

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 220**

51 Int. Cl.:

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

C07H 15/04 (2006.01)

A61K 31/722 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2013 PCT/US2013/067212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14070709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2013 E 13850423 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 2911676**

54 Título: **Nuevos adyuvantes mucosos y sistemas de administración**

30 Prioridad:

29.10.2012 US 201261719713 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.03.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ARKANSAS (100.0%)
2404 North University Avenue
Little Rock, AR 72207, US**

72 Inventor/es:

**HARGIS, BILLY, M.;
PUMFORD, NEIL, R.;
MORGAN, MARION;
SHIVARAMAIAH, SRICHAITANYA;
TELLEZ, GUILLERMO y
WOLFENDEN, AMANDA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 809 220 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos adyuvantes mucosos y sistemas de administración

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud de patente reivindica el beneficio de prioridad para la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/719.713, presentada el lunes, 29 de octubre de 2012.

10 **Introducción**

Un adyuvante es un agente farmacológico o inmunológico que modifica el efecto de otros agentes, tal como un fármaco o vacuna. Los adyuvantes a menudo se incluyen en las vacunas para mejorar la respuesta inmunitaria del receptor a un antígeno suministrado, mientras el material extraño inyectado se mantiene al mínimo.

15 Los adyuvantes no confieren inmunidad en sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar de varias maneras al presentar un antígeno al sistema inmunológico. Los adyuvantes pueden actuar como depósito para el antígeno, presentando el antígeno durante un largo período de tiempo, maximizando así la respuesta inmunitaria antes de que el cuerpo elimine el antígeno. Ejemplos de adyuvantes de tipo depósito son las emulsiones de aceite, como el adyuvante de Freund.
20 Los adyuvantes también pueden actuar como irritantes, lo que hace que el cuerpo reclute y amplifique su respuesta inmunitaria. La vacuna contra el tétanos, la difteria y la tos ferina, por ejemplo, contiene pequeñas cantidades de toxinas producidas por cada una de las bacterias objetivo, pero también contiene hidróxido de aluminio. Las sales de aluminio son adyuvantes comunes en las vacunas vendidas en Estados Unidos y se han utilizado en vacunas durante más de 70 años.

25 El quitosano es un polisacárido lineal compuesto por D-glucosamina ligada a β -(1-4) (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) distribuidas aleatoriamente. Se elabora tratando gambas y otras conchas de crustáceos con hidróxido de sodio alcalino. El quitosano se ha utilizado como portador de vacunas tanto orales como subcutáneas con cierto éxito. En el presente documento se presentan nuevas formulaciones de adyuvantes a base de
30 quitosano que se demuestra que funcionan mejor como adyuvantes que los adyuvantes de alumbre utilizados tradicionalmente. En particular, los adyuvantes a base de quitosano proporcionados en el presente documento fueron eficaces para estimular una respuesta de IgA.

35 **Sumario**

En un aspecto, la invención proporciona una formulación de vacuna que comprende una cantidad efectiva de una composición adyuvante, comprendiendo la composición adyuvante un carbohidrato unido a quitosano para formar una base de Schiff y un antígeno, en el que el carbohidrato es un resto de manosa de anillo abierto, en el que la vacuna se formula para la administración en alimentos o agua de bebida, y en el que la base de Schiff se reduce opcionalmente
40 y en el que la cantidad efectiva es una cantidad de composición que, cuando se administra a un sujeto para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto, es capaz de aumentar la respuesta inmunitaria del sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona la formulación de vacuna de la invención para su uso en un método para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto al antígeno, comprendiendo el método administrar la formulación de la
45 vacuna al sujeto en una cantidad efectiva para potenciar la respuesta inmunitaria al antígeno.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos IgG anti- β -galactosidasa en pavos después de la vacunación primaria y el refuerzo con las formulaciones de vacuna-adyuvante indicadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La figura 2 es un gráfico que muestra la respuesta de anticuerpos IgG contra *Clostridium septicum* en pavos después de la vacunación primaria y el refuerzo con las formulaciones de vacuna-adyuvante indicadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

55 La figura 3 es un conjunto de gráficos que muestran la respuesta de anticuerpos IgG (Figura 3A) e IgA (Figura 3B) en pollos en varios puntos de tiempo después de la vacunación y el refuerzo con las formulaciones adyuvantes de la vacuna contra la gripe aviar vectorizada con *Bacillus* indicadas.

La figura 4 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos IgG contra *Salmonella* después de la vacunación primaria y el refuerzo con las formulaciones de vacuna-adyuvante indicadas medidas usando un ELISA competitivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

60 La figura 5 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos IgA contra *Salmonella* después de la vacunación primaria y el refuerzo con las formulaciones de vacuna-adyuvante indicadas medidas usando un ELISA competitivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

65 La figura 6 es un conjunto de gráficos que muestran los niveles de anticuerpos IgG (Figura 6A) e IgA (Figura 6B) contra *Salmonella* después de la vacunación primaria y el refuerzo con las formulaciones de vacuna-adyuvante indicadas medidas usando un ELISA competitivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La figura 7 es un gráfico que muestra el porcentaje de recuperación de *Salmonella* en el hígado y el bazo (L/S) o los apéndices cecales (CT) el día 22 después de la vacunación primaria (día 3 después de la exposición). El protocolo de vacunación fue el mismo que el utilizado en la figura 6 y un * indica $P < 0,05$.

La figura 8 es un gráfico que muestra el nivel de anticuerpos IgA contra *Salmonella* el día 22 después de la vacunación primaria y el refuerzo (día 12) con las formulaciones de vacuna-adyuvante indicadas a través de las vías de administración indicadas, medido usando un ELISA competitivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La figura 9 es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria de tipo IgG a *Salmonella* después de la vacunación de polluelos con las formulaciones indicadas de vacuna-adyuvante, medida con un ELISA competitivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,03$).

La figura 10 es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria de tipo IgA a *Salmonella* después de la vacunación de polluelos con las formulaciones de vacuna-adyuvante indicadas, medidas medida con un ELISA competitivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La figura 11 es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria de tipo IgG a *Bordetella avium* después de una única vacunación parenteral de pavos con las formulaciones de vacuna-adyuvante indicadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La figura 12 es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria de tipo IgG a *Bordetella avium* después de la vacunación por vía subcutánea con la formulación de vacuna-adyuvante indicada de pavos el día de la eclosión, seguida de una administración de agua de bebida de la misma combinación de vacuna-adyuvante el día 14. La respuesta se midió el día 21. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan adyuvantes que incluyen quitosano, formulaciones de vacunas que comprenden los adyuvantes, métodos para fabricar los adyuvantes y métodos para usar las formulaciones de adyuvantes y vacuna. En resumen, en el presente documento se describe un nuevo sistema adyuvante que puede usarse en métodos similares a otros adyuvantes, tales como los utilizados para vía parenteral (inyección). La molécula base implica quitosano, que es una forma desacetilada de quitina, el exoesqueleto de muchos animales invertebrados (gambas, cangrejos, insectos, etc.). El quitosano se considera un compuesto generalmente reconocido como seguro (GRAS) y se usa para la pérdida de peso, reducción de colesterol, el insomnio y mejora de la función renal. El quitosano también se usa como adyuvante usado con varias vacunas de la mucosa (Jabbal-Gill *et al.*, 2012), pero los quitosanos descritos en el presente documento son nuevos y funcionan mejor que el quitosano tradicional, como se muestra en los Ejemplos.

La proteína de quitosano reticulada con formaldehído y quitosano unido a carbohidratos proporcionan un adyuvante único para la administración oral o parenteral de antígenos de vacunas. El quitosano se ha utilizado como vehículo de vacunas tanto orales como subcutáneas. En algunas de las formulaciones, el antígeno se une covalentemente al quitosano mediante tratamiento con formaldehído. En otras, el sistema adyuvante se mejora mediante la adición de un carbohidrato (manosa, fucosa y galactosa) unido al quitosano, lo que permite orientar hacia los receptores de manosa en las células presentadoras de antígeno, mejorando así la respuesta inmunitaria al complejo quitosano-antígeno. Tanto la proteína de quitosano entrecruzada con formaldehído como el complejo de proteína quitosano manosilado, proporcionan una respuesta inmunitaria robusta, tanto por vía de administración parenteral como oral (u otra mucosa), que es única para las vacunas inactivadas.

En un aspecto, se proporciona una composición adyuvante que comprende un carbohidrato unido a quitosano para formar una base de Schiff. El adyuvante puede combinarse con un antígeno. El carbohidrato puede ser manosa, manobiosa, glucosa, galactosa o fructosa. Se pueden usar otros carbohidratos adecuados. Sin quedar ligado a teoría alguna, el carbohidrato se añade al quitosano con el objetivo de dirigir el quitosano a los receptores de estos carbohidratos en la superficie de las células presentadoras de antígeno.

El carbohidrato-quitosano usado en el presente documento se prepara como se describe más completamente en los ejemplos siguientes. El método de los inventores se basa en Jayasree (Jayasree *et al.*, 2011) usando un carbohidrato de anillo abierto con un grupo carbonilo disponible que reacciona con el grupo amino en el quitosano para formar una base de Schiff. Esta base de Schiff puede estabilizarse mediante reducción con cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_4).

Los inventores han demostrado que la reducción no era necesaria para la inmunopotenciación en la figura 6 en la que la forma reducida (Man-C V1) se comparó con la forma no reducida (Man-C V2) del quitosano, La forma no reducida produjo la mejor respuesta de tipo IgA, por lo tanto, se puede usar cualquier forma. Además, la forma no reducida del quitosano manosilado no requiere la adición de una sustancia química tóxica (NaCNBH_4). En resumen, el carbohidrato, adecuadamente manosa (10 μM), se disuelve en acetato de sodio 0,1 M a pH 4,0 a 60 °C durante 2 horas y el quitosano (0,2-2 %) se disuelve en ácido acético al 1,5 %. A continuación, la manosa disuelta y el quitosano disuelto se combinan e incuban a temperatura ambiente para permitir que el grupo amina en el quitosano reaccione con el carbonilo en el azúcar para producir una base de Schiff. La reducción de la base de Schiff no es necesaria para que el adyuvante funcione y, de hecho, los ejemplos muestran que la base de Schiff no reducida es un mejor adyuvante (véase la figura 6). En otras realizaciones, la base de Schiff puede reducirse.

En otra realización, el quitosano y un antígeno pueden reticularse usando un aldehído. En un aspecto, una composición

que comprende de 0,5 % a 2 % de un aldehído se reticula con quitosano y un antígeno. La formulación final de la vacuna contiene adecuadamente de 0,5 a 1,5 % de quitosano. El adyuvante puede contener de 0,5 % a 3 % de quitosano, adecuadamente de 0,5 % a 2 % de quitosano, adecuadamente de 0,5 % a 1,5 % de quitosano, adecuadamente de 0,5 % a 1,2 % de quitosano. La concentración final de aldehído en una composición de vacuna es adecuadamente inferior al 0,5 %). La concentración máxima de aldehído se basa en el nivel máximo de aldehído residual permitido en las vacunas. Se puede usar un nivel más alto de un aldehído para reticular el quitosano, pero la formulación final de la vacuna contiene adecuadamente menos de 0,3 % de aldehído. En los ejemplos, se utilizó formaldehído como aldehído para reticular el quitosano. Otros aldehídos, tal como formalina, glutaraldehído, acetaldehído, propionaldehído o butiraldehído, también se pueden usar. Los aldehídos reticulan los grupos amino del quitosano con los de otras moléculas de quitosano o con los de los antígenos.

En el presente documento también se proporcionan métodos para preparar una formulación de vacuna que comprende un quitosano reticulado con aldehído y un antígeno. Los métodos incluyen disolver el quitosano en una solución de ácido acético. El quitosano unido a carbohidratos también se puede usar como quitosano en este método. Adecuadamente, el ácido acético se usa a una concentración final del 1,5 % en agua o 1,5 ml de ácido acético disuelto en 1 l de agua. Adecuadamente, la cantidad de quitosano está entre 0,5 % y 2 %, adecuadamente entre 0,5 % y 1,5 %. Se añade un antígeno al quitosano disuelto en el nivel apropiado. Los expertos en la materia pueden determinar la cantidad y la forma de los antígenos utilizados en las formulaciones de vacunas. Por último, el antígeno y el quitosano se combinan con el aldehído de tal manera que la concentración final del aldehído esté entre 0,02 % y 0,5 %. El aldehído es capaz de reticular químicamente el quitosano con otras moléculas de quitosano y el quitosano con el antígeno. Se puede añadir Tris-HCl para inactivar los aldehídos libres. El Tris se puede añadir a una concentración final de 0,5 g/l.

