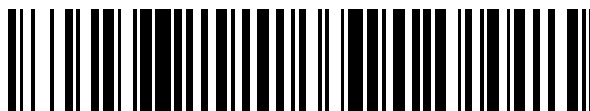


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 401**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.1995 E 07008378 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1820512**

54 Título: **Vacuna viva modificada contra el BRSV, mejorada**

30 Prioridad:

10.05.1994 US 240373

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

14.11.2013

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
(100.0%)
2621 North Belt Highway
St. Joseph, MO 64506, US**

72 Inventor/es:

CHU, HSIEN-JUE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 429 401 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

Vacuna viva modificada contra el BRSV, mejorada

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a métodos mejorados para inducir inmunidad protectora frente al Virus Sincítico Respiratorio Bovino (BRSV), específicamente empleando una vacuna viva modificada, adecuada para administrar a animales receptores en una sola dosis.

10

Antecedentes de la invención

15 Actualmente el Virus Sincítico Respiratorio Bovino (BRSV) está reconocido como un agente etiológico importante en el Complejo de la Enfermedad Respiratoria Bovina (BRDC). La enfermedad se caracteriza por respiración rápida, tos, pérdida de apetito, secreción ocular y nasal, y temperaturas elevadas. En un ataque agudo, la muerte se puede producir dentro de las 48 horas de la iniciación de los síntomas.

20 El BRSV infecta a ganado de todas las edades, incluidas las terneras lactantes. El BRSV está considerado como el patógeno vírico más común en la neumonía enzootica en las terneras, y también se ha asociado al enfisema pulmonar entre terneras recién destetadas. Así pues, existe una necesidad de una profilaxis eficaz contra este virus en el ganado y en las granjas lecheras.

25 El establecer una inmunidad protectora frente al BRSV es problemático. Como en algunas otras enfermedades mediadas por virus, los niveles de anticuerpos en suero contra el BRSV no están necesariamente correlacionados con una protección frente a la enfermedad. Este fenómeno puede reflejar un papel para IgA localmente producidas, dirigidas contra el BRSV (Kimman y otros, J. Clin. Microbiol., 25: 1097-1106, 1987), y/o un requisito de la inmunidad mediada por células para establecer una defensa eficaz contra este virus. El establecer una inmunidad protectora en terneras lactantes presenta obstáculos adicionales, puesto que los anticuerpos maternos frente al BRSV pueden debilitar el inmunógeno inyectado y neutralizar eficazmente la vacuna. Finalmente, la inconveniencia y el gasto de vacunaciones múltiples hacen que sea deseable una vacuna en una sola dosis. Así pues, en el estado de la técnica existe una necesidad de formulaciones de una vacuna contra el BRSV, en una sola dosis, que produzcan una respuesta inmunitaria enérgica y multifacética.

35 El régimen de administración estándar para las vacunas contra el BRSV, del estado de la técnica anterior, es de dos dosis (Stott y otros, J. Hyg. Camb., 93: 251-261, 1984; Thomas y otros, Agri-Practice, 5: 1986; y Syvrud y otros, Vet. Med., 83: 429-430, 1988; Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals, 8ª Edición, 1993/94, págs. 484, 740-741, 956-960, 982-983). Tal como se muestra en Kucera y otros (Agri-Practice, Vet. Med., Vol. 78, octubre de 1983, págs. 1599-1604, 1983), una sola vacunación experimental contra el BRSV inducía niveles relativamente bajos del título de anticuerpos de neutralización del suero (SN) frente al BRSV, mientras que dos dosis de la vacuna producían títulos de anticuerpos SN de 1:10 a 1:320. Además de esto, en los rebaños aparentemente expuestos al BRSV durante las pruebas de campo, aproximadamente el 48% de los animales no vacunados requirieron tratamiento para la enfermedad respiratoria, en comparación con el 27% y el 21% entre los vacunados con una dosis única y con una dosis doble, respectivamente. Sin embargo, no se demostró concluyentemente que el agente causante de la enfermedad respiratoria en las pruebas de campo fuera el BRSV. Asimismo, se advirtió que una vacuna en una sola dosis no se mostró muy inmunogénica. Evaluaciones posteriores llevaron a la conclusión de que serían esenciales dos dosis de esta vacuna para obtener una buena protección (Bovine Vet. Forum 1, No. 2, págs. 2-16, 1986; Syvrud, y otros, Vet. Med., 429-430, 1988).

