

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 094**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2005 E 05816010 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1796720**

54 Título: **Vacunas bivalentes contra la gripe aviar**

30 Prioridad:

07.10.2004 US 616707 P

31.01.2005 US 648459 P

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

11.06.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PLANA-DURAN, JUAN;
VILA-QUINTANA, RUT;
TARRES-CALL, JORDI y
KUMAR, MAHESH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 467 094 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

Vacunas bivalentes contra la gripe aviar

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a vacunas bivalentes contra la gripe aviar útiles para vacunar a aves susceptibles ante un brote de la enfermedad. La invención también se refiere al uso de las vacunas para prevenir o mejorar la enfermedad viral de la gripe aviar en aves de corral.

Antecedentes de la invención

10 La gripe aviar, también denominada "GA" es una infección viral aguda y muy contagiosa de pollos y otras aves. Como virus de la gripe, se clasifica en subtipos en base a las diferencias de antígenos en las moléculas hemaglutinina (HA; también denominad abreviado H) y neuraminidasa (NA; también se abrevia a N), que se "reorganizan" o "mutan" de una estación a otra. Dada su constante mutación, la preparación de vacunas es difícil debido a la impredecibilidad en cuanto a qué cepa reaparecerá en las siguientes estaciones. Las cepas usadas para la preparación de vacunas no suelen reproducirse en condiciones de fabricación a una velocidad muy rápida, de modo que esperar la aparición de una cepa concreta y fabricar después la vacuna correcta para la protección frente a una cepa no supone una opción viable. Normalmente, la epidemia de la cepa concreta durará varios meses y, después, quizá desaparezca durante varios años.

15 La erradicación es el procedimiento principal para controlar la enfermedad en aves, sin las obvias desventajas económicas pero si se pudiera producir una vacuna con un inicio rápido de la inmunidad, dicho producto ofrecería una alternativa viable al sacrificio en masa de todas las aves de la granja.

20 Se sabe que los virus de la gripe se pueden clasificar en las diversas topologías A, B, C, de acuerdo con el antígeno del grupo que portan los virus. Los virus de la gripe de los tipos A, B, C se pueden distinguir entre sí en base a las diferencias antigénicas que se pueden hallar en las proteínas de la nucleocápsida (NP) y de la matriz (M) del virus. En particular, los virus de la gripe de tipo A se pueden clasificar en subtipos en base a las diferencias antigénicas en las moléculas de hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA). En la actualidad se han identificado nueve subtipos de las proteínas de neuroaminidasa NA, designadas de NA1 a NA9, y quince subtipos diferentes de las proteínas séricas hemaglutinina designadas como HA1 a HA15. En aves se han aislado los virus portadores de los diversos subtipos de HA (o H) y NA (o N).

30 La HA es una glicoproteína de superficie viral que comprende aproximadamente 560 aminoácidos y que representa 25 de la proteína total del virus. Principalmente es responsable de la adhesión de la partícula viral a la célula huésped y de 25 su penetración en la última en las primeras etapas de la infección. Entre las proteínas virales, la hemaglutinina es una de las que está más sujeta a reorganizaciones postraduccionales. Una vez completada su síntesis, la molécula sigue la vía exocitótica 5 de la célula huésped, durante la cual la HA se pliega, montada en trómeros y glicosilada. Por último, se escinde en dos subunidades H1 y H2; esta escisión es la etapa clave en la activación de la molécula y en la adquisición de 10 la capacidad infecciosa por el virión.

35 Es bien sabido, de hecho, que la diferente composición del sitio de escisión, concerniente a los residuos de aminoácidos básicos, se traduce en la capacidad del virus de la gripe aviar para producir infecciones localizadas o sintomáticas, o al contrario, infecciones generalizadas que tienen un resultado letal para muchas especies de ave. Por tanto, se ha sugerido que este hecho podría influir sobre el tropismo orgánico, la especificidad del huésped, así como la patogenicidad del virus. Con respecto a la patogenicidad del virus, las cepas con HA de sitio con múltiples bases hallan proteasas que esconden la molécula HO, en la forma active Hi y H2 en varios tipos celulares, dando lugar de este modo a múltiples ciclos de infección con una producción masiva de 25 partículas virales infecciosas y causando una generalización de las infecciones en todos los distritos en un periodo corto de tiempo (cepas HPAI). En consecuencia, la infección tendrá una evolución aguda hiperaguda, con una mortalidad muy alta.

45 La neuroaminidasa (NA) representa la segunda glicoproteína de membrana del los virus A de la gripe. Está codificada por un gen (segmento 6 del ARN del virus) de 1.413 nucleótidos de longitud que codifica un péptido de 413 aminoácidos. Esta proteína tiene al menos dos funciones importantes 10:destrucción del receptor celular de la hemaglutinina viral escindiendo entre la molécula de ácido siálico y la propia hemaglutinina. De este modo, se supone que posiblemente facilita la liberación de la progenie viral al impedir que las partículas virales recién formadas se acumulen a lo largo de la membrana celular, así como estimulando el transporte de los virus a través del moco que está presente en la superficie mucosa. Además, la NA representa un importante determinante antigénico sujeto a variaciones antigénicas.

55 Actualmente existe la necesidad en la técnica de vacunas para la gripe aviar que proporcionen una alternativa útil a la erradicación de bandadas infectadas. Dichas vacunas tendrían que provocar una rápida respuesta inmunitaria en el ave vacunada y, preferentemente, permitiría que las aves vacunadas se pudieran diferenciar de las aves infectadas. Se ha postulado que las vacunas bivalentes o polivalentes de la gripe se pueden utilizar en los denominados procedimientos "DIVA", en los que se administra una vacuna que tenga un N diferente del de la cepa contra la que se está vacunando, para proporcionar un medio de diferenciar las aves vacunadas de las aves

infectadas. El documento PCT WO 03/086453 publicado describe la tecnología DIVA y algunas vacunas representativas que se pueden utilizar en los procedimientos de la misma.