Cualquiera de las composiciones adyuvantes desveladas en el presente documento puede combinarse con moléculas potenciadoras, incluidas, aunque sin limitaciones, saponina, receptores tipo Toll, la subunidad B de una toxina bacteriana, toxinas bacterianas, toxoide tetánico, motivos CpG, liposomas o monofosforil lípido A. Adecuadamente, las moléculas potenciadoras actúan como estimuladores adicionales del sistema inmunológico y mejoran la respuesta inmunitaria generada después de la administración de la formulación de vacuna a un sujeto.

Las formulaciones de vacuna proporcionadas en el presente documento comprenden los adyuvantes a base de quitosano descritos en el presente documento y antígenos. Los antígenos pueden ser cualquier antígeno disponible para los expertos en la materia. En las vacunas se pueden usar antígenos tales como proteínas, péptidos sintéticos, péptidos conjugados con vehículos, o microbios. Los microbios incluyen bacterias, levaduras, parásitos, hongos, virus, helmintos u otros organismos causantes de enfermedades. Los microbios incluyen organismos vivos, muertos, atenuados, recombinantes o inactivados. Los ejemplos de microbios incluyen, pero sin limitaciones, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Influenza* y *Eimeria*. Los microbios se pueden inactivar o matar antes del uso mediante tratamiento con calor, metanol u otros fijadores, tales como formaldehído u otros aldehídos. Los aldehídos pueden inactivarse mediante la adición posterior de Tris-HCl a una concentración final de 0,5 g/l. Los antígenos adecuados también pueden incluir antígenos peptídicos, tales como M2e de *Influenza*, hemaglutinina, neuraminidasa, o proteínas nucleares; TRAP o MPP de *Eimeria*; sialidasa de *Clostridium*, SagA, alfa-toxina, toxina NetB o proteína transportadora de hierro. Ejemplos de otros antígenos peptídicos se pueden encontrar al menos en las solicitudes de Estados Unidos n.º 12/441,851; 12/740,631; 12/740,608; 13/574,504; y 13/702.827. Los adyuvantes a base de quitosano pueden usarse para aumentar la respuesta inmunitaria a las vacunas ya disponibles o a las vacunas de nuevo desarrollo o vacunas autógenas.

Hay dos mejoras significativas en la vacunación asociadas con este trabajo. En primer lugar, cuando el quitosano modificado se administra conjuntamente con la vacuna inactiva por vía parenteral, se observa una respuesta inmunitaria que es superior a la respuesta inmunitaria observada con otros adyuvantes, tal como alumbre, con una mínima reacción en el sitio de inyección. Muchos adyuvantes funcionan causando una respuesta inflamatoria en el sitio de inyección o retrasando la absorción del sitio de inyección, o ambos. Una de las desventajas de los adyuvantes tradicionales es que a menudo causan alguna reacción, dolor y, en algunos casos, causan lesiones persistentes que provocan degradación o recorte de los animales productores de carne en el momento del sacrificio. El quitosano modificado puede reducir estas preocupaciones asociadas a otros adyuvantes de vacuna. Es barato de producir y fácil de convertir en vacunas comerciales.

Además, se generan respuestas inmunitarias robustas cuando los antígenos muertos se presentan de forma conjunta por vía oral, ya sea por sonda o por inclusión en el agua de bebida. Esto es realmente importante para los animales domésticos, especialmente para las aves de corral, porque la manipulación para inyección parenteral requiere mucho trabajo y causa estrés a las aves u otros animales. Con la excepción del criadero, por lo general es demasiado costoso usar vacunas inactivadas en aves de corral debido al coste de la administración. La capacidad de administrar la vacuna por vía oral cambia la forma en que se puede vacunar a los animales. Existen dos ventajas principales de la administración en masa con organismos vivos (llamadas vacunas vivas o atenuadas modificadas). En primer lugar, se puede aplicar en masa mediante el agua de bebida o la aplicación por pulverización. En segundo lugar, estas vacunas vivas también generan inmunidad en la mucosa local (tracto respiratorio y tracto intestinal donde la mayoría de los patógenos infectan). Como tales, las vacunas muertas o vivas pueden proteger contra enfermedades, pero las vacunas vivas son históricamente más efectivas para prevenir la infección real y, por lo tanto, se prefieren.

Las vacunas muertas tienen grandes ventajas, ya que pueden producirse rápidamente con un riesgo muy bajo de causar infección y enfermedad, no pueden volver a cambiar genéticamente al tipo original causante de la enfermedad, y tienen muchos menos problemas reglamentarios por estos motivos. Además, hay una gran cantidad cada vez mayor de enfermedades huérfanas que no son lo suficientemente comunes como para que una compañía dedicada a las vacunas desarrolle una vacuna regulada/autorizada, y hay disposiciones en la ley de Estados Unidos (y en muchos otros países) para producir vacunas "autógenas" elaboradas específicamente a partir del patógeno de interés, muerto, y se utilizan en los grupos fuente (o poblaciones de animales o seres humanos). En los países en desarrollo existen enfermedades huérfanas que requieren vacunas que no son asequibles o que técnicamente no son posibles de producir localmente o lo suficientemente rápido como para enfrentarse a un brote. Los adyuvantes proporcionados en el presente documento son asequibles y tecnológicamente fáciles de producir. Se pueden combinar fácilmente con un microbio inactivo o muerto para generar una vacuna.

Se encuentran disponibles varias aplicaciones potenciales para la tecnología descrita en el presente documento. La respuesta sistémica a las vacunas muertas puede mejorarse mediante la incorporación del quitosano alterado como adyuvante para inyección. Se pueden prevenir algunas enfermedades mediante la administración oral de vacunas muertas con esta plataforma adyuvante. Esta plataforma adyuvante, cuando se administra por vía oral, puede estar dirigida a estimular respuestas sistémicas y/o mucosas, lo que significa que tiene muchas de las ventajas de las vacunas vivas, pero evitando los problemas de las vacunas vivas descritos anteriormente.

Las formulaciones de adyuvantes y vacunas descritas en el presente documento pueden combinarse con otros vehículos farmacéuticamente aceptables. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo adecuado para la administración *in vivo*. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en las composiciones incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones tamponadas, soluciones de glucosa, fluidos de cultivos bacterianos o a base de aceite. Los componentes adicionales de las composiciones pueden incluir adecuadamente, por ejemplo, excipientes tales como estabilizadores, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen estabilizadores tales como carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas, tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo, tampón fosfato). Especialmente, cuando tales estabilizantes se añaden a las composiciones, la composición es adecuada para liofilización o desecación por pulverización. La composición también puede ser emulsionada.

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden combinarse con otras composiciones farmacéuticas y estas composiciones pueden administrarse en cualquier orden, al mismo tiempo o como parte de una composición unitaria. Las dos composiciones pueden administrarse de modo que una se administre antes que la otra con una diferencia en el momento de administración de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 20 horas, 1 día, 2 días, 4 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas o más.

Una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente efectiva de las formulaciones de vacuna como se usa en el presente documento significa la cantidad de la composición que, cuando se administra a un sujeto para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto a la enfermedad objetivo, es capaz de aumentar la respuesta inmunitaria, tal como la respuesta inmunitaria mediada por células o por anticuerpos, para limitar la morbilidad o mortalidad asociada con la infección o exposición a la enfermedad objetivo. Adecuadamente, la respuesta inmunitaria se potencia a un nivel tal que la administración es suficiente para efectuar un tratamiento o bloquear la morbilidad o mortalidad relacionada con la enfermedad. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo de la vacuna, la formulación o la composición, la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, el estado físico y la capacidad de respuesta del sujeto. Por ejemplo, el nivel de anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación puede multiplicarse por dos, por tres, por cuatro o más mediante la inclusión del adyuvante descrito en el presente documento en comparación con la administración del mismo antígeno sin un adyuvante o con alumbre como adyuvante. El aumento de la respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de tipo IgA o una respuesta de tipo IgG. El adyuvante también puede conducir a una reducción en la morbilidad o mortalidad asociada con la infección posterior. Como se muestra en los Ejemplos, el uso de los adyuvantes descritos en el presente documento en combinación con un antígeno puede conducir a una reducción en la tasa de infección posterior o de la gravedad de la infección posterior con el microbio frente al que el antígeno provoca una respuesta inmunitaria en comparación con la vacunación con el antígeno solo o la vacunación con el antígeno y un adyuvante distinto. La gravedad de la infección puede medirse mediante la capacidad de un microorganismo para invadir tejidos más allá del sitio de introducción, replicarse y/o persistir dentro del organismo a lo largo del tiempo o causar morbilidad o mortalidad. Los animales vacunados pueden infectarse posteriormente con un patógeno. En estos casos, el crecimiento del patógeno en el sujeto después de la exposición se reduce en al menos $1 \log_{10}$, $2 \log_{10}$ o incluso $3 \log_{10}$ en los sujetos que recibieron la vacuna en comparación con los sujetos que recibieron un control.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por cualquier medio conocido por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, oral, intranasal, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, absorción nasofaríngea o transmucosa. Por tanto, los compuestos pueden formularse como una formulación ingerible, pulverizable o inyectable. Por ejemplo, la administración oral puede implicar la adición al agua de bebida, rociado en la comida, rociado en a los animales (tal como pollos o pavos que ingerirán la vacuna

en el aerosol cuando se acicalen las plumas). Los sujetos pueden ser mamíferos, incluyendo seres humanos, vacas, cerdos, gatos, perros u otros animales domesticados, o no mamíferos, tales como aves de corral, es decir, pollos o pavos.

5 Se apreciará que la dosis específica administrada y el momento de la administración (es decir, vacunación primaria y refuerzo) en cualquier caso dado se ajustarán de acuerdo con la formulación que se administra, la enfermedad a la que está dirigida, el riesgo de exposición, el estado del sujeto y otros factores médicos relevantes que pueden modificar la respuesta del sujeto o la factibilidad de proporcionar la formulación al sujeto. Por ejemplo, la dosis específica para un sujeto depende del tipo de sujeto, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, la dieta, el momento y la vía de administración, la velocidad de excreción, los fármacos usados en combinación y la gravedad del trastorno en particular en al que está dirigida la vacuna. La vacunación inicial y el refuerzo pueden administrarse por diferentes medios. Por ejemplo, una vacunación inicial por vía subcutánea puede reforzarse mediante la inclusión del complejo adyuvante-antígeno en el agua de bebida o en los alimentos. El porcentaje de quitosano en las formulaciones de vacunas generalmente está entre 0,2 y 2 %, adecuadamente 0,5-1,5 %. La cantidad total de quitosano administrado puede ser de menos de 1 mg por vacunación a 100 mg, adecuadamente, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 50, 75 o 100 mg de quitosano. En los ejemplos, se usaron 2-5 mg de quitosano por dosis. Cuando se combina con un antígeno microbiano, el microbio puede incluirse entre 1×10^6 a 1×10^9 microbios por dosis. En los ejemplos, se utilizaron de 1×10^7 a 1×10^8 microbios por dosis. Se puede incluir un antígeno a de 10 μg a 10 mg por dosis. En los ejemplos, se usaron 100 μg por dosis.

Los siguientes ejemplos pretenden ser solo ilustrativos y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención ni de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo I: Respuesta inmunitaria a la β -galactosidasa después de la vacunación primaria y el refuerzo

El primer experimento de los inventores para probar la vacuna de proteína quitosano reticulado con formaldehído usó la proteína clásica β -galactosidasa (β -Gal) como proteína modelo. Se vacunaron las crías de pavo con β -Gal, como se describe en la Tabla 1 a continuación, con seis grupos de tratamiento y un control. Las crías se vacunaron con solución salina o 100 μg de P-Gal (0,25 ml) en solución salina, 15 % de alumbre, 1 % de quitosano reticulado (3 grupos) con formaldehído (Form.) o 1,5 % de quitosano no reticulado con formaldehído mediante inyección parenteral subcutánea (sc) el día de la eclosión. Todos los grupos fueron reforzados con la misma fórmula sc los días 14 y 25, excepto dos de los grupos de 1% de quitosano, uno se reforzó ambos días con 1 % de quitosano- β -Gal por sonda oral y otro se reforzó por pulverización con 1 % de quitosano- β -Gal (2 ml).