50 Vet. Immunol. Immunopathol., vol, 22, nº 2, 1989 NL, páginas 145-60, Kimman y otros, describe el cebado para respuestas de memoria de anticuerpo sistémicas y locales al virus sincítico respiratorio bovino y el efecto de la cantidad de virus, replicación del virus, ruta de administración y anticuerpos maternos. J. Clin. Microbiol. vol. 25, no 6, 1987, páginas 1.097-1.106, Kimman y otros, describe la respuesta de anticuerpo sistémica y local a la infección y reinfección por virus sincítico respiratorio bovino en terneras con y sin anticuerpos maternos. Vet. Q. vol. 13, no 1, 1991 NL, páginas 47-59, Baker, da a conocer los mecanismos inmunopatológicos del virus sincítico respiratorio bovino y humano. Semin. Immunol. vol. 2, no 5, 1990 USA, páginas 369-374, Allison y otros, da a conocer formulaciones de coadyuvante y su modo de acción.

60 La solicitud de patente europea no 129.923 (publicada el 1 de febrero de 1985 y concedida como patente el 9 de julio de 1988) describe un método para preparar una nueva vacuna BRSV viva; dicho método implica disolver la vacuna viva en una vacuna inactivada que contiene uno o más antígenos (particularmente virus de la influenza inactivados) formulada en forma de una emulsión aceite-en-agua. Se obtuvo una respuesta serológica en animales jóvenes que todavía tenían inmunidad materna. La solicitud también describe una preparación viva modificada que incluye el BRSV y un coadyuvante. Sin embargo, no se aportó ningún dato sobre la eficacia protectora de ninguna vacuna BRSV frente a un reto con BRSV.

65

Un objeto de la invención es proporcionar una vacuna eficaz contra el BRSV que cree una inmunidad protectora y evite la enfermedad causada por este virus.

5 Un objeto más de la invención es proporcionar un coadyuvante adecuado para utilizar en una vacuna BRSV, donde el coadyuvante aumenta la inmunogenicidad del virus, de manera que cree una inmunidad protectora después de una sola dosis de la vacuna.

Resumen de la invención

10 La invención comprende las utilizaciones tal como se indica en las reivindicaciones adjuntas a la misma.

15 La invención se refiere asimismo a una composición para aumentar la respuesta inmunitaria, que comprende un copolímero de bloque, tal como un copolímero de bloque de polioxipropileno/polioxietileno (POP/POE), preferentemente PLURONIC® L121 (por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4.772.466), y un componente orgánico, tal como un aceite metabolizable como, por ejemplo, un hidrocarburo terpénico no saturado, preferentemente el escualano (2,6,10,15,19,23-hexametiltricosano) o el escualeno. La composición también puede incluir un detergente no- iónico o tensioactivo, preferentemente un monooleato de polioxietilensorbitano tal como un detergente Tween®, más preferentemente el Tween®-80, esto es el monooleato de polioxietil(20)sorbitano.

20 En esta mezcla madre de coadyuvantes, el copolímero de bloque, el aceite orgánico y el tensioactivo pueden estar presentes en cantidades que oscilan entre alrededor de 10 y alrededor de 40 ml/l, de alrededor de 20 a alrededor de 80 ml/l y de alrededor de 1,5 a alrededor de 6,5 ml/l, respectivamente. En una realización preferida del coadyuvante madre, el componente orgánico es el escualano presente en una cantidad de aproximadamente 40 ml/l, el tensioactivo es el monooleato de polioxietilensorbitano (Tween®-80) presente en una cantidad de aproximadamente 3,2 ml/l y el copolímero de bloque POP/POE es el Pluronic® L121 presente en una cantidad de aproximadamente 20 ml/l. El Pluronic® L121 es un copolímero líquido a 15-40°C, en el que el componente de polioxipropileno (POP) tiene un peso molecular de 3250 a 4000 y el componente de polioxietileno (POE) comprende aproximadamente del 10-20%, preferentemente del 10%, de la molécula total.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición inmunogénica para inmunizar a un animal frente a la infección por el Virus Sincítico Respiratorio Bovino (BRSV), que comprende un virus BRS vivo modificado combinado con el coadyuvante anterior y un estabilizante, portador o diluyente, farmacéuticamente aceptable. El coadyuvante está presente en esta composición de vacuna a una concentración final de alrededor del 1-25% (v/v), preferentemente al 5% (v/v). La composición también puede incluir otros virus, tales como el Virus de la Rinotraqueítis Bovina Infecciosa (IBRV), el Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV) y el Virus de la Parainfluenza 3 (PI-3V), y se puede administrar por las vías intramuscular o subcutánea.