Las vacunas combinadas o multivalentes ofrecen una serie de ventajas obvias sobre las vacunas monovalentes. Una ventaja de una vacuna multivalente es que se requieren menos inoculaciones de la vacuna. Una única preparación se puede administrar en una inoculación y es eficaz contra varias enfermedades o cepas de una única enfermedad. A medida que la gama de potenciales cepas virales aumenta, la combinación de vacunas se hace cada vez más obligatoria con el fin de minimizar el número de inoculaciones. El menor número de inoculaciones necesarias cuando las vacunas se combinan probablemente conduzcan a un aumento del cumplimiento del programa de vacunación. A su vez, probablemente esto conduzca a un incremento resultante de la cobertura de las vacunas, lo que en última instancia llevaría a un mejor control de la enfermedad.

Un problema inesperado de las vacunas combinadas es la recientemente identificada influencia negativa que una vacuna puede tener sobre otra en una vacuna de combinación, el denominado efecto de "interferencia antigénica". Se ha descubierto que cuando dos vacunas existentes simplemente se mezclan, una o ambas pueden perder su potencia (Andre, F.E., "Development of Combined Vaccines: Manufacturers' Viewpoint," *Biologicals* 22:317 - 321 (1994); Hadler, S.C., "Cost benefit of combining antigens," *Biologicals* 22:415- 418 (1994); Goldenthal, K, L., et al., "Overview - Combination Vaccines and Simultaneous Administration. Past, Present, and Future." En: *Combined Vaccines and Simultaneous Administration, Current Issues and Perspectives* (Eds. Williams, J.C., et al.) The New York Academy of Sciences, New York, pág. 1 XI-XV (1995); Clemens, J., et al., "Interactions between PRP-T Vaccine against *Hemophilus influenzae* Type b and Conventional Infant Vaccines Lessons for Future Studies of Simultaneous Immunization and Combined Vaccines." En: *Combined Vaccines and Simultaneous Administration. Current Issues and Perspectives* (Eds. Williams, J.C., et al.) The new York Academy of Sciences, New York, pág. 255 - 266 (1995); Insel, R.A., "Potential Alterations In Immunogenicity by Combining or Simultaneously Administering Vaccine Component,". En: *Combined Vaccines and Simultaneous Administration. Currant Issues and Perspectives* (Eds. Williams. J.C., et al.) The New York Academy of Sciences, New York, pág. 35 - 47 (1995).

Desgraciadamente, no siempre se puede predecir mediante el uso de pruebas de potencia establecidas actualmente en el laboratorio si cada componente individual de la vacuna conserva o no su potencia. Por ejemplo, en varios estudios independientes se indicó que cuando la vacuna Hib se combina con una vacuna contra pertussis de células enteras, no hay interferencias entre las dos vacunas pero cuando la vacuna Hib se combina con vacunas contra pertussis acelulares, existe una pérdida sustancial de la inmunogeneidad frente a Hib. Se demostró que cuando Hib se combina con una DTaP, mantiene su inmunogeneidad si se administra en sitios separados, mientras que la inmunogeneidad es 5-15 veces menor cuando las vacunas se administran combinadas en el mismo sitio. Este inesperado resultado confirma que la combinación de dos vacunas existentes puede no ser un proceso simple o rutinario y que dicha combinación a menudo da resultados muy impredecibles que no se detectan durante los estudios iniciales. Los estudios requeridos para documentar la no interferencia a menudo añaden varios meses o años adicionales de estudios para documentar la no interferencia y la idoneidad de uso.

Las vacunas trivalentes contra la gripe aviar se conocen por Fatunmbi et al. (*Avian Pathology* 1992, vol. 21(2), pág. 225 - 237). Capua et al. (*Avian Pathology* 2004, vol. 33(4), pág. 393 - 404) revisan los brotes de la gripe aviar por los virus H5 y H7.

Las vacunas bivalentes contra la gripe aviar han estado disponibles en el mercado, como la vacuna conocida como Fluvac® comercializado por Merial, pero sigue existiendo la necesidad de mejores vacunas bivalentes contra la gripe aviar que provocan una respuesta inmunitaria rápida y una respuesta de título superior y que, por tanto, se puedan usar para proteger rápidamente a las aves ante un brote.

Sumario de la invención

Se describe una composición de vacuna bivalente contra la gripe aviar que es eficaz en la prevención o mejora de la gripe aviar y que se puede usar en la tecnología DIVA y que además tiene las ventajas de proporcionar un inicio rápido de la respuesta inmunitaria, que comprende una proporción HA/dosis de más de aproximadamente 200 HA/dosis y, lo más preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 250 - 300 HA/dosis.

La invención proporciona una composición de vacuna que comprende dos cepas inactivadas de virus de la gripe aviar en el que la proporción HA/dosis combinada es de al menos 200 HA/dosis y, preferentemente, es de 250 - 300 HA/dosis y la cantidad de la HA/dosis de cada una de las cepas de gripe aviar puede variar pero es al menos de aproximadamente 128 HA/dosis y, adicionalmente, en la que una de dichas cepas es un virus de la gripe aviar H5N9 y en la que una de dichas cepas es un virus de la gripe aviar H7N1 y, también, en la que dicha composición se formula como una emulsión de agua en aceite que comprende un aceite mineral y dos tensioactivos que consisten esencialmente en ésteres de oleato de sorbitano.

Las cepas concretas de la gripe aviar elegidas para una vacuna bivalente contra la gripe aviar dependen de la cepa concreta prevalente en el área en la que se va a administrar la vacuna. Una de las cepas puede tener un subtipo HA idéntico al subtipo HA de la cepa prevalente o de exposición y un componente N diferente para permitir el uso de la tecnología DIVA. Las cepas adicionales pueden seleccionarse de otros subtipos de HA que tienen una incidencia en

el área que se va a tratar, de nuevo preferentemente con diferentes subtipos de N.