La respuesta inmunitaria a la β -galactosidasa se determinó usando suero en un ELISA para β -galactosidasa y los resultados se muestran en la figura 1. Los niveles de la respuesta inmunitaria se indican como relaciones entre la muestra y el control positivo de absorbancia en un ELISA indirecto. Las relaciones S/P más altas indican títulos de anticuerpos anti- β -galactosidasa más altos. Hubo muy poca reactividad cruzada en el ELISA usando suero de pavos vacunados con solución salina y solo un aumento numérico modesto cuando se vacunó con β -Gal en solución salina. Un adyuvante comercial común utilizado actualmente es el 15 % de alumbre y hubo una buena respuesta inmunitaria cuando se usó. Al utilizar el sistema de los inventores de vacuna inmunoestimulada con quitosano y reticulada con formaldehído (marcada como 1 % de quitosano) hubo un aumento significativo en la respuesta inmunitaria al antígeno modelo, β -Gal. Usando quitosano solo incluso a una concentración más alta de 1,5 % hubo una respuesta inmunitaria significativamente más baja. Además, cuando el antígeno se reforzó con 1 % de adyuvante tratado con quitosano-tremalaldehído mediante pulverización o tratamiento oral, hubo una respuesta comparable al adyuvante estándar, 15 % de alumbre, administrado por vía subcutánea.

Tabla 1 Grupos de tratamiento

Grupo	Inmunógeno	Día de eclosión VX primario (100 μg /0,25 ml)	Refuerzo a los 14 días desde la eclosión
Solución salina	Ninguno	SC	SC (100 μg /0,5 ml)
β G en solución salina	β -galactosidasa	SC	SC (100 μg /0,5 ml)
15 % de alumbre	β -galactosidasa	SC	SC (100 μg /0,5 ml)
1 % de quitosano	β -galactosidasa	SC	SC (100 μg /0,5 ml)
1,5 % de quitosano sin form.	β -galactosidasa	SC	SC (100 μg /0,5 ml)

(continuación)

Grupo	Inmunógeno	Día de eclosión VX primario (100 µg/0,25 ml)	Refuerzo a los 14 días desde la eclosión
1% de quitosano 2 ^a oral	β-galactosidasa	SC	Sonda oral (100 µg/0,5 ml)
1% de quitosano 2 ^a pulverización	β-galactosidasa	SC	Pulverización (100 µg/ml) pulverización atomizada de 50 ml por 20 aves en un espacio de 1,8 m ² (20 pies cuadrados)

Ejemplo II: Respuesta inmunitaria a *Clostridium* tras la vacunación con varios adyuvantes

- 5 Se realizó un experimento similar al descrito anteriormente mediante la administración de 4×10^8 UFC/ml de la bacterina de *Clostridium septicum* (CS) en alumbre o quitosano reticulado con formalina de manera que la dosis final por ave sea de 1×10^8 UFC/ave a crías de pavo el día de la eclosión por vía subcutánea (en 0,25 ml) solos o en combinación con 12 % de alumbre o 0,5 % de quitosano reticulado con formalina. El día 14, todas las aves recibieron un refuerzo con la misma vacuna por la misma vía. Los niveles de la respuesta inmunitaria resultante se midieron mediante un ensayo ELISA indirecto y se indicaron como la relación de la absorbancia entre la muestra y el control positivo (S/P). Las relaciones S/P más altas son indicativas de anticuerpos anti-CS más altos.

15 Las aves que recibieron la vacuna sin adyuvante dieron como resultado una respuesta de anticuerpos detectable por ELISA con una relación S/P de 0,16 como se muestra en la Figura 2. Este nivel de anticuerpos no fue estadísticamente diferente del CS adyuvado con alumbre. Después de un refuerzo (14 días después de la vacunación primaria), las crías vacunadas con la bacterina CS adyuvada con 0,5 % de quitosano reticulado con formalina mostraron niveles de IgG que dieron como resultado relaciones S/P de aproximadamente el doble que la bacterina CS sin adyuvante, 0,4 y 0,16, respectivamente. La bacterina CS con adyuvante de hidróxido de aluminio indujo niveles de tipo IgG que fueron aproximadamente un 30 % más bajos que los niveles de IgG inducidos por CS con quitosano en comparación con las relaciones S/P, 0,27 y 0,4, respectivamente, (Véase la Figura 2). Es importante destacar que, las lesiones en el sitio de inyección son menos pronunciadas a las 72 horas (o más tarde) debido a la administración de quitosano, mientras que el alumbre siempre produce inflamación local y granulomas, a menudo progresando a tejido cicatricial encapsulado.

25 Ejemplo III: Experimentos de vacunación contra la gripe aviar.

30 La gripe aviar (AI) es un problema importante de salud pública y una grave amenaza económica para la industria avícola comercial de todo el mundo. Los datos anteriores de los inventores sugieren que las vacunas vectorizadas con *Salmonella* que expresan M2e en asociación con CD154 son eficaces contra la IA. Se probaron nuevas construcciones usando *Bacillus subtilis* como vector y epítomos M2e con moléculas inmunoestimuladoras. Los niveles de anticuerpos específicos de M2e de tipo IgG sérica y de tipo IgA de la mucosa se determinaron mediante ELISA los días 11, 15 y 21 después de la eclosión. El día de la eclosión, las crías fueron vacunadas mediante sonda oral o inyección subcutánea con la vacuna contra la gripe aviar vectorizada con *Bacillus* (BSAI), *Bacillus* salvaje (BSBB) como vacuna viva, BSAI después de la inactivación con formalina, BSAI después de la inactivación con formalina, liofilización y reconstitución con solución salina o BSAI después de la inactivación con formalina y reticulada con 1 % de quitosano. Cada vacuna se administró a 10^6 UFC/cría o en 0,25 ml o 0,25 ml de solución salina. El día 10 después de la eclosión, las crías de dos grupos (BSAI viva, BSAI inactivada y liofilizada) recibieron una vacuna de refuerzo del mismo tratamiento que recibieron el día 0 y los grupos no recibieron la segunda dosis de la vacuna.

40 Las muestras de IgG en suero y de IgA mucosa se obtuvieron de aves de todos los grupos los días 11, 15 y 21 después de la eclosión y se usaron en un ELISA de captura de anticuerpos. Las placas se revistieron con M2e conjugado con BSA (10 µg/ml), se bloquearon, se incubaron con suero de cada uno de los grupos de tratamiento diluidos a 1:50 en 2 % de FBS/PBS, seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con HRP dilatado 1:7.500, y desarrollado usando sustrato TMB. Los resultados se presentan como las relaciones S/P (media de las muestras media del control negativo), (media del control positivo - media del control negativo) \pm SEM (n = 20).

50 En comparación con el control de la estructura principal de *Bacillus* (BSBB), hubo aumentos significativos en las respuestas de anticuerpos de tipo IgG específicos de M2e en cada grupo vacunado en cada punto de tiempo probado. Sin embargo, no se observaron diferencias dentro de cada punto de tiempo entre ninguno de los seis grupos vacunados en el aumento de la respuesta de anticuerpos de tipo IgG (véase la Figura 3A). La diferencia real en la respuesta inmunitaria es evidente cuando se observa la respuesta de anticuerpos específicos de tipo IgA de la mucosa (véase la Figura 3B). BSAI + 1 % de quitosano mostró un marcado aumento en la respuesta específica de anticuerpos de tipo IgA en comparación con el control o los cinco grupos de tratamiento adicional que recibieron la vacuna en los tres puntos de tiempo muestreados.

55 En resumen, en experimentos que utilizan quitosano reticulado, se ha demostrado anteriormente que esta modificación de quitosano es un mejor adyuvante que el hidróxido de aluminio a través de las vías parenteral y oral (Figura 1 y 2). Se demostró que el quitosano tratado con formaldehído como agente de reticulación es más efectivo que el quitosano

sin formaldehído (Figura 1). Cuando se usó por vía oral, el quitosano potenció la producción de IgA (Figura 3B) preferentemente sobre IgG (Figura 3A).

Ejemplo IV: Potenciación del adyuvante de quitosano

5 El adyuvante se potenció aún más a través de una serie de experimentos diseñados para mejorar el adyuvante a base de quitosano mediante la adición de potenciales moléculas potenciadoras o estrategias de administración alternativas. Los compuestos inmunoestimuladores pueden mejorar potencialmente las respuestas cuando se usan con adyuvantes y varios se han investigado previamente; véanse las revisiones (Guy, 2007; Mutwiri *et al.*, 2011). Los potenciales
10 adyuvantes incluyen saponinas, componentes bacterianos, compuestos que interactúan con el sistema inmunológico innato, tales como receptores tipo Toll, ácidos nucleicos, tales como el motivo CpG, virus, emulsiones, incluidos los liposomas, o una combinación de cualquiera de estos componentes. Algunas de las moléculas de inmunoestimulación más prometedoras que interactúan con el sistema inmunológico innato son el toxoide del tétanos (TT), la subunidad de enterotoxina B termolábil (LTB) y la subunidad B de la toxina del cólera (CTB). Otros compuestos que demuestran
15 potencian el sistema inmunológico empíricamente a través de propiedades químicas innatas incluyen saponina y monofosforil lípido A (MPLA). El uso de manosa u otros azúcares para atacar a la unión a los receptores de macrófagos puede mejorar la función inmunitaria. Las combinaciones de diferentes adyuvantes pueden actuar sinérgicamente, tal como con IL-12 u otras citocinas para estimular la respuesta inmunitaria.

20 El primer experimento para mejorar el adyuvante comparó el adyuvante de quitosano reticulado con formaldehído, que consiste en un antígeno de interés reticulado con 0,5 % de quitosano, usando formaldehído para generar los datos que se muestran en las Figuras 1-3 anteriores. Este sistema adyuvante se utilizó luego como control o referencia para la selección de las mejores combinaciones de moléculas candidatas potenciadoras del sistema inmunitario seleccionadas. El inmunógeno de prueba fue una bacterina de *Salmonella enteritidis* (SE) desarrollada a 10^8 UFC/ml e inactivada con formaldehído. Para determinar si el adyuvante de quitosano reticulado podía mejorarse aún más, el
25 inmunógeno de prueba (la bacterina de *Salmonella* con quitosano fue 4×10^7 UFC/ml con una dosis final de 1×10^7 UFC por ave) se mezcló en una proporción DE 2:1 con quitosano reticulado solo o potenciado con el toxoide del tétanos (TT), la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) o el quitosano manosilado y se administró en el agua de bebida o en el alimento. Los resultados se presentan en la figura 4.

30 El TT puede ser una posible molécula potenciadora del sistema inmunológico y se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de vacunas. Se ha demostrado que la enterotoxina termolábil de *E. coli* es una potente molécula inmunoestimuladora, pero es muy tóxica y, por lo tanto, no es adecuada como adyuvante. La enterotoxina termolábil consiste en dos subunidades, un núcleo central LTA y cinco subunidades de LTB (da Hora *et al.*, 2011). La subunidad
35 de LTB retiene las propiedades inmunes del adyuvante y, sin embargo, no es tóxica. Por lo tanto, este es un potencial componente adyuvante seguro. La manosa y algunos otros carbohidratos (como la galactosa y la fucosa) son ligandos para los receptores que activan los macrófagos. El quitosano manosilado se preparó mediante un método similar al descrito previamente por Yalpani y Hall (1980 y 1985) y Jayasree *et al.*, (2011) sin la adición del cinc. En resumen, dos equivalentes molares de manosa en un volumen de acetato de sodio 0,1 M se calentaron a 60 °C durante dos
40 horas. A continuación, la solución se añadió a dos volúmenes de un equivalente molar de 2 % de quitosano en 0. 15 % de ácido acético y se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente para producir 1,5 % de quitosano manosilado. La bacterina de SE se añadió después a 1,5 % de quitosano manosilado en una proporción de dos a uno. A continuación, las bases de Schiff formadas se redujeron con cianoborohidrato de sodio (NaCNBH_4).

45 Además, a las moléculas inmunopotenciadoras, también se investigaron diferentes sistemas de administración como se ha señalado anteriormente. El sistema típico de suministro de agua de bebida utilizado en la industria avícola diluye el fármaco o la sustancia química de una parte en 128 partes de agua. La fórmula original de quitosano utilizada en las Figuras 1-3 se diluyó a 1:128 en el agua de bebida como potencial sistema de administración. El último grupo de
50 prueba fue de 0,5 % de quitosano reticulado con formaldehído con la bacterina de SE (fórmula original de quitosano) encapsulada mediante la adición gota a gota al tripolifosfato (TPP), después se secó y se molió en un polvo para añadir al alimento a una tasa de 0,5 % (peso/peso).

Las crías de pollo de engorde el día de eclosión fueron sensibilizadas con 0,25 ml de las preparaciones indicadas por vía subcutánea como se ha indicado anteriormente. Estos grupos se sensibilizaron igual que el del grupo con solo
55 quitosano. Se reforzó a las crías mediante sonda oral a los 12 días de edad, excepto el agua de bebida y los grupos de TPP que fueron reforzados en el agua a 1:128 o en la alimentación al 0,5 % (peso/peso) durante 8 horas, respectivamente. Los niveles de anticuerpos el día 22 en suero (IgG) y la mucosa ileal (IgA) se determinaron con un kit de ELISA competitivo (IDEXX). La disminución de los niveles de absorbancia o de las relaciones muestra:control indica niveles más altos de anticuerpos que reconocen las placas recubiertas con flagelina de SE.

