8	1.1 ^c	0.522	0.2	2.0
	T07	2.5 ^c	0.944	0.90	4.1	0 ^b	0.11	-0.2	0.2

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Viremia

- 20 Todas las vacunas experimentales protegían contra la viremia. En algunos grupos hubo protección completa (T02 y T05 ambos contenían CpG) y en otros parcial (T03, T04, T06 y T07). La cantidad de animales virémicos en T01 fue significativamente mayor que la cantidad en T02, T03, T04, T05, T06 y T07

($P \leq 0.10$) (Tabla 5). No se observó viremia en los grupos T02 y T05. Sin embargo, hubo una diferencia entre la cantidad de animales virémicos en los grupos T03, T04 y T06 que no contenían ORN, una baja dosis de ORN y una alta dosis de ORN en comparación con los controles.

Tabla 5. Resumen de la fase de exposición al aislamiento de virus

Grupo	Muestra siempre positiva			
	Sí		No	
	Cantidad	%	Cantidad	%
T01	0	0	8	100 ^a
T02	9	100	0	0 ^c
T03	6	75	2	25 ^{bc}
T04	4	44.4	5	55.6 ^b
T05	9	100	0	0 ^c
T06	4	44.4	5	55.6 ^b
T07	1	16.7	5	83.3 ^{ab}

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

La duración de la viremia para el grupo T01 fue significativamente mayor que todos los grupos vacunados (T02 a T07) ($P \leq 0.1$) (Tabla 6). Los terneros en T07 habían recibido una vacuna que contenía un adyuvante que contenía Quil A + antígeno gp53 recombinante de virus BVDV-1 y también estaban parcialmente protegidos y tuvieron una duración

significativamente más corta de viremia en comparación con T01. Para estos terneros la exposición fue con un biotipo diferente de virus BVDV (tipo 2) lo que refleja que había una protección cruzada parcial entre el antígeno gp53 BVDV-1 y la cepa de exposición.

Tabla 6 Días con diseminación positiva de virus

Grupo	Media de LS en días	Error estándar	90% de CI Inferior	90% de CI Superior
T01	8.1 ^a	0.451	7.4	8.9
T02	0 ^d	0.168	-0.3	0.3
T03	0.4 ^{cd}	0.178	0.1	0.7
T04	1.1 ^{bc}	0.426	0.4	1.8
T05	0 ^d	0.168	-0.3	0.3
T06	0.7 ^c	0.168	0.4	0.9
T07	2.2 ^b	0.521	1.3	3.0

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Titulaciones de SN

El día 49, antes de la exposición, todos los animales de los grupos T02 a T07 tuvieron una titulación de SN a BVDV-1, BVDV-2 y solo T02 a T06 tuvieron anticuerpos contra el antígeno IBR de $\geq 1:8$. Se consideró que todas las vacunas tenían potencia adecuada ya que cumplían con el requisito de $\geq 1:8$. Las medias de cuadrados mínimos posteriores a la

primera y segunda vacunaciones de titulaciones de SN a BVDV-1 y 2 (Día 28 y 49) se muestran en la Tabla 7. Todos los animales vacunados tuvieron titulaciones de SN significativamente mayores que el grupo de control y hubo 5 diferencias significativas entre las titulaciones de SN de los grupos vacunados. Las vacunas liposomales (T03 a T06) indujeron titulaciones de SN significativamente menores a BVDV-1 y 2 que la vacuna con adyuvante de una composición que contiene Quil A (T02). La adición de ORNS o CpG a estas 10 formulaciones no mejoró estas respuestas. La vacuna gp53 con adyuvante de una composición que contiene Quil A también indujo altas titulaciones de SN al día 49 al antígeno BVDV-1 pero menores al antígeno BVDV-2. Las titulaciones de SN de BVDV-1 del grupo T07 no fueron significativamente diferentes 15 de las titulaciones de T02 pero las titulaciones de BVDV-2 sí lo fueron. Luego de la exposición a BVDV-2, las titulaciones de SN de todos los grupos vacunados se reforzaron mientras que los terneros del grupo T01 desarrollaron respuestas de anticuerpo primario (día 63).

20 **Tabla 7. Medias de cuadrados mínimos de titulación de SN de BVDV-1a y BVDV2**

5

Grupo	BVD-1a				BVD-2			
	Día 0	Día 28	Día 29	Día 63	Día 0	Día 28	Día 29	Día 63
T01	1 ^a	1 ^a	1 ^a	11 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	450 ^a
T02	1 ^a	29 ^d	1896 ^c	29193 ^d	1 ^a	25 ^c	878 ^d	96321 ^c
T03	1 ^a	3 ^b	512 ^b	11337 ^{bc}	1 ^a	3 ^b	354 ^c	36521 ^{cd}
T04	1 ^a	4 ^{bc}	621 ^b	8513 ^b	1 ^a	5 ^b	293 ^c	22292 ^c
T05	1 ^a	7 ^c	492 ^b	22295 ^{cd}	1 ^a	7 ^b	376 ^c	53618 ^d
T06	1 ^a	6 ^{bc}	767 ^b	15765 ^c	1 ^a	6 ^b	355 ^c	54058 ^d
T07	1 ^a	6 ^{bc}	2814 ^c	35734 ^d	1 ^a	1 ^a	128 ^b	10624 ^b

10

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Tabla 8 Medias de cuadrados mínimos de titulación de SN de IBR

15

20

Grupo	IBR			
	Día 0	Día 28	Día 29	Día 63
T01	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
T02	1 ^a	9 ^b	149 ^b	94 ^b
T03	1 ^a	2 ^c	21 ^c	15 ^c
T04	1 ^a	3 ^d	24 ^c	15 ^c
T05	1 ^a	3 ^{cd}	21 ^c	14 ^c
T06	1 ^a	3 ^{cd}	19 ^c	13 ^c
T07	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Reacciones en el sitio de inyección.

Las medias de cuadrados mínimos de las reacciones en el sitio de inyección (ISR, por sus siglas en inglés) para el lado izquierdo y derecho del cuello se muestran en las Tablas 9 y 10. El Día 1, ocurrieron reacciones pequeñas en los seis grupos vacunados pero estas disminuyeron. Los sitios de reacción más grandes ocurrieron en T02 y T07 el día 29, 41.8 y 16.3, respectivamente. Hubo diferencias significativas entre las reacciones en el sitio de inyección en determinados días. Todas las vacunas eran seguras ya que las reacciones en el sitio de inyección se resolvieron rápidamente.