5 Por tanto, se describe una composición de vacuna contra la gripe aviar que es eficaz en la prevención o mejora de la infección por el virus de la gripe aviar, que comprende dos cepas inactivadas del virus de la gripe aviar, en la que la hemaglutinina (HA) combinada total es de al menos aproximadamente 200 HA/dosis de la composición de vacuna y en la que cada una de las cepas presenta al menos aproximadamente 128 HA/dosis, en la que una de las cepas tiene el mismo subtipo de HA que el de un virus de exposición y en la que al menos una de las cepas tiene un subtipo de NA diferente que el del virus de exposición.

10 En el presente documento también se describe una vacuna bivalente contra la gripe aviar para usar en la prevención o mejora de un brote de infección por el virus de la gripe aviar, que comprende administrar a un miembro de aves de corral una composición de vacuna que contiene al menos dos cepas inactivadas del virus de la gripe aviar, en la que la hemaglutinina combinada total es de al menos aproximadamente 200 HA/dosis de la composición de vacuna y en la que las cepas presentan al menos aproximadamente 128 HA/dosis.

15 También se describe una composición de vacuna que es eficaz en la prevención o mejora de la infección por el virus de la gripe aviar, que comprende al menos dos cepas inactivadas del virus de la gripe aviar, en la que la hemaglutinina (HA) combinada total es de al menos aproximadamente 200 HA/dosis de la composición de vacuna y en la que cada una de las cepas presenta al menos aproximadamente 150 HA/dosis y, además, en la que una de las cepas tiene el mismo subtipo de HA que el de un virus de exposición y en la que al menos una de las cepas tiene un subtipo de NA diferente que el del virus de exposición y también en la que la composición se formula como una emulsión de agua en aceite que comprende un aceite mineral y dos tensioactivos que consisten esencialmente en ésteres de oleato de sorbitano.

20 Las características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de reivindicaciones adjuntas expuestas más adelante en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

25 En un aspecto, la presente invención está dirigida a vacunas bivalentes de la gripe aviar que tiene un contenido en HA total de al menos aproximadamente 200 HA/dosis, como se define en las reivindicaciones.

30 Los aislados de gripe aviar útiles para las vacunas de la presente invención se pueden aislar usando técnicas disponibles en la materia. Por ejemplo, se puede obtener tejido o suero de pollos infectados de una granja de pollos de engorde comerciales. Después, el virus se puede pasar en tejido u otros medios adecuados para establecer un virus semilla maestra. El experto en la técnica también puede llevar a cabo una caracterización adicional usando procedimientos disponibles. Los virus se pueden inactivar usando procedimientos disponibles, tales como, por ejemplo, tratamiento térmico y químico.

35 La composición de vacuna de la invención se formula usando técnicas disponibles como emulsión de agua en aceite, que comprende un aceite mineral y dos tensioactivos que consisten esencialmente en ésteres de oleato de sorbitano. También se contemplan emulsiones dobles, a menudo caracterizadas como emulsiones de agua en aceite en agua. El aceite puede ayudar a estabilizar la formulación y posterior función como adyuvante o potenciador. Los aceites adecuados incluyen aceite blanco o aceite Drake. El aceite mineral puede ser de origen natural o sintético.

Además, la composición de vacuna puede contener otros adyuvantes adecuados disponibles en la técnica. Estos pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, por ejemplo, así como otras sales metálicas.

40 En la composición de vacuna también se pueden incluir excipientes adicionales, tales como otros agentes humectantes o auxiliares de formulación. Tensioactivos incluyen ésteres de oleato de sorbitano. En la vacuna también se pueden incluir otros compuestos reconocidos como estabilizantes o conservantes. Estos compuestos incluyen, sin limitaciones, hidratos de carbono, tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrina o glucosa y similares, así como, por ejemplo, el conservante formalina.

45 La composición de vacuna se formula usando virus inactivados.

La composición de vacuna de la invención contendrá un mínimo de aproximadamente 200 HA total de sus componentes del virus de la gripe. La vacuna contendrá aproximadamente 128 HA/dosis de cada cepa e, incluso más preferentemente, de aproximadamente 192 HA/dosis de cada cepa.

50 También se pueden incluir otros antígenos de aves de corral contra otras enfermedades y administrarse con la composición de vacuna de la invención. Por ejemplo, como parte de la composición de vacuna de la invención se pueden incluir los antígenos de vacuna contra el virus del herpes del pollo, el virus de la anemia del pollo (VAP), el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus de la bronquitis infecciosa (BI), así como antígenos de reovirus. Uno o más antígenos de reovirus pueden ser particularmente preferidos como parte de la composición de la invención.

La invención también está dirigida a la composición de vacuna para usar con objeto de inducir protección contra la infección por el virus de la gripe aviar. El uso implica la administración a un ave de corral una composición de vacuna como se describe en el presente documento de acuerdo con la invención que contiene dos cepas del virus inactivado de la gripe aviar con el contenido en HA combinada superior a aproximadamente 200 HA/dosis, siendo particularmente preferido de 250 a 300 HA/dosis.

El experto en la técnica puede seleccionar el procedimiento de administración. Por ejemplo, la composición de vacuna se puede administrar a polluelos jóvenes tras la eclosión (de pocos días a varias semanas de edad) a través del agua de bebida, mediante pulverización o por gotas oculares. En el presente documento se contempla la administración *in ovo*. Por ejemplo, se puede inocular en embriones, normalmente aproximadamente el día 18 - 19. También están dentro del alcance de la invención otros procedimientos en los que la composición de vacuna de la invención se administra a un portador del virus de la gripe aviar causante de la enfermedad por vía parenteral, subcutánea, peritoneal, oral, intranasal o mediante otros medios, preferentemente por vía parenteral, más preferentemente por vía intramuscular, en cantidades eficaces de acuerdo con un programa que se puede determinar de acuerdo con el tiempo de potencial exposición anticipada.

Normalmente, una dosis está dentro del intervalo de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 2,0 ml por ave de corral, más preferentemente de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml por animal. Por tanto, en el presente documento se contemplan una, dos o más dosis, siendo particularmente preferidas las menos posibles.