60 Como se indica en las Figuras 1 y 2 anteriores, el adyuvante de quitosano fue superior al alumbre en la producción de una respuesta inmunitaria robusta. En el presente documento, cada uno de los adyuvantes a base de quitosano fue capaz de producir una respuesta robusta a la bacterina de SE, con niveles significativamente más altos de IgG e IgA en comparación con el quitosano solo administrado por vía subcutánea (Figuras 4 y 5, respectivamente). Los grupos
65 TT y TPP de polvo seco tuvieron una respuesta inmunitaria significativamente más alta que los preparados sc con adyuvante de quitosano de refuerzo sc (Figuras 4 y 5). Los otros tres grupos, quitosano con LTB, quitosano manosilado

y refuerzo de quitosano en el agua de bebida, fueron consistentemente superiores en la producción de anticuerpos en comparación con el quitosano solo administrado por vía subcutánea (Figuras 4 y 5).

5 En el siguiente conjunto de experimentos, los tres mejores grupos del experimento anterior (LTB, refuerzo de quitosano en AB y quitosano manosilado reducido) se repitieron junto con el control negativo (solución salina) y el control de referencia de quitosano reticulado con formaldehído administrado sc para vacunas primarias y de refuerzo, que se había demostrado previamente que eran superiores al alumbre. En este experimento, se añadieron tres nuevos grupos de tratamiento utilizando el control de referencia de 0,5 % de quitosano reticulado con formaldehído inmunopotenciado con la subunidad de la toxina B del cólera (CTB), el lípido A de *Salmonella* (MPLA), o saponina. También se añadió 10 en este experimento otro grupo de tratamiento que era similar al grupo de tratamiento con quitosano manosilado, que se demostró que era un excelente adyuvante en el experimento anterior (quitosano manosilado versión 1, Man-C V1), pero en este grupo no se redujo con NaCNBH₄ (Man-C V2).

15 El ELISA competitivo de flagelina de SE mostró nuevamente que las aves vacunadas por vía subcutánea con 0,5 % de quitosano (C) tanto para la primaria como para el refuerzo tenían niveles más altos de inmunoglobulinas en el suero (Figura 6A). Las aves vacunadas con 0,5 % de quitosano con CTB (C + CTB), Man-C V2 y quitosano con saponina (C + saponina) dieron la mejor respuesta de tipo IgG (Figura 6A). Man-C V2 dio numéricamente la mejor respuesta de tipo IgA (Figura 6B). Los tres grupos de tratamiento fueron significativamente diferentes del grupo de referencia (0,5 % de vacuna con quitosano sc tanto para el primario como para el refuerzo) (Figura 6).

20 Además, se expuso a las aves fueron el día 19 a *Salmonella* viva a 5 X 10⁷ UFC/cría. Tres días después de la exposición, se realizaron cultivos de las aves para detectar *Salmonella* en el apéndice cecal (CT) y el hígado/bazo (L/S). Quitosano con CTB, ambas versiones de quitosano manosilado, quitosano en el refuerzo en el agua de bebida, y el quitosano más la saponina disminuyeron significativamente la *Salmonella* por debajo de los límites detectables en el hígado/bazo (L/S) en comparación con el control negativo (vacunado con solución salina) (Fig. 7; p < 0,05). En el 25 intestino (CT), los niveles de *Salmonella* se redujeron significativamente usando cualquiera de las dos versiones de quitosano manosilado y en el grupo con refuerzo con 0,5 % de quitosano diluido a 1:128 en el agua de bebida. La disminución significativa en los grupos quitosano manosilados indica que el direccionamiento directo del macrófago con un ligando para el receptor manosa aumenta la efectividad del adyuvante quitosano. Además, es muy importante que la formulación con base de Schiff no reducida del quitosano manosilado fue tan efectiva como el NaCNBH, el 30 quitosano manosilado reducido que no tenía la adición de un químico potencialmente dañino. Otra sorpresa importante fue que el quitosano diluido a 1:128 al 0,5 % en el agua de bebida que se utilizó para el refuerzo dio resultados superiores en la disminución de la colonización de *Salmonella* en comparación con la vacunación parenteral solamente (Fig. 7).

35 Ejemplo V: Vía de administración para la vacunación

Se investigó la mejor vía y combinación adyuvante para la vacunación. El día de la eclosión se administró a las crías 40 0.25 ml de solución salina o de la vacuna con la mezcla adyuvante respectiva como se indica en la Figura 8. Los adyuvantes comparados incluyen el quitosano reticulado con formaldehído, el quitosano manosilado reducido (Man C V1), el quitosano manosilado no reducido (Man C V2), y cada adyuvante se combinó con antígeno y se administró el día de la eclosión, ya sea por vía subcutánea o en el agua de bebida. Las aves recibieron un refuerzo con una segunda administración de la misma combinación de adyuvante-antígeno por vía subcutánea, en el agua de bebida o por sonda oral. Los grupos que fueron vacunados en el agua de bebida (AB) se diluyeron a 1:128 en el agua. A los reforzados 45 mediante sonda oral se les administraron 0,25 ml. La respuesta de tipo IgA mucosal se midió usando un ensayo ELISA competitivo de flagelina de SE (IDEXX) como se ha descrito anteriormente. Aunque los últimos cinco grupos de tratamiento en la Figura 8 no fueron significativamente diferentes, el grupo numéricamente más bajo fue el quitosano manosilado V2 administrado sc en la vacunación primaria y una dilución 1:128 en el AB para el refuerzo. Este grupo tenía niveles significativamente más altos de IgA en el íleon en comparación con 0,5 % de quitosano con vacunación 50 primaria sc y refuerzo sc o AB. No se observaron diferencias significativas entre las formas reducidas y no reducidas del quitosano manosilado o cuando el refuerzo se administró a través del agua de bebida o la sonda oral.

Ejemplo VI: Comparación con un adyuvante a base de aceite mineral

55 A continuación, el quitosano manosilado se comparó y combinó con un adyuvante a base de aceite mineral disponible comercialmente. Se usó como antígeno la bacterina de *Salmonella enteritidis* (SE) desarrollada a 10⁸ UFC/ml e inactivada con formaldehído. La bacterina de *Salmonella* se mezcló con quitosano, quitosano manosilado, el adyuvante de aceite mineral, el adyuvante de aceite mineral, una combinación de quitosano y el adyuvante de aceite mineral o PBS a 4 X 10⁷ UFC/ml con una dosis final de 1 x 10⁷ UFC por ave en una proporción de 2:1. Las crías de 60 pollo de engorde el día de eclosión fueron sensibilizadas con 0,25 ml de las preparaciones indicadas por vía subcutánea como se ha indicado anteriormente. Las crías recibieron refuerzopor sonda oral a los 12 días de edad. Los niveles de anticuerpos el día 22 en suero (IgG) y mucosa ileal (IgA) se determinaron con un kit ELISA competitivo (IDEXX) y los resultados se muestran en las Figuras 9 y 10, respectivamente. La disminución de los niveles de absorbancia o de las relaciones muestra:control indica niveles más altos de anticuerpos que reconocen las placas 65 recubiertas con flagelina de SE. La vacunación con quitosano manosilado y el protocolo de refuerzo produjeron niveles significativamente aumentados de IgG e IgA en comparación con cada uno de los otros grupos.

Ejemplo VII: Respuesta de tipo IgG después de una sola administración

5 Para investigar la respuesta inmunitaria de tipo IgG después de una sola vacuna parenteral, se vacunó a las crías el día de la eclosión por vía subcutánea con $2,5 \times 10^8$ UFC/cría de bacterina de *Bordetella avium* combinada con solución salina, quitosano normal o quitosano manosilado. Se obtuvo suero el día 14 y se midió la IgG específica de *Bordetella* mediante ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 11 y muestran las proporciones de muestra: control positivo de la absorbancia para los tratamientos indicados. Los niveles más altos de absorbancia son indicativos de aumento de IgG específica. El quitosano manosilado combinado con el antígeno de *Bordetella* produjo los niveles más altos de
10 IgG.

Ejemplo VIII: Respuesta de IgG después del refuerzo en el agua de bebida

15 Investigar la respuesta inmunitaria de tipo IgG después de la administración de la bacterina de *Bordetella avium* por vía subcutánea, seguida de un refuerzo de agua de bebida el día 14. Se vacunó a las crías el día de la eclosión por vía subcutánea con $2,5 \times 10^8$ UFC/cría de bacterina de *Bordetella avium* combinada con solución salina, quitosano normal o quitosano manosilado. El día 14, se incluyeron $7,8 \times 10^6$ UFC/ml de bacterina de *Bordetella avium* en el agua de bebida como un refuerzo de la vacunación. El día 21, 7 días después del refuerzo se obtuvo suero y se midió la respuesta de tipo IgG específica mediante ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 12 y muestran las proporciones de muestra: control positivo de la absorbancia para los tratamientos indicados. Los niveles más altos de absorbancia son indicativos de aumento de IgG específica. El quitosano manosilado combinado con el antígeno de *Bordetella* produjo niveles significativamente más altos de IgG en comparación con el control o el quitosano no
20 modificado.

25 Métodos para la preparación de adyuvantes:

Preparación de la vacuna con proteína quitosano reticulada con formaldehído:

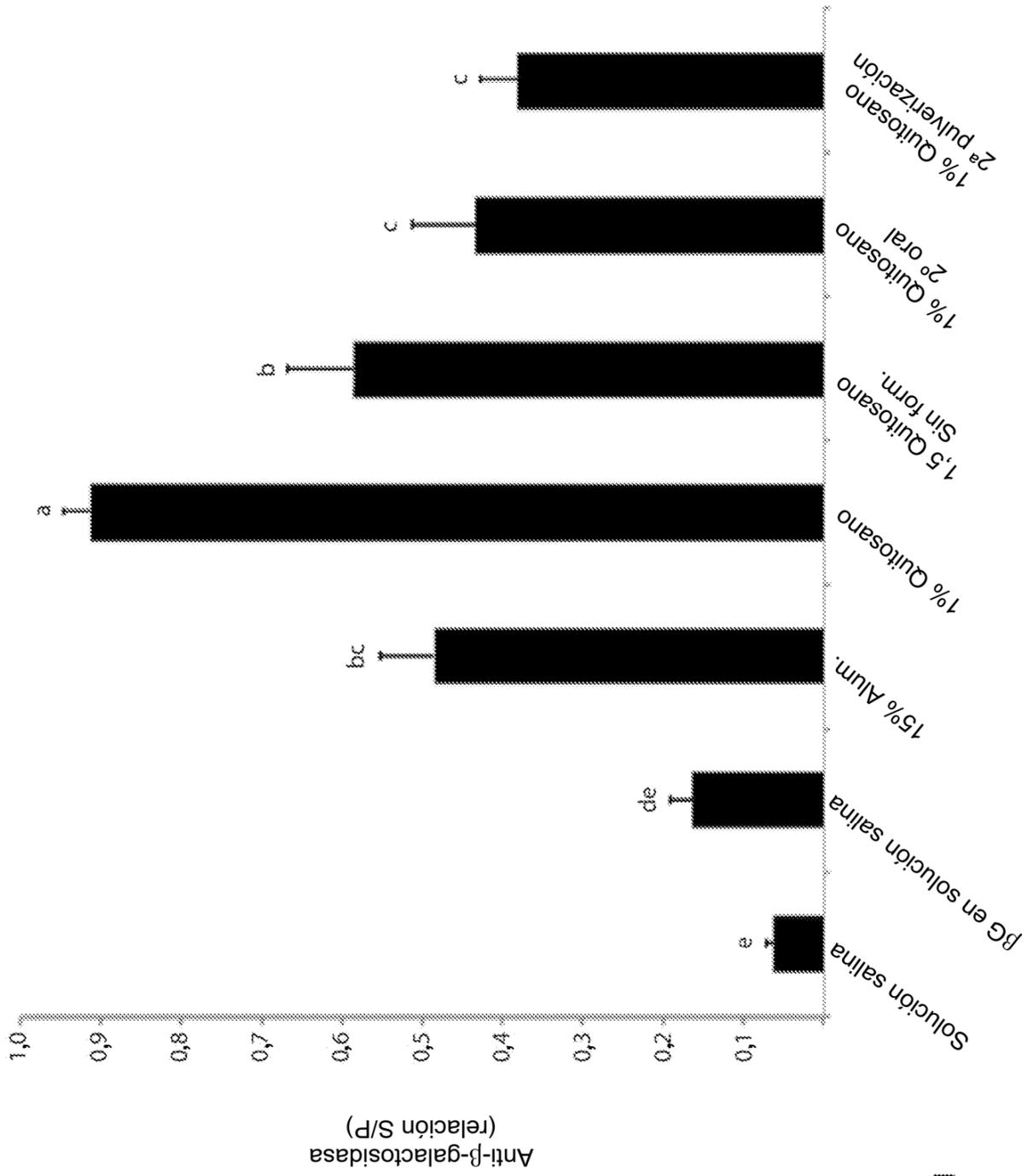
30 El producto final de quitosano sin manosa puede variar desde una concentración final mínima de 0,5 % de quitosano y una concentración final máxima de 2 % de quitosano en la formulación de la vacuna. El quitosano se disuelve en una solución que contiene 15 ml de ácido acético glacial por l de agua desionizada a la concentración apropiada (ácido acético al 1,5 % en agua). Normalmente para cultivos de caldo, se mezclan 2 volúmenes de cultivo con un volumen de 1,5 % de quitosano (0,5 % de quitosano en la formulación final de la vacuna). Otros antígenos se diluyen lo menos posible dando una concentración final de hasta 1.5 % de quitosano. A continuación, el formaldehído se añade a la
35 mezcla de quitosano disuelto en antígeno de modo que la concentración final es de formaldehído al 0,2 % o formaldehído 0,008 M. En los ejemplos anteriores, se utiliza una solución de formaldehído al 37 %. Se puede añadir Tris-HCl a una concentración final de 0,5 g/l.

