

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 095**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/193 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2002 E 02806585 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1427444**

54 Título: **Vacuna del Nilo Occidental**

30 Prioridad:

27.07.2001 US 308334 P

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

18.12.2013

73 Titular/es:

**ZOETIS W LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

CHU, HSIEN-JUE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 435 095 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 del Nilo Occidental

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de los Estados Unidos en trámite junto con la presente número de serie 60/308.334 presentada el 27 de julio de 2001.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas del Virus del Nilo Occidental y al uso de tales vacunas en la prevención o alivio de la encefalitis del Nilo Occidental en équidos, en particular caballos.

Antecedentes de la invención

10 Conocido como *Flavivirus*, el virus del Nilo Occidental se identificó por primera vez en 1937 en África y se encontró por primera vez en América del Norte en 1999. Las aves migratorias se consideran el medio principal mediante el cual se propaga la infección dentro de y entre países. El virus se transmite mediante mosquitos que han adquirido la infección alimentándose de aves virémicas. Después el virus se amplifica durante periodos de alimentación con sangre de mosquitos adultos. Los mosquitos infectados posteriormente transmiten el virus a seres humanos y animales cuando se alimentan de los mismos.

15 El virus del Nilo Occidental es el agente causal de la enfermedad del Virus del Nilo Occidental, particularmente encefalitis del Nilo Occidental, principalmente en seres humanos, otros mamíferos y aves. Una preocupación principal es la carencia de un tratamiento eficaz para la enfermedad del Nilo Occidental. Se usan fármacos antiinflamatorios para combatir la inflamación de los tejidos del sistema nervioso central, pero más allá de esto no está disponible una intervención médica. Tampoco se cree que exista una vacuna adecuada conocida para evitar la infección. Hasta la fecha, la prevención del contacto con portadores parece ser el único medio para controlar el virus del Nilo Occidental.

20 Los científicos creen que el virus del Nilo Occidental sigue el mismo patrón de infección observado con otros virus transmitidos por mosquitos. Cuando un mosquito infectado pica a un équido, el virus entra en la piel o tejidos inmediatamente por debajo del sitio de la picadura, donde se recoge por la circulación. El virus se puede multiplicar en el torrente sanguíneo y el équido puede desarrollar fiebre, la cual con frecuencia no se detecta debido a que no existen otros signos de enfermedad al mismo tiempo. Sin embargo, una vez que el virus ha invadido el sistema nervioso, aparecen signos clínicos dentro de uno a tres días. Los équidos más afectados, tales como caballos, muestran en primer lugar signos de debilidad o parálisis posterior y mala coordinación. Los cambios físicos pueden estar acompañados de depresión y cambios del comportamiento relacionados. En casos graves, se pueden desarrollar temblores, convulsiones, movimientos de pedaleo de las extremidades y parálisis. También se han observado problemas neurológicos graves y mortalidad. Hasta la fecha, no está disponible ninguna vacuna que se conozca que evite la infección por virus del Nilo Occidental en équidos; y el único medio para controlar el virus del Nilo Occidental parece ser la prevención del contacto con un portador.

25 Por lo tanto, existe una necesidad de medios seguros y eficaces para controlar la propagación del virus del Nilo Occidental en équidos. En particular existe la necesidad de una vacuna que sea lo suficientemente segura como para ser adecuada para administración incluso a yeguas preñadas sin efectos secundarios. También se necesita una vacuna capaz de prevenir o aliviar la enfermedad del Virus del Nilo Occidental, particularmente encefalitis del Nilo Occidental en équidos.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona una composición de vacuna para su uso en la prevención o alivio de la encefalitis del Nilo Occidental en équidos que comprende: un componente inmunogénicamente activo seleccionado entre el grupo que consiste en una cepa VM-2 del virus del Nilo Occidental completo inactivado o muerto; un adyuvante, que comprende un aceite inmunoestimulante; y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La presente invención proporciona además una vacuna del virus del Nilo Occidental adecuada para su uso en caballos que comprende un componente inmunogénicamente activo seleccionado entre el grupo que consiste en una cepa VM-2 del virus del Nilo Occidental completo inactivado o muerto; un adyuvante que comprende un aceite inmunoestimulante y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 En una realización adicional de la invención la composición de vacuna comprende al menos 1×10^4 DICT₅₀ por dosis unitaria de virus del Nilo Occidental inactivado y del 4% al 10% v/v de un adyuvante que comprende del 1 al 3% de copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, del 2 al 6% de escualeno y del 0,1 al 0,5% de monooleato de polioxietileno sorbitán.

Se proporciona además una vacuna del virus del Nilo Occidental segura y eficaz para équidos, que comprende al menos 1×10^6 DICT₅₀ por dosis unitaria del virus del Nilo Occidental muerto o inactivado y al menos el 1% v/v de un adyuvante que comprende al menos un aceite metabolizable y al menos un agente humectante o de dispersión.

Una realización particularmente preferida de la invención es una composición de vacuna para caballos, que comprende al menos dos unidades de dosificación de virus del Nilo Occidental muerto o inactivado, en el que dicha unidad de dosificación comprende de 0,5 a 5 mililitros de una composición que contiene al menos 5×10^7 ACID₅₀ de dicho virus y del 1 al 10% v/v de un adyuvante, comprendiendo dicho adyuvante al menos un aceite metabolizable y al menos dos tensioactivos no iónicos y en la que además dicha unidad de dosificación comprende un vehículo farmacológicamente aceptable.