Tabla 9. Medias de cuadrados mínimos para las reacciones en el sitio de inyección (lado izquierdo del cuello)

Grupo	Volumen de reacción en el sitio de inyección en el lado izquierdo del cuello el día						
	0	1	2	3	7	28	49
T01	-0.1 ^a	-0.1 ^a	-0.1 ^a	-0.1 ^a	-0.1 ^a	-0.1 ^a	-0.1 ^a
T02	0.1 ^a	5.7 ^b	4.3 ^{ab}	7.9 ^b	10.4 ^b	1.3 ^a	0.2 ^a
T03	0.0 ^a	3.0 ^{ab}	0.9 ^{ab}	0.7 ^a	1.5 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
T04	0.1 ^a	0.6 ^a	2.1 ^{abc}	1.7 ^a	1.9 ^a	0.4 ^a	0.4 ^a
T05	-0.1 ^a	0.0 ^a	0.1 ^a	0.2 ^a	0.0 ^a	-0.1 ^a	-0.1 ^a
T06	0.1 ^a	0.6 ^a	8.1 ^d	1.3 ^a	1.0 ^a	0.1 ^a	0.1 ^a
T07	0.0 ^a	6.4 ^b	6.0 ^{cd}	9.8 ^b	2.7 ^a	0.3 ^a	1.1 ^a

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Tabla 10 Medias de cuadrados mínimos para las reacciones en el sitio de inyección (lado derecho del cuello)

5	Grup o	Volumen de reacción en el sitio de inyección en el lado derecho del cuello el día					
		28	29	30	31	35	49
10	T01	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
	T02	0.0 ^a	41.8 ^c	10.5 ^b	17.0 ^c	17.1 ^b	1.5 ^a
	T03	0.0 ^a	2.6 ^a	3.0 ^a	6.5 ^{ab}	5.2 ^a	0.0 ^a
	T04	0.0 ^a	3.8 ^a	1.1 ^a	1.8 ^a	1.3 ^a	0.4 ^a
	T05	0.0 ^a	1.2 ^a	0.7 ^a	0.8 ^a	0.8 ^a	1.3 ^a
	T06	0.0 ^a	2.8 ^a	2.0 ^a	5.0 ^{ab}	3.2 ^a	0.8 ^a
	T07	0.0 ^a	16.3 ^b	5.6 ^{ab}	11.4 ^{bc}	5.8 ^a	0.0 ^a

15 Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Inmunidad mediada por células

El ensayo ELISPOT de IFN gamma de BVDV tuvo un alto
 20 antecedente en el grupo T01 antes de la exposición y, por lo tanto, se considera poco confiable para la demostración de la inducción de respuestas CMI por estas vacunas a este antígeno (no se muestran los datos). Sin embargo, los ensayos para los antígenos IBR reflejaron la inducción de una CMI por las

vacunas correspondientes (véase Tablas 11-13, respuestas a antígeno IBR destruido, respuestas de memoria del péptido gB y gD de IBR de T02 a T06). En general, las respuestas más altas fueron en el grupo de vacuna T02 y el grupo T05 que tenía CpG en la formulación. Las respuestas posteriores a la exposición no mejoraron ya que la exposición era una exposición al virus BVDV. Supuestamente, se indujeron respuestas de CMI similares por las vacunas al antígeno BVDV.

Tabla 11

10

Grupo	IFN-gamma de péptidos gB de IBR (SFC el día)			
	0	7	36	58
T01	0.6 ^a	157.8 ^b	115.3 ^a	15.6 ^a
T02	0.6 ^a	235.6 ^b	459.7 ^{cd}	215.3 ^b
T03	4.1 ^a	280.0 ^b	518.8 ^d	141.3 ^{ab}
T04	0.6 ^a	162.5 ^b	317.8 ^b	42.8 ^a
T05	2.5 ^a	307.2 ^b	612.8 ^d	103.3 ^{ab}
T06	1.9 ^a	274.4 ^b	328.9 ^{bc}	70.0 ^{ab}
T07	1.3 ^a	82.9 ^a	97.1 ^a	28.8 ^a

15

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

25

Tabla 12

5

10

Grupo	IFN-gamma de péptidos gD de IBR (SFC el día)			
	0	7	36	58
T01	0.0 ^a	127.8 ^a	135.3 ^a	11.3 ^a
T02	1.1 ^a	209.2 ^b	562.2 ^c	127.2 ^a
T03	1.3 ^a	150.0 ^{ab}	401.3 ^{bc}	117.8 ^a
T04	1.7 ^a	139.7 ^b	301.1 ^b	76.1 ^a
T05	2.8 ^a	244.2 ^b	402.2 ^{bc}	54.7 ^a
T06	5.0 ^a	195.8 ^b	338.3 ^b	70.6 ^a
T07	3.3 ^a	50.8 ^a	90.4 ^a	29.6 ^a

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Tabla 13

15

20

Grupo	IFN-gamma de antígeno mIBR (SFC el día)			
	0	7	36	58
T01	5.6 ^a	199.7 ^a	210.6 ^a	15.6 ^a
T02	0.8 ^a	591.9 ^b	1721.7 ^c	215.3 ^a
T03	1.6 ^a	411.3 ^{ab}	1187.5 ^b	141.3 ^a
T04	1.1 ^a	489.4 ^b	1340.8 ^b	42.8 ^a
T05	1.4 ^a	643.9 ^b	1738.6 ^c	103.3 ^a
T06	11.1 ^a	621.7 ^b	1129.2 ^b	70.0 ^a
T07	2.5 ^a	106.3 ^a	328.3 ^a	28.8 ^a

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Se observó un efecto de vacuna en el desarrollo y la duración de la viremia. Todas las vacunas experimentales protegían
5 contra la viremia. Se observó una protección completa en algunos grupos (T02 y T05 que contenían CpG) mientras que se observó una protección parcial en los otros grupos (T03, T04, T06 y T07). Los perfiles de temperatura rectal mostraron un aumento transitorio un día después de la primera y segunda
10 vacunaciones para los grupos de tratamiento T02 y T07 en comparación con los controles T01. Las vacunas liposomales indujeron menores elevaciones en la temperatura rectal en comparación con T02 y T07 que tenía adyuvante que contiene Quil A. Este adyuvante que contiene Quil A típicamente induce
15 una elevación de un solo día de la temperatura inmediatamente después de la vacunación. Esto último es particularmente importante para vacas lecheras debido a que la fiebre que acompaña la vacunación frecuentemente resulta en una caída inaceptable del rendimiento de la leche. Las formulaciones
20 liposomales indujeron respuestas sólidas de anticuerpo así como de linfocitos T (incluso liposomas sin inmunomoduladores adicionales). Las vacunas liposomales indujeron titulaciones de SN significativamente menores a BVDV-1 y 2 y al antígeno IBR en comparación con las vacunas que contienen Quil A pese

a que los niveles alcanzados se consideraron en el intervalo de protección para estas enfermedades correspondientes (titulaciones de SN de BVDV-1 de 1:256-512; BVDV-2 $\pm$ 256 o más; titulación de SN de IBR de 1:32).