Como se ha establecido anteriormente, la invención está dirigida a composiciones de vacuna contra el virus de la gripe y su uso en aves de corral. La expresión "aves de corral" se pretende abarcar, sin limitaciones, todas las aves de corral criadas comercialmente, incluyendo pollos, patos, gansos, pavos, pavos reales, gallos enanos y similares.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran diversos aspectos preferidos de la invención, pero no deben interpretarse como limitantes de su ámbito en modo alguno.

Ejemplo 1

Composición del producto (por dosis)

Nombre del ingrediente	Cantidad	Función
Ingrediente(s) activo(s)		
Cepa H5N9 del virus inactivado de la gripe aviar A/CK/Italia/22A/H5N9/1998	≥ 128 HA	Ingrediente activo
Cepa H7N1 del virus inactivado de la gripe aviar A/CK/Italia/1067/H7N1/1999	≥ 128 HA	Ingrediente activo
Constituyentes de los adyuvantes		
Aceite mineral ligero	230 mg	adyuvante emulsionante
Sesquiolato de sorbitano (vegetal)	22,5 mg	emulsionante
Polisorbato 80 (vegetal)	4,3 mg	emulsionante
Constituyentes de los excipientes		
Tiomersal	0,02 mg	conservante
Solución salina tamponada con fosfato	añadir 0,5 ml	diluyente

Desarrollo farmacéutico

Cepas incluidas en POULVAC® i-AI H5N9, H7N1

Las cepas, H5N9 del virus de la gripe aviar y H7N1 del virus de la gripe aviar, para POULVAC i-AI H5N9, H7N1 se seleccionaron en base a la prevalencia en el campo. Ambas cepas fueron suministradas por el Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZS), Italia. Su eficacia se ha demostrado mediante la seroconversión de los pollos.

Adyuvante incluido en POULVAC i- AI H5N9,H7N1

El adyuvante se eligió en base al efecto inmunoestimulante bien establecido de las emulsiones en aceite mineral formuladas como emulsión de agua en aceite (A/Ac). En la formulación se usa un aceite mineral ligero de calidad farmacéutica (NF) Drakeol 5.

Con el fin de alcanzar una emulsión de agua en aceite (A/Ac) estable, es necesario usar tensioactivos. Los tensoactivos sesquiolato de sorbitano (vegetal), un tensioactivo hidrófobo y polisorbato 80 (vegetal), un tensoactivo hidrófilo, se eligieron debido a sus propiedades emulsionantes. Recientemente, se ha demostrado que el uso de una combinación de estos tensioactivos da lugar a una emulsión estable.

- 5 Arlacel 83V = Sesquiolato de sorbitano, una mezcla equimolar de monoésteres y diésteres;
Número CAS= 8007-43-9. Se usa en la preparación de cremas, emulsiones y pomadas.
Tween 80V = Polisorbato 80 = Polioxietileno 20 monooleato de sorbitano;
Número CAS= 9005-65-6. Se usa en la preparación de emulsiones de aceite en agua.

- 10 Los ésteres de sorbitano como Arlacel 83V producen emulsiones estables de A/Ac pero con frecuencia se usan en combinación con proporciones variables de un polisorbato como Tween 80V para producir una emulsión de A/Ac.

Tanto Arlacel 83V como Tween 80V usados para formular el producto son de origen vegetal.

Volumen de la dosis y programa de vacunación

El volumen de la dosis de 0,5 ml es habitual para el uso en la industria avícola.

Poulvac i-AI H5N9, H7N1

- 15 Eficacia basada en los estudios serológicos

1. Estudio exploratorio de respuesta a la dosis

- 20 Se llevó a cabo un estudio exploratorio de titulación de la dosis para determinar la respuesta de anticuerpo a niveles variables del antígeno HA. Se prepararon cuatro vacunas experimentales que contienen concentraciones antigénicas de 256, 128, 64 o 32 unidades de HA y cada una se usó para vacunar por vía intramuscular a 10 pollos SPF a las dos y las cuatro semanas de edad. Un grupo de diez pollos similares se dejaron sin vacunar como controles. Se extrajeron muestras de sangre antes de cada vacunación y dos semanas, 6 semanas y 10 semanas después de la segunda vacunación para monitorizar la serología. Las muestras de suero se evaluaron usando una inhibición de la hemaglutinación (prueba HI) interna y también se evaluaron en el Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) mediante la prueba HI.

- 25 Los datos serológicos mostraron que todas las aves eran seronegativas contra las dos cepas de gripe aviar antes de la vacunación y que todas las aves sin vacunar permanecieron seronegativas a lo largo de todo el estudio.

Resultados serológicos de H5N9

- 30 Los resultados obtenidos en los laboratorios de los inventores generalmente fueron más altos que en el IZS, pero estaban dentro de 2-4 diluciones (véase la Tabla 1, más adelante). Dos semanas después de la primera vacunación con la vacuna que contiene 128 o 256 unidades de HA, los diez animales vacunados tenían un título de al menos 16 unidades HI (datos de los inventores) y 4 unidades HI (IZS). A segunda dosis de vacuna incluyó una fuerte respuesta anamnésica a la cepa H5N9 en todos los pollos y se observaron títulos dos semanas después de al menos 64 unidades HI en todas las aves que recibieron la vacuna con el título más alto.

Resultados serológicos de H7N1

- 35 Los resultados obtenidos en los laboratorios de los inventores generalmente fueron, de nuevo, generalmente más altos que en el IZS, pero la diferencia de 3 – 8 veces fue mayor que para la cepa H5N9. En cualquier caso, tomando los títulos más conservadores de los resultados del IZS, está claro que dos semanas después de la primera vacunación, todos los pollos que recibieron una vacuna con 128 o 256 unidades de HA tenían un título de al menos 8 unidades HI. La segunda dosis de vacuna incluyó una fuerte respuesta anamnésica a la cepa H7N1 en todos los pollos y se observaron títulos dos semanas después de al menos 512 unidades HI en todas las aves que recibieron la vacuna con el título más alto.

