

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 599**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/08 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/15 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2005 PCT/US2005/007879**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2005 WO05089795**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2005 E 05732938 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 1722814**

54 Título: **Aislados y vacunas antigénicos del virus de la enfermedad de bursitis Infecciosa**

30 Prioridad:

12.03.2004 US 552989 P

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

12.04.2017

73 Titular/es:

ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)

10 Sylvan Way

Parsippany, NJ 07054, US

72 Inventor/es:

RODENBERG, JEFFREY HAROLD;

KUMAR, MAHESH y

COOKSON, KALEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 608 599 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

Aislados y vacunas antigénicos del virus de la enfermedad de bursitis Infecciosa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a aislados antigénicos del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, así como a nuevas composiciones vacunales que contienen estos aislados y su uso en la inducción de protección en aves de granja contra la enfermedad de bursitis infecciosa.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de bursitis infecciosa, también llamada “enfermedad de Gumboro”, es una infección vírica aguda y altamente contagiosa en pollos jóvenes y otras aves. Se produce por el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa Tipo I (IBDV), que es un miembro de un grupo de virus llamado *Birnaviridae*. La enfermedad se caracteriza por la degeneración del tejido linfóide. La primera diana de la infección es la Bursa de Fabricio, aunque el daño linfóide puede producirse también en el bazo, timo, y glándula de Harder.

15 La degeneración de la Bursa de Fabricio y otros tejidos linfoides en pollos jóvenes tiene graves consecuencias económicas, ya que los pollos infectados tienen una respuesta cada vez menor a la vacunación y un aumento de susceptibilidad a otros agentes infecciosos tales como la enfermedad de Newcastle, enfermedad de Marek y enfermedad de bronquitis infecciosa. Muchas veces, las tasas de mortalidad pueden alcanzar un 80 % o más en pollos jóvenes.

20 La inmunización es el procedimiento principal para controlar la enfermedad. Los pollos se pueden inmunizar pasivamente, recibiendo anticuerpos derivados maternalmente, o se pueden inmunizar activamente con vacunas vivas, vivas-atenuadas, o muertas (inactivadas). Las vacunas vivas atenuadas contienen un virus que se ha “modificado” o atenuado por medio del pasaje seriado en cultivos celulares. Por el pasaje se espera producir una cepa vírica que sea menos patógena. Con el fin de que sea útil en una vacuna, sin embargo, tiene que mantener las propiedades antigénicas e inmunogénicas del virus original. Es decir, debe inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. El control de la enfermedad por inmunización fue muy satisfactorio hasta que empezaron a emerger cepas variantes como resultado de la deriva antigénica en condiciones de campo. Estas variantes producían enfermedad en pollos inmunizados tanto activa como pasivamente.

25 El virus de la enfermedad de bursitis infecciosa a menudo se clasifica por separado en la técnica como cepa “Estándar” o “STC”, o como tipos variantes, aunque la inmensa mayoría de los IBDV de tipo silvestre en los Estados Unidos son ahora variantes. Los virus Delaware son algunos de los tipos de variantes más comunes, y en particular los Delaware E se han considerado el tipo de variante prototípico durante años. Los estudios de IBDV indican que el virus Delaware E sigue siendo el que se aísla más comúnmente; sin embargo, otros tipos de variantes víricas tales como GLS, Rs593 y AL2 también se han convertido en bastante prevalentes. Estas cepas se pueden caracterizar utilizando un panel de anticuerpos monoclonales. Además, utilizando técnicas de PCR-RFLP, ha aumentado una clase molecular distinta de virus (llamada Grupo 6) en cuanto a prevalencia durante los últimos varios años. La secuenciación de esta familia de virus muestra que la mayoría son distintos del virus Delaware E prototípico en la región que se considera en general como quizá una de las más críticas para la identidad o singularidad antigénica.

30 El documento U.S. 5.919.461 se refiere a una cepa variante vacunal viva que se ha informado que es eficaz para inmunizar pollos jóvenes contra las cepas Estándar, Delaware y otras variantes de tipo nuevo.

40 El documento U.S. 6.471.962 desvela el uso de ciertos anticuerpos monoclonales en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la enfermedad de bursitis infecciosa.

El documento U.S. 5.192.539 se refiere a una vacuna IBDV para las aves de granja con material antigénico que se deriva de una línea celular de mamífero.

45 El documento U.S. 5.804.195 proporciona una vacuna para prevenir la enfermedad de bursitis infecciosa que contiene cepas específicas de IBDV vivas, atenuadas pero medianamente virulentas. La vacuna puede contener otros inmunógenos de las aves de granja, incluyendo contra la Enfermedad de Newcastle, enfermedad de Marek, y virus de la bronquitis infecciosa.

Además, el documento WO 9105569 se refiere a un diagnóstico y una vacuna que utiliza una variante de IBDV con sitios de reconocimiento alterados.

50 El documento US5605792 describe una proteína de fusión antigénica que comprende una secuencia de 314 aminoácidos del gen VP2 de la variante A del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) y secuencias de la proteína polihedrina de baculovirus, así como aplicaciones de diagnóstico y vacunales de la misma.

Existe actualmente la necesidad en la técnica de mejores aislados antigénicos de IBDV, así como de vacunas que comprendan estos aislados para su uso contra la infección por IBDV. También se necesitan mejores procedimientos para proteger las aves de granja, en particular los pollos, de las muchas variantes del virus IBD, incluyendo las

nuevas que han aparecido recientemente.

Sumario de la invención

5 La invención se refiere a una composición vacunal que es eficaz en la prevención o mejora de la infección por el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, que comprende un antígeno VP-2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) en combinación con un antígeno ACL Lukert de IBDV y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho antígeno VP-2 de IBDV comprende, en comparación con el consenso clásico, la secuencia de aminoácidos que se expone en la Figura 1 de la siguiente manera SSQ YQPGGVITL FSNIDAITS LSVGELVFQ TSVOGLVGA TIYLIGFDGT AVITRAVAAD NGLTAGTDNL MPFNLVIPTN EITOPITSIK
10 LEIVTSKSGG QAGDQMSWSA SGS, con solo una sustitución de G por D en la posición 318 en el pico hidrófilo mayor B del VP-2 de IBDV, y además, solo una o más sustituciones distintas que se seleccionan de entre 222-T, 249-K, 254-S, 279-N y 286-I.

Además, el componente de antígeno o antigénico debería mantener una reactividad sustancial con un panel básico de anticuerpos monoclonales que caracteriza los virus de la variante de la cepa Delaware.

15 También se desvela en el presente documento una composición vacunal que comprende un antígeno o un componente antigénico que tiene una 318D como única sustitución en el pico hidrófilo mayor B de la secuencia de aminoácidos de VP-2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa.

La invención también se refiere a una composición vacunal contra el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa que, además del antígeno ACL Lukert de IBDV, comprende el aislado antigénico 28-1 de IBDV depositado el 4 de marzo de 2004 en la ATCC con el número de registro PTA-5848.