Adicionalmente, los objetos y características de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones expuestas en la presente memoria más adelante.

Descripción detallada de la invención

En general, el problema en el diseño de una vacuna nueva es que una vacuna de virus vivo puede carecer potencialmente de seguridad suficiente en un huésped diana dado y que una vacuna de virus muerto o inactivado puede carecer potencialmente de la capacidad de estimular una respuesta inmunológica suficientemente eficaz. Comúnmente se usa un adyuvante o un compuesto inmunogénicamente estimulante en combinación con un virus muerto o inactivado en una composición de vacuna para obtener eficacia aceptable. Sin embargo, la seguridad del huésped diana con frecuencia está comprometida mediante la adición de un adyuvante. Por ejemplo, se conoce que muchas veces animales gestantes tienen un índice significativamente más elevado de aborto involuntario después de administrarse una vacuna de virus muerto o inactivado que contiene un adyuvante.

Ahora se ha observado que cuando se usa un adyuvante adecuado, por ejemplo, un aceite metabolizable tal como aceite SP en combinación con un componente inmunogénicamente activo como se describe en la presente memoria, la composición de vacuna del Nilo Occidental resultante se vuelve más segura para su uso y es particularmente útil en équidos, particularmente caballos e incluso para su uso en yeguas preñadas, a la vez que demuestra también una eficacia importante. Por tanto, la invención consigue los objetivos simultáneos de una inmunización eficaz y de seguridad, especialmente para animales gestantes.

Una composición de vacuna segura y eficaz comprende: un componente inmunogénicamente activo seleccionado entre el grupo que consiste en un virus del Nilo Occidental completo inactivado o muerto; un adyuvante que comprende un aceite inmunoestimulante; y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición de vacuna se puede administrar de forma segura y eficaz a équidos, tales como caballos, burros, asnos, etc. La composición de vacuna es particularmente adecuada para caballos, para prevenir o aliviar la enfermedad del virus del Nilo Occidental tal como encefalitis.

El virus del Nilo Occidental completo se puede aislar a partir de animales infectados usando técnicas convencionales. Las muestras del virus también se pueden obtener a partir de colecciones de cultivo de tejido que mantienen un depósito de organismos tal como el Nilo Occidental. En la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), por ejemplo, el virus del Nilo Occidental se ha depositado con los N^o de ATCC VR-82, VR-1267 y VR-1267 AF.

El virus del Nilo Occidental completo se puede usar muerto o inactivado mediante medios de inactivación convencionales, por ejemplo, inactivación química usando agentes de inactivación químicos tales como etilenoimina binaria, beta-propiolactona, formalina, glutaraldehído, dodecil sulfato de sodio o similares o una mezcla de los mismos, preferentemente formalina. Dichos virus también se pueden inactivar mediante calor o psoraleno en presencia de luz ultravioleta. La atenuación se consigue mediante procedimientos convencionales.

El virus del Nilo Occidental completo se puede mantener o cultivar en cerebros de ratón o en medios de cultivo de tejido adecuados, tales como medios optiMEM (LTI, Grand Island, NY) o MEM, o en células que se conocen en la técnica tales como células de riñón de mono verde Africano (Vero) o células de hámster recién nacido (BHK), preferentemente células Vero. Dichos virus se pueden posteriormente separar del medio de cultivo de tejido o celular usando técnicas convencionales tales como centrifugación, filtración o similares.

El aislado de virus del Nilo Occidental de la invención se puede obtener en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (parte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) en Ames, IA, como la cepa VM-2. La cepa de virus se puede purificar en placa hasta tres veces y pasarse a X + 5 en células Vero.

Como se usa en la presente memoria el término "inmunogénicamente activo" significa la capacidad de estimular una respuesta inmune, es decir, de estimular la producción de anticuerpos, particularmente anticuerpos humorales o de estimular respuesta mediada por células. Por ejemplo, la capacidad de estimular la producción de anticuerpos en circulación o secretores o la producción de una respuesta mediada por células en regiones locales de la mucosa (por ejemplo, mucosa intestinal), sangre periférica, líquido cefalorraquídeo o similares.

La cantidad del componente inmunogénicamente activo que es eficaz e inmunizante puede variar y es cualquier cantidad suficiente para provocar una respuesta inmune y proporcionar protección inmunológica frente a la enfermedad del Virus del Nilo Occidental. La cantidad de componente inmunogénicamente activo por unidad de dosificación es preferentemente al menos 1×10^4 DICT₅₀, preferentemente desde 1×10^4 DICT₅₀ a 10^9 DICT₅₀, más preferentemente al menos 1×10^6 DICT₅₀, particularmente 10^6 a 10^7 DICT₅₀ (preferentemente al menos 1×10^7).

Estas cantidades son adecuadas para virus completo muerto o inactivado. Es especialmente deseable que al menos 5×10^7 DICT₅₀ de virus del Nilo Occidental completo muerto o inactivado se usen en la composición de vacuna de la invención.