Estos resultados indican que POULVAC i-AI H5N9, H7N1 pueden inducir título contra las cepas H5N9 y H7N1 por encima del nivel de 1:16, que el Consejo Europeo (Directiva del consejo 92/40/CE) considera protector.

TABLA 1

Resumen de la comparación de los títulos de HI entre Fort Dodge Veterinaria S.A. (FD) y el <i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie</i> (ZSV)					
Media geométrica de los títulos de HI					
Concentración del antígeno	Edad en semanas	<i>Títulos de HI</i>			
		H5N9		H7N1	
		FD	IZSV	FD	IZSV
256 unidades de HA para cada subtipo	2 sem	1	1	1	1
	4 sem	59,7	27,9	274,4	52
	6 sem	1910,8	388	8780	1910,8
	10 sem	73,5	RP	274,4	RP
	14 sem	26	RP	168,9	RP
128 unidades de HA para cada subtipo	2 sem	1	1	1	1
	4 sem	39,4	13	274,4	32
	6 sem	831,8	256	4390	831,8
	10 sem	69,1	RP	276,5	RP
	14 sem	50,8	RP	74,7	RP
64 unidades de HA para cada subtipo	2 sem	1	1	1	1
	4 sem	19,7	4,3	90,5	8
	6 sem	861	207,9	2786,9	338
	10 sem	42,2	RP	111,4	RP
	14 sem	34,3	RP	64	RP
32 unidades de HA para cada subtipo	2 sem	1	1	1	1
	4 sem	4,6	1,87	13	2,1
	6 sem	445,7	111,4	2048	157,6
	10 sem	34,6	RP	52	RP
	14 sem	27,4	RP	47	RP
Sin vacunar	2 sem	1	1	1	1
	4 sem	1	1	1	1
	6 sem	1	1	1	1
	10 sem	1	RP	1	RP
	14 sem	1	RP	1	RP

fd: títulos de hi obtenidos en fort dodge veterinaria s.a.
 izsv: títulos de hi obtenidos en el istituto zooprofilattico sperimentale delle venezie
 2 semanas: edad con la primera vacunación y extracción de sangre
 4 semanas: edad con la segunda vacunación y extracción de sangre
 6 semanas: dos semanas, 6 semanas, 10 semanas o 14 semanas tras la segunda vacunación y extracción de sangre
 RP: Resultados pendientes
 Con fines de cálculo, si un suero no tenía título, se consideró que tenía un título de 1

2. Estudio de eficacia

La eficacia de POULVAC i-A H5N9, H7N1 en pollos se ha evaluado mediante el procedimiento siguiente.

- 5 110-A1-E-14-04. Se vacunó a veinte pollos SPF por vía intramuscular a las dos semanas de edad con una dosis única de 0,5 ml formulada con un título mínimo (128 unidades de HA) para ambos antígenos. Se administró una segunda dosis de vacuna 3 semanas después, cuando las aves tenían 5 semanas de edad. Veinte pollos similares se mantuvieron sin vacunar, como controles, para comparar. Se extrajeron muestras de sangre antes de cada vacunación y tres semanas después de la segunda vacunación para monitorizar la serología. Las muestras de suero
- 10 se evaluaron usando una inhibición de la hemaglutinación (prueba HI) interna y también se evaluaron en el Istituto

Zooprofilattico Sperimentale (IZS) mediante la prueba HI.

Los datos serológicos mostraron que todas las aves eran seronegativas contra las dos cepas de a gripe aviar antes de la vacunación y que todas las aves sin vacunar permanecieron seronegativas a lo largo de todo el estudio.

Resultados serológicos de H5N9

5 Los resultados obtenidos en los laboratorios de los inventores generalmente fueron más altos que en el IZS, pero estaban dentro de 2-4 diluciones (véase la Tabla 2, más adelante). Tres semanas después de la primera vacunación, los veinte animales vacunados tenían un título de al menos 128 unidades de HA (datos de los inventores) y 64 unidades de HA (IZS). Esto indica que una sola dosis de POULVAC i-AI H5N9, H7N1 puede inducir títulos contra la cepa H5N9 por encima del nivel de 1:16, que el Consejo Europeo (Directiva del consejo 92/40/CE) considera protector.

La segunda dosis de la vacuna indujo una fuerte respuesta anamnésica a la cepa H5N9 en todos los pollos y, de nuevo, es indicativa de que se observará una buena protección contra la exposición.

Resultados serológicos de H7N1

15 Los resultados obtenidos en los laboratorios de los inventores generalmente fueron, de nuevo, generalmente más altos que en el IZS, pero la diferencia de 3 – 8 veces fue mayor que para la cepa H5N9. Todavía o se sabe por qué esta diferencia en las pruebas es tan amplia. En cualquier caso, tomando los títulos más conservadores de los resultados del IZS, está claro que tres semanas después de la primera vacunación, los veinte pollos vacunados tenían un título de al menos 128 unidades de HA. Esto indica que una sola dosis de POULVAC i-AI H5N9, H7N1 puede inducir títulos contra la cepa H7N1 significativamente por encima del nivel de 1:16, que el Consejo Europeo (Directiva del consejo 92/40/CE) considera protector.

20 La segunda dosis de la vacuna indujo una respuesta anamnésica a la cepa H7N1 muy fuerte en todos los pollos y, de nuevo, es indicativa de que se observará una buena protección contra la exposición.

TABLA 2

Resumen de la comparación de los títulos de HI entre Fort Dodge Veterinaria S.A. (FD) y el <i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie</i> (IZSV)					
Títulos de HI expresados como la media geométrica					
Concentración del antígeno	Edad en semanas	Subtipos de la gripe aviar			
		H5N9		H7N1	
		FD	IZSV	FD	IZSV
Animales vacunados del grupo 1	2 sem	1	1	1	1
	5 sem	374,8	163,1	955,4	304,4
	8 sem	1351,2	588,1	14263,1	1782,9
Grupo 2 Controles	2 sem	1	1	1	1
	5 sem	1	1	1	1
	8 sem	1	1	1	1

Con fines de cálculo, si un suero no tenía título, se consideró que tenía un título de 1.