20 También se desvela en el presente documento un aislado antigénico del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa que tiene una 318-D como la única sustitución en el pico hidrófilo mayor B de la secuencia de aminoácidos VP-2 que es adecuada para su uso en una vacuna contra IBD.

25 También se desvela en el presente documento un aislado antigénico del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la Figura 1 (28-1). Este es un aislado único en cuanto a que se hace referencia ahora como el Grupo 6 de la familia molecular de aislados de IBDV.

Además, se proporciona un aislado antigénico del virus de enfermedad de bursitis infecciosa depositado el 4 de marzo de 2004 en la ATCC con el Número de Registro PTA-5848 como parte de la divulgación.

También se proporciona la vacuna de la presente invención para su uso en la inducción de protección en aves de granja contra la infección por el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa.

30 Además se proporciona una composición vacunal de la invención para su uso en la inducción de protección contra la enfermedad de bursitis infecciosa, que comprende la administración a un ave de granja de un aislado antigénico que se identifica por el n° de registro de la ATCC PTA-5848.

Estas y otras realizaciones, características y ventajas de la invención, según se definen en las reivindicaciones, serán evidentes a partir de la descripción detallada expuesta posteriormente en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una comparación de secuencias de aminoácidos de varias variantes de IBDV de referencia en EE. UU. con respecto al virus clásico (estándar).

Descripción detallada de la invención

40 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición vacunal que comprende un aislado antigénico del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) que comprende, en comparación con el consenso clásico la secuencia de aminoácidos que se expone en la Figura 1 de la siguiente manera SSQ YQPGGVITL FSNIDAITS LSVGELVFQ TSVOGLVGA TIYLIGFDGT AVITRAVAAD NGLTAGTDNL MPFNLVIPTN EITOPITSIK
45 LEIVTSKSGG QAGDQMSWSA SGS, con la única sustitución de G por D en la posición 318 del pico hidrófilo mayor B del VP-2 de IBDV, y además, solamente una o más sustituciones que se seleccionan de entre 222-T, 249-K, 254-S, 279-N y 286-I, en combinación con el antígeno ACL Lukert de IBDV. El aislado generalmente se caracteriza como un virus tipo Delaware utilizando un ELISA de captura anticuerpo monoclonal-antígeno, en el que reacciona igual que el Delaware E contra un panel limitado de anticuerpos monoclonales. Además el virus se caracteriza además utilizando el procedimiento de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción/reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR/RFLP) de Jackwood y col., Restriction Fragment Length Polymorphisms in the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses, Avian Dis. 41:627-637, 1997, como un virus del Grupo 6 (mejor
50 que el Grupo molecular 2 al que se ha asignado la variante Delaware E prototípica).

En referencia a la Figura 1, se expone una caracterización adicional en términos de secuencia de aminoácidos de la región variable de la Proteína Vírica 2 (VP-2) antigénica principal, junto con la información de secuencia de aislados

establecidos para compararlos. También se incluye un sumario de la caracterización de aislados de IBDV con particular atención a las cualidades especiales del aislado 28-1 como un ejemplo adecuado (que se define en el presente documento posteriormente). Los expertos en la técnica reconocerán que la VP-2 es una de las dos principales proteínas estructurales de IBDV y también es la diana de los anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo que confieren inmunidad protectora. (La segunda proteína estructural principal del virus, VP-3, no da lugar a anticuerpos neutralizantes).

Como ilustra la Figura 1, los aislados de IBDV tienen dos regiones pico hidrófilas mayores y dos menores. Sin quedar ligados por teoría alguna, se cree que todas las regiones hidrófilas, y en particular las regiones hidrófilas mayores tienen un efecto importante en la antigenicidad. El aislado 28-1 tiene 318-D como única sustitución en el pico B que se señala en la Figura 1, y por eso es identificable por separado de otras variantes de IBDV de referencia, incluyendo la cepa clásica (estándar-STC) y la cepa Delaware E. De hecho, el aislado 28-1 se diferencia de Delaware E en la que se considera en general como la región antigénica más crítica del pico B hidrófilo mayor de IBDV. Además, el aislado 28-1 de IBDV tiene una o más de las siguientes sustituciones adicionales: 222-T, 249-K, 254-S, 279-N y 286-I (según las abreviaturas de aminoácidos de letra única comúnmente aceptadas). Además, el aislado 28-1 se diferencia de la variante Delaware A en la posición 222. La Delaware A tiene 222-Q que es una sustitución relativamente rara en esta posición, mientras que la 28-1 tiene 222-T. La mayoría de los virus de campo tienen 222-T, que quizá indica que el aislado 28-1 es una mejor pareja antigénica que el Delaware A para los virus de campo en EE. UU., y también suficiente significado para distinguir las dos cepas. Un sumario de los patrones de aminoácidos de las cepas víricas que se presentan en la Figura 1 se muestra en la TABLA 1 posterior:

TABLA 1. COMPARACIÓN DE LOS PATRONES DE AMINOÁCIDOS DEL VIRUS DE REFERENCIA EN LAS POSICIONES CRÍTICAS VP-2

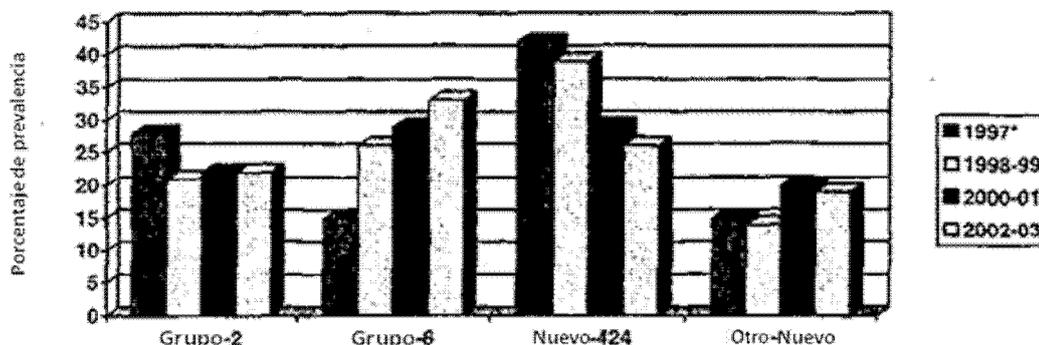
Virus	222	249	254	286	318	321	322	323
Clásico-STC	P	Q	G	T	G	A	G	D
Delaware E	T	K	S	I	D	A	G	E
GLS	T	K	S	T	G	E	G	D
Rs593	T	K	N	I	G	A	E	D
28-1	T	K	S	I	D	A	G	D
Delaware A	Q	K	S	I	D	A	G	D

Las posiciones 318, 321, 322 y 323 se localizan en el Pico B y cambios de aminoácidos que dan como resultado un cambio antigénico.

