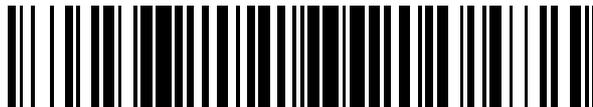


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 992**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2008 PCT/EP2008/065993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.0009 WO09065930**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2008 E 08853123 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2222335**

54 Título: **Vacuna del virus de la lengua azul y composiciones inmunógenas, procedimientos de uso y procedimientos de producción de la misma**

30 Prioridad:

**21.11.2007 EP 07380323**

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

**17.08.2017**

73 Titular/es:

**ZOETIS BELGIUM S.A. (100.0%)  
1, Rue Laid Burniat  
1348 Louvain-la-Neuve, BE**

72 Inventor/es:

**PLANA DURAN, JOAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 629 992 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Vacuna del virus de la lengua azul y composiciones inmunógenas, procedimientos de uso y procedimientos de producción de la misma

**Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere a una vacuna o composición inmunógena para inmunizar rumiantes frente a cepas patógenas o serotipos del virus de la lengua azul (BTV, acrónimo del inglés *Bluetongue Virus*) y a un procedimiento para preparar la vacuna e inmunizar rumiantes con estas composiciones.

**Antecedentes de la invención**

- 10 La lengua azul, una enfermedad vírica transmitida por artrópodos, se produce en ganado vacuno, ovejas, cabras, y rumiantes salvajes. Las lesiones de la lengua azul en animales afectados se asemejan a las de la diarrea vírica bovina infecciosa, a las del virus de la estomatitis vesicular, fiebre catarral maligna, estomatitis micótica, peste bovina, fotosensibilización y fiebre aftosa. El virus de la lengua azul (BTV) se ha considerado como causa de la hidranencefalia en ganado vacuno y de infertilidad, aborto, y nacimiento de crías defectuosas en ganado vacuno y
- 15 ovejas. En la bibliografía se han notificado veinticuatro serotipos que originan problemas que van desde una infección imperceptible hasta una infección fulminante aguda. Se ha reconocido también que el virus persistente crónico se propaga entre el ganado vacuno. Con el BTV se produce una notable pérdida del estado corporal y puede retrasarse la comercialización de los animales sacrificados. En ovejas infectadas con BTV, el crecimiento de la lana puede verse deteriorado por el desarrollo de roturas en la lana que producen un vellón defectuoso o de bajo rendimiento. La marcada debilidad que sigue a las infecciones por BTV puede dar como resultado una disminución
- 20 de la resistencia a infecciones bacterianas secundarias o infecciones por clamidia y otros factores predatorios. La eficacia reproductora de los animales infectados se ve también afectada de forma adversa.

- Se observan abortos y descendientes defectuosos en animales infectados, y algunos animales pueden ser estériles durante una o más estaciones de cría. El daño más significativo producido por las infecciones de la lengua azul es la pérdida económica resultante de los embargos y de los rigurosos requerimientos de pruebas impuestos sobre los
- 25 productores que exportan ganado, semen de ganado vacuno, y ovejas desde las áreas endémicas de la enfermedad de la lengua azul.

- En condiciones naturales, la transmisión de los virus se produce a través de las picaduras de al menos cuatro especies de *Culicoides*, por ejemplo, moscas de arena, mosquitos pequeños. Se ha demostrado experimentalmente la transmisión biológica del BTV entre ganado vacuno y ovejas por el mismo vector culicoide (Luedke y col., 28 AJVR
- 30 457 (1967)). El ganado vacuno, las ovejas, y muchas especies de rumiantes salvajes pueden actuar como reservorios de BTV lo que produce un medio para que el virus pase el invierno. Se ha identificado una viremia de BTV persistente, que puede durar hasta tres años en ganado vacuno (Hourrigan, 51 Aust Vet J 170 (1975)). Una vez que el BTV llega a establecerse en un país, es prácticamente imposible erradicar el virus (Erasmus, 51 Aust Vet J 209). El agente etiológico de la enfermedad de la lengua azul pertenece a la familia *Reoviridae*, género *Orbivirus*.