5 En conclusión, las formulaciones liposomales ofrecen una opción segura y nueva para suministrar antígenos muertos para enfermedades que no solo requieren del anticuerpo sino también de CMI para la protección. Las formulaciones fueron comparables con las vacunas que contienen Quil-A en cuanto a
10 la eficacia. El efecto de GpG en la eficacia se pudo reproducir, sin embargo, ORN no fue eficaz para mejorar la inmunidad contra la exposición a BVDV.

Ejemplo 4 - virus de la gripe porcina

El objetivo de este estudio era evaluar la respuesta
15 inmunitaria y la eficacia de varias vacunas de SIV (virus muerto, pH1N1 y H3N2) que contenían inmunomoduladores y formulaciones adyuvantes novedosas. La eficacia se determinó tanto por parámetros inmunológicos (humoral y celular) como por criterios de valoración de eficacia incluyendo síntomas
20 clínicos, viremia, diseminación viral y lesiones pulmonares.

Animales.

Se usaron cerdos de tres semanas de edad (21 $\pm$ 3 días) de ambos sexos para este estudio. Los animales no tenían antecedentes de exposición a PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Los animales o sus madres no tenían antecedentes de vacunación contra ningún serotipo de SIV ni exposición a este. Los animales llegaron al sitio cuatro a siete días antes de la vacunación y se alimentaron con ración estándar y agua a demanda.

Los cerdos se vacunaron con composiciones de la Tabla 14 los días cero (parte izquierda del cuello) y 21 (parte derecha del cuello) y se expusieron al virus H3N2 IN/12 el día 35.

Tabla 14. Configuración experimental

10

15

20

Grupo	N	Antígeno	Adyuvante	Dosis/Vía
T01	10	Ninguno	Ninguno	2 ml IM
T02	10	80HA	5% AMPHIGEN® (emulsión de aceite de lecitina)	2 ml IM
T03	10	pH1N1; 120HA H3N2	20% AMPHIGEN® + CpG (SEQ ID NO: 8, 50 µg /dosis)+agonista de CD40 (anticuerpo monoclonal anti-CD40, Clon 2A5C7P1G8, 250 µg /dosis)	2 ml IM
T04	10		10% de aceite SP *	2 ml IM
T05	10		10% de aceite SP + CpG (SEQ ID NO: 8, 50 µg/dosis)+agonista de CD40 (250 µg/dosis)	2 ml IM

5

T06	10	TXO (CpG (SEQ ID NO: 8, 50 µg/dosis+DEAE dextrano (10 mg/dosis) +DRAKEOL® 6VR (45% v/v), SPAN®80 (6.3% v/v) + TWEEN®80 (1.45% v/v)	2 ml IM
T07	10	Liposomas DCRL (Colesterol (250 µg), DDA (250 µg), BAYR1005® acetato (500 µg), lecitina (500 µg))	2 ml IM
T08	10	Liposomas DCRL (Colesterol (250 µg), DDA (250 µg), BAYR1005® base libre (500 µg), lecitina (500 µg)) + CpG (SEQ ID NO: 8, 50 µg/dosis) + agonista de CD40 (250 µg/dosis)	2 ml IM

10

*4% de subsolución a base de escualeno diluida 10x para el producto final (0.4% de aceite)

Se recogió suero en sangre para análisis de inhibición de hemaglutinación (HAI, por sus siglas en inglés) los días 35 y 40 y se recogió la sangre entera para análisis ELISPOT (IFNγ) los días 28, 35 y 40. Los cerdos se sacrificaron el día 40 (5 días después de la exposición) y se estableció el porcentaje de consolidación para cada lóbulo (craneal izquierdo, medio izquierdo, caudal izquierdo, craneal derecho, medio derecho, caudal derecho y accesorio) y se registró como un porcentaje entre 0 y 100%.

20

Ninguna de las vacunaciones resultó en efectos secundarios sistémicos o reacciones inaceptables en el sitio de inyección (no se muestran los datos).

Las titulaciones de HAI se muestran en la Tabla 15.

5 **Tabla 15. Titulaciones de HI (día 35 antes de la exposición, día 40 después de la exposición)**

10	Gru po	CA09-H1N1 (Vacuna #1) D35		H3N2Vac (Vacuna #2) D35		H3N2v-IN/12 (exposición) D35		H3N2v-IN/12 (exposición) D40	
		Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
15	T01	16.25 ^a	1.83	17 ^a	1.528	<10 (nd)	na	34 ^a	14.47
	T02	464 ^b	110.5	208 ^b	32	96	18.09	755.6 ^b	172.4
	T03	284 ^b	67.05	137.8 ^b	27.85	98	29.28	391.1 ^b	113.5
	T04	552 ^b	102.9	416 ^b	64	220	54.41	976 ^b	155.4
	T05	232 ^b	55.23	156 ^b	22.67	54	7.333	546 ^b	163.1
	T06	432 ^b	109.4	184 ^b	31.66	108	29.24	848 ^b	177
	T07	293.3 ^b	127.2	435.6 ^b	267.4	133.3	64.64	464 ^b	137.9
20	T08	106.7 ^b	17.64	75.56 ^b	12.37	28.89	3.514	124 ^b	25.61

^aLos valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes de T01 ($p \leq 0.10$); Prueba T no emparejada con corrección de Welch (GraphPad Prism, Ver. 6.04). nd, no detectable; na, no aplicable.