40 En todavía otro aspecto, se describe un método para proteger a un animal frente a la enfermedad causada por el Virus Sincítico Respiratorio Bovino, administrando una sola dosis de la vacuna anterior, que comprende BRSV vivo modificado y un coadyuvante.

Descripción detallada de la invención

45 Tal como se utiliza aquí, una "vacuna viva modificada" es una vacuna que comprende un virus que ha sido alterado típicamente por pases en células de un cultivo de tejidos, con el fin de atenuar su capacidad de provocar la enfermedad, pero que mantiene su capacidad de proteger frente a la enfermedad o la infección, cuando se administra a animales.

50 "Coadyuvante" significa una composición constituida por una o más substancias que aumenta(n) la inmunogenicidad y eficacia del BRSV cuando se combina con BRSV en una composición de vacuna.

Una "unidad infecciosa" de BRSV se define como una TCID₅₀, o la cantidad de virus requerida para infectar o matar el 50% de las células de un cultivo de tejidos.

55 La presente invención se refiere asimismo a vacunas contra el BRSV que resultan adecuadas para la administración en forma de una dosis única. Las vacunas son de la variedad de virus vivo modificado. Ello proporciona la ventaja de preservar la inmunogenicidad y/o la eficacia del virus al tiempo que reduce su virulencia.

60 La vacuna se puede preparar a partir de cultivos víricos recién cosechados, por métodos que son estándar en el estado de la técnica (véase el ejemplo 1, más adelante). Esto es, el virus se puede propagar en células de un cultivo de tejidos, tales como fibroblastos diploides humanos, o, preferentemente, células MDBK (riñón bovino Madin-Darby) u otras células bovinas. El crecimiento del virus se monitoriza por técnicas estándar (observación del efecto citopático, inmunofluorescencia u otros ensayos basados en anticuerpos), y se recolecta cuando se ha conseguido un título vírico lo suficientemente elevado. Las soluciones madre del virus se pueden concentrar más, o bien liofilizar

65

por métodos convencionales, antes de la inclusión en la formulación de la vacuna. Se pueden emplear otros métodos, tales como los descritos en Thomas y otros, Agri-Practice, Vol. 7 No. 5, págs. 26-30.

Las vacunas comprenden el virus vivo modificado combinado con uno o más estabilizantes, portadores o coadyuvantes, farmacéuticamente aceptables. Portadores adecuados para utilizar incluyen solución salina, solución salina tamponada con fosfatos, medio esencial mínimo (MEM), o MEM con tampón HEPES. Los estabilizantes incluyen, aunque no se limitan a, sacarosa, gelatina, peptona, extractos proteínicos digeridos tales como la NZ-amina o la NZ-amina AS. En particular, la presente invención se refiere a un coadyuvante que acrecienta la inmunogenicidad del virus vivo modificado y hace que una sola administración cree una inmunidad protectora.