5 En la presente memoria se contempla al menos una unidad de dosificación por animal como un régimen de vacunación. Dos o más unidades de dosificación pueden ser especialmente útiles. Una unidad de dosificación puede ser típicamente 0,1 a 10 mililitros de composición de vacuna, preferentemente 0,5 a 5 mililitros y aún más preferentemente 1 a 2 mililitros, conteniendo cada unidad de dosificación la cantidad de virus descrita hasta ahora. El experto reconocerá que una cantidad particular de composición de vacuna por unidad de dosificación, así como también el número total de unidades de dosificación por régimen de vacunación se puede optimizar, siempre y cuando se administre una cantidad inmunizante eficaz del virus al animal.

10 La composición de vacuna del virus del Nilo Occidental de la invención contiene uno o más adyuvantes. Como se usa en la presente memoria el término "adyuvante" se refiere a cualquier componente que mejora la respuesta del organismo frente a una vacuna o un inmunógeno. El adyuvante típicamente comprenderá del 0,1 al 50% v/v de la formulación de vacuna de la invención, preferentemente del 1 al 50% de la vacuna, más preferentemente del 1 al 20%, particularmente del 1 al 10% v/v de la misma. Las cantidades del 4 al 10% son aún más preferidas.

15 Al menos un adyuvante contenido en la composición de vacuna de la presente invención incluye un aceite inmunoestimulante, tal como determinados aceites metabolizables. Los aceites metabolizables adecuados para su uso en la composición de la invención incluyen emulsiones oleosas, por ejemplo, aceite SP (descrito en lo sucesivo en la presente memoria), Emulsigen (MPV Laboratories, Ralston, NZ), Montanide 264, 266, 26 (Seppic SA, París, Francia), así como también aceite de cacahuete y otros aceites con base vegetal, escualeno (aceite de hígado de tiburón) u otro aceite metabolizable que pueda demostrar ser adecuado como un adyuvante en la práctica de vacuna veterinaria.

20 El adyuvante puede ser una composición que comprende además del aceite metabolizable, uno o más agentes humectantes o de dispersión en cantidades del 0,1 al 25%, más preferentemente del 1 al 10% y aún más preferentemente del 1 al 3% en volumen del adyuvante. Los tensioactivos no iónicos son particularmente preferidos como agentes humectantes o de dispersión. Los tensioactivos no iónicos útiles incluyen copolímero de bloque de polioxietileno/polioxipropileno, especialmente aquellos comercializados bajo el nombre comercial PLURONIC® y disponibles en BASF Corporation (Mt. Olive, NJ). Otros tensioactivos no iónicos útiles incluyen ésteres de polioxietileno tales como monooleato de polioxietileno sorbitán, disponible bajo el nombre comercial TWEEN 80®.

30 Puede ser deseable incluir más de uno, por ejemplo, al menos dos, agentes humectantes o de dispersión en el adyuvante como parte de la composición de vacuna de la invención.

Otros componentes del adyuvante pueden incluir componentes conservantes tales como formalina y timerosal en cantidades de hasta el 1% v/v del adyuvante.

35 Un adyuvante particularmente preferido se denomina aceite SP. Como se usa en la descripción y en los ejemplos, el término "aceite SP" designa una emulsión que comprende un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, escualeno, monooleato de polioxietileno sorbitán y una solución salina tamponada. En general, la emulsión de aceite SP comprenderá del 1 al 3% v/v de copolímero de bloque, del 2 al 6% v/v de escualeno, más particularmente del 3 al 6% de escualeno y del 0,1 al 0,5% v/v de monooleato de polioxietileno sorbitán, siendo el resto una solución salina tamponada.

40 Cuando se utiliza, las cantidades inmunogénicamente estimulantes de aceite SP como adyuvante en la composición de la vacuna de la invención pueden variar de acuerdo con el componente inmunogénicamente activo, el grado de exposición infecciosa potencial, el procedimiento de administración de la composición de vacuna, la edad y tamaño del équido o similares. En general, las cantidades del 1% al 50% v/v de la composición de vacuna son adecuadas, preferentemente del 4% al 10% v/v y más preferentemente aproximadamente del 4% al 5% v/v de aceite SP.

45 Los vehículos farmacéuticamente (o farmacológicamente) aceptables adecuados para su uso en la composición de vacuna de la invención pueden ser cualquier vehículo líquido convencional adecuado para composiciones farmacéuticas veterinarias, preferentemente una solución salina equilibrada u otra solución en base acuosa para su uso en medios de cultivo de tejido. También se pueden utilizar otros vehículos disponibles.

50 Los excipientes adicionales disponibles en la técnica también se pueden incluir en la composición de vacuna de acuerdo con las diversas realizaciones descritas hasta ahora. Por ejemplo, se pueden utilizar modificadores de pH.

Los componentes de la composición de vacuna de la invención como se ha descrito hasta ahora, incluyendo el vehículo, se pueden combinar en conjunto usando técnicas disponibles.

55 Además del componente inmunogénicamente activo del virus del Nilo Occidental como se ha descrito en la presente memoria anteriormente como un principio activo, se contempla que la composición de vacuna de la invención también puede contener otros componentes activos tales como un componente antipatogénico dirigido contra el virus de la rabia, virus de la encefalitis equina Oriental, virus de la encefalitis equina Occidental, virus de la encefalitis equina Venezolana, virus del herpes equino tal como EHV-1 o EHV-4, *Ehrlichia risticii*, *Streptococcus equi*, toxoide

tetánico, virus de influenza equina (VIE), virus de rinoneumonitis Oriental, Occidental y Venezolana o similares o una combinación de los mismos. Las cantidades de uno o más de estos virus se pueden determinar a partir de bibliografía de eficacia en la técnica o determinarse usando técnicas disponibles.