Cada una de las posiciones superiores de la TABLA 1 se había ligado a la unión de anticuerpos monoclonales neutralizantes, y por lo tanto el experto puede ver las diferencias entre las cepas incluyendo el aislado 28-1 del Grupo 6.

La acumulación de los datos por medio de tipaje PCR de las muestras de campo de EE. UU. ha mostrado claramente ahora la prevalencia y significación de los virus IBDV del Grupo molecular 6. Los virus del Grupo 6 son de lejos el tipo molecular más común recuperado de los pollos de EE. UU, suponiendo aproximadamente 1 de cada 3 aislados de campo, como indica la TABLA 2 posterior. Sin quedar ligados por teoría alguna, probablemente el aumento de prevalencia de los virus del Grupo 6 en los pollos en EE. UU. desde 1997 es un resultado del escape más satisfactorio de los anticuerpos de tipo clásico y Delaware E proporcionados por vacunas de IBD convencionales. Apoyando este concepto está el hecho de que el análisis de secuenciación de varias muestras de campo de EE.UU muestra que la mayoría de los virus IBD de la familia del Grupo 6 no tiene el patrón de sustitución de Delaware E en el Pico B hidrófilo mayor - Jackwood y col., Amino Acid Comparison of Infectious Bursal Disease Viruses Placed in the Same and Different Molecular Groups by RT/PCR-RFLP, Avian Dis. 45:330-339, 2001.

TABLA 2. Sistema de ensayo PCR-RFLP de Jackwood que muestra la prevalencia de virus de tipo silvestre en los Estados unidos con el tiempo.



Los datos de 1997 se obtienen del estudio Jackwood (Referencia)

Los datos de 1998-2003 se obtienen de estudios de Fort Dodge de más de 600 muestras positivas.

La significación práctica de la familia del Grupo 6 de virus se exploró recientemente llevando a cabo un estudio de desafío de la progenie de cinco gallineros con cinco programas diferentes de vacunación con IBD muerto. Una de las variantes del Grupo 6 de Jackwood se comparó con cepas de virus Delaware E y GLS en un estudio de desafío de progenie. Los resultados mostraban que el virus de la variante del Grupo 6 sobrepasaba los anticuerpos maternos con una tasa más alta de lo que lo hacía cualquiera de las variantes de Delaware E y GLS, lo que daba lugar a más atrofia de la bursa y menos aves protegidas. Este estudio demostraba no solo el peligro que suponían los virus del Grupo 6 virulentos silvestres, sino que además reforzaba la necesidad de una vacuna eficaz contra los mismos.

El aislado de IBDV grupo 6 que se utiliza en la composición vacunal de la presente invención es el aislado 28-1 que tiene una sustitución 318-D señalada en la Figura 1, y además, una o más de las siguientes sustituciones adicionales en VP-2: 222-T, 249-K, 254-S, 279-N y 286-I. Preferentemente, el aislado 28-1 tendrá al menos dos de las sustituciones señaladas, en particular 222-T y 254-S, y más preferentemente al menos tres, cuatro, o las cinco sustituciones señaladas. Un ejemplo adecuado se ha depositado en la ATCC con el número de registro [PTA-5848](#) el 4 de marzo de 2004. El aislado vírico 28-1 se diferencia de los aislados anteriores por una combinación de su clasificación de grupo molecular (como se ha expuesto anteriormente), y también por el hecho de que mantiene una reactividad sustancial con el panel básico de anticuerpos monoclonales que caracterizan las variantes víricas del tipo Delaware.

Los aislados antigénicos del Grupo 6 de IBDV, y en particular el aislado 28-1, se pueden aislar utilizando técnicas disponibles en la técnica. Por ejemplo, se puede obtener la bursa de pollos infectados en una granja de pollos comercial. Entonces pueden hacerse pasajes del virus por el tejido de la bursa u otro medio adecuado para establecer una siembra maestra de virus. También puede llevarse a cabo una caracterización adicional por el experto utilizando los procedimientos disponibles.

Como se desvela en el presente documento, la composición vacunal contiene uno o más de los aislados del Grupo 6 de IBDV descritos. Se prefiere especialmente el aislado antigénico de IBDV que presenta características inmunogénicas y de seguridad cuando se formulan en una composición vacunal. Se prefiere mucho que las cualidades de la composición vacunal sean suficientes para obtener la aprobación reguladora y licencia de la misma de la USDA. El aislado 28-1, y otros aislados que tienen sustancialmente las mismas características de identificación sustantivas, se prefieren mucho para la composición vacunal. Los aislados antigénicos del Grupo 6 descritos en el presente documento deberían ofrecer una protección cruzada significativa contra un amplio intervalo de variantes de desafío de IBDV, incluyendo sin limitación, la Estándar (STC) así como las variantes Delaware y AL-2, y variantes de la familia molecular del Grupo 6, incluyendo la 28-1. La protección contra la cepa variante Shelton 21, o S-21 de la familia del Grupo 6 también se contempla en el presente documento – la variante S-21 tiene las siguientes sustituciones en la región VP-2: 318-N y 321-E.

La composición vacunal de la invención se formula utilizando técnicas disponibles, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, en una realización se contempla una formulación acuosa. Dichas formulaciones utilizan agua, solución salina, o fosfato u otros tampones adecuados. En otra realización más, la composición vacunal preferentemente es una emulsión de agua en aceite o aceite en agua. También se contemplan emulsiones dobles, a menudo caracterizadas como emulsiones agua en aceite en agua. El aceite puede ayudar a estabilizar la formulación y además funciona como un adyuvante vacunal. Los aceites adecuados se pueden

seleccionar por el experto en la técnica, y pueden incluir sin limitación, aceite blanco, Drakeoil, escualano o escualeno, así como otros aceites animales, vegetales o minerales, sean de origen natural o sintético. Además, la composición vacunal 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.

- 5 Se pueden incluir también en la composición vacunal excipientes adicionales, tal como tensioactivos u otros agentes humectantes. Los tensioactivos pueden incluir los ésteres monooleato de sorbitan (serie TWEEN®), así como copolímeros de óxido de etileno/óxido de propileno en bloque (serie PLURONIC®), así como otros disponibles en la técnica. También se pueden incluir en la vacuna otros compuestos reconocidos como estabilizadores o conservantes. Estos compuestos incluyen, sin limitación, carbohidratos tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrina o glucosa y similares, así como el conservante formalina, por ejemplo.

La composición vacunal también se puede formular como un polvo seco, sustancialmente libre de agua exógena, que puede ser reconstituido por un usuario final.