Los coadyuvantes adecuados incluyen el escualano y el escualeno (u otros aceites de origen animal); copolímeros de bloque tales como el Pluronic® (L121); saponina; detergentes tales como el Tween®-80; Quil® A; aceites minerales tales como el Drakeol® o el Markol®; aceites vegetales tales como el aceite de cacahuete; coadyuvantes derivados del Corynebacterium tales como el Corynebacterium parvum; coadyuvantes derivados del Propionibacterium tales como el Propionibacterium acne; el Mycobacterium bovis (bacilo de Calmette y Guérin, o BCG); interleuquinas tales como la interleuquina 2 y la interleuquina 12; monoquinas tales como la interleuquina 1; factor de la necrosis tumoral; interferones tales como el gamma-interferón; combinaciones tales como saponina-hidróxido de aluminio o Quil®-A-hidróxido de aluminio; liposomas; coadyuvante iscom; extracto de la pared celular de micobacterias; glucopéptidos sintéticos tales como los dipéptidos de muramilo u otros derivados; Avridina; Lípido A; sulfato de dextrano; DEAE-dextrano o DEAE-dextrano con fosfato de aluminio; un carboxipolimetileno, tal como el Carbopol®; EMA y emulsiones de copolímeros acrílicos tales como el Neocryl® A640 (como se describe en por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5.047.238); vacunas o proteínas de poxvirus animales; coadyuvantes basados en partículas subvéricas tales como los orbivirus; toxina del cólera; bromuro de dimetildioctadecilamonio; o mezclas de los mismos.

La formulación de una mezcla de coadyuvantes preferida se describe en el ejemplo 2, más adelante.

La vacuna de la presente invención se puede administrar, preferentemente, por las vías intramuscular o subcutánea o bien, menos preferentemente, por las vías intranasal, intraperitoneal u oral.

Para la administración en una dosis única, la vacuna tendría que contener una cantidad de BRSV correspondiente a desde alrededor de $10^{3.0}$ hasta alrededor de $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml, preferentemente desde 10^4 hasta 10^5 TCID₅₀/ml. Por animal, se pueden administrar alrededor de 1 a 5 ml, preferentemente 2 ml, por vía intramuscular, subcutánea o intraperitoneal. Por las vías oral o intranasal se pueden administrar de 1 a 10 ml, preferentemente de 2 a 5 ml.

Los ejemplos que se aportan a continuación pretenden ilustrar con mayor detalle la invención, sin limitar su alcance.

Ejemplo 1: Crecimiento y recolección del BRSV

A) Descripción de los stocks de virus: El BRSV se puede obtener a partir de cualquier número de fuentes fácilmente asequibles. En una realización, se puede utilizar la cepa 375 del BRSV. Esta cepa virulenta del BRSV tenía su origen en la Iowa State University, Ames Iowa. En la invención se contempla y se incluye cualquier cepa adecuada de BRSV. Análogamente, los BHV-1, BVDV y PI-3V son virus fácilmente asequibles. Cuando se obtienen en forma virulenta, estos virus se pueden atenuar, por medios conocidos, para proporcionar virus vivos modificados, adecuados para utilizar en vacunas. Los virus también se pueden matar por métodos convencionales para proporcionar virus inactivados adecuados para el uso en vacunas. Los métodos de atenuar o inactivar virus para su uso en vacunas son bien conocidos. Vacunas para los virus BRSV, BHV-1, BVDV y PI-3V vivos modificados y/o muertos son conocidas y comercialmente asequibles. Véase, por ejemplo, Thomas y otros, ut supra y Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals, ut supra y Apéndice 2, A-31-45.

B) Cultivo de células: La línea de células MDBK (NBL-1), exenta de BVD, se adquirió en la American Type Culture Collection. Dichas células se mantuvieron en medio OptiMEM (Gibco, Grand Island, NY), complementado con hasta el 10% (v/v) de suero bovino, hasta el 0,5% de hidrolizado de lactalbúmina (JRH, Lenexa, KS), hasta 30 mcg/ml de polimixina B (Phizer, NY, NY) y neomicina (Upjohn, Kalamazoo, MI) y hasta 2,5 mcg/ml de anfotericina B (Sigma Chemical Co., St. Louis MO). También se pueden añadir piruvato sódico, bicarbonato sódico, glucosa, L- glutamina y cloruro cálcico, según se requiera, para mantener el crecimiento de las células.