5 El componente inmunogénicamente activo de la invención se puede incorporar en liposomas usando tecnología conocida tal como la descrita en Nature, 1974, 252, 252-254 o Journal of Immunology, 1978, 120, 1109-13. Como alternativa, el componente inmunogénicamente activo de la invención se puede conjugar con compuestos biológicos adecuados tales como polisacáridos, péptidos, proteínas o similares o una combinación de los mismos.

10 En una realización preferida de la invención, la composición de vacuna inventiva se puede formular en forma unitaria de dosificación como se ha descrito hasta ahora para facilitar la administración y asegurar la uniformidad de dosis. La formulación se puede lograr usando técnicas disponibles, tales como las que son aplicables a preparaciones de emulsiones.

La composición de vacuna inventiva se puede administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica o similares, preferentemente por vía intramuscular; o dicha composición se puede administrar por vía oral o por vía intranasal.

15 Por consiguiente, la presente invención también proporciona la prevención o alivio de encefalitis del Nilo Occidental en équidos, preferentemente caballos, mediante la administración a dichos équidos de una composición de vacuna como se ha descrito en la presente memoria anteriormente.

20 En la práctica real, la composición de vacuna de la invención se administra por vía parenteral, por vía subcutánea, por vía oral, por vía intranasal o por otros medios disponibles, preferentemente por vía parenteral, más preferentemente por vía intramuscular, en cantidades eficaces de acuerdo con un programa que se puede determinar mediante el tiempo de exposición potencial anticipada a un portador del virus del Nilo Occidental. De esta manera, el animal tratado puede tener tiempo de construir inmunidad antes de la exposición natural. A modo de ejemplo no limitante, un programa de tratamiento o régimen de dosificación típico puede incluir la administración parenteral, preferentemente inyección intramuscular de una unidad de dosificación, al menos aproximadamente 2-8
25 semanas antes de la exposición potencial. Se prefieren al menos dos administraciones, por ejemplo, una unidad de dosificación 8 semanas antes de la exposición potencial al virus y una segunda unidad de dosificación 3-5 semanas antes de la exposición potencial del animal tratado. Como se ha descrito hasta ahora, una unidad de dosificación estará típicamente dentro del intervalo de 0,1 a 10 mililitros de composición de vacuna que contiene las cantidades de activos y porcentajes de adyuvantes e inactivo o inactivos como se ha descrito anteriormente. Una unidad de
30 dosificación dentro del intervalo de 0,5 a 5 mililitros es tal vez más preferida, siendo particularmente preferida de 1 a 2 mililitros.

35 Para una comprensión más clara de la invención, se exponen a continuación los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son simplemente ilustrativos y no se han de interpretar como limitantes del ámbito o de los principios subyacentes de la invención de ninguna manera. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en la presente memoria, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de los siguientes ejemplos y la descripción anterior. Tales modificaciones también tienen por objeto estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Preparación de la vacuna

40 **A/Formulación de aceite SP**

<u>Descripción del Ingrediente</u>	<u>Volumen</u>
Copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic [®] L121, BASF, Mt. Olive, NJ)	20,0 ml
Escualeno (Kodak, Rochester, NY)	40,0 ml
Monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween [®] 80, Sigma Chemical, St. Louis, MO)	3,2 ml
Solución salina tamponada (Solución PBS D-V, sin Ca, Mg)	936,8 ml

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

B/Preparación de vacuna

Un aislado de virus del Nilo Occidental equino, obtenido en las instalaciones de USDA en Ames, IA (Nº de Lote VM-2, Origen Equino, aislado Norteamericano de 1999, segundo pase en cultivo de células VeroM), se cultivó en cultivos múltiples de células Vero en medio de cultivo de tejido OptiMEM (LTI, Grand Island, NY) a 37 °C. Las recolecciones se titulan y después se inactivan mediante la adición de una solución de formalina al 10% hasta una concentración final del 0,1%. Esto se permite que se inactiva a 37 °C durante un periodo de no menos de 144 horas. Posteriormente, se añade otra adición de formalina al 0,1% y se incuba a 37 °C durante otro periodo de no menos de 144 horas.

Las vacunas se formulan suspendiendo el volumen apropiado de líquido de virus inactivado en el 1-20% en volumen de aceite SP por dosis de 1 ml.

Ejemplo 2**Evaluación de respuesta de anticuerpo frente a la inyección intramuscular de vacuna de ensayo**

En esta evaluación, los caballos se dividen de forma aleatoria en cuatro grupos: a un grupo de veinte caballos se administra vacuna de ensayo a una dosis de 1×10^7 DICT₅₀ (Dosis Infecciosa de Cultivo de Tejido); a un segundo grupo de veinte caballos se administra vacuna de ensayo a una dosis de 5×10^7 DICT₅₀; a un tercer grupo de cinco caballos se administra vacuna de ensayo a una dosis de 1×10^8 DICT₅₀; y un cuarto grupo de ocho caballos se mantiene como controles ambientales no vacunados. A los caballos tratados se proporciona una primera dosis de vacuna de acuerdo con el grupo al cual se han asignado. Veintiún días después de la administración de la primera dosis, se administra una segunda dosis de la misma vacuna. Se toman muestras de sangre de todos los caballos para obtener suero al momento de la administración de la primera y segunda dosis a intervalos semanales a lo largo de 28 días después de la administración de la segunda dosis.