- 15 La composición vacunal puede contener virus vivos, o virus vivos, pero atenuados. También se contemplan los virus muertos o inactivados para su uso en la invención. En una realización, el virus que se utiliza en la composición vacunal se ha atenuado utilizando técnicas de pasaje en serie. Se puede utilizar todo o parte del aislado antigénico. Es altamente preferido que cualquier forma de aislado antigénico que se seleccione, que se identifiquen las características de la familia del Grupo 6, en particular las características descritas anteriormente, se mantenga en el virus vacunal mencionado. También se contempla para su uso en el presente documento una vacuna recombinante que exprese los ácidos nucleicos, secuencia de aminoácidos, y/o proteínas que tienen las características de identificación estructural de los aislados antigénicos del Grupo 6, por ejemplo 28-1, descritos en el presente documento.

- 20 La composición vacunal de la invención contendrá una cantidad eficaz de aislado vírico IBD para prevenir o mejorar la enfermedad de bursitis infecciosa. En una realización de la invención, la vacuna contendrá desde aproximadamente $10^{2.0}$ a aproximadamente $10^{6.0}$ de EID50 ("Dosis infecciosa de huevo") de aislado por dosis. Una dosis normalmente está en el intervalo de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 2,0 ml por ave de granja, más preferentemente aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml por animal.

La composición vacunal de la presente invención también contiene el antígeno ACL Lukert de IBDV de la cepa Lukert, aislada por primera vez por el Dr. Phil Lukert de la Universidad de Georgia en Athens y desarrollado por Salsbury Laboratories, Inc.

- 30 También se pueden incluir otros antígenos de las aves de granja contra otras enfermedades y administrarse con la composición vacunal de la invención. Por ejemplo, se pueden incluir antígenos vacunales contra herpesvirus del pollo, virus de anemia del pollo (CAV), Enfermedad de Newcastle y virus de la Bronquitis infecciosa (BI), así como antígenos de reovirus como parte de la composición vacunal de la invención. Pueden ser particularmente preferidos uno o más antígenos de reovirus como parte de la composición vacunal de la invención.

- 35 La invención se refiere también a la composición vacunal de la presente invención para su uso en la inducción de protección contra la infección por el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa. El uso implica la administración a un ave de granja de una composición vacunal de la presente invención, en particular, el aislado que se expone anteriormente que está depositado con el número de registro PTA-5848 de la ATCC el 4 de marzo de 2004 que es particularmente deseable, en combinación con el antígeno ACL Lukert de IBDV.

- 40 El procedimiento de administración puede seleccionarlo un experto. La administración in ovo se contempla en el presente documento. Por ejemplo, se pueden inocular embriones, habitualmente a partir del día 18-19. Además, la composición vacunal se puede administrar a los pollitos tras la eclosión (desde pocos días a varias semanas) por medio del agua de bebida, pulverización o gotas oftálmicas. La composición vacunal de la invención se administra también por vía parenteral, subcutánea, peritoneal, oral, intranasal, o por otros medios disponibles, preferentemente parenterales, más preferentemente intramusculares, en cantidades eficaces de acuerdo con una programación que se puede determinar de acuerdo con el momento de exposición anticipada potencial a un portador del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa que produce la enfermedad.

- 50 Como se ha expuesto anteriormente, la invención se refiere a nuevas composiciones vacunales preferentemente para el uso en la inducción de protección contra el IBDV en las aves de granja, que incluye pollos, patos, gansos, pavos reales, gallos enanos, y similares.

- 55 También se desvela en el presente documento un marcador vacunal para IBDV que utiliza el aislado antigénico que se expone en la Figura 1 (28-1) para distinguir entre miembros vacunados y no vacunados de una bandada, así como para distinguir los animales vacunados de los que pueden haberse infectado con una o más variantes distintas del virus. El marcador vacunal también puede incluir un reactivo en forma de kit para ensayar los animales. El reactivo en forma de kit podría incluir uno o más aislados antigénicos, tales como 28-1, así como anticuerpos que reconozcan y reaccionen con el mismo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran varios aspectos preferidos de la invención, pero no se debería considerar que limiten de ninguna manera el ámbito completo de la misma.

Ejemplo 1

5 **SUMARIO DEL ESTUDIO**

Se vacunaron pollos White Leghorn libres de patógenos específicos (SPF) a las cinco semanas de edad con 1/50 de una dosis de combinación vacunal del virus de enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) inactivada prototípica/Reovirus aviar. Las vacunas contenían antígenos de Reovirus aviar y virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, cepa Lukert, con o sin la adición de las cepas variantes de IBDV de origen tisular de la bursa (BTO). Las vacunas de ensayo se formularon en un formato con una relación 55 % oleosa:45 % acuosa, de 0,5 ml. Se administró también un producto vacunal IBDV/Reo de la competencia a 1/50 de una dosis a un grupo de pollos.

A los grupos se les extrajo sangre para suero a los 24 días tras la vacunación y se desafiaron con aislados de la variante S-21, variante E de Delaware o la variante AL2 de IBDV a los 28 días tras la vacunación. Se registraron las relaciones de peso de la bursa respecto al corporal a los 10 días tras el desafío.

15 Los datos serológicos y de protección de los pollos vacunados indicaban que el antígeno preparado a partir de un aislado de variante denominada 28-1, y en particular cuando se añadía la ACL Lukert IBDV en una vacuna inactivada, aumentaba significativamente la inmunidad.

Se concluyó que los esfuerzos adicionales de desarrollo de una vacuna deberían incluir la cepa variante 28-1 del antígeno de IBDV.

20 Evaluación de aislados adicionales de variantes de IBDV como vacunas inactivadas: Estudio fraccionado de dosis

ANTECEDENTES

Se adquirieron varios aislados de campo del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) a partir de casos en los que el sistema de tipaje molecular revelaba nuevos patrones o únicos que indicaran virus de antigenicidad variante. Este ejemplo se llevó a cabo para examinar y caracterizar varios de estos aislados adicionalmente para un posible desarrollo futuro como vacunas vivas, vivas (atenuadas), o inactivadas. La primera etapa de la caracterización era evaluar la patogenicidad de los virus. Basándose en los resultados del ensayo inicial, los aislados seleccionados se utilizaron como virus de desafío para determinar cuales, si había, tenían la capacidad de sobrepasar la inmunidad inducida por las vacunas inactivadas actuales. El tercer estudio intentaba evaluar el uso de dos aislados variantes identificados en combinación con ACL Lukert IBDV en vacunas inactivadas, pero se invalidó por una exposición inadvertida al virus antes del desafío.

El estudio que se describe actualmente se diseñó para evaluar el uso de antígenos BTO de aislados alternativos variantes de IBDV en combinación con ACL Lukert IBDV en vacunas inactivadas. La respuesta serológica, según se mide por ELISA y ensayos de seroneutralización (SN), y se evaluó la protección contra tres cepas variantes de desafío.

35 **OBJETIVO(S)**

Comparar las vacunas prototipo, que se prepararon con la inclusión del antígeno BTO a partir de aislados variantes S-21, 15-4 (una variante de la cepa Delaware), 28-1 y ArkProvent de IBDV, para inmunizar pollos. (S-21 y ArkProvent son otros aislados moleculares de virus del Grupo 6, pero S-21 se considera un nuevo tipo según se define por un panel de anticuerpos monoclonales, y ArkProvent no se ha definido).