40 Preparación de quitosano manosilado:

45 Dos equivalentes molares de manosa en un volumen de acetato de sodio 0,1 M, a pH 4,0 se calentaron a 60 °C durante dos horas. A continuación, la solución se añadió a dos volúmenes de un equivalente molar de 2 % de quitosano en ácido acético al 0,15 % y se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente para producir una solución de quitosano manosilado al 1,5 %. Esto se puede mezclar con cultivos de caldo de tal manera que se mezclan 2 volúmenes de cultivo con un volumen de quitosano manosilado al 1,5 %. Los antígenos concentrados se pueden diluir lo menos posible o según se desee. Se puede añadir Tris-HCl a una concentración final de 0,5 g/l.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de vacuna que comprende una cantidad efectiva de una composición adyuvante, comprendiendo la composición adyuvante un carbohidrato unido a quitosano para formar una base de Schiff y un antígeno, en el que el carbohidrato es un resto de manosa de anillo abierto, en donde la vacuna está formulada para administración en alimentos o agua de bebida, y en donde la base de Schiff está reducida opcionalmente y en donde la cantidad efectiva es una cantidad de composición que, cuando se administra a un sujeto para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto, es capaz de aumentar la respuesta inmunitaria del sujeto.
2. La formulación de vacuna de la reivindicación 1, que comprende además una molécula potenciadora que es capaz de actuar como un estimulador adicional del sistema inmunológico y potenciar la respuesta inmunitaria generada después de la administración de la formulación de vacuna a un sujeto, en la que la molécula potenciadora se selecciona del grupo que consiste en saponina, receptores tipo Toll, la subunidad B de una toxina bacteriana, toxinas bacterianas, motivos CpG, liposomas, monofosforil lípido A, es toxoide del tétanos, subunidad B de la toxina del cólera, subunidad B de la enterotoxina termolábil y tripolifosfato.
3. La formulación de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el antígeno es un microbio.
4. La formulación de vacuna de la reivindicación 3, en la que el microbio es *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bordetella*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Influenza* o *Eimeria*.
5. La formulación de vacuna de las reivindicaciones 3 o 4, en la que el microbio está inactivado o muerto.
6. La formulación de vacuna de la reivindicación 5, en la que el microbio se mata usando formaldehído, glutaraldehído o formalina.
7. La formulación de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto al antígeno, comprendiendo el método administrar la formulación de la vacuna al sujeto en una cantidad efectiva para potenciar la respuesta inmunitaria al antígeno.
8. La formulación de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la respuesta inmunitaria incluye una respuesta de anticuerpos potenciada en comparación con la administración de una vacuna sin un adyuvante.
9. La formulación de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la respuesta de anticuerpos potenciada es una respuesta de anticuerpos de tipo IgA secretora potenciada en comparación con la administración de una vacuna sin un adyuvante.
10. La formulación de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que el sujeto es un mamífero o un ave de corral.
11. La formulación de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en la que la vía de administración es subcutánea u oral.
12. La formulación de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en la que la formulación de vacuna se administra en los alimentos o en el agua de bebida.