Para la propagación del virus, el medio OptiMEM, el medio MEM de Eagle, el medio 199, o un medio equivalente, se complementa con hasta un 2% de suero bovino, hasta un 0,5% de albúmina de suero bovino, hasta un 0,5% de un hidrolizado de lactalbúmina, hasta 30 mcg/ml de polimixina B y neomicina, y hasta 2,5 mcg/ml de anfotericina B. También se pueden añadir piruvato sódico, bicarbonato sódico, glucosa, L-glutamina y cloruro cálcico, según se requiera, para mantener el crecimiento de las células.

C) Inoculación de los cultivos: Cultivos subconfluente individuales de células MDBK se inocularon con BRSV, BVDV, PI-3V o BHV-1V utilizando una multiplicidad de infección de unidades infecciosas 1:5 a 1:5.000 por célula. El medio de crecimiento de las células se desechó y se substituyó por el medio de propagación para virus (véase más

arriba), tras lo cual el virus de siembra se añadió directamente al recipiente de cultivo. Los cultivos infectados con virus se mantuvieron a 36°C.

El crecimiento vírico se determinó por examen microscópico del efecto citopático o por tinción fluorescente de anticuerpos. Para el BRSV, las células infectadas mostraban la formación de sincitios y de células fusiformes alargadas, que progresaban hasta que esencialmente se veía implicada toda la envoltura celular. Para el BHV-1V, las células infectadas presentaban una granulación citoplásmica seguida por un redondeo y/o un hinchamiento de las células infectadas. Para el BVDV, las células infectadas forman vacuolas intracelulares, se vuelven redondas y dejan zonas circunscritas despojadas de células. Los cambios citopáticos en las células infectadas con PI-3V son similares a los observados en las células infectadas con BHV-1V.

D) Recolección de virus: Los fluidos de cultivo se recolectaron en recipientes estériles. Se pueden empezar recolecciones múltiples cuando el 50% de la envuelta de las células muestra una citopatología característica, y continuar hasta que el 100% de las células se ven afectadas. Los fluidos víricos se pueden o no clarificar por centrifugación o filtración. Los fluidos víricos se conservan a -50°C o menos, o se liofilizan y se conservan a entre 2 y 8°C.

Para la preparación de una vacuna final, los stocks víricos, ya sean solos o en combinación, se mezclan con coadyuvante.

Cuando se utilizan los stocks víricos líquidos, 19 partes de stock vírico se mezclan con una parte de coadyuvante, preferentemente con el coadyuvante del ejemplo 2. Cuando se utilizan stocks víricos liofilizados, se prepara una disolución diluida, al 5% (v/v), de coadyuvante en solución salina (mezclar 1 parte de coadyuvante con 19 partes de solución salina). El stock vírico liofilizado se reconstituye (rehidrata) con el coadyuvante diluido para formar la composición de vacuna final. Se puede añadir timerosal a la formulación final hasta una concentración final de 1:10.000.

Ejemplo 2: Formulación de un coadyuvante del stock preferido

Un coadyuvante preferido para utilizar en la presente invención se preparó de acuerdo con la siguiente formulación:

Copolímero de bloque de polioxipropileno/polioxietileno (por ejemplo, Pluronic® L121, BASF, Parsippany, NJ)	20 ml
Escualeno (por ejemplo, Kodak, Rochester, NY)	40 ml
Monooleato de polioxietilensorbitano (por ejemplo, Tween®-80, Sigma Chemical, St. Louis, MO)	2 ml
Solución salina tamponada (por ejemplo, solución D-V PAS, exenta de Ca y Mg)	936,8 ml

Los ingredientes se mezclan y se homogeneizan hasta que se forma una masa estable o una emulsión. Antes de la homogeneización, los ingredientes o la mezcla se pueden esterilizar en un autoclave. La emulsión se puede esterilizar adicionalmente por filtración. Se puede añadir formalina hasta una concentración final del 0,2%. El timerosal se puede añadir hasta una dilución final de 1:10.000.

Ejemplo 3: Intensificación de una vacuna BRSV viva modificada

Para este estudio, se prepararon dos vacunas BRSV, una con y una sin la mezcla coadyuvante descrita en el ejemplo 2. La vacuna carente de coadyuvante contenía 2,52 log unidades infecciosas por 2 ml, mientras que la vacuna que comprendía coadyuvante contenía 2,96 log unidades infecciosas por 2 ml y un 5% (v/v) de coadyuvante.