40 Evaluar la actuación de las vacunas prototípicas en comparación con un producto de la competencia.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

EVENTO LOGARÍTMICO

Día de ensayo	Actividad
0	Vacuna de los grupos apropiados a las 4 semanas de edad
24	Extracción de sangre de 15 aves por grupo vacunal y 20 aves de los grupos no vacunados
28	Desafío de los grupos apropiados con aislados de desafío de IBDV
38	Determinación de las relaciones de peso de la bursa respecto al corporal

SELECCIÓN DE ANIMALES

Animales de ensayo

Tipo: *Gallus domesticus*

Número: 400 (375 utilizados en el ensayo y 25 extra)

5 Estado serológico: SPF

Intervalo de edad/peso: 3 semanas de edad

Sexo: mezclados

Raza: White Leghorn

Identificación: Tarjetas de jaula aisladora

10 Fuente: HyVac

Criterios de pre-admisión/exclusión: Solamente se utilizaron los pollos con un estado aparentemente sano en el momento de la inoculación. Cualquier pollo que se considerara que por su comportamiento o aspecto estaba desarrollando una enfermedad se excluyó del estudio.

Alojamiento y cuidado de los animales

15 Los pollos se alojaron en aisladores de Plexiglás tipo Horsfal modificado bajo presión negativa en una construcción apropiada de las instalaciones de ensayo. Se les suministró alimento y agua ad libitum durante la duración del estudio. Se utilizaron los procedimientos de cuidado de aves de granja convencionales para las instalaciones de ensayo de animales.

Vacunas de ensayo

20 Composición de la vacuna

Se ensayaron un total de siete vacunas en el estudio. Una vacuna era un producto actual de la competencia (que contenía al menos un componente de antígeno BTO) y las restantes seis vacunas se prepararon en Investigación y Desarrollo de Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, Iowa.

25 Las vacunas de ensayo estaban compuestas por fluidos víricos de reovirus aviar e IBDV inactivado formulados en una emulsión de agua en aceite. El antígeno del lote ACL Lukert de IBDV se originó en las instalaciones de Bioproducción, y se añadió a cinco de las vacunas en una cantidad que daba lugar a una potencia relativa (RP) de 1,0 según se compara con el antígeno de materia prima. Los fluidos de variantes Shelton 21, 15-4, 28-1 y ArkProvent se adquirieron a partir de tejido de la bursa que se preparó en Investigación y Desarrollo, y se añadieron en una cantidad que daba lugar a una dosis de $10^{4.0}$ EID₅₀ en 0,5 ml. La quinta vacuna contenía solo el antígeno

30 ACL Lukert de IBDV básico sin ninguna variante.
Se añadió el IBDV Lukert de origen Chicklet, lote nº XXXX-XX-XX a la sexta vacuna para dar lugar a $10^{6.5}$ TCID₅₀ por dosis de 0,5 ml. Adicionalmente, se añadió el antígeno Shelton 21 a $10^{4.0}$ EID₅₀ por cada 0,5 ml.

35 Los antígenos de Reovirus se obtuvieron de materias primas propagadas de ACL, producidas TTPI y se añadieron a todas las vacunas para dar lugar $10^{6.7}$ TCID₅₀ por 0,5 ml de dosis. Las formulaciones estaban en una relación 55 % oleosa:45 % acuosa con Arlacel 83 y Tween 80 como emulsionantes, formuladas para un volumen final de 0,5 ml por dosis.

Origen de la vacuna

Las vacunas se prepararon en las instalaciones de Fort Dodge I+D con la excepción del producto de la competencia que se obtuvo de un distribuidor comercial.

40 Transporte de la vacuna

Las vacunas se transportaron antes del inicio del estudio en la lanzadera regular intra-instalaciones y se transportaron y almacenaron manteniendo una temperatura de 2 °C a 7 °C.

Número de serie

45 Las vacunas de Fort Dodge prototípicas se identificaron en este momento por un número de serie. Las botellas individuales se etiquetaron con el nombre indicado en la tabla de tratamiento posterior (TABLA 3).

Producto de la competencia – serie nº 1159011 (también contenía el antígeno de reovirus)

Ensayo del control de calidad o certificado de lote de EU (si está disponible)

50 No se llevó a cabo un ensayo de las vacunas por el Departamento de Control de Calidad. Fort Dodge I+D llevó a cabo una titulación pre-inactivación y un ensayo de inactivación completa de los antígenos de variante BTO como base para el desarrollo de formulaciones vacunales.

Almacenamiento

Las vacunas se almacenaron a 2 °C a 7 °C.

TABLA 3

DISEÑO EXPERIMENTAL				
Grupo	Tratamiento	Vía/volumen	Desafío	Nº de aves
A	Chicklet Lukert + S21	IM/0,01 ml	Véase el procedimiento de desafío posteriormente	45
B	ACL Lukert solo	IM/0,01 ml	Véase posteriormente	45
C	ACL Lukert+ S21	IM/0,01 ml	Véase posteriormente	45
D	ACL Lukert+ 28-1	IM/0,01 ml	Véase posteriormente	45
E	ACL Lukert+ 15-4	IM/0,01 ml	Véase posteriormente	45
F	ACL Lukert+ ArkProvent	IM/0,01 ml	Véase posteriormente	45
H	Producto de la competencia	IM/0,01 ml	Véase posteriormente	45
I	Control de desafío	N/a	Véase posteriormente	45
J	Control Normal	N/a	n/a	15

5 Vacunación

Los pollos se vacunaron una vez, por vía intramuscular, en el pecho. La vacuna se suministró utilizando una microjeringa con un aparato de repetición mecánica ajustado a una aguja de calibre 20, y se administró un volumen de 0,010 ml a cada pollo a las 5 semanas de edad.

Desafío y procedimiento de observación

10 Se produjeron las diluciones adecuadas de los aislados de desafío Shelton 21, variante Delaware E y AL2 en caldo de fosfato de triptosa para conseguir una dosis de $10^{3,0}$ a $10^{3,5}$ EID₅₀ por pollo. Se administró el desafío por gotas oculares, utilizando una pipeta y suministrando 30 µl en un ojo de cada una de las 15 aves por grupo de cada aislado. El desafío tuvo lugar a las cuatro semanas post-vacunación.

15 A los diez días tras el desafío, los grupos se sometieron a eutanasia y se determinaron las relaciones de peso de la bursa respecto al corporal.