Vacuna de ensayo A

Componente	Conc./Dosis	Volumen/ml
Virus del Nilo Occidental Inactivado MEM ¹	1×10^7 DICT ₅₀	0,0347 ml
Aceite SP	NA	0,9138 ml
Polimixina B ²	5%	0,0500 ml
Neomicina	30,0 mcg/ml	0,0003 ml
Timerosal (5%)	30,0 mcg/ml	0,0003 ml
	1:20.000	0,0010 ml

Vacuna de ensayo B

Componente	Conc./Dosis	Volumen/ml
Virus del Nilo Occidental Inactivado MEM	5×10^7 DICT ₅₀	0,1734 ml
Aceite SP	NA	0,7752 ml
Polimixina B ²	5%	0,0500 ml
Neomicina ³	30,0 mcg/ml	0,0002 ml
Timerosal ⁴ (5%)	30,0 mcg/ml	0,0002 ml
	1:20.000	0,0010 ml

Vacuna de ensayo C

Componente	Conc./Dosis	Volumen/ml
Virus del Nilo Occidental Inactivado MEM ¹	1×10^8 DICT ₅₀	0,3467 ml
Aceite SP	NA	0,6019 ml
Polimixina B ²	5%	0,0500 ml
Neomicina ³	30,0 mcg/ml	0,0002 ml
Timerosal ⁴ (5%)	30,0 mcg/ml	0,0002 ml
	1:20.000	0,0010 ml

25

ES 2 435 095 T3

(continuación)

Componente	Conc./Dosis	Volumen/ml
¹ LTI, Grand Island, NY		
² Sigma, St. Louis, MO		
³ Sigma, St. Louis, MO		
⁴ Sigma, St. Louis, MO		

Los datos serológicos obtenidos se muestran en la Tabla I más adelante, en los que: 0 DPV 1 designa el día cero, antes de la vacunación; y 14 DPV 2 designa el día 14, después de la vacunación. SR designa sin resultados.

- 5 Como se puede observar a partir de los datos en la Tabla I, los caballos tratados de todos los grupos mostraron aumentos significativos en los anticuerpos frente al virus del Nilo Occidental mientras que los caballos de control mantuvieron un nivel de anticuerpos de bajo a no existente. El nivel de respuesta en los caballos que recibieron vacuna era independiente del nivel de antígeno en la vacuna que los mismos recibieron.

Tabla I

Vacuna de	Dosis	Ensayo N° 1		Ensayo N° 2			
		Ensayo	(DICT ₅₀)	0DPV1	14DPV	0DPV1	14DPV
				<u>2</u>		<u>2</u>	
A	1x10 ⁷	<10	160	<10	80		
A	1x10 ⁷	<10	20	<10	10		
A	1x10 ⁷	<10	≥320	<10	40		
A	1x10 ⁷	<10	80	<10	≥320		
A	1x10 ⁷	<10	80	<10	40		
A	1x10 ⁷	<10	80	<10	160		
A	1x10 ⁷	<10	40	<10	40		
A	1x10 ⁷	<10	80	<10	80		
A	1x10 ⁷	<10	160	<10	80		
A	1x10 ⁷	<10	40	<10	10		
A	1x10 ⁷	<10	40	<10	10		
A	1x10 ⁷	<10	160	<10	40		
A	1x10 ⁷	<10	≥320	<10	SR*		
A	1x10 ⁷	<10	≥320	<10	SR		
A	1x10 ⁷	<10	≥320	<10	80		
A	1x10 ⁷	<10	160	<10	20		
A	1x10 ⁷	>20	≥320	<10	160		
A	1x10 ⁷	<10	80	<10	80		
A	1x10 ⁷	<10	80	<10	160		
A	1x10 ⁷	<10	160	<10	160		
B	5x10 ⁷	<10	80	<10	40		
B	5x10 ⁷	<10	20	<10	<10		
B	5x10 ⁷	<10	≥320	<10	160		
B	5x10 ⁷	<10	80	<10	≥320		
B	5x10 ⁷	<10	≥320	<10	160		
B	5x10 ⁷	<10	80	<10	80		
B	5x10 ⁷	<10	160	<10	>320		
B	5x10 ⁷	<10	80	<10	40		
B	5x10 ⁷	<10	160	<10	40		
B	5x10 ⁷	<10	40	<10	80		
B	5x10 ⁷	<10	20	<10	20		
B	5x10 ⁷	<10	≥320	<10	160		

(continuación)