Las puntuaciones de lesiones pulmonares se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16 Resumen de puntuaciones de lesiones pulmonares (día 40)

5	Gru po	Media	SEM	90 de % CI Inferio r	90% de CI Superio r,	N
	T01	3.029 ^a	0.8004	1.562	4.496	10
10	T02	0.651 ^b	0.4224	-0.1232	1.425	10
	T03	0.815 ^b	0.7331	-0.5289	2.159	10
	T04	0.733 ^b	0.5106	-0.203	1.669	10
	T05	1.36 ^a	0.7563	- 0.02643	2.746	10
	T06	0.237 ^b	0.1926	-0.1161	0.5901	10
15	T07	0.668 ^b	0.3254	0.07155	1.264	10
	T08	4.374 ^a	1.11	2.339	6.409	10
	NTX	0.453 ^b	0.4161	-0.3098	1.216	10

^aLos valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes de T01 ($p \leq 0.10$); Prueba T no emparejada con corrección de Welch (GraphPad Prism, Ver. 6.04). NTX es un grupo de cerdos no vacunados ni expuestos. El grupo T04 tuvo la mayor titulación de HAI a una de las cepas de vacuna (H1N1), mientras que T07 tuvo la máxima

titulación a la otra cepa (H3H2), sin embargo, las titulaciones en los grupos T02-T08 fueron significativamente más altas que en el grupo de control T01.

Todas las vacunas (excepto T08) tendían a reducir LLS 5 días después de la exposición. El grupo T06 (TX0) tendía a tener las puntuaciones de lesiones pulmonares más bajas.

Las células secretoras de IFN-gamma específico del péptido de proteína NP de la gripe y células secretoras enteras de IFN-gamma específico del virus de la gripe (ambas determinadas por ELISPOT) se proporcionan en las Tablas 19 y 20, respectivamente. Los péptidos en los grupos tienen 16 miembros con una superposición de 12 aminoácidos. Los cuatro grupos contenían secuencias de péptido NP del extremo N (grupo 1) al extremo C (grupo 4). Las secuencias de los péptidos se proporcionan en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. Grupos de péptidos NP usados para IFN- γ ELISPOT (grupos 1 y 2)

5

10

15

20

Grupo de péptidos NP #1			Grupo de péptidos NP #2		
SEQ NO:	ID	Secuencia	SEQ NO:	ID	Secuencia
15		MATQGTKRSYEQMETG	45		RQANNGEDATAGLTHI
16		GTKRSYEQMETGGERQ	46		NGEDATAGLTHIMIWH
17		SYEQMETGGERQDATE	47		ATAGLTHIMIWHSNLN
18		METGGERQDATEIKAS	48		LTHIMIWHSNLN DATY
19		GERQDATEIKASVGRM	49		MIWHSNLN DATYQRTR
20		DATEIKASVGRMVGGI	50		SNLN DATYQRTRALVR
21		IKASVGRMVGGIGRFY	51		DATYQRTRALVRTGMD
22		VGRMVGGIGRFYIQMC	52		QRTRALVRTGMDPRMC
23		VGGIGRFYIQMCTELK	53		ALVRTGMDPRMCSLMQ
24		GRFYIQMCTELKLSDY	54		TGMDPRMCSLMQGSTL
25		IQMCTELKLSDYEGRL	55		PRMCSLMQGSTLPRRS
26		TELKLSDYEGRLIQNS	56		SLMQGSTLPRRS GAAG
27		LSDYEGRLIQNSITIE	57		GSTLPRRS GAAGA AVK
28		EGRLIQNSITIERMVL	58		PRRS GAAGA AVKGVGT
29		IQNSITIERMVLSAFD	59		GAAGA AVKGVGTIAME
30		ITIERMVLSAFDERRN	60		AAVKG VGTIAMELIRM
31		RMVLSAFDERRNKYLE	61		GVGTIAMELIRMIKRG
32		SAFDERRNKYLEEHPS	62		IAMELIRMIKRGINDR
33		ERRNKYLEEHPSAGKD	63		LIRMIKRGINDRNFWR
34		KYLEEHPSAGKDPKKT	64		IKRGINDRNFWRGENG
35		EHPSAGKDPKKTGGPI	65		INDRNFWRGENGRRTR
36		AGKDPKKTGGPIYRRV	66		NFWRGENGRRTRAAYE
37		PKKTGGPIYRRVDGKW	67		GENGRRTRAAYERMCN
38		GGPIYRRVDGKWMREL	68		RRTRAAYERMCNILKG
39		YRRVDGKWMRELILYD	69		AAYERMCNILKGKFQT
40		DGKWMRELILYDKEEI	70		RMCNILKGKFQTAAQR
41		MRELILYDKEEIRR VW	71		ILKGKFQTAAQRAMMD
42		ILYDKEEIRR VWRQAN	72		KFQTAAQRAMMDQVRE
43		KEEIRR VWRQANNGED	73		AAQRAMMDQVRESRNP
44		RRVWRQANNGEDATAG	74		AMMDQVRESRNP GNAE

25

Tabla 18. Grupos de péptidos NP usados para IFN- γ ELISPOT (grupos 3 y 4)

Grupo de péptidos NP #3		Grupo de péptidos NP #4	
SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:	Secuencia
5	75	105	RGVQIASNENVEAMDS
	76	106	IASNENVEAMDSNTLE
	77	107	ENVEAMDSNTLELRSR
	78	108	AMDSNTLELRSRYWAI
	79	109	NTLELRSRYWAIRTRS
10	80	110	LRSSRYWAIRTRSGGNT
	81	111	YWAIRTRSGGNTNQQR
	82	112	RTRSGGNTNQQRASAG
	83	113	GGNTNQQRASAGQISV
	84	114	NQQRASAGQISVQPTF
	85	115	ASAGQISVQPTFSVQR
	86	116	QISVQPTFSVQRNLPF
	87	117	QPTFSVQRNLPFERAT
	88	118	SVQRNLPFERATIMAA
	89	119	NLPFERATIMAAFSGN
15	90	120	ERATIMAAFSGNNEGR
	91	121	IMAAFSGNNEGRTSDM
	92	122	FSGNNEGRTSDMRTEV
	93	123	NEGRTSDMRTEVIRMM
	94	124	TSDMRTEVIRMMESSAK
	95	125	RTEVIRMMESSAKPEDL
	96	126	IRMMESSAKPEDLSFQG
	97	127	ESAKPEDLSFQGRGVF
	98	128	PEDLSFQGRGVFELSD
	99	129	SFQGRGVFELSDEKAT
20	100	130	RGVFELSDEKATSPIV
	101	131	ELSDEKATSPIVPSFD
	102	132	EKATSPIVPSFDMSNE
	103	133	SPIVPSFDMSNEGSYF
	104	134	PSFDMSNEGSYFFGDN
		135	MSNEGSYFFGDNAEEY
		136	GSYFFGDNAEEYDS

Tabla 19 Grupos de péptidos NP IFN- γ ELISPOT (Día 40)