Tabla de desafío:

Aislado de desafío	Dosis/Administración	Esquema de desafío
Shelton 21	$10^{3,5}$ EID ₅₀ por 0,03 ml en gotas oculares a 15 aves/grupo	Una vez a los 28 días tras la vacunación
Variante E	$10^{3,5}$ EID ₅₀ por 0,03 ml en gotas oculares a 15 aves/grupo	Una vez a los 28 días tras la vacunación
AL2	$10^{3,5}$ EID ₅₀ por 0,03 ml en gotas oculares a 15 aves/grupo	Una vez a los 28 días tras la vacunación

Recolección y ensayo de las muestras

20 Las muestras de sangre se recolectaron a los 24 días tras la vacunación. La sangre se dejó coagular y el suero se decantó en tubos separados. Los sueros se congelaron y se enviaron a Fort Dodge I+D para los análisis ELISA Idexx (de intervalo extendido) y los ensayos de neutralización vírica en laboratorio.

Para determinar las relaciones de peso de la bursa respecto al corporal (B/BW), los pollos se sometieron a eutanasia y se registró el peso corporal de cada ave. Para cada ave, se escindió la bursa completamente y se pesó de manera similar.

25 Las muestras de las bolsas también se recolectaron en formalina en tampón neutro y se archivaron.

Análisis de los datos

5 Se calculó la media geométrica de los títulos de ELISA de IBDV para los grupos y se compararon por ANOVA de una vía y PSLD de Fisher ($\alpha = 0,05$) tras la importación de los datos en el paquete de software Statview. Los datos del ELISA se evaluaron también en términos de porcentaje positivo, en el que cualquier muestra con una relación de señal positiva respecto al control positivo, mayor de 0,20 se consideraba positiva a anticuerpos (como se especifica por el fabricante del kit de ensayo ELISA, Idexx). Para los datos de neutralización, se calcularon también los títulos de la media geométrica, y para definir el porcentaje positivo, cualquier muestra con una dilución recíproca de 20 o más se consideró como positiva a anticuerpos.

10 La relación B/BW se calculaba dividiendo un peso de bursa registrado por su peso corporal asociado multiplicándolo por 1000. Los controles normales se utilizaron para establecer una media de la relación B/BW normal, y se calculó un corte del valor de corte que era dos desviaciones estándar menos que esta media. Cualquier ave con una relación B/BW menor que el valor de corte se consideraba afectada por el desafío, y por tanto no protegida por la vacunación. Este análisis daba lugar a los datos de porcentaje de protección.

15 Las medias de grupo de las relaciones B/BW también se compararon por ANOVA de una vía ($\alpha = 0,05$) y el PSLD de Fisher tras la importación de los datos en el paquete de software. Una media de grupo de la relación B/BW que era significativamente mayor que los controles de desafío indicaba que se había conseguido la protección en un grupo. Una media de grupo de la relación B/BW mayor en un grupo en comparación con otro grupo, indicaba un nivel de protección significativamente más alto en ese grupo.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

20 Serología

El ensayo de los datos del ELISA y seroneutralización se exponen en la Tabla 4.

El control de desafío y los grupos de control normales se mantenían libres de anticuerpos IBDV antes del desafío, validando la bioseguridad del estudio.

25 Las vacunas que contenían el ACL Lukert con adición de la variante de antígeno de una fuente de BTO daba lugar a un ELISA GMT contra IBDV significativamente más alto que lo que lo hacían las de solo el grupo ACL Lukert, pero los títulos no siempre eran significativamente mayores que los grupos de control no vacunados. La vacuna ACL Lukert+ 15-4 daba lugar a un ELISA GMT significativamente mayor que el control y los grupos con solo ACL Lukert, pero solo el antígeno 28-1 aumentaba la respuesta en el ELISA en o por encima del "punto de referencia" del producto de la competencia.

30 El ensayo de seroneutralización (SN) de GMT era menor en general y por lo tanto no se evaluó estadísticamente. En términos de SN positiva, se observaron resultados similares a los que se obtenían por ELISA. Los grupos de control estaban libres de anticuerpos detectables. Los grupos con solo ACL Lukert, Chicklet Lukert + S21, ACL Lukert+ ArkProvent y ACL Lukert+ S21 solo tenían 1 o 2 positivos, y los grupos ACL Lukert+ 15-4 y ACL Lukert+ 28-1 tenían 5 positivos.

35 Protección del desafío

La protección del desafío se evaluó por dos maneras. En primer lugar, como se expone en la Tabla 5, era por comparación de las medias de grupo de las relaciones B/BW. La tabla 5 incluye la dispersión de las comparaciones por aislado de desafío y para todos los desafíos combinados.

40 Son los datos de "todos los desafíos combinados" los que pueden ser más pertinentes en la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas. Se esperaba proporcionar una vista completa de la protección contra las variantes en general, incluyendo los aislados más recientes, que es el objetivo diana de cualquier vacuna en desarrollo.

45 Cuando se consideran los datos de desafío combinados, la media de las relaciones B/BW de los grupos de ACL Lukert solo, Chicklet Lukert + S21, ACL Lukert+ S21 y ACL Lukert+ ArkProvent eran estadísticamente equivalentes al grupo de desafío de control. Esto indicaba que no se alcanzaba protección esencialmente por vacunación con un 1/50 de una dosis de estas vacunas. El grupo ACL Lukert + 28-1 tenía una media de relación B/BW que era significativamente mayor que el grupo de desafío de control, indicando que se inducía algún nivel de protección con esta vacuna. El grupo ACL Lukert + 28-1 tenía una media de la relación B/BW que era significativamente mayor que el ACL Lukert + 15-4, indicando un nivel de protección aún más alto. El producto vacunal de la competencia se encontraba entre los grupos ACL Lukert + 15-4 y ACL Lukert + 28-1, y no era significativamente diferente de cualquiera de estos grupos.

50 Los datos se evaluaron también en términos de porcentaje de protección derivado de un valor de corte calculado a partir del grupo de pollos de control normal sin desafiar, que se expone en la Tabla 6. De nuevo, los datos derivados por la combinación de todos los desafíos, probablemente son más pertinentes. Esta evaluación daba esencialmente los mismos resultados que los datos de la media en grupo de B/BW (Tabla 5) en los que ACL Lukert + 28-1 y la

vacuna del producto del competidor daban lugar a niveles más altos de protección que los otros, siendo el grupo ACL Lukert + 28-1 el que daba el nivel de protección numéricamente más alto.

Discusión

5 Uno de los objetivos primarios del estudio era determinar si otros aislados de variante combinados con ACL Lukert de IBDV darían lugar a vacunas más antigénicas como se determinaba por respuestas serológicas y protectoras. Ese objetivo se conseguía esencialmente en el estudio ya que se determinó que la suplementación de la vacuna con el antígeno derivado del aislado 28-1 daba como resultado vacunas más inmunógenas. Cuando se formulaban en las vacunas prototípicas a dosis equivalentes y se administraba en volúmenes de dosis fraccionadas equivalentes por vías equivalentes, las vacunas suplementadas con 28-1 daban lugar a un ELISA y respuestas protectoras mayores que las otras vacunas.