Vacuna de Ensayo	Dosis (DICT ₅₀)	Ensayo N° 1		Ensayo N° 2	
		0DPV1	14DPV	0DPV1	14DPV
			<u>2</u>		<u>2</u>
B	5x10 ⁷	<10	≥40	<10	≥320
B	5x10 ⁷	<10	80	<10	40
B	5x10 ⁷	<10	80	<10	SR
B	5x10 ⁷	<20	≥320	<10	80
B	5x10 ⁷	>20	160	<10	80
B	5x10 ⁷	<10	≥320	<10	160
B	5x10 ⁷	<10	≥320	<10	≥320
B	5x10 ⁷	<10	80	<10	160
C	1x10 ⁸	<10	≥320	<10	≥320
C	1x10 ⁸	<10	≥320	<10	160
C	1x10 ⁸	<10	160	<10	80
C	1x10 ⁸	<10	≥320	<10	SR
C	1x10 ⁸	<10	40	<10	40
Control	0	<10	<10	<10	<10
Control	0	<10	<10	<10	<10
Control	0	<10	<10	<10	<10
Control	0	<10	<10	<10	SR
Control	0	<10	<10	<10	<10
Control	0	<10	<10	<10	<10
Control	0	<10	<10	<10	<10
Control	0	<10	<10	<10	<10

Ejemplo 3**Evaluación de seguridad de vacuna de ensayo en caballos en condiciones de campo**

5 En esta evaluación, 200 caballos macho y hembra sanos se vacunan con una dosis de 6x10⁶ DICT₅₀ de vacuna de ensayo inactivada administrada como una vacunación de dosis de 1 ml mediante administración intramuscular y seguido tres a cuatro semanas después por una segunda vacunación de dosis de 1 ml. Los caballos tratados se alojan y alimentan usando prácticas de agricultura convencional para granja o establo. Todos los caballos tratados se observan por un veterinario durante 30 minutos a continuación de la vacunación para determinar reacciones tales como salivación, respiración trabajosa o irregular, agitación o anafilaxis. Durante dos semanas después de la

10 vacunación, los caballos se observan diariamente para determinar cualquier reacción retardada tal como letargo, anorexia o inflamación no habitual en el sitio de inyección. Se toman muestras de sangre de 5 a 10 ml mediante punción en vena a partir de caballos tratados el día de la primera vacunación (día Cero) y al menos una vez más dos semanas o más después de la segunda vacunación (día 36 o posterior). Se realizan ensayos serológicos usando ensayo de ENRP⁵.

15 ⁵ Chang, G. J.; Hunt, A. R. y Davis B., Journal of Virology, 74 págs. 4244-5422 (2000).

Vacuna de ensayo

Componente	Conc./Dosis	Volumen/ml
Virus del Nilo Occidental Inactivado	6x10 ⁶ DICT ₅₀	0,21 ml
Aceite SP	5%	0,05 ml
MEM	N/A	0,74 ml

Se observó que menos del 2% de los caballos tenía algún signo clínico de debilitación. Esta evaluación demuestra que la vacuna de la invención es segura para su uso en caballos en condiciones de campo.

Ejemplo 4**Evaluación de la eficacia de vacuna de ensayo (preparaciones multivalentes y monovalentes) en caballos en condiciones de campo**

5 Se evaluó la eficacia de una vacuna de combinación que contiene virus del Nilo Occidental muerto (VNO) frente a exposición a VNO experimental.

10 Un total de 30 caballos se asignaron a un grupo vacunado (20 caballos) y un grupo de control (10 caballos). Los caballos en el grupo vacunado recibieron por vía intramuscular dos dosis de la vacuna de ensayo que contenía virus del Nilo Occidental muerto (5×10^7 DICT₅₀ por dosis con aceite SP al 5%), virus influenza, virus de encefalomiелitis (Oriental, Occidental y Venezolano), virus de rinoneumonitis (serotipos 1 y 4) y toxoide tetánico, con tres semanas de separación. Las muestras de suero se recogieron periódicamente para determinar respuesta de anticuerpo medida mediante ensayo de neutralización de reducción de placa (ENRP). Veinticuatro (24) días después de la segunda vacunación, todos los caballos se expusieron por vía subcutánea a VNO. Después de la exposición, los caballos se supervisaron para temperatura rectal y cualquier signo clínico dos veces al día durante dos semanas y una vez a la semana a partir de entonces para la detección de viremia. Los caballos se sometieron a eutanasia y necropsia 21 y 22 DDE. Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), médula espinal (cervical, torácica y lumbar) y cerebro (frontal, occipital, médula oblonga y tronco cerebral) se examinaron para patología macroscópica y se recogieron para aislamiento de virus.

20 Catorce días después de la segunda vacunación, el 75% de los animales vacunados sufrieron seroconversión (título ≥ 5) con un título de media geométrica de 10 mientras que los animales de control permanecieron negativos (título < 5). La vacunación confirió una protección significativa frente a viremia (un precursor del desarrollo de enfermedad del Virus del Nilo Occidental en toda regla). Nueve de 10 (90%) controles desarrollaron viremia frente a la exposición, mientras que únicamente ocho de 20 (40%) vacunados tenían viremia transitoria o viremia que duraba solo pocos días como mucho. De forma importante, no se observaron signos clínicos de enfermedad de VNO en ninguno de los animales vacunados expuestos a lo largo del periodo de observación. (Se observaron respuestas febriles transitorias en un control y dos caballos vacunados. Sin embargo, no hubo evidencia que sugiriera que estas respuestas se debían a infección por VNO). Se observó hemorragia petequial en la sustancia blanca y hemorragia subdural en el tejido cerebral de un animal de control. Se aisló VNO a partir del cerebro pero no de las muestras de LCR y médula espinal recogidas a partir de este animal. No se aisló VNO a partir de ninguna de las muestras de tejido recogidas a partir de otros caballos expuestos.