5	Grupo	Grupo de péptidos NP #1		Grupo de péptidos NP #2		Grupo de péptidos NP #3		Grupo de péptidos NP #4	
		Media	Error estándar	Media	Error estándar	Media	Error estándar	Media	Error estándar
10	T01	47 ^a	9.634	40 ^a	10.68	157 ^a	68.03	65.2 ^a	19.59
	T02	66 ^a	16.79	28.4 ^a	6.598	68.4 ^a	20.38	40.8 ^a	10.19
	T03	83 ^a	34.75	56.8 ^a	17.58	101.6 ^a	21.91	120 ^a	53.86
	T04	52.6 ^a	24.63	41.2 ^a	14.61	63 ^a	16.98	75.8 ^a	28.02
	T05	110.8 ^b	29.5	93.6 ^a	33.8	179.6 ^a	40.35	74 ^a	19.43
15	T06	100.6 ^a	49.25	118.4 ^a	43.82	132.4 ^a	57.12	53.8 ^a	17.96
	T07	388.4 ^b	139.1	140.2 ^b	42.29	275.8 ^a	103.5	76.2 ^a	19.15
	T08	61.8 ^a	15.02	70.6 ^a	15.22	177.4 ^a	34.7	61.8 ^a	13.76

^aLos valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes de T01 ($p \leq 0.10$); Prueba T no emparejada con corrección de Welch (GraphPad Prism, Ver. 6.04).

La proteína NP en general se conserva bien entre las cepas de SIV y, por lo tanto, una respuesta eficaz de CMI probablemente se traduce en un mejor potencial de protección cruzada.

Tabla 20. Antígeno de memoria de virus IFN- γ ELISPOT (Día 40)

5	Gru po	H3N2v-IN/12 (exposición)		CA09-H1N1 (Vacuna #1)		H3N2Vac (Vacuna #2)	
		Media	Error estándar	Media	Error estándar	Media	Error estándar
10	T01	91.8 ^a	25.4	30 ^a	10.56	23 ^a	5.41
	T02	216.6 ^b	36.69	147 ^b	16.6	312 ^b	75.42
	T03	387 ^b	72.43	231 ^b	40.74	497.4 ^b	84.63
	T04	390.8 ^b	65.18	225.6 ^b	41.22	513 ^b	108.3
	T05	524.4 ^b	80.27	255 ^b	52.56	598.2 ^b	87.71
	T06	419.6 ^b	108	584.2 ^b	149.6	491.2 ^b	144.9
	T07	788 ^b	164.7	552.8 ^b	115	1041 ^b	233.8
	T08	362 ^b	93.1	151.6 ^b	44.56	486.8 ^b	130.2

^aLos valores con diferentes superíndices son
 15 significativamente diferentes de T01 ($p \leq 0.10$); Prueba T no
 emparejada con corrección de Welch (GraphPad Prism, Ver.
 6.04).

El grupo T07 (liposomas DCRL) proporcionó las respuestas de
 IFN gamma más altas a tres de cuatro grupos de péptido de
 20 proteína NP y dos de los tres virus enteros evaluados. El
 único grupo con una respuesta de IFN- γ observada después de
 la vacunación (antes de la exposición) fue T06 (TX0) (no se
 muestran los datos).

Agregar el agonista de CD40 y CpG uniformemente tendía a

reducir las titulaciones, así como aumentar LLS, especialmente en el contexto de la formulación liposomal.

Tomados en su conjunto, estos resultados indican que la vacuna con adyuvante de liposomas DCRL es tan eficaz como la formulación T02 (formulación experimental similar a una vacuna comercial) en la reducción de las puntuaciones de lesión pulmonar. Al mismo tiempo, los liposomas DCRL son mucho más eficaces para activar la respuesta de CMI que las otras vacunas evaluadas, proporcionando posiblemente de este modo un potencial de protección cruzada más amplio y una duración mejorada de la inmunidad que el producto comercial.

Ejemplo 5 Desarrollo de inmunidad a Eimeria maxima después de la vacunación con profilina

El objetivo del estudio era evaluar los efectos de varios adyuvantes (propiedad de Zoetis) sobre el desarrollo de la inmunidad a *Eimeria maxima* luego de la vacunación con profilina.

Se compraron pollitos recién salidos del huevo del criadero Longenecker, Elizabethtown, PA. A los pollitos se les suministró agua y alimento a demanda. Las aves se mantuvieron en corrales de criadero en una instalación libre de *Eimeria* y se transfirieron a jaulas colgantes grandes en una ubicación separada donde se infectaron y se mantuvieron hasta el final del período experimental.

La profilina purificada (50 µg/dosis) se mezcló con diferentes adyuvantes como se establece en la Tabla 21.

Tabla 21

Grupo	Composición de vacuna	
5	T01	PBS
	T02	PBS
	T03	Profilina sola (50 µg)
	T04	50 µg de profilina +50 µg de Colesterol + CpG (SEQ ID NO: 8; 65% de pureza, 5 µg/ds)
	T05	50 µg de profilina + Quil-A (50 µg/dosis), Colesterol (50 µg/dosis), CpG (5 µg/dosis)
10	T06	50 µg de profilina + Quil-A (50 µg/dosis), colesterol (50 µg/dosis), DDA (50 µg/dosis), Carbopol (0.05%), BAYR1005® base libre (100 µg/dosis)
	T07	50 µg de profilina + Quil-A (50 µg/dosis), colesterol (50 µg/dosis), DDA (50 µg/dosis), Carbopol (0.05%), BAYR1005® (100 µg/dosis), CpG (SEQ ID NO: 8; 65% de pureza, 5 µg/ds)
	T08	50 µg de profilina + DCRL (Lyo) (DDA (12.5 µg /ds), colesterol (12.5 µg/ds), BAYR1005® (25 µg /ds), lecitina (25 µg /ds))
15	T09	50 µg de profilina + DCRL + CpG (SEQ ID NO: 8; 65% de pureza, 5 µg/ds) (Lyo) (DDA (12.5 µg /ds), colesterol (12.5 µg /ds), BAYR1005® (25 µg /ds), lecitina (25 µg/ds))
	T10	50 µg de profilina + CpG (SEQ ID NO: 8; 65% de pureza, 25 µg/ds), DEAE-Dextrano (500 µg/ds), 45% v/v de Drakeol 6VR, Span-80 (6.3% v/v), Tween-80 (1.45% v/v)

20 Posteriormente, las aves se inmunizaron con dos inyecciones subcutáneas (0.5 mL por dosis) de profilina más adyuvante al día 1 y día 7 de edad. Siete días después de la segunda inmunización (14 días de edad), las aves (excepto en el grupo T01) se expusieron a 1×10^4 ooquistes esporulados de *Eimeria*

maxima.