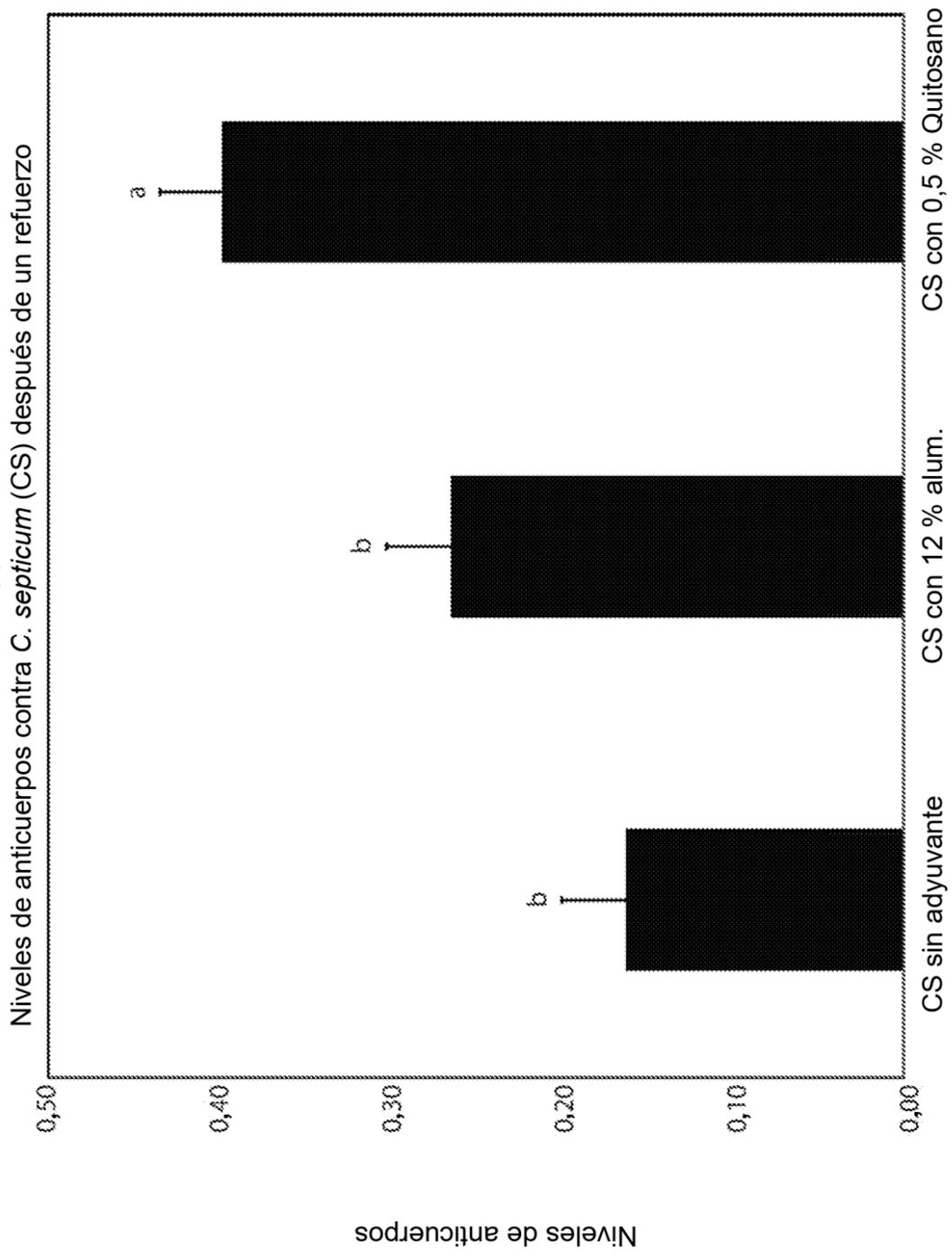


Fig. 2

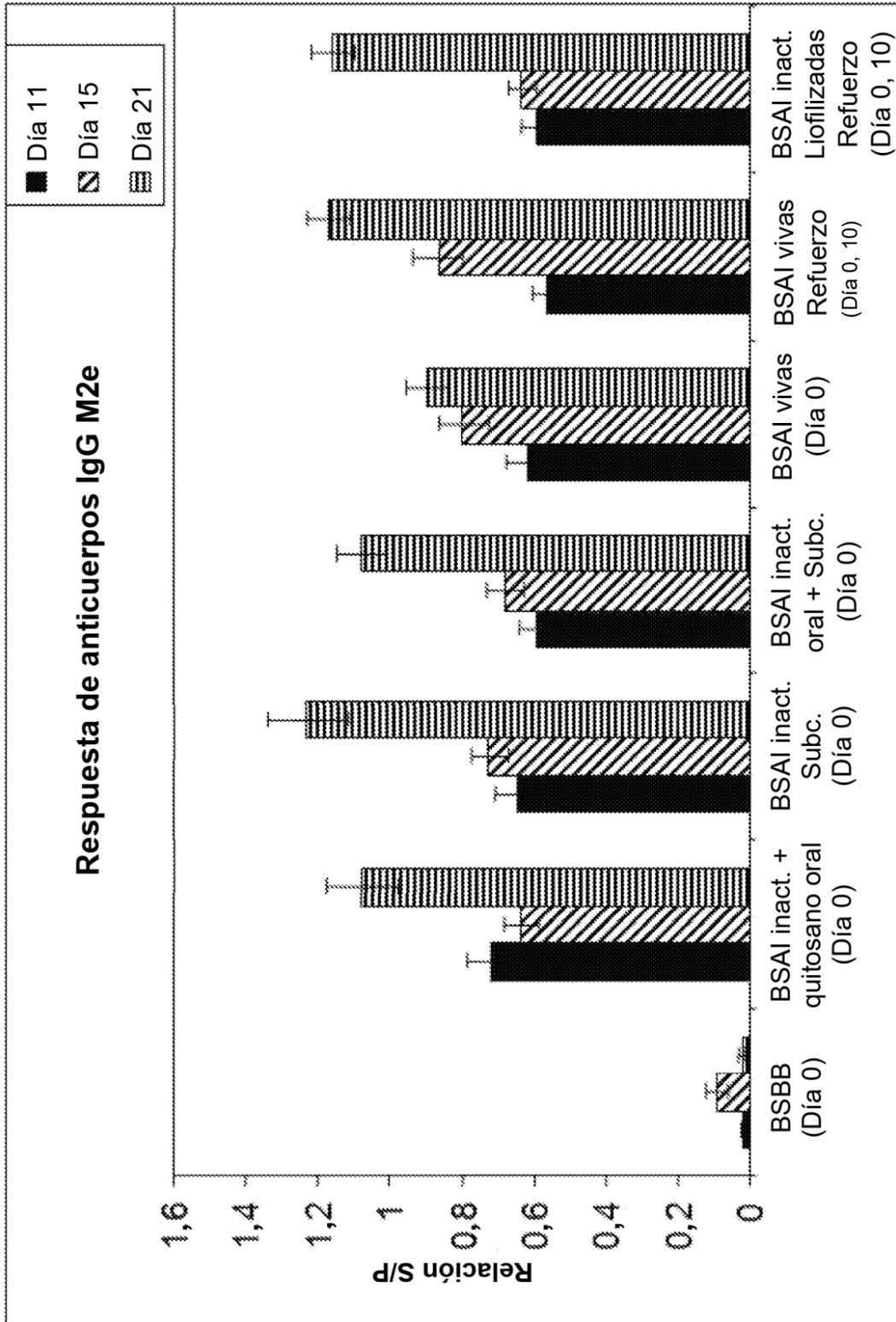


Fig. 3A

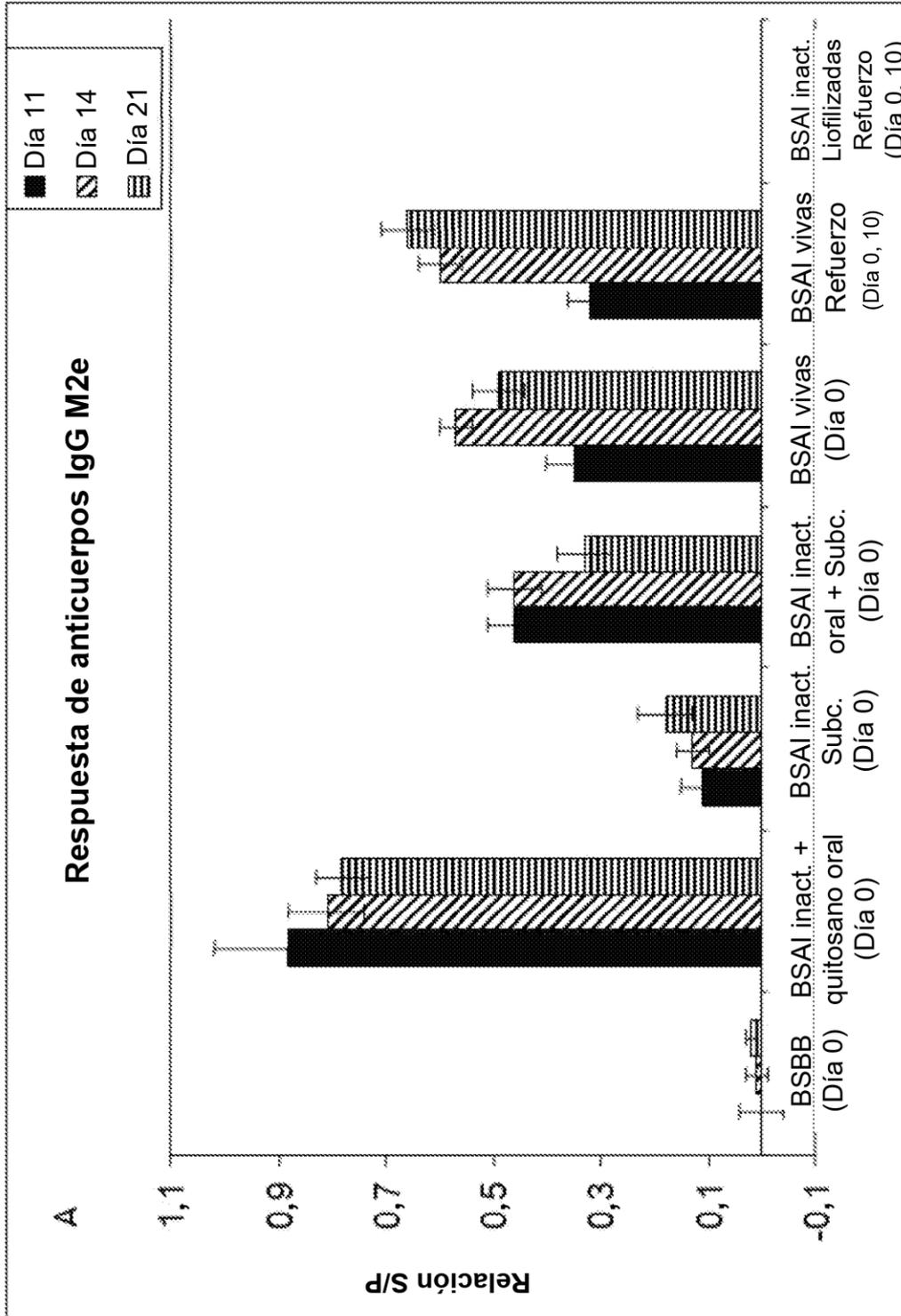
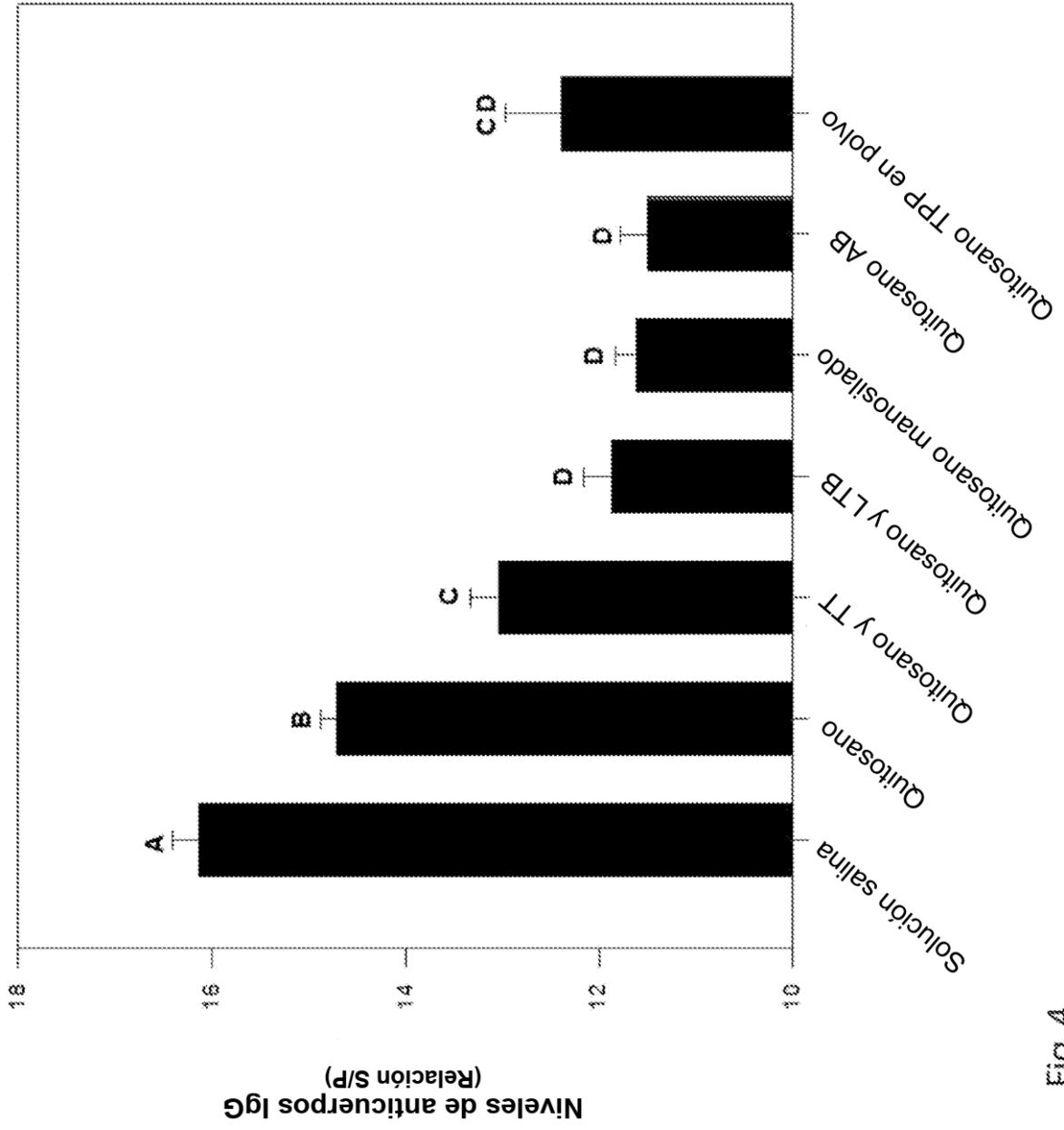