30 Los resultados de este estudio demostraron una protección significativa frente tanto a viremia como a signos de enfermedad VNO clínica en caballos vacunados con la vacuna de combinación de ensayo.

35 Se llevó a cabo un segundo estudio con un protocolo similar al anterior, con la excepción de que se utilizó una vacuna de VNO monovalente (vacuna de VNO en solitario) y todos los caballos se expusieron a VNO 12 meses después de la segunda vacunación. Nueve de 11 (81,8%) controles desarrollaron viremia después de la exposición, mientras que únicamente uno de 19 (5,3%) de los animales vacunados tenía viremia transitoria. No se observaron signos clínicos asociados con VNO en ninguno de los animales expuestos a lo largo del periodo de observación. No se observaron respuestas febriles en ninguno de los caballos expuestos. No se aisló VNO a partir de ninguno de los tejidos o muestras de LCR recogidas a partir de ninguno de los caballos expuestos. (Antes de la exposición al final del periodo de 12 meses, 17 de los diecinueve caballos vacunados tenían títulos en el ensayo de neutralización de reducción de placa (ENRP) de 5 o más, mientras que el grupo de control permaneció negativo (<5)).

40 Los resultados de este segundo estudio demuestran una protección significativa (94% de fracción prevenible) frente a viremia en caballos vacunados con la vacuna de VNO monovalente muerto. Estos resultados también demuestran una larga duración de inmunidad protectora.

Ejemplo 5**Evaluación de eficacia de vacuna de ensayo de ADN en caballos en condiciones de campo**

45 Este ejemplo demuestra la eficacia de una vacuna de ADN de Virus del Nilo Occidental (VNO), como parte de una realización adicional de la invención. La vacuna de ADN contenía 100 μg de ADN purificado junto con adyuvante de aceite SP al 5% por dosis de 2 ml y se evaluó frente a exposición a VNO experimental.

50 Para la composición de vacuna de ADN de VNO, se recogieron células bacterianas a partir de un cultivo que se había pasado 10 veces a partir de una semilla maestra usando *E. coli* DH10B obtenida en Invitrogen (Carlsbad, CA) que contenía plásmido del Nilo Occidental pCBWN obtenido en el Centro para el Control de Enfermedades (Fort Collins, CO). Las células bacterianas se suspendieron en tampón de glucosa-tris-EDTA y se lisaron con hidróxido de sodio y dodecil sulfato de sodio. El lisado se neutralizó con una solución de acetato de potasio. El material de complejo precipitado que contenía ADN, ARN, detrito celular y proteínas se eliminó mediante filtración. El filtrado se precipitó con adición de alcohol isopropílico. El precipitado se recogió mediante centrifugación y se resuspendió en tampón. Este procedimiento se repitió usando acetato de amonio. El precipitado recogido se resuspendió en tampón y se cargó en una columna de cromatografía empaquetada con resina Polyflo[®]. Posteriormente la columna se lavó y

el ADN de plásmido se eluyó de la columna. El eluido se sometió a diafiltración finalmente de forma exhaustiva frente a solución salina tamponada con fosfato. Las reservas de ADN de plásmido purificadas se enviaron posteriormente para mezcla. La vacuna de ensayo contenía 100 µg de ADN de plásmido junto con adyuvante de aceite SP al 5%.

5 Los caballos usados para ensayo se asignaron de forma aleatoria a dos grupos: 20 animales recibieron la vacuna de ADN de VNO y 10 animales se usaron como controles. El primer grupo se vacunó por vía intramuscular con dos dosis de 2,0 ml de vacuna con tres semanas de separación. Los caballos de control no recibieron vacunaciones o placebo. Un grupo de caballos (9 vacunados y 5 controles) se expuso 5 semanas después de la segunda vacunación, mientras que un segundo grupo de caballos (11 vacunados y 5 controles) se expuso 12 semanas después de la segunda vacunación. En resumen, se permitió que mosquitos *Aedes albopictus* que se habían infectado con VNO 12 días antes de la exposición de caballos se alimentaran de cada caballo durante al menos 5 minutos. A continuación de la exposición, únicamente los mosquitos que se habían llenado con comidas de sangre de cada caballo se congelaron a -20 °C y la carga de virus de título como una combinación posteriormente. Los mosquitos se homogeneizaron posteriormente mediante agitación vorticial usando diluyente. El homogenado se centrifugó y el sobrenadante se retiró para titulación en células Vero.

Después de la exposición, se tomaron temperaturas rectales dos veces al día durante al menos 9 días y los signos clínicos se supervisaron dos veces al día durante al menos 21 días. Se tomaron muestras de suero dos veces al día durante los primeros 9 días después de la exposición (DDE); una vez al día del 10 al 14 DDE y finalmente el 21 DDE. El aislamiento de virus se realizó en muestras de suero de 0 DDE a 10 DDE para el primer grupo de exposición y de 0 DDE a 11 DDE para el segundo grupo de exposición. El primer grupo de 14 caballos y el segundo grupo de 16 caballos se sometieron a eutanasia y a necropsia 28 a 37 DDE y 29 a 38 DDE, respectivamente. Las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y de tejido del cerebro, cerebelo y el tronco cerebral se recogieron para patología macroscópica y aislamiento de virus.