El aumento de peso corporal se determinó el día 6 y día 15 después de la exposición. También se determinó la diseminación de ooquistes en las heces del día 6-9 después de la exposición. Los anticuerpos en suero contra profilina se evaluaron por ELISA.

Grupos de control: Inyecciones de PBS y sin exposición (control no expuesto y no vacunado), inyecciones de PBS y exposición el día 14 (control expuesto y no vacunado), profilina/sin adyuvante y exposición el día 14 (control de antígeno).

Para evaluar las puntuaciones de lesión, seis aves/grupo se mataron 6 d después de la exposición. Se obtuvieron segmentos intestinales de aproximadamente 20 cm extendiéndose 10 cm anterior y posterior del divertículo y se cortaron longitudinalmente. Los contenidos intestinales se retiraron cuidadosamente. Se dio una puntuación que varía de 0-4 según la gravedad de las lesiones.

Para evaluar la producción de ooquistes fecales, las heces de cada grupo (8 aves/grupo; 4 jaulas con 2 aves/jaula) se recolectaron por separado de 6 a 9 días después de la exposición. Comenzando 6 días después de la exposición, se establecieron las jaulas de recolección y los cuidadores de los animales recibieron instrucciones de no limpiar las

heces. Se recolectaron los excrementos de cada jaula de recolección de ooquistes que tenía 2 aves por jaula. Se colocaron bandejas de recolección debajo de cada jaula por 3 días comenzando 6 días pi y el material fecal se recolectó en tarros de plástico grandes. Los excrementos en cada tarro se molieron en una licuadora con agua y se tomaron dos muestras aleatorias de 35 ml de cada muestra. Para contar los ooquistes de coccidia, se hicieron varias diluciones inicialmente para determinar las diluciones óptimas para la enumeración de ooquistes para cada muestra. Los ooquistes se contaron microscópicamente. La cantidad total de ooquistes diseminados por cada gallina se calculó usando la fórmula: total de ooquistes/ave = (conteo de ooquistes x factor de dilución x volumen de muestra fecal/volumen de cámara de conteo)/cantidad de aves por jaula.

Se recolectaron muestras de sangre (4 aves/grupo) el día 9 después de la exposición a *Eimeria* para tomar mediciones de respuesta al anticuerpo. Las muestras de sangre se dejaron coagular a 4 °C durante 4 horas y se separó el suero. Las muestras de suero se evaluaron para detectar anticuerpos contra *Eimeria* usando ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación durante la noche con 200 ng/pocillo del antígeno coccidial recombinante, se lavaron con PBS-0.05% de Tween y se bloquearon con PBS-1% de BSA. Se agregaron

diluciones en suero, se incubaron con agitación suave y continua y se detectó el Ab unido con IgG antigallina de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) y sustrato específico de peroxidasa. Se midió la densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) a 450 nm con un lector de microplacas (Bio-Rad, Richmond, CA).

Todos los valores se expresan como media $\pm$ SEM. Las diferencias entre las medias se consideran significativas a $p < 0.05$.

El control negativo y el control de exposición fueron significativamente diferentes a los 6 días pero no a los 15 días después de la infección. La pérdida de peso del día 6 después de la exposición en los controles de exposición en comparación con los controles negativos fue de alrededor de 15%. Ningún tratamiento se diferenció de los controles sin adyuvante o sin exposición pero los tratamientos con T05, T06 y T08 tampoco se diferenciaron del control negativo.

Apenas menos del 60% de las aves tuvo puntuaciones de lesión de 2 o más. Ninguna formulación fue significativamente diferente del control de exposición. El grupo T09 fue el que tuvo peor desempeño. T04 tuvo el mejor desempeño.

En términos generales, una reducción de < 1 log en respuesta no se considera biológicamente relevante pero igual puede indicar inmunidad activa. Las únicas formulaciones que fueron

significativamente menores que el control de exposición fueron T05 y T09.

La respuesta de anticuerpo generalmente no se considera relevante a la inmunidad a coccidiosis por lo que puede no correlacionarse con otros criterios. En los experimentos que anteceden, el grupo T07 provocó una respuesta al anticuerpo que era mayor que la respuesta provocada por el control negativo (aves no vacunadas, no infectadas), el control positivo (aves no vacunadas, infectadas) o las aves vacunadas solo con el antígeno. Los grupos T05, T06 y T08-T10 provocaron respuestas de anticuerpo mayores que el control negativo (aves no vacunadas, no infectadas).

Los resultados se resumen en la Tabla 22. El aumento de peso, niveles de anticuerpo en suero (expresados como un % de control no infectado) y las puntuaciones de lesión, producción de ooquistes (expresada como un % del control infectado) luego de la inmunización de aves con dos inyecciones subcutáneas de profilina más varios adyuvantes el día 1 y día 7 de edad y una posterior exposición a 1×10^4 ooquistes de *Eimeria maxima* a los 14 días de edad.

Tabla 22

Grupo	Aumento de peso, % de control		Producción de ooquistes, % de control	Puntuación de lesión, % de control	Titulación de AB en suero (OD450), % de control
	Día 0-6	Día 0-15	infectado, día 6	infectado, día 6	
T01	100	100	0	0	100
T02	85	96	100	100	189
T03	86	96	83	63	193
T04	93	95	117	63	194
T05	88	87	63	53	231
T06	83	90	74	74	268
T07	92	96	83	42	310
T08	81	88	108	74	203
T09	86	95	56	95	205
T10	86	87	113	63	269

Ejemplo 6 - Vacuna BVDV/IBR con adyuvante de DCRL + CpG

En este ejemplo, se accedió al potencial de capacidad de adyuvante de los liposomas DCRL con CpG (sin ORN). Además, se compararon diferentes métodos para cargar los liposomas.