Fig. 3B



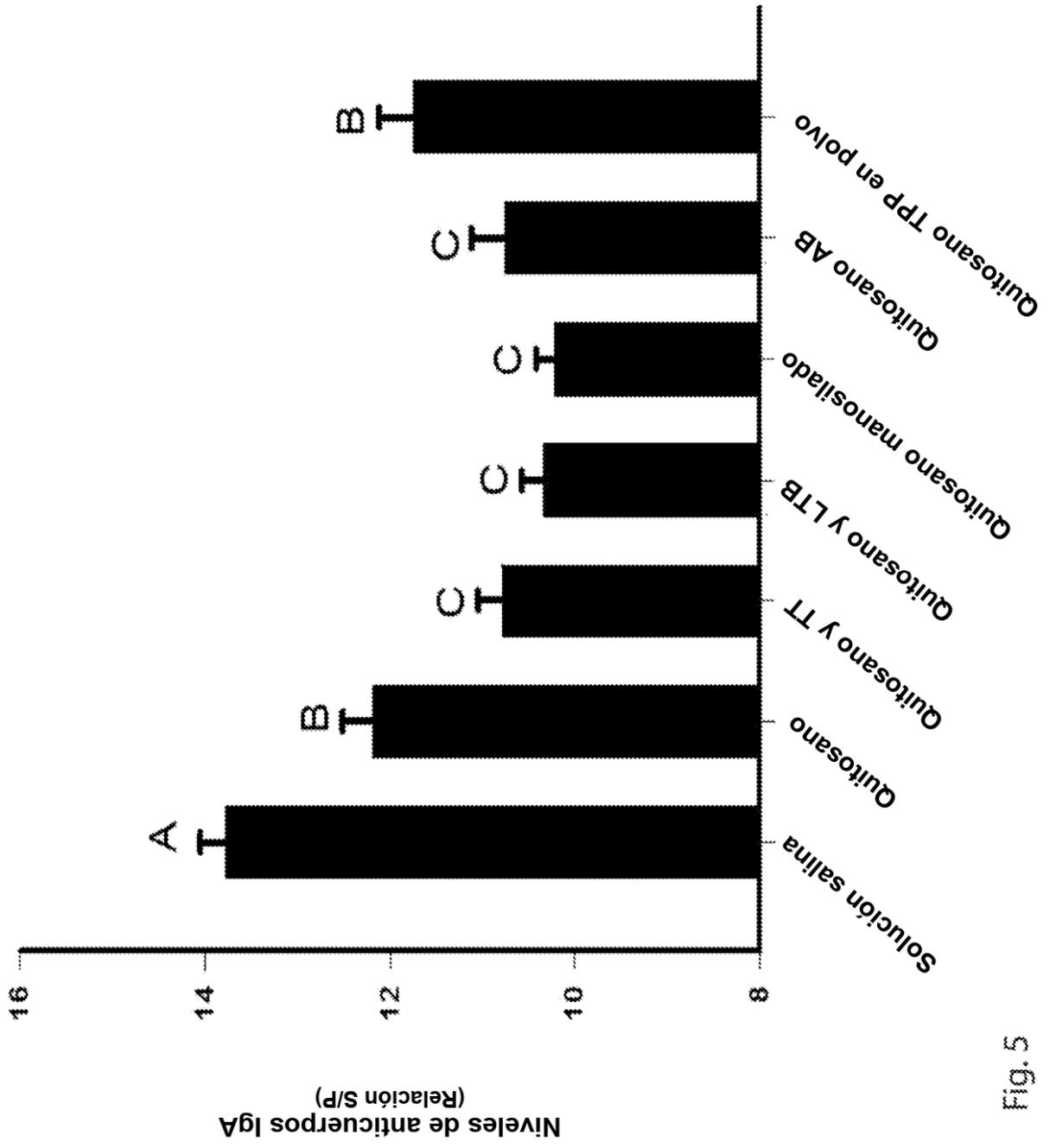


Fig. 5

**ELISA competitivo para IgG sérica
Día 22 tras la 1ª vacunación**

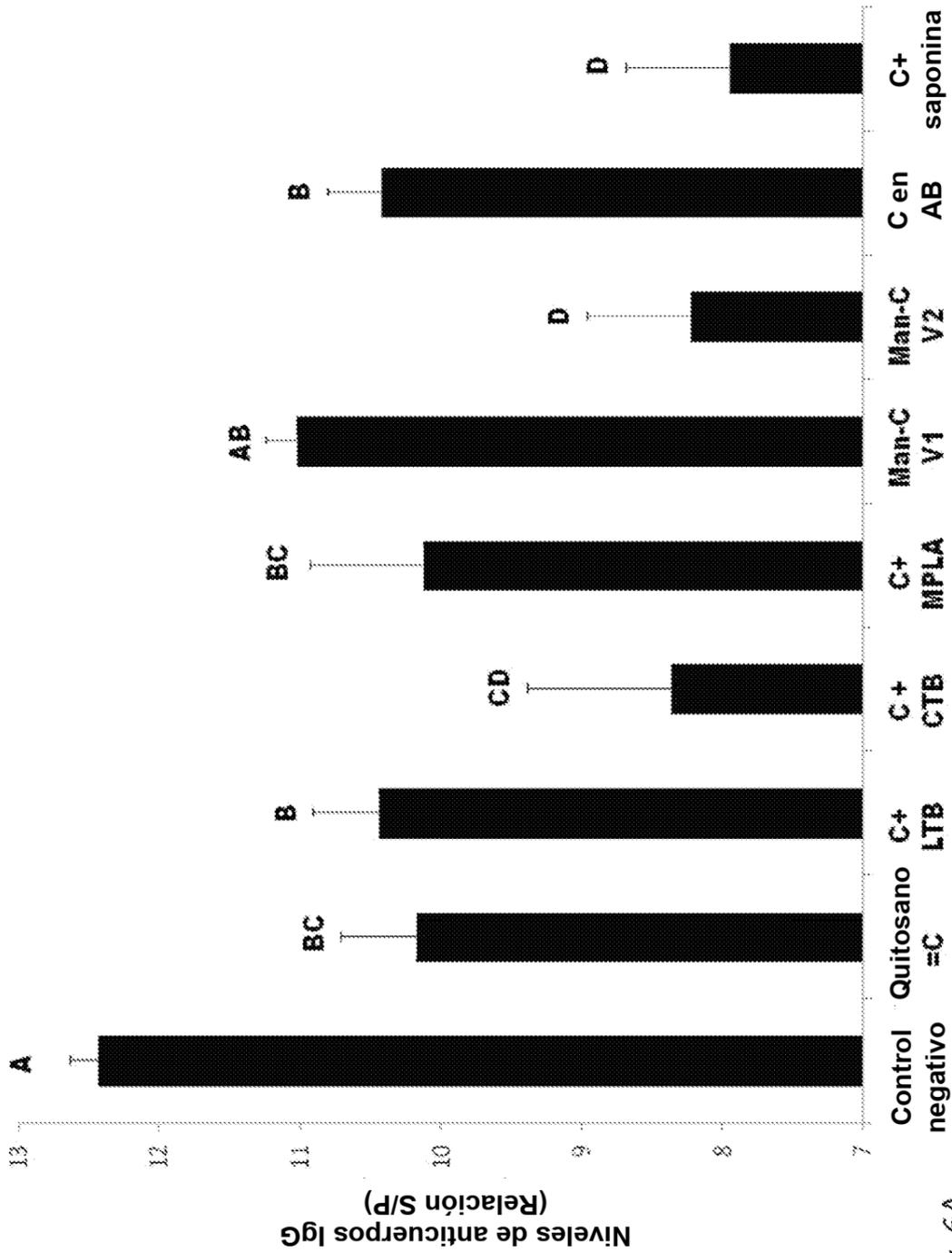


Fig. 6A

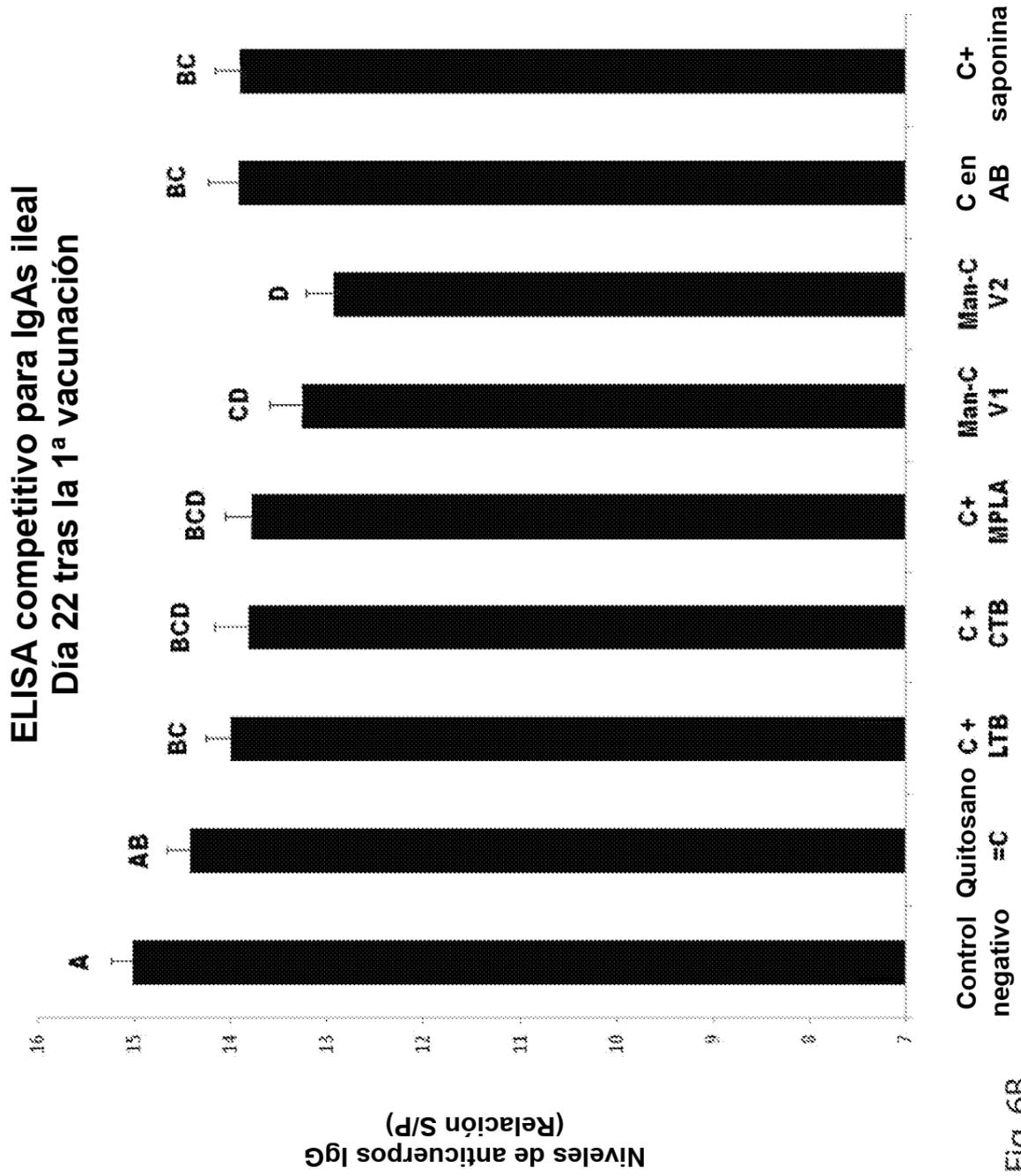


Fig. 6B