Cada una de las veinte terneras recibió una dosis de 2 ml de vacuna carente de coadyuvante, diez por vía intramuscular y diez por vía subcutánea. Cinco terneras adicionales recibieron una dosis de 2 ml de vacuna que contenía coadyuvante. Todas las vacunaciones se repitieron a los 21 días. Se obtuvieron mezclas de suero el sexto día después de la segunda vacunación, y se ensayaron para determinar la presencia de anticuerpos de neutralización del suero anti-BRSV. El ensayo de anticuerpos de neutralización del suero se describe en el ejemplo 4.

Los resultados de este estudio indican que 4 de las 5 terneras inoculadas con la vacuna BRSV que contenía coadyuvantes presentaban evidencia de anticuerpos anti-BRSV (seroconversión), mientras que ninguno de los veinte animales inoculados con vacuna BRSV carente de coadyuvante mostraron evidencia de anticuerpos. Ello indica que el coadyuvante descrito en el ejemplo 2 tiene la propiedad de intensificar la inmunogenicidad de las vacunas BRSV vivas modificadas.

Ejemplo 4: Administración en una sola dosis de la vacuna BRSV mejorada

Se llevaron a cabo la siguiente vacunación y el siguiente estudio de reto a fin de determinar si una sola inmunización con Virus Sincítico Respiratorio Bovino (BRSV) vivo modificado, formulado con un coadyuvante, induciría inmunidad protectora en las terneras. En segundo lugar, el estudio se diseñó para determinar si la administración concurrente

de Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV) modificado, Herpes Virus Bovino del tipo 1 (BHV-1 o IBRV) y virus de la Parainfluenza bovina (PI3) interfería con la inmunidad protectora frente al BRSV.

5 A) Vacunas experimentales: Virus Sincítico Respiratorio Bovino (BRSV) vivo modificado por cinco pases después de la siembra madre se hizo crecer sobre células de Riñón Bovino Madin Darby (MDBK) en el pase 20 del stock de células madre. En resumen, células MDBK se plantaron en botellas cilíndricas, de 850 cm² a una densidad de 3 x 10⁷ células por botella en medio esencial mínimo (MEM) que contenía un 5% de suero bovino, un 0,5% de LAH y 30 µg/ml de gentamicina. Las células se dejaron crecer a 37°C durante 2 días antes de proceder a la infección con el virus. El medio se decantó de la botella cilíndrica y el virus se añadió a una multiplicidad de infección de 1:600 en 10 100 ml de medio de propagación para el virus, por botella (MEM que contenía un 2% de suero bovino, un 0,5% de LAH y 30 µg/ml de gentamicina). Siete días después de la infección, se hallaba presente un 100% de citopatología y se recolectaron los fluidos sobrenadantes. El virus se estabilizó con un 25% (v/v) de estabilizante SGGK3 y se liofilizó. El día de la vacunación, el virus liofilizado se reconstituyó con coadyuvante diluido al 5% (v/v) en diluyente salino (Véase el ejemplo 2). El virus BRSV reconstituido se combinó con virus PI3, BVDV y BHV-1. El título de cada uno de los componentes de la vacuna se determinó por valoración por triplicado en día de la vacunación.

20 B) Animales experimentales utilizados: Para este estudio se utilizó un total de 30 terneras. Estas terneras eran susceptibles al BRSV, tal como indicó un título de anticuerpos neutralizantes del suero (SN) de <2 el día de la vacunación para los animales sometidos a ensayo y el día del reto para los controles. Los animales se alojaron en el exterior con acceso a un recinto resguardado por tres lados, abierto hacia el sur. Los controles se alojaron separadamente de los vacunados antes del reto a fin de evitar una exposición al virus de la vacuna. Se suministró una ración completa una vez al día, y el heno y el agua se suministraron ad libitum.

25 C) Vacunación: A cada uno o de los animales vacunados se administró un volumen de dos ml de la combinación vacunadora. Se vacunaron veinte (20) animales (diez por vía subcutánea y diez por vía intramuscular) y los diez animales restantes no se vacunaron y sirvieron de controles del reto.