25 Ejemplo comparativo 2

Para este ejemplo, se hace referencia a dos textos publicados: Referencia 1: Capua et al., Developments of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) Strategy Using a Vaccine Containing a Heterologous Neuraminidase for the Control of Avian Influenza; Avian Pathology 32, 47 - 55 (2003); y Referencia 2: Ellis et al., Vaccination of Chickens Against H5N1 Avian Influenza in the Face of an Outbreak Interrupts Virus Transmission. La referencia 1 indica que las aves vacunadas con 2 dosis de la vacuna del competidor H7N3 a las 2 y 4 semanas de edad tenían serología a las 6 semanas con un título media geométrica de 45, medido mediante HI, alcanzando 11 de 13 aves títulos superiores a 1:16 de HI (que se estima que son protectores). Las aves vacunadas una vez a las 3 semanas de edad, con la serología realizada a la semana 6, mostraron un título geométrico de 19,, medido mediante HI. En este caso, solo 8 de las 13 aves alcanzó títulos de HI superiores a 1:16. Por el contrario, los resultados de la fracción de H7N1 descritos en el presente documento son considerablemente superiores a estos con un programa de dosis única y doble. La referencia 2 indica las aves vacunadas con 1 dosis de otra vacuna contra la gripe del competidor en aves, que varían de 56 a 99 días de edad. A los 15 días de la vacunación, la media geométrica del título fue de 11,7, medido mediante HI, mostrando 32 de 60 aves un título de HI superior a 1:16 o mayor- A los 22 días de la vacunación, la media geométrica del título fue de 33,9, medido mediante HI, mostrando 49 de 60 aves

títulos de HI superior a 1:16 o mayores. No obstante, los resultados obtenidos en el presente documento parecen demostrar una eficacia mayor.

Ejemplo 3

Estudio de eficacia de Poulvac xxx para vacunación profiláctica en pavos

5 Resumen ejecutivo de los resultados

información general

- realizado en el istituto zooprofilattico sperimentale delle venezie, padova, italia, que es oie y laboratorio de referencia nacional para ai y nd
- el ensayo se basó en trabajos previos pero se desarrolló para investigar la eficacia de poulvac xxx como herramienta para la vacunación profiláctica contra:
 - la reaparición de un virus altamente adaptado (a/ty/italia/8000/h7n3/2002)
 - introducción de una cepa nueva con un grado bajo de adaptación al huésped doméstico (a/ty/italia/h5n2/1980)
 - ensayo realizado en pollos y pavos con diferentes dosis infecciosas

10

15 Ensayo experimental

Pavos

- vacunados con poulvac xx, 0,5ml/s.c. a los 8, 34, 60 días de edad
- 4 grupos experimentales, 2 vacunados y 2 sin vacunar, fueron expuestos 21 días después de la tercera vacunación a 10^4 eid/50 en 100 ul/vía intranasal
 - lpai a/ty/italia/8000/2002/h7n3
 - lpai a/ty/italia/h5n2/1980
- un grupo de controles sin vacunar
- se evaluó la diseminación (se recogieron torundas traquelaes y de la cloaca los días 3, 5, 7, 10, 14, 20), la serología y los signos clínicos

20

25 Procedimientos

- aislamiento de virus de acuerdo con la directiva de la ue 92/40/ce
- prueba de la inhibición de la hemaglutinación de acuerdo con la directiva de la ue 92/40/ce
- pcr-rt en tiempo real de acuerdo con cattoli et al., (2004), avian pathology, 33 (4), pag. 432 - 437.
- prueba de detección de anticuerpos anti-n con ensayo "diva" de acuerdo con capua et al., (2003) avian pathology 32 (1), 47 - 55

30

Definiciones y pruebas estadísticas

- infección: combinación de positividad virológica mediante pcr-rrt (traqueal y cloacal) y serovonversión y positividad al ensayo "diva"
- seroconversión: incremento de al menos 4 logs (título previo y posterior a la exposición)
- comparación de la diseminación entre grupos de animales vacunados y sin vacunar: prueba exacta de fisher
- comparación de los títulos previos y posteriores a la exposición: prueba del signo no paramétrico (antes-después dentro del mismo grupo) y ensayo de dos muestras de wilcoxon (mann-whithney) (comparación entre el incremento del título entre diferentes grupos, es decir establecer si existe una diferencia en el incremento del título entre el grupo de animales vacunados y el grupo de animales no vacunados tras la exposición)

35

40 Resultados

pavos expuestos a 10^4 dei/50 de h5n2

1. Comparación entre los indicadores de consecución de la infección entre aves vacunadas frente a no vacunadas
prueba exacta de fisher $p = 0,0005 (< 0,01)$

significativo: existe una diferencia estadísticamente significativa entre el número de aves en las que se alcanzó la infección en aves vacunadas frente a no vacunadas.

	Positivos	Negativos	Total
Vacunados	1	9	10
Sin vacunar	9	1	10

5

2. Comparación entre los niveles de diseminación (torundas cloacales y traqueales) en aves vacunadas y no vacunadas

prueba exacta de fisher $p = 0,0005 (< 0,01)$

Significativo: En aves vacunadas, los niveles de diseminación fueron significativamente menores que en las aves no vacunadas

10

	Positivos	Negativos	Total
Vacunados	44	96	140
Sin vacunar	57	69	126

3. Comparación entre los títulos de hi antes y después de la exposición en aves vacunadas y no vacunadas

prueba del signo no paramétrica:

sin vacunar: $h5n2: p = 0,0039 (< 0,01)$; $h5n9: p = 0,0039 (< 0,01)$

vacunados: $h5n2: p = 0,1797 (> 0,05)$; $h5n9: p = 0,0039 (< 0,01)$

15

Significativo: En aves vacunadas, el aumento del título serológico a la exposición al virus no es significativo. En su lugar, en las aves no vacunadas, se produjo una elevación significativa del título.