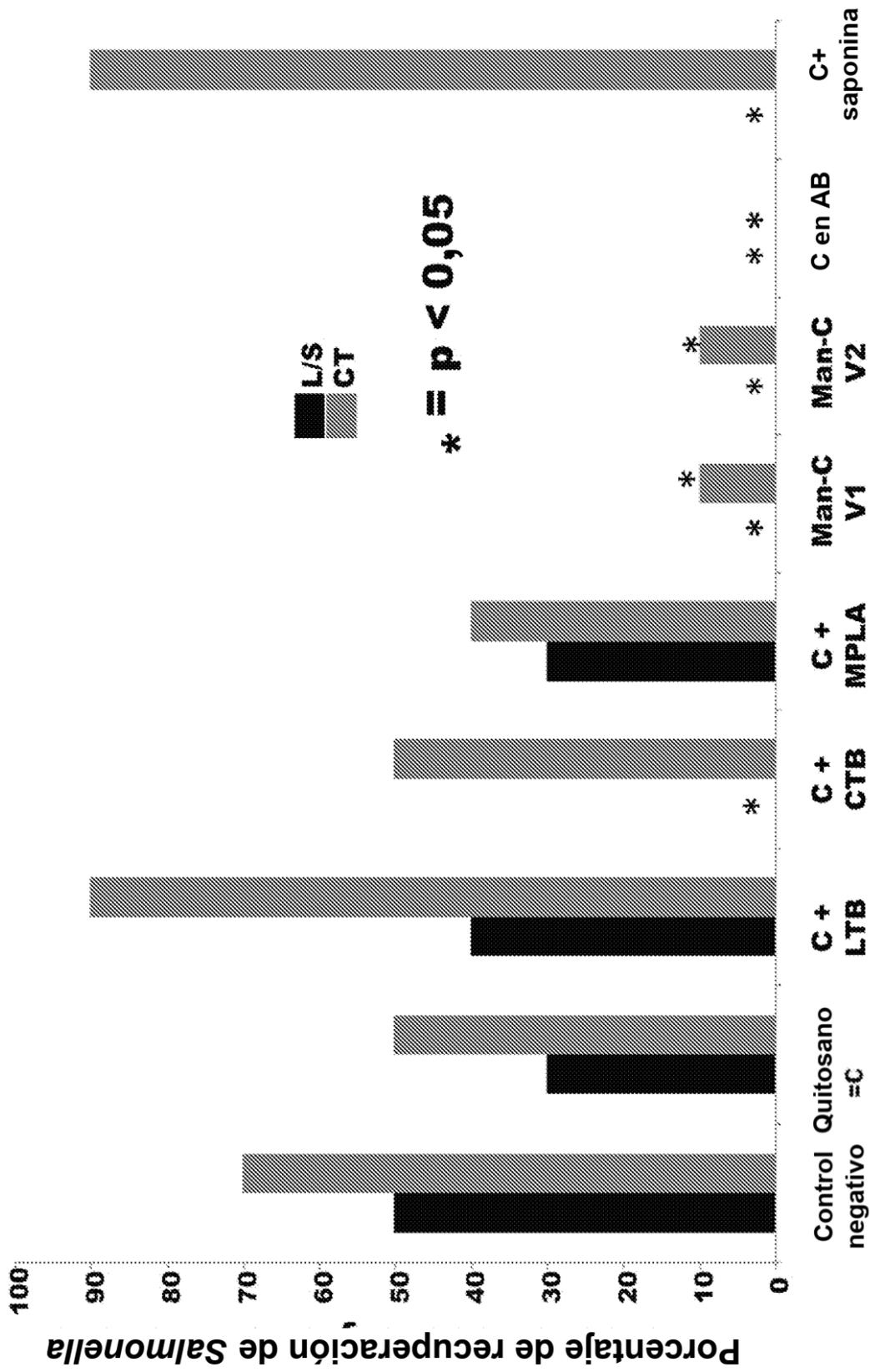


Fig. 7

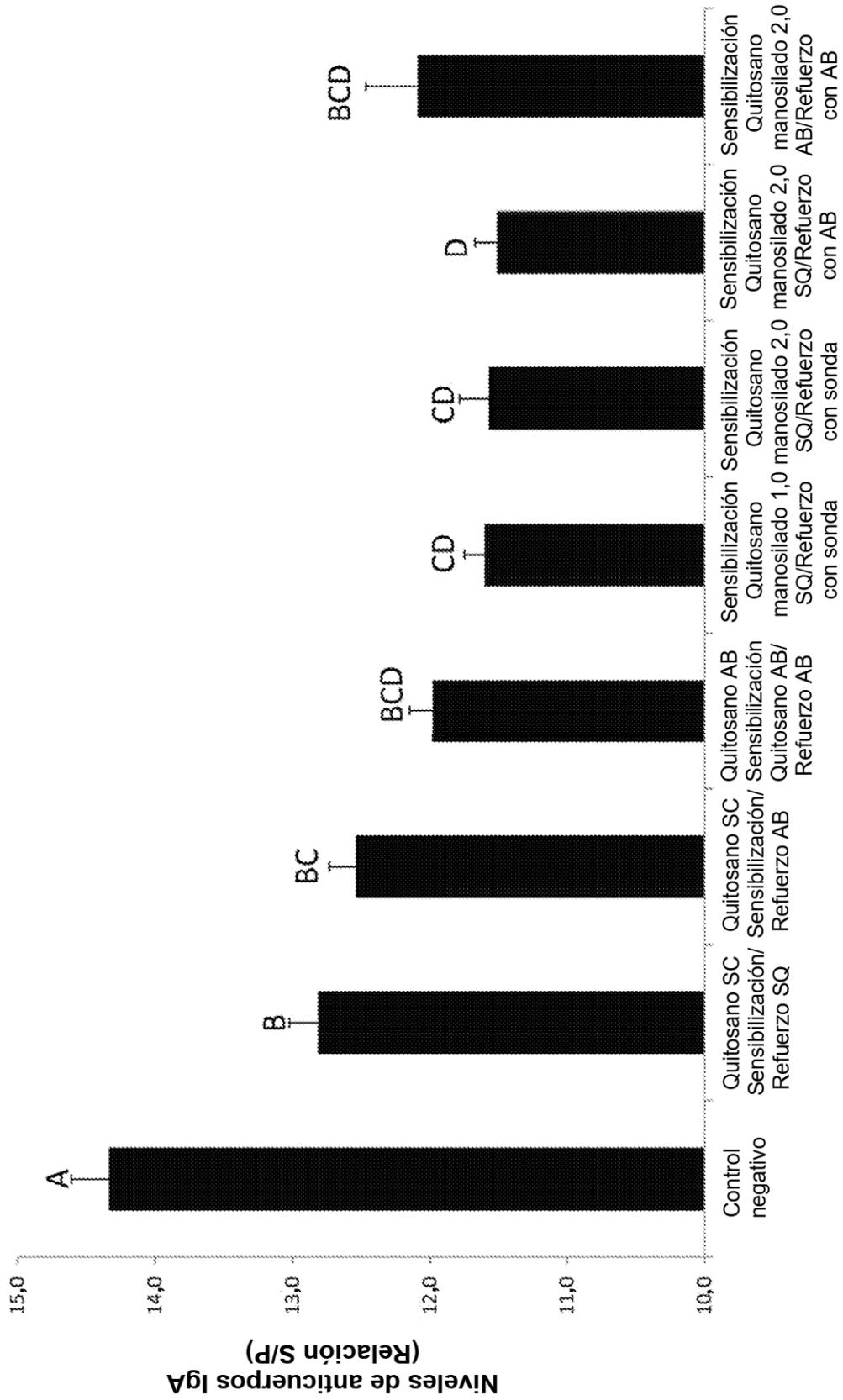


Fig. 8

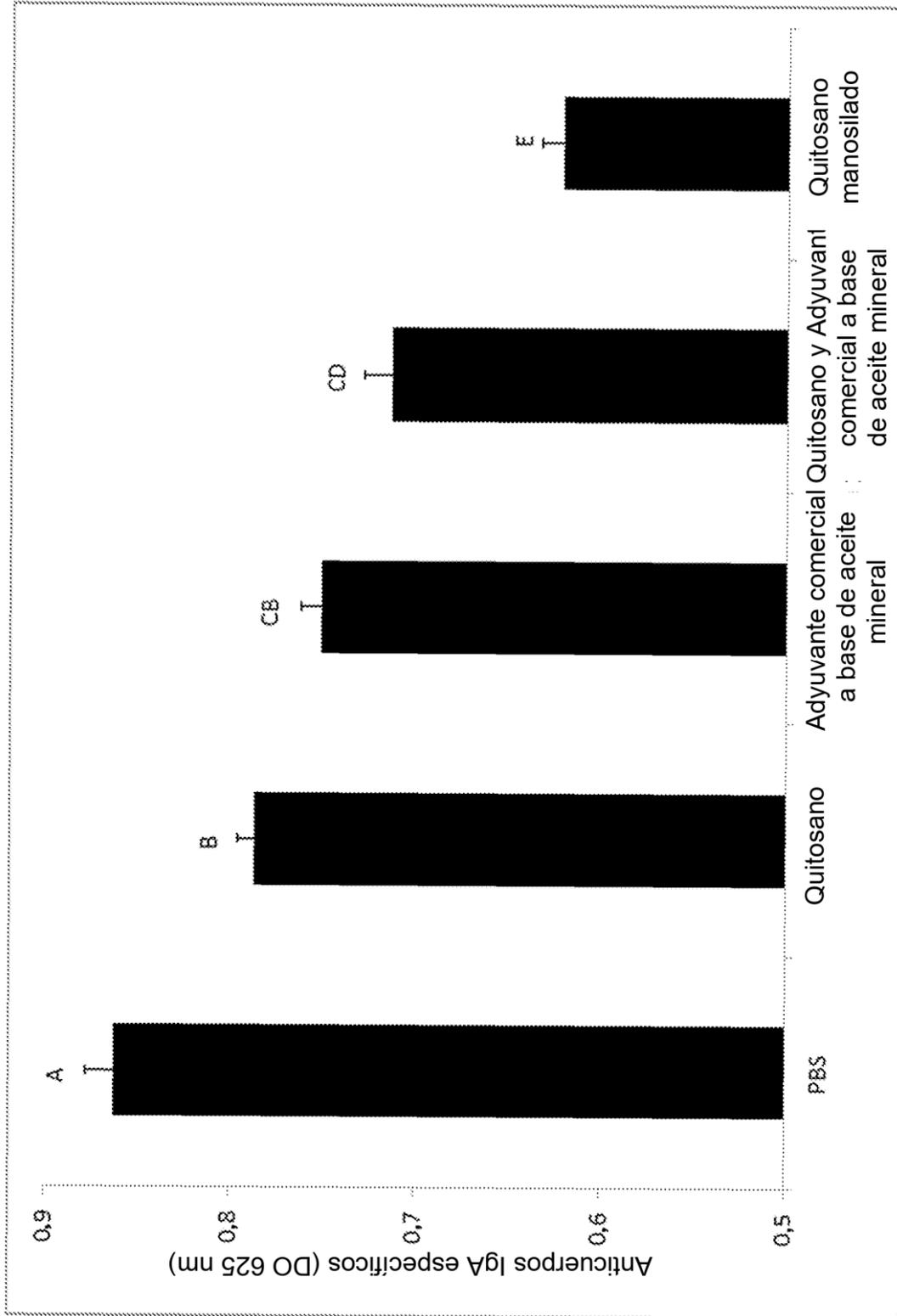


Fig. 9

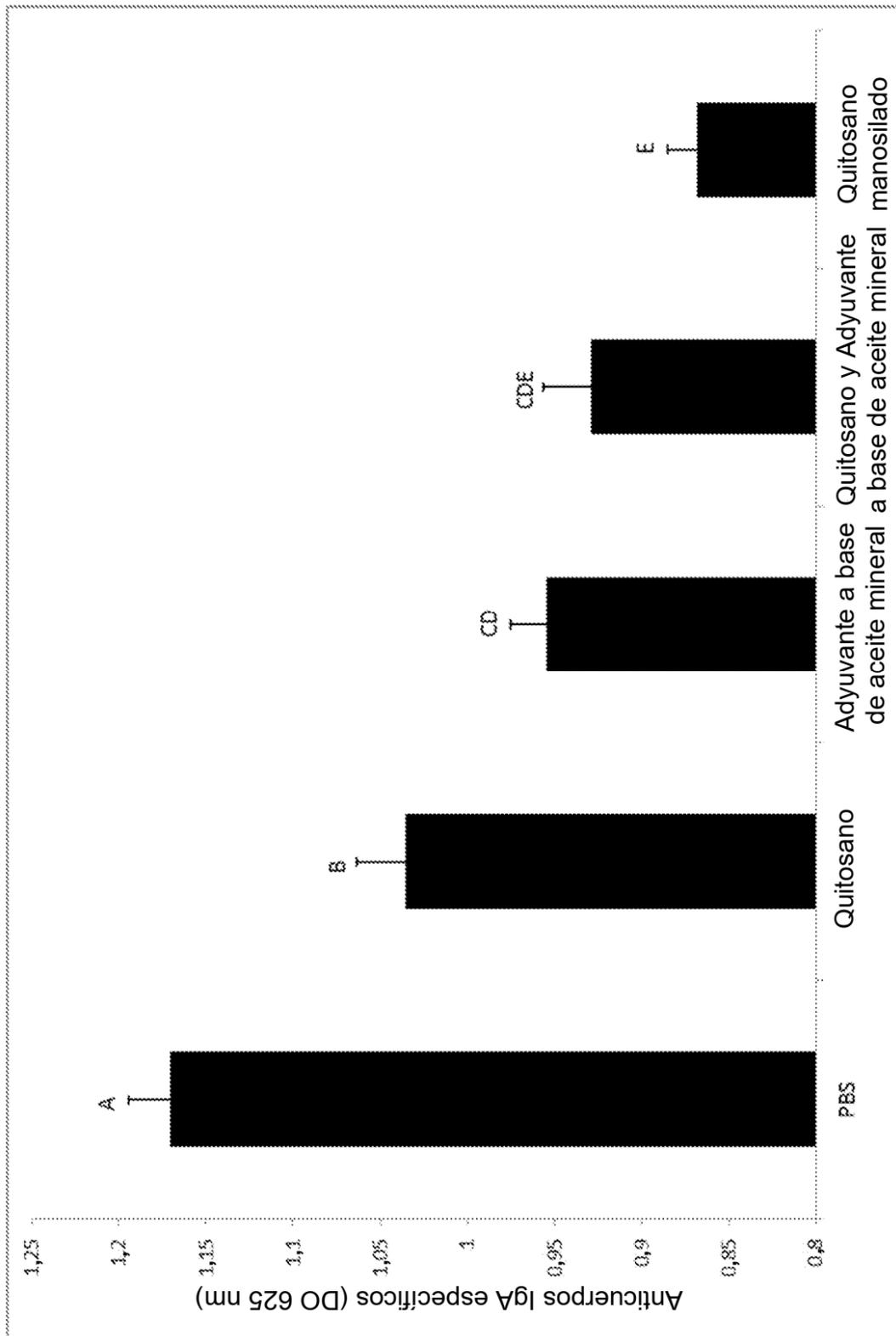


Fig. 10

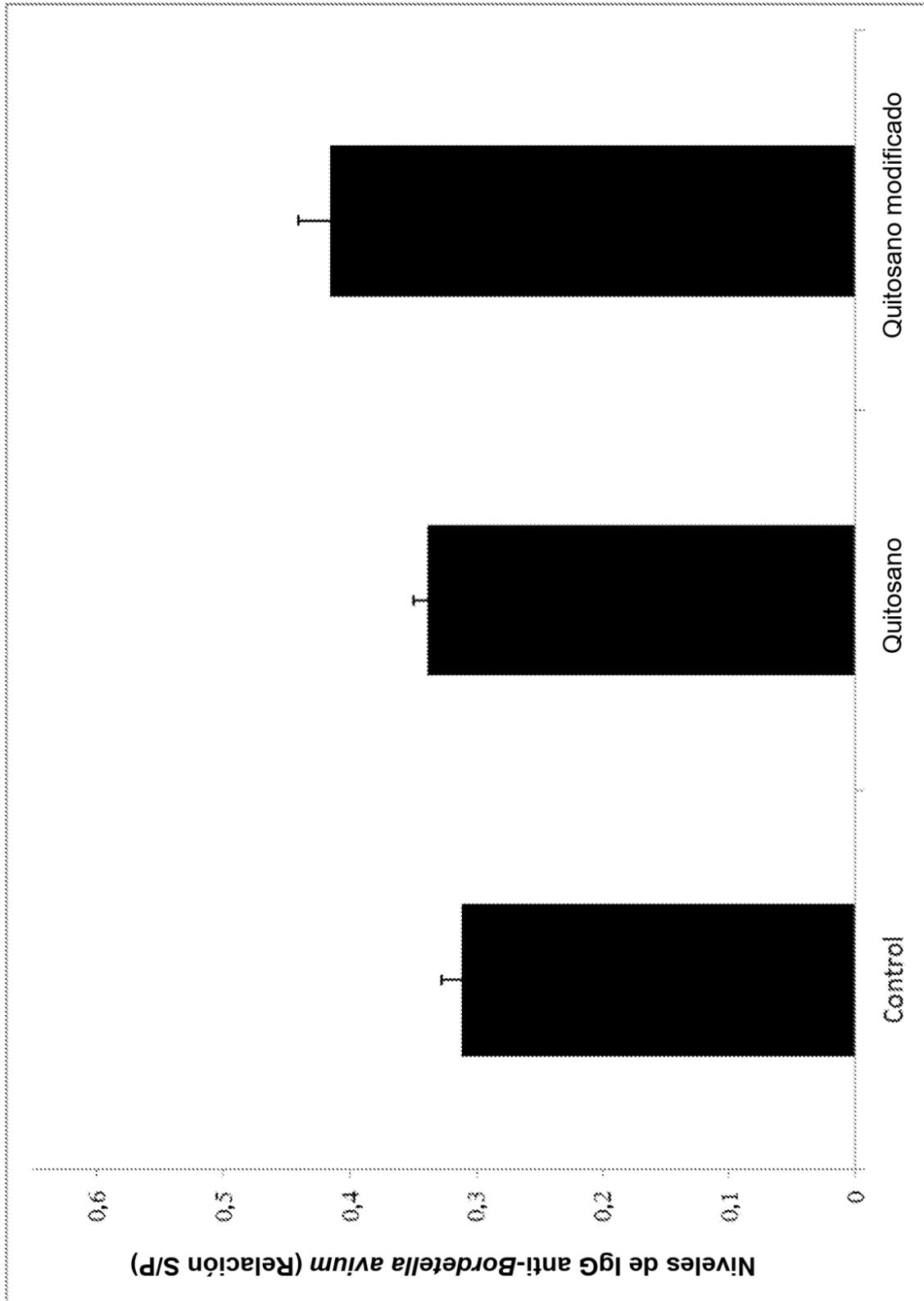


Fig. 11