La configuración experimental fue la siguiente (Tabla 21):

5	Grupo de tratamiento	N	Tratamiento	Adyuvante (por dosis)
	T01	9	Control negativo de solución salina	
10	T02	9	Adyuvante que contiene Quil A (gp53 de BVDV 1 y BVDV 2)	Quil-A (250 µg), colesterol (250 µg), DDA (100 µg), CARBOPOL® (0.0375%v/v), BAYR1005®acetato (1,000 µg), SEQ ID NO: 8 (100 µg, 65% homogéneo) + 10 µg cada uno de BVDV 1 y 2 gp 53 recombinante
	T03	9	DCRL + T (sucrosa liofilizada sin antígeno) + mBVDV 1, mBVDV 2 y mIBR	colesterol (250 µg), DDA (250 µg), BAYR1005® base libre (500 µg), lecitina (500 µg), SEQ ID NO: 8 (100 µg, 65% homogéneo)
15	T04	9	DCRL + T (no liofil.) mBVDV 1, mBVDV 2 y mIBR	Como en T03
	T05	9	DCRL + T (carga activa con antígeno luego sucrosa liofilizada) mBVDV 1, mBVDV 2 y mIBR	Como en T03
20	T06	9	DCRL-ORN (sucrosa liof.) mBVDV 1, mBVDV 2 y mIBR	colesterol (250 µg), DDA (250 µg), BAYR1005® base libre (500 µg), lecitina (500 µg), SEQ ID NO: 11, con enlaces fosforotioato (100 µg)

Las vacunas en los grupos T03-T06 también contenían mBVD1 (4,500 RU/ds) + BVDV1 (4500RUs), BVDV 2 (4500RUs), mIBR $10^8 \log_{10}$ TCID₅₀ (dosis de preinactivación).

En este estudio se registraron terneros Holstein saludables (6-7 meses de edad, seronegativos para BVDV1, BVDV2 e IBR) (n=9/grupo tratamiento). A los terneros se les administró 2 mL de la vacuna asignada subcutáneamente los Días 0 y 28. Una
5 exposición a BVDV2 virulento (4 mL ($5.14 \text{ Log}_{10}\text{TCID}_{50}$ por dosis intranasalmente) se administró el Día 49. Se realizaron observaciones clínicas y se midieron las temperaturas rectales y en los sitios de inyección cerca de cada vacunación. Se recolectaron muestras de sangre para obtener
10 conteos de glóbulos blancos, viremia y serología hasta el Día 63.

Todos los terneros en T02, T03, T04 y T06 lograron titulaciones 1:8 contra BVDV-1a y BVDV2 antes de la exposición, en comparación con 22.1 y 11.1% de los terneros
15 en T05. Se cree que debido a la carga activa usada en T5, la mayoría del antígeno se eliminó de la preparación de vacuna. De este modo, los animales en el grupo T05 recibieron menos antígeno que los animales en los grupos T03, T04 y T06. Por lo tanto, la interpretación de los hallazgos del grupo T05
20 debería hacerse cuidadosamente.

Dicho esto, las titulaciones de BVDV-1a y BVDV2 para T05 fueron significativamente menores que los otros grupos vacunados los Días 28, 49 y 63. Ningún ternero en T02 o T05 logró titulaciones 1:8 contra BHV antes de la exposición y

estos grupos también tuvieron titulaciones significativamente menores en comparación con los otros grupos vacunados los Días 28, 49 y 63. Las medias de cuadrados mínimos para gp53-1 SFC fueron significativamente mayores para T02 en comparación con todos los otros grupos de tratamiento los Días 0, 35 y 56 y las medias de cuadrados mínimos para gp53-2 SFC fueron significativamente mayores para T02 los Días 35 y 56.

Se observó viremia en todos los terneros en T01 y T05. Ningún ternero en T02 desarrolló viremia después de la exposición. En los grupos T03, T04 y T06, 22.2, 33.3 y 33.3% de los terneros desarrollaron viremia; estos grupos no fueron significativamente diferentes de T02. La duración de la viremia fue significativamente más larga en T01 y T05 en comparación con todos los otros grupos de tratamiento. Cuando se determinó leucopenia por una reducción del 40% en WBC en comparación con la línea basal, 22.2% de los terneros en T02 tuvieron leucopenia después de la exposición, mientras que todos los terneros en todos los grupos tuvieron leucopenia. Los terneros en T01 y T05 tuvieron una duración significativamente mayor de leucopenia en comparación con todos los otros grupos (8.6 días, cero días, 0.2 días, 0.7 días, 6.7 días y 0.8 días para los grupos T01-T06, respectivamente). Solo se observaron síntomas leves de enfermedad clínica luego de la exposición en este estudio. En

el grupo de control T01, 22.2% de los terneros tuvo puntuaciones clínicas de ≥ 2 después de la exposición, mientras que 11.1% de los terneros en T05 tuvo puntuaciones clínicas de ≥ 2 después de la exposición. Ningún ternero en ningún otro grupo de tratamiento tuvo puntuaciones clínicas de ≥ 2 después de la exposición.

Se observaron fiebres transitorias en T02 los Días 1 y 29. Las temperaturas de todos los otros terneros fueron normales durante el estudio.

Tabla 22. Medias de cuadrados mínimos de la temperatura rectal para la fase de vacunación , °F

Tra tam ien to		Día	Día	Día	Día		Día	Día	Día	Día
	Día 00	01	02	03	07	Día 28	29	30	31	35
T01	102.1 ab	101.9 a	101.9 a	101.9 a	102.0 a	101.9 ab	102.1 a	102.0 a	102.0 a	102. 3 ^a
T02	101.9 ^a	103.1 b	101.7 a	101.9 a	102.0 a	101.9 ab	103.2 b	102.3 a	102.1 ab	102. 2 ^a

5

T03	101.9 ^a	102.1 ^a	101.7 ^a	102.0 ^a	102.3 ^{ab}	101.7 ^a	102.1 ^a	102.1 ^a	102.1 ^{ab}	102.1 ^a
T04	101.9 ^a	101.9 ^a	101.7 ^a	101.9 ^a	102.3 ^{ab}	102.2 ^b	102.4 ^a	102.3 ^a	102.3 ^b	102.4 ^a
T05	102.1 ^{ab}	102.0 ^a	101.9 ^a	102.3 ^a	102.5 ^b	102.0 ^{ab}	102.2 ^a	102.0 ^a	102.2 ^{ab}	102.1 ^a
T06	102.3 ^b	102.1 ^a	101.7 ^a	102.0 ^a	102.1 ^{ab}	101.8 ^a	102.3 ^a	102.0 ^a	102.1 ^{ab}	102.2 ^a

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

10 **Tabla 23. Medias de cuadrados mínimos de la temperatura rectal para la fase de exposición, °F**