	Preexposición a H5N2	Postexposición a H5N2	Preexposición a H5N9	Postexposición a H5N9
Vacunados	7,2*	9,6	6,0	6,9
Sin vacunar	0	8,5	0	6,2
* \log_2				

pavos expuestos a 10^4 DEI/50 DE H7N3

20

1. Comparación entre los indicadores de consecución de la infección entre aves vacunadas frente a no vacunadas
prueba exacta de fisher $p=0,0001 (< 0,01)$

significativo: existe una diferencia estadísticamente significativa entre la consecución de la infección en aves vacunadas frente a no vacunadas.

	Positivos	Negativos	Total
Vacunados	1	9	10
Sin vacunar	9	1	10

- 5 2. Comparación entre los niveles de diseminación (torundas cloacales y traqueales) en aves vacunadas y no vacunadas

prueba exacta de fisher $p = 0,0000 (< 0:01)$

Significativo: En aves vacunadas, los niveles de diseminación fueron significativamente menores que en las aves no vacunadas

	Positivos	Negativos	Total
Vacunados	21	119	140
Sin vacunar	63	63	126

- 10 3. Comparación entre los títulos de hi antes y después de la exposición en aves vacunadas y no vacunadas

prueba del signo no paramétrica:

sin vacunar: $h7n1 : p = 0,0039 (< 0,01)$; $h7n3: p = 0,0039 (< 0,01)$

vacunados: $h7n1 : p = 0,0020 (< 0,01)$; $h7n3: p = 0,0215 (< 0,05)$

- 15 no significativo: en aves vacunadas se produjo un aumento significativo del título serológico a la exposición al virus comparable con el observado en las aves sin vacunar.

	Preexposición a H7N1	Postexposición a H7N1 °	Preexposición a H7N3	Postexposición a H7N3
Vacunados	8,4*	10,6	5,3	7,1
Sin vacunar	0	9	0	6,8
* log 2				

°la reactividad serológica superior con el virus H7N1 se debe atribuir a la cepa concreta de virus. Con el fin de evaluar la significación, se debe considerar el título del virus de exposición.

Conclusiones - pavos

- 20 • poulvac xxx en un programa de 3 inyecciones puede:
- reducir significativamente el número de aves infectadas, la diseminación y los signos clínicos con una exposición de 10^4 die/50 de una cepa h7n3 endémica de la población de pavos italianos
 - reducir significativamente el número de aves infectadas y la diseminación con una exposición de 10^4 die/50 de una cepa h5n2 seleccionada para imitar una nueva introducción
- 25 • vacunación profiláctica en pavos ha tenido como resultado una menor susceptibilidad del grupo a la infección experimental y en niveles de diseminación significativamente más bajos

Ejemplo 4

Estudio de eficacia de Poulvac xxx para vacunación profiláctica en pollos

Resumen ejecutivo de los resultados

Información general

- 5 • realizado en el istituto zooprofilattico sperimentale delle venezie, padova, italia, que es oie y laboratorio de referencia nacional para ai y nd
- el ensayo se basó en trabajos previos pero se desarrolló para investigar la eficacia de poulvac xxx como herramienta para la vacunación profiláctica contra:
 - 10 - la reaparición de un virus altamente adaptado (a/ty/italia/8000/h7n3/2002)
 - introducción de una cepa nueva con un grado bajo de adaptación al huésped doméstico (a/ty/italia/h5n2/1980)
 - ensayo realizado en pollos y pavos con diferentes dosis infecciosas

Ensayo experimental

Pollos

- 15 • vacunados con poulvac xx, 0,5ml/i.m. a las 2 y 5 semanas de edad
- 4 Grupos experimentales, 2 vacunados y 2 sin vacunar, fueron expuestos 21 días después de la segunda vacunación a 10^6 eid/50 en 100 ul/vía intranasal
 - lpai a/ty/italia/8000/2002/h7n3
 - lpai a/ty/italia/h5n2/1980
- 20 • un grupo de controles sin vacunar
- se evaluó la diseminación (se recogieron torundas traqueales y de la cloaca los días 3, 5, 7, 10, 14, 20), la serología y los signos clínicos

Procedimientos

- aislamiento de virus de acuerdo con la directiva de la ue 92/40/ce
- 25 • prueba de la inhibición de la hemaglutinación de acuerdo con la directiva de la ue 92/40/ce
- pcr-rt en tiempo real de acuerdo con cattoli et al., (2004), avian pathology, 33 (4), pág. 432 - 437.
- prueba de detección de anticuerpos anti-n con ensayo "diva" de acuerdo con capua et al., (2003) avian pathology 32 (1), 47 - 55

Definiciones y pruebas estadísticas

- 30 • infección: combinación de positividad virológica mediante pcr-rrt (traqueal y cloacal) y seroconversión y positividad al ensayo "diva"
- seroconversión: incremento de al menos 4 logs (título previo y posterior a la exposición)
- comparación de la diseminación entre grupos de animales vacunados y sin vacunar: prueba exacta de fisher
- 35 • comparación de los títulos previos y posteriores a la exposición: prueba del signo no paramétrico (antes-después dentro del mismo grupo) y ensayo de dos muestras de wilcoxon (mann-whithney) (comparación entre el incremento del título entre diferentes grupos, es decir establecer si existe una diferencia en el incremento del título entre el grupo de animales vacunados y el grupo de animales no vacunados tras la exposición)

Resultados

pollos expuestos a 10^6 dei/50 de h5n2

1. Comparación entre los indicadores de consecución de la infección entre aves vacunadas frente a no vacunadas

prueba exacta de fisher $p = 0,0433 (< 0,05)$

5 significativo: no se detectó infección en las aves vacunadas

	Positivos	Negativos	Total
Vacunados	0	10	10
Sin vacunar	4	6	10

2. Comparación entre los niveles de diseminación (torundas cloacales y traqueales) en aves vacunadas y no vacunadas

prueba exacta de fisher $p = 0,0008 (< 0,01)$

10 significativo: en aves vacunadas, los niveles de diseminación fueron significativamente menores que en las aves no vacunadas (porque no se alcanzó infección)