30 D) Reto experimental: Los animales se retaron con virus BRSV virulento catorce días después de la vacunación. Se administró un mínimo de 10^{5,7} TCID₅₀ de virus BRSV virulentos a cada una de las terneras, por medio de un reto con un aerosol durante tres días consecutivos.

35 E) Observaciones clínicas: Las terneras se observaron diariamente desde el día -2 hasta el día 14, tras el reto, para determinar los síntomas clínicos de la enfermedad y la presencia de fiebre (temperatura rectal). Las terneras se observaron para determinar signos de infección por BRSV incluidos, pero no limitados a, secreción nasal y ocular, conjuntivitis, tos, disnea, anorexia y depresión. La temperatura rectal se registró diariamente a lo largo de todo el período de observación.

F) Ensayos:

40 1. Ensayo de anticuerpos neutralizantes del suero (SN)

45 Diluciones seriadas de suero inactivado por el calor se mezclaron con volúmenes iguales de suspensiones de virus, en un test cambiante de neutralización de virus en suero constante, utilizando de 100 a 500 TCID₅₀ de BRSV. La mezcla de virus en suero se incubó a 37°C durante 1 hora y luego se inoculó sobre células VERO en placas de microvaloración de 96 pocillos. La presencia de títulos de anticuerpos SN venía indicada por la ausencia de virus, detectada por el efecto citopático. Para la determinación de títulos de anticuerpos SN, se calcularon los puntos finales de neutralización al 50% de acuerdo con el método de Reed y Muench.

50 2. Valoración de virus en la dilución final de la vacuna

55 El título de virus BRSV en la vacuna se determinó por valoración reiterada el día de la vacunación. En resumen, la vacuna combinada se juntó con los antisueros neutralizantes apropiados. La vacuna y la mezcla de antisueros se incubaron a 37°C por espacio de 45 a 60 minutos. Se hicieron diluciones seriadas de la vacuna y de los antisueros y se inocularon en células VERO. La presencia de virus vino indicada por la presencia de un efecto citopático, y se confirmó por inmunofluorescencia específica (FA). Se calculó el título vírico para cada uno de los replicados por el método de Reed y Muench. El título medio de la fracción BRSV de la vacuna era de 10^{3,4} TCID₅₀ por dosis.

3. Valoración del virus de reto

60 La dilución del virus BRSV de reto administrada se diluyó seriadamente y se inoculó en células MDBK en placas de microvaloración de 96 pocillos. La presencia de virus venía indicada por la aparición de un efecto citopático, y se confirmó por inmunofluorescencia específica, tal como se ha descrito para el aislamiento del virus.

65 Para interpretar los resultados, las puntuaciones clínicas se asignaron de la manera siguiente:

<u>Signo clínico</u>	<u>Puntuación/observación</u>
Secreción nasal	
Serosa grave	2
Mucopurulenta suave	2
Mucopurulenta moderada	3
Mucopurulenta grave	4
Secreción ocular	
Serosa grave	1
Mucopurulenta suave	2
Mucopurulenta moderada	3
Mucopurulenta grave	4
Conjuntivitis	2
Tos	2
Disnea	2
Anorexia	1
Hipertermia y enrojecimiento de la mucosa nasal	1
Fiebre (tiene que estar por lo menos 1 °F por encima de la línea base)	
de 103,5 a 103,9 °F	1
de 104,0 a 104,9 °F	2
de 105,0 a 105,9 °F	3
≥106,0°F	4

5 Una secreción nasal y ocular serosa suave se consideró normal para las terneras alojadas en el exterior. La fiebre se consideró significativa sólo si era por lo menos de un grado por encima de la temperatura corporal base. La temperatura corporal base se determinó como la temperatura corporal media para cada uno de los animales el día antes y el día del reto.

Se sumaron las puntuaciones clínicas para cada uno de los animales. Las apreciaciones clínicas de los animales vacunados y de los animales control se compararon por análisis de sumas ordenado por rangos de Mann Whitney.