15

20

Tra tam ien to									Día
	Día 47	Día 48	Día 49	Día 50	Día 51	Día 52	Día 53	Día 54	55
T01	102.3 ^a	101.9 ^a	101.7 ^a	101.8 ^a	101.7 ^a	101.9 ^a	102.6 ^{de}	102.5 ^b	102.4 ^b
T02	102.3 ^{ac}	101.9 ^a	101.7 ^a	101.7 ^a	102.1 ^{bc}	101.9 ^a	101.6 ^a	101.9 ^a	101.9 ^a
T03	102.3 ^{ab}	101.8 ^a	102.1 ^{ab}	101.8 ^a	102.1 ^{bc}	101.9 ^a	102.1 ^{bc}	102.7 ^b	102.6 ^b
T04	102.5 ^{bc}	102.0 ^a	102.3 ^b	101.8 ^a	102.3 ^c	101.9 ^a	101.9 ^b	102.4 ^b	102.1 ^{ab}
T05	102.4 ^{ac}	101.9 ^a	101.8 ^{ab}	102.0 ^a	101.8 ^{ab}	102.0 ^a	103.0 ^e	102.7 ^b	102.4 ^b
T06	102.3 ^{ab}	102.0 ^a	101.9 ^{ab}	101.7 ^a	102.1 ^{bc}	101.9 ^a	102.3 ^{cd}	102.4 ^b	102.1 ^{ab}

5

10

15

Tratamiento	Día 56	Día 57	Día 58	Día 59	Día 60	Día 61	Día 62	Día 63
T01	102.6 ^b	103.5 ^b	104.5 ^{cd}	105.2 ^d	104.5 ^{bc}	103.8 ^b	103.2 ^b	102.5 ^b
T02	101.8 ^a	102.5 ^a	102.3 ^a	102.5 ^a	102.5 ^a	102.4 ^a	101.5 ^a	101.8 ^{ab}
T03	102.6 ^{ab}	103.4 ^{ab}	103.7 ^{bc}	103.5 ^{ab}	102.6 ^a	102.0 ^a	101.6 ^a	102.1 ^{ab}
T04	102.8 ^b	102.9 ^{ab}	103.3 ^b	104.9 ^{cd}	103.8 ^{ab}	102.6 ^a	101.6 ^a	101.7 ^a
T05	102.9 ^b	104.6 ^c	105.0 ^d	105.2 ^d	105.3 ^c	104.3 ^b	102.6 ^b	102.4 ^{ab}
T06	102.4 ^b	102.8 ^a	103.2 ^b	104.2 ^{bc}	103.0 ^a	102.0 ^a	101.6 ^a	101.7 ^a

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

El análisis de animales individuales reveló que en el grupo T02 (con un adyuvante que contiene Quil A), cuatro animales tuvieron una temperatura mayor que 103.5 °F luego de la primera inyección y dos animales tuvieron una temperatura mayor que 103.5 °F después de la segunda inyección. Además, un animal tuvo una temperatura de 103.2 °F el día 1 (un día después de la primera vacunación) y cinco tuvieron

temperaturas en el intervalo de 103.0-103.4 °F el día 29 (un día después de la segunda vacunación). Por el contrario, ninguno de los animales vacunados con los adyuvantes que carecían de Quil A tuvo temperaturas mayores que 103.5 °F ni después de la primera ni después de la segunda vacunación. Dos tuvieron temperaturas en el intervalo de 103.0-103.4 °F. No se observaron reacciones en el sitio de inyección >200 cm³ en este estudio. El grupo T02 (con adyuvante que contiene Quil A) tuvo reacciones en el sitio de inyección significativamente mayores los Días 2, 7 y 29 en comparación con todos los otros grupos de tratamiento. Las reacciones en el sitio de inyección medibles seguían presentes el Día 49 en T02 (segunda inyección) y T06 (primera inyección).

Tabla 24. Medias de cuadrados mínimos de reacciones en el sitio de inyección después de la primera vacunación (cm³)

Tratamien to	Día 00	Día 01	Día 02	Día 03	Día 07	Día 28	Día 49
T01	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
T02	0.0 ^a	2.0 ^a	5.4 ^c	5.7 ^b	7.2 ^c	0.2 ^a	0.0 ^a
T03	0.0 ^a	0.3 ^a	1.8 ^{ab}	1.2 ^a	1.0 ^{ab}	0.0 ^a	0.0 ^a
T04	0.0 ^a	0.4 ^a	2.1 ^b	0.0 ^a	2.0 ^{ab}	0.0 ^a	0.0 ^a
T05	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
T06	0.0 ^a	1.2 ^a	3.3 ^b	4.2 ^b	2.1 ^b	0.0 ^a	0.6 ^a

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

Tabla 25. Medias de cuadrados mínimos de reacciones en el sitio de inyección después de la segunda vacunación (cm^3)

5

Tratamien to	Día 28	Día 29	Día 30	Día 31	Día 35	Día 49
T01	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.3 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
T02	0.0 ^a	35.8 ^b	5.8 ^b	5.4 ^a	8.3 ^{bc}	0.2 ^a
T03	0.0 ^a	2.4 ^a	0.4 ^{ab}	3.6 ^a	9.8 ^c	0.0 ^a
T04	0.0 ^a	0.9 ^a	1.2 ^{ab}	5.1 ^a	1.9 ^a	0.0 ^a
T05	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a
T06	0.0 ^a	1.2 ^a	1.2 ^{ab}	3.0 ^a	3.9 ^{ab}	0.0 ^a

10

Los valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p \leq 0.10$)

15 En suma, los candidatos de vacuna T02, T03, T04 y T06 cumplieron con el criterio de resultados para proporcionar titulaciones BVDV2 $>1:8$ en todos los terneros. El candidato de vacuna T02 también proporcionó una protección del 100% contra la viremia y protección completa contra la leucopenia

20 (según se mide por una reducción en el 40% de WBC). Los terneros en este grupo experimentaron fiebre transitoria y reacciones en el sitio de inyección.

Todas las publicaciones citadas en la memoria descriptiva tanto las publicaciones de patente como las publicaciones que

no son patentes, indican el nivel de experiencia de los expertos en la técnica con la cual está relacionada esta invención. Todas estas publicaciones se incorporan en su totalidad en la presente mediante esta referencia en la misma
5 medida que si cada publicación individual se indicara específica e individualmente como incorporada mediante esta referencia.

Si bien la invención en la presente se describió con referencia a modalidades particulares, se debe comprender que
10 estas modalidades son meramente ilustrativas de los principios y las aplicaciones de la presente invención. Por lo tanto, se debe entender que se pueden hacer numerosas modificaciones a las modalidades ilustrativas y que se pueden inventar otras disposiciones sin apartarse del alcance de la
15 presente invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.