	Positivos	Negativos	Total
Vacunados	0	140	140
Sin vacunar	10	130	140

Comparación entre los títulos de hi antes y después de la exposición en aves vacunadas y no vacunadas

prueba del signo no paramétrica:

sin vacunar: h5n2 : $p = 0,0078 (< 0,01)$; h5n9: $p = 0,0078 (< 0,01)$

vacunados: h5n2 : $p = 0,4531 (> 0,05)$; h5n9: $p = 0,6875 (> 0,05)$

15 significativo: en aves vacunadas, el aumento del título serológico a la exposición al virus no es significativo (porque no se alcanzó infección). en su lugar, en las aves no vacunadas, se produjo una elevación significativa del título.

	Preexposición a H5N2	Postexposición a H5N2	Preexposición a H5N9	Postexposición a H5N9
Vacunados	8,9*	9,6	7,7	8,5
Sin vacunar	0	4,1	0	4,1
_* $\log 2$				

pollos expuestos a 10^6 DEI/50 DE H7N3

1. Comparación entre los indicadores de consecución de la infección entre aves vacunadas frente a no vacunadas

prueba exacta de fisher $p = 0,0015 (< 0,01)$

20 significativo: no se detectó infección en las aves vacunadas

	Positivos	Negativos	Total
Vacunados	0	10	10
Sin vacunar	7	3	10

2. Comparación entre los niveles de diseminación (torundas cloacales y traqueales) en aves vacunadas y no vacunadas

prueba exacta de fisher $p = 0,0000 (< 0,01)$

significativo: en aves vacunadas, los niveles de diseminación fueron significativamente menores que en las aves no vacunadas (porque no se alcanzó infección)

5

	Positivos	Negativos	Total
Vacunados	2	138	140
Sin vacunar	25	115	140

3. Comparación entre los títulos de hi antes y después de la exposición en aves vacunadas y no vacunadas

prueba del signo no paramétrica:

sin vacunar: h7n1 : $p = 0,0020 (< 0,01)$; h7n3: $p = 0,0020 (< 0,01)$

10

vacunados: h7n1 : $p = 0,0020 (< 0,01)$; h7n3: $p = 1,0000 (> 0,05)$

significativo: en aves vacunadas, no se produjo un aumento significativo del título serológico a la exposición al virus (porque no se alcanzó infección). en su lugar, en las aves no vacunadas, se produjo una elevación significativa del título.

	Preexposición a H7N1	Postexposición a H7N1 °	Preexposición a H7N3	Postexposición a H7N3
Vacunados	8,4*	10,8	6,1	6,1
Sin vacunar	0	5	0	3,5
* $\log 2$				

15 °la reactividad serológica superior con el virus H7N1 se debe atribuir a la cepa concreta de virus. Con el fin de evaluar la significación, se debe considerar el título del virus de exposición.

Conclusiones- pollos

- poulvac xxx en un programa de 2 inyecciones puede:
 - prevenir la infección con 10^6 die/50 de una cepa h7m3 endémica de la población de pavo italiano
 - prevenir la infección con 10^6 die/50 de una cepa h5n2 seleccionada para imitar una nueva introducción
- la vacunación profiláctica en pollos ha prevenido el establecimiento de la infección activa en pollos

20

Aunque La invención se ha descrito en cada una de sus diversas realizaciones, cabe esperar que el experto en la técnica pueda efectuar determinadas modificaciones sin desviarse del alcance de la invención, como se establece en la descripción anterior y como se define en las reivindicaciones siguientes.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna bivalente contra la gripe aviar que es eficaz en la prevención o mejora de la infección por el virus de la gripe aviar, que comprende dos cepas inactivadas del virus de la gripe aviar, en la que la hemaglutinina (HA) combinada total es de al menos aproximadamente 200 HA/dosis de dicha composición de vacuna y en la que cada una de dichas cepas presenta al menos aproximadamente 128 HA/dosis y, además, en la que una de dichas cepas es un virus de la gripe aviar H5N9 y en la que una de dichas cepas es un virus de la gripe aviar H7N1 y también en la que dicha composición está formulada como una emulsión de agua en aceite que comprende un aceite mineral y dos tensioactivos que consisten esencialmente en ésteres de oleato de sorbitano.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos tensioactivos son polioxietileno 20 monooleato de sorbitano y éster de sesquiolato de sorbitano.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el aceite mineral es un aceite blanco o Drakeol.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada una de dichas cepas presenta al menos aproximadamente 150 HA/dosis.
- 15 5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada una de dichas cepas presenta aproximadamente 192 HA/dosis.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la HA/dosis total es de al menos aproximadamente 250.
7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 2, en la que la HA/dosis total es de al menos aproximadamente 300.
- 20 8. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el aceite mineral es un aceite mineral ligero de calidad farmacéutica (NF) Drakeol 5 y al menos dos ésteres de oleato de sorbitano son polioxietileno 20 monooleato de sorbitano y éster de sesquiolato de sorbitano.
- 25 9. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición contiene 230 mg de aceite mineral ligero, 4,3 mg de polioxietileno 20 monooleato de sorbitano, 22,5 mg de éster de sesquiolato de sorbitano, 0,02 mg de tiomersal y solución salina tamponada con fosfato a 0,5 ml.
10. Una composición de vacuna como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la prevención o mejora de un brote de la infección por el virus de la gripe aviar en un miembro de ave de corral.
11. La composición de vacuna como se define en la reivindicación 10, para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la composición de vacuna está dispuesta para su administración mediante vacunación intramuscular.
- 30 12. La composición de vacuna como se define en la reivindicación 10, para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que la dosis de la composición es 0,5 ml por miembro de ave de corral.
13. La composición de vacuna como se define en la reivindicación 10, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que dicha composición de vacuna se administra en no más que una dosis.