10 Los signos clínicos de la enfermedad se observaron en las terneras control desde el día 5 al día 10 después del reto (tabla 1). Todos los controles (100%) se observaron para determinar si presentaban signos de enfermedad respiratoria durante múltiples días. Los signos específicos de una enfermedad respiratoria incluían: una secreción nasal serosa grave (una secreción que realmente destilaba de la ventana de la nariz), una secreción nasal mucopurulenta, una secreción ocular y tos. La puntuación clínica media para las terneras control fue de 3,7.

15 Comparativamente, los síntomas respiratorios eran mucho menos frecuentes en los animales vacunados. Sólo el 40% de los animales vacunados presentaban algún síntoma de enfermedad respiratoria y sólo dos (10%) tenían signos clínicos en múltiples días. La puntuación clínica para el grupo vacunado era de 1,0. El análisis de sumas ordenado por rangos de Mann Whitney puso de manifiesto una reducción estadísticamente significativa de la patología clínica en los animales vacunados, en comparación con los controles ($p < 0,05$).

20 Estos datos muestran que una administración a una dosis única de la vacuna contra el virus BRSV, viva, modificada con coadyuvantes, de acuerdo con la presente invención, proporciona protección frente a un reto con BRSV virulentos. Esta vacuna y el método son eficaces, incluso cuando con la vacuna contra el BRSV se coadministran otras vacunas.

25 Así pues, la invención se refiere a una composición vacunadora para inmunizar un animal contra la infección por el virus sincítico respiratorio bovino (BRSV). La vacuna comprende un virus BRSV vivo modificado, un coadyuvante, y un portador farmacéuticamente aceptable, de modo que la combinación proporciona inmunidad frente a la infección por BRSV después de una administración única, y crea una respuesta inmunológica específica al BRSV que se selecciona entre una inmunidad mediada por las células y una inmunidad local (IgA secretoria).

30 La inmunidad mediada por células incluye la estimulación de las células T coadyuvantes, las células T asesinas y las células T de hipersensibilidad retardada, así como la estimulación de macrófagos, monocitos y la producción de otras linfoquinas y de interferón. La presencia de una inmunidad mediada por células se puede determinar por ensayos in vitro e in vivo convencionales. La inmunidad local, tal como la IgA secretoria, se puede determinar por ensayos ELISA o IFA convencionales que muestran un título de anticuerpos neutralizantes del suero de 1-2 o mayor. De acuerdo con la invención, la inmunidad mediada por células o la inmunidad local, resultante, es específica del, o van asociadas al, BRSV.

40

REIVINDICACIONES

1. Composición de vacuna para su utilización en la inmunización de un animal contra infección por Virus Sincitial Respiratorio Bobina (BRSV) que comprende:
5 un virus BRS vivo modificado, un cocoadyuvante que comprende un copolímero bloque y un aceite metabolizado y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que la composición de vacuna contiene de $10^{3,0}$ a $10^{6,0}$ TCID₅₀/ml de BRSV y es administrada como dosis única.
2. Composición, según la reivindicación 1, en la que el cocoadyuvante comprende un copolímero bloque de polioxipropileno-polioxietileno y un hidrocarburo de terpeno no saturado.
10
3. Composición, según la reivindicación 2, en la que el hidrocarburo de terpeno no saturado es uno de escualeno y escualano y el copolímero tiene un componente de polioxipropileno con un peso molecular promedio aproximadamente de 3250 a 4000 y el polioxietileno comprende aproximadamente 10-20% de la molécula total.
15
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el copolímero se encuentra presente en una concentración final aproximada de 0,01 a 1% (v/v) y el componente de hidrocarburo se encuentra presente en una concentración final aproximada de 0,02 a 2% (v/v)
- 20 5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el cocoadyuvante comprende, adicionalmente, un tensioactivo.
6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el cocoadyuvante también comprende un tensioactivo presente a una concentración final de aproximadamente 0,0015 a 0,20% (v/v).
25
7. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en la que el tensioactivo es un monooleato de polioxietilensorbitano.
- 30 8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además el virus de la rinotraqueítis bovina (BHV-IV), el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) y el virus 3 de la parainfluenza (PI-3V).
9. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición es administrada de forma intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, oral o intranasal.