10 El segundo objetivo del estudio era evaluar las distintas vacunas prototípicas en comparación con el producto de la competencia que actuaba bien en estudios previos. Por todos los medios de evaluación excepto el porcentaje de respuesta SN, la vacuna suplementada con el antígeno BTO 28-1 cumplía o excedía el nivel de actuación de la vacuna producida por la competencia. Por lo tanto, el antígeno 28-1 es altamente adecuado para el desarrollo adicional de vacunas.

15 El 1/50 de una dosis normal administrado en este estudio se diseñó para dar niveles de protección reducidos de manera que se pudiera distinguir las diferencias entre las vacunas.

CONCLUSIONES

20 La inclusión de los antígenos BTO del aislado 28-1 aumentaba significativamente las respuestas serológicas y protectoras desencadenadas por las vacunas prototípicas.

La inclusión del antígeno BTO aislado 28-1 daba lugar a una vacuna prototípica que actuaba al, o sobrepasaba el, nivel del producto de la competencia cuando se consideraba la respuesta serológica y la respuesta protectora contra la variante IBDV.

25 TABLA 4. RESPUESTA SEROLÓGICA INDUCIDA POR VACUNAS PROTOTÍPICAS E INACTIVADAS CON LICENCIA ACTUALMENTE CON UN COMPONENTE DE IBDV

Tratamiento	Respuesta ELISA		Respuesta SN	
	Título de la media geométrica*	% positivos	Título de la media geométrica	% positivos
Chicklet Lukert + S21	15 ^{a,b}	0 % (0/15)	1	7 % (1/15)
ACL Lukert solo	5 ^a	7 % (1/15)	1	13 % (2/15)
ACL Lukert+ S21	32 ^b	0 % (0/15)	2	13 % (2/15)
ACL Lukert+ 28-1	589 ^d	60 % (9/15)	4	33 % (5/15)
ACL Lukert+ 15-4	66 ^c	20 % (3/15)	4	33 % (5/15)
ACL Lukert+ ArkProvent	32 ^b	20 % (3/15)	1	7 % (1/15)
Producto de la competencia	491 ^d	73 % (11/15)	23	73 % (11/15)
Control de desafío	27 ^b	0 % (0/15)	1	0 % (0/15)
Control Normal	10 ^{a,b,c}	0 % (0/5)	1	0 % (0/5)

* Las medias con los mismos superíndices son estadísticamente equivalentes por ANOVA de una vía y PLSD de Fisher ($\alpha = 0,05$)

5 TABLA 5. PROTECCIÓN CONTRA EL DESAFÍO CON LA VARIANTE DE IBDV INDUCIDA POR LAS VACUNAS INACTIVADAS PROTOTÍPICA Y CON LICENCIA ACTUALMENTE CON UN COMPONENTE DE IBDV SEGÚN SE MIDE POR LA MEDIA DE GRUPO DE LAS RELACIONES DE PESO DE LA BURSA RESPECTO AL CORPORAL

Tratamiento	Media de grupo de la relación B/BW*			
	Cepa de desafío			Todos los desafíos combinados
	S-21	Variante E	AL-2	
Chicklet Lukert + S21	0,92 ^a	1,11 ^a	0,97 ^{a,b}	1,00 ^a I
ACL Lukert solo	0,96 ^a	1,16 ^{a,b,c}	0,96 ^a	1,03 ^a
ACL Lukert + S21	1,06 ^{a,b}	0,98 ^a	1,02 ^{a,b}	1,02 ^a
ACL Lukert + 28-1	1,17 ^{a,b,c}	2,24 ^d	1,77 ^c	1,73 ^c
ACL Lukert + 15-4	1,40 ^{b,c}	1,52 ^{b,c}	1,04 ^{a,b}	1,32 ^b
ACL Lukert + ArkProvent	1,01 ^{a,b}	1,03 ^a	0,88 ^a	0,97 ^a
Producto de la competencia	1,49 ^c	1,62 ^{b,c}	1,44 ^{b,c}	1,52 ^{b,c}
Control de desafío	0,90 ^a	0,99 ^a	1,01 ^{a,b}	0,97 ^a
Control normal	4,17 ^d	4,17 ^e	4,17 ^d	4,17 ^d

* Las medias con los mismos superíndices son estadísticamente equivalentes por ANOVA de una vía y PLSD de Fisher ($\alpha = 0,05$)

5 TABLA 6. PROTECCIÓN CONTRA EL DESAFÍO CON LA VARIANTE IBDV INDUCIDA POR VACUNAS INACTIVADAS PROTOTÍPICAS Y CON LICENCIA ACTUALMENTE CON UN COMPONENTE DE IBDV SEGÚN SE MIDE POR PORCENTAJE DE PROTECCIÓN EN REFERENCIA A UN VALOR DE CORTE CALCULADO

Tratamiento	Porcentaje protegido*			
	Cepa de desafío			Todos los desafíos combinados
	S-21	Variante E	AL-2	
Chicklet Lukert + S21	0	0	0	0
ACL Lukert solo	0	7	0	2
ACL Lukert+ S21	7	7	0	4
ACL Lukert+ 28-1	7	60	27	31
ACL Lukert+ 15-4	13	13	0	9
ACL Lukert+ Arkprevent	7	7	0	4
Producto de la competencia	20	13	13	16
Desafío control	0	0	0	0
Control Normal	n/a	n/a	n/a	100

* El porcentaje de protegidos se basaba en un valor de corte utilizando el grupo de control normal. La media del grupo de control normal de la relación del peso de la bursa con respecto al corporal (4.17) menos dos desviaciones estándar (2.23) = corte calculado (1,94). Se clasificó como protegida un ave cuya relación de peso de la bursa con respecto al corporal excedía 1,94, cuando se sometió a necropsia 10 días tras el desafío.

Ejemplos 2 y 3

10 En las Tablas posteriores, la composición vacunal de la invención se comparó adicionalmente en estudios de desafío de la progenie en pollos. En cada ensayo de campo, el programa convencional que consiste en dos inyecciones de vacunas comerciales se comparó con un programa en el que la composición vacunal de la invención sustituía una de las vacunas comerciales. El origen eran pollos de cría de 38-44 semanas de edad cuando se recolectaron huevos fértiles para el estudio. Los resultados se representaron en gráficos en términos de porcentaje

de protección. En cada tabla, los resultados a la derecha representan el programa de vacunación que contiene la composición de la invención:

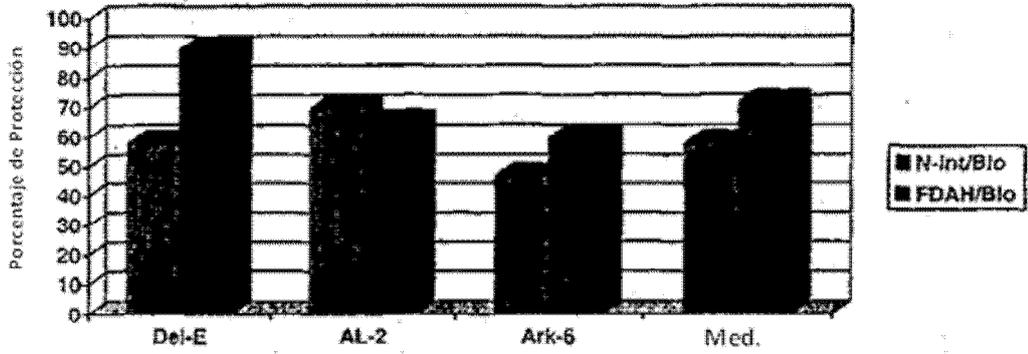
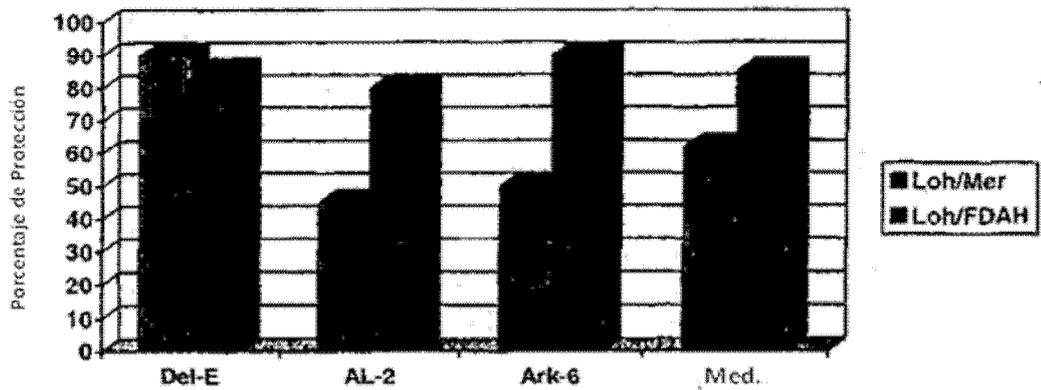


TABLA 7. NIVELES DE PROTECCIÓN EN UN ESTUDIO DE DESAFÍO DE PROGENIE, ENSAYO DE CAMPO Nº 1

TABLA 8. NIVELES DE PROTECCIÓN EN UN ESTUDIO DE DESAFÍO DE PROGENIE, ENSAYO DE CAMPO Nº 2



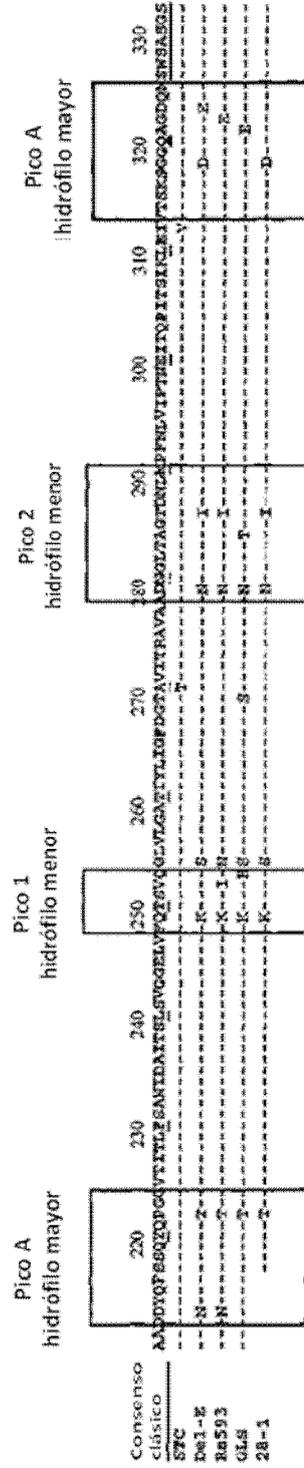
REIVINDICACIONES

1. Una composición vacunal que comprende un antígeno VP-2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) en combinación con el antígeno ACL Lukert y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho antígeno VP-2 de IBDV comprende, en comparación con la secuencia de aminoácidos de consenso clásica expuesta en la Figura 1 de la siguiente manera
- 5 SSQ YQPGGVTITL FSNIDAITS LSVGGELVFQ TSVQGLVLGA TIYLIGFDGT AVITRAVAAD
NGLTAGTDNL MP-FNLVIPTN EITQPITSIK LEIVTSKSGG QAGDQMSWSA SGS,
- solo una sustitución de G por D en la posición 318 en el pico hidrófilo mayor B de VP-2 de IBDV, y además, solo una o más sustituciones distintas que se seleccionan de entre 222-T, 249-K, 254-S, 279-N y 286-I.
- 10 2. La composición vacunal de la reivindicación 1, en la que dicho antígeno VP-2 de IBDV comprende las sustituciones de aminoácidos 222-T, 249-K, 254-S, 279-N y 286-I.
3. La composición vacunal de la reivindicación 1, en la que dicho vehículo es al menos un miembro que se selecciona de entre el grupo que consiste en vehículos acuosos y emulsiones.
4. La composición vacunal de la reivindicación 3, en la que dicho vehículo es una emulsión de agua en aceite.
- 15 5. La composición vacunal de la reivindicación 1, que comprende un antígeno adicional de aves de granja que es un reovirus.
6. La composición vacunal de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende un IBDV vivo, vivo-atenuado o muerto-inactivado que expresa dicho antígeno VP-2.
- 20 7. La composición vacunal de la reivindicación 6, en la que dicho IBDV está vivo atenuado y ha sido sometido a pasajes seriados.
8. La composición vacunal de la reivindicación 1 en el que dicha composición comprende el antígeno VP-2 depositado en la ATCC con el número de registro PTA-5848.
9. Una composición vacunal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la inducción de protección en aves de granja contra la enfermedad de bursitis infecciosa.

25

FIGURA I

Comparación de secuencias de aminoácidos de VP-2 de varias variantes de IBDV de referencia en EE.UU. respecto a virus clásicos



Notas:

Secuencias deducidas del dominio variable VP-2 con las posiciones indicadas (los números según Bayliss y col., 1990).

Los picos hidrófilos mayores (Azad y col., 1987) y menores (Van den Berg y col., 1996 se indican por cuadros).

Los picos hidrófilos A y B son determinantes antigénicos mayores — especialmente el pico B. Por ejemplo, las variantes antigénicas verdaderas tienen al menos una sustitución entre las posiciones 317-324. Delavare E es la variante prototipo de IBDV en EE. UU.

Los picos hidrófilos menores 1 y 2 también tienen influencia sobre la antigenicidad.

Se cree que las regiones hidrófilas interactúan entre ellas como epítopos dependientes de la conformación.

Las letras rojas indican sustituciones de aminoácidos en el IBDV clásico en las posiciones que se han asociado con anticuerpos monoclonales neutralizantes.