14 días después de la segunda vacunación, 6 de 20 vacunados tenían un título medible de 2 o más y un caballo tenía un título de 5. La vacunación había conferido protección frente a la exposición de Nilo Occidental experimental usando mosquitos. Se detectó viremia en 5 de 5 animales de control y 4 de 9 vacunados en el primer grupo de exposición, mientras que 4 de 5 controles y 2 de 11 vacunados eran virémicos en el segundo grupo de caballos de exposición. La viremia detectada era transitoria y aparecía únicamente dentro de los primeros seis días después de la exposición. En conjunto, se detectó viremia en 9 de 10 (90%) caballos de control, mientras que se detectó viremia en únicamente 6 de 20 (30%) de los vacunados.

No se observaron signos neurológicos atribuibles a infección por VNO en ninguno de los caballos de estudio a lo largo del periodo de observación de exposición. No se aisló VNO de ninguna de las muestras de tejido recogidas de ninguno de los caballos de estudio. Un caballo del primer grupo de exposición que se había sometido a eutanasia el 7 DDE no mostró evidencia macroscópica ni microscópica de encefalitis o meningitis.

35 Los resultados de este estudio demostraron una protección significativa frente a viremia en caballos vacunados con la vacuna de ensayo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna para su uso en la prevención o alivio de encefalitis del Nilo Occidental en équidos que comprende un componente inmunogénicamente activo seleccionado entre el grupo que consiste en una cepa VM-2 del Virus del Nilo Occidental completo inactivado o muerto; un adyuvante que comprende un aceite inmunoestimulante; y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el componente inmunogénicamente activo es un Virus del Nilo Occidental completo inactivado.
3. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el adyuvante comprende del 0,1 al 50% v/v de la composición de vacuna.
- 10 4. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el adyuvante comprende un aceite metabolizable.
5. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el adyuvante comprende del 1 al 50% v/v de aceite metabolizable.
- 15 6. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en la que el aceite metabolizable es escualeno.
7. La composición de vacuna de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que el adyuvante comprende además uno o más agentes humectantes y/o agentes de dispersión.
- 20 8. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que los agentes humectantes y/o agentes de dispersión comprenden del 0,1 al 25% v/v del adyuvante.
9. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que dichos agentes humectantes o de dispersión son tensioactivos no iónicos.
- 25 10. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dichos tensioactivos no iónicos son seleccionados entre el grupo que consiste en copolímeros de bloque de polioxietileno/polioxipropileno y ésteres de polioxietileno.
11. La composición de vacuna de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que dicho componente inmunogénicamente activo está presente en cantidad suficiente para proporcionar de 1×10^4 DICT₅₀ a 5×10^8 DICT₅₀ por dosis unitaria de la composición de vacuna.
- 30 12. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho componente inmunogénicamente activo está presente en cantidad suficiente para proporcionar al menos 1×10^6 DICT₅₀ por dosis unitaria.
13. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende 5×10^7 DICT₅₀ de dicho virus.
- 35 14. La composición de vacuna de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, comprendiendo además un componente de vacuna dirigido frente a uno o más virus de rabia, virus de encefalitis equina Oriental, virus de encefalitis equina Occidental, virus de encefalitis equina Venezolana, virus de herpes equino tal como EHV-1 o EHV-4, *Ehrlichia risticii*, *Streptococcus equi*, toxoide tetánico, virus de influenza equina (VIE), virus de rinoneumonitis Oriental, Occidental y Venezolana.
- 40 15. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende: al menos 1×10^4 DICT₅₀ por dosis unitaria de virus del Nilo Occidental inactivado; y del 4% al 10% v/v de un adyuvante que comprende del 1 al 3% de copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, del 2 al 6% de escualeno y del 0,1 al 0,5% de monooleato de polioxietileno sorbitán.
- 45 16. La composición de vacuna de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es formulada en al menos dos unidades de dosificación.
17. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 16 para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que una primera unidad de dosificación es administrada ocho semanas antes de la exposición potencial al virus y una segunda unidad de dosificación es administrada de tres a cinco semanas antes de la exposición potencial del animal tratado.
- 50 18. La composición de vacuna de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la composición es proporcionada en una o más unidades de

dosificación de 0,5 a 5 ml de la composición.

- 5 19. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos 1×10^6 DICT₅₀ por dosis unitaria de virus del Nilo Occidental muerto o inactivado y al menos el 1% v/v de un adyuvante que comprende al menos un aceite metabolizable y al menos un agente humectante o de dispersión.
20. La composición de vacuna de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que dichos équidos son caballos.
21. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 20 para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dichos caballos son yeguas preñadas.
- 10 22. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 21 para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, en la que dicha composición de vacuna es administrada por vía parenteral.
23. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 22 para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en la que dicha composición de vacuna es administrada por vía intramuscular.
- 15 24. La composición de vacuna de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la composición de vacuna proporciona prevención o alivio de encefalitis del Nilo Occidental en équidos durante al menos 1 año.
- 20 25. El uso de un componente inmunogénicamente activo seleccionado entre el grupo que consiste en una cepa VM-2 del virus del Nilo Occidental completo inactivado o muerto, un adyuvante que comprende un aceite inmunoestimulante; y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable; en la preparación de una composición de vacuna como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 para su uso en la prevención o alivio de enfermedad en équidos causada por virus del Nilo Occidental.