- 35 La etiología vírica de la enfermedad de la lengua azul se estableció por Theiler en 1906, (Erasmus, 51 Aust Vet J 165 (1975)). Desde entonces, han aparecido algunos informes en la bibliografía que (a) confirman el aislamiento del virus de la lengua azul a partir de ganado vacuno, ovejas, cabras, y numerosos rumiantes salvajes y (b) las características clínicas y patológicas de las enfermedades de la lengua azul, y (c) describen las infecciones resultantes de diferentes serotipos de BTV. Por ejemplo, véase Onderstepoort (J Vet Sci Anim Indus 7 (1944); Komarov y Goldsmit, Refuah Vet 96 (1951); Price y Hardy, 124 J Am Med Assn 255 (1954); Shope et al, 111 J Exp
- 40 Med 155 (1960); Livingston y Hardy, 25 AJVR 1958 (1964); Luedke y col. 30 AJVR 511 (1969); Hourrigan y col., 51 Aust Vet J 170 (1975), El control inmunológico de la enfermedad de la lengua azul en los Estados Unidos se intentó en primer lugar por McKercher y col. 118 AJVR 310 (1975) con una vacuna de serotipo 10 Internacional de BTV que crece en huevos de gallina fértiles. Este producto siguió el modelo de Alexander, (J Vet Sci Indus 231 (1947)), que
- 45 fue el primero que tuvo éxito en la propagación del virus de la lengua azul en embriones de pollo.

- Se llevaron a cabo protocolos de vacunación temprana rutinaria en Sudáfrica e Israel utilizando una vacuna de un virus vivo polivalente atenuado en huevo que contenía numerosas cepas del virus de la lengua azul. Una vacuna adaptada para huevo producida por Cutter Laboratories y utilizada en los Estados Unidos fue retirada del mercado debido a graves reacciones en las ovejas vacunadas. Posteriormente, Kemeny y Drehle, 22 AJVR 921 (1961),
- 50 adaptaron el tipo 10 Internacional de BTV procedente de huevos a cultivos de células renales de bovino. Esta vacuna del virus vivo modificado, producida por Colorado Serum Company, se usa para ovejas en los Estados Unidos. \*

- Existe necesidad de mejoras en el desarrollo de vacunas para su uso en la inmunización de rumiantes, en particular, ovejas y corderos frente al virus de la lengua azul. La presente invención resuelve esta necesidad. La cita de cualquier referencia en el presente documento no debe considerarse como una admisión de que dicha referencia
- 55 está disponible como técnica anterior de la presente invención.

**Sumario de la invención**

- De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que los virus de la lengua azul pueden inactivarse dos veces utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, y estos virus inactivados dos veces pueden utilizarse en la preparación de vacunas e inmunógenos \* Ramakrishnan y col.. (Veterinary Research Communications 30(8):873-880) se refieren a las respuestas inmunitarias y a la eficacia protectora de las vacunas del virus de la lengua azul inactivado con BEI en ovejas, composiciones para inmunizar ruminantes contra diversas cepas y serotipos patógenos de BTV. Además, se ha determinado que combinaciones concretas de adyuvantes y excipientes son eficaces para su uso en composiciones de la invención para estimular una respuesta inmunitaria eficaz en los ruminantes a los que se han administrado las composiciones.
- 5 Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona una composición para estimular una respuesta inmunitaria contra el virus de la lengua azul (BTV) en un animal, comprendiendo la composición una cantidad inmunogénicamente eficaz de al menos una cepa de un virus de la lengua azul inactivado dos veces y un adyuvante biológicamente aceptable, en la que el BTV inactivado dos veces utilizado en las composiciones se inactiva en una primera vez con un agente inactivante a una concentración de aproximadamente 10 mM durante 24 horas y se inactiva una segunda vez con un agente inactivante a una concentración de aproximadamente 5 mM, durante 48 horas, en el que el agente inactivante utilizado para tratar el BTV para su uso en las composiciones es etilenimina binaria (BEI).
- 10 En una realización, la composición comprende una cepa de BTV que es un serotipo 4.
- En una realización, la composición es una composición de vacuna o una composición inmunógena.
- 15 En una realización, el animal que se va a tratar con la composición es un rumiante seleccionado entre el grupo que consiste en ovejas, corderos, cabras, ganado vacuno y ciervos.
- En una realización, el animal que se va a tratar con la composición es una oveja o un cordero.
- En una realización, el adyuvante biológicamente aceptable que se va a usar con la composición es hidróxido de aluminio, y Quil-A.
- 20 En una realización, el adyuvante biológicamente aceptable que se va a usar con la composición comprende una mezcla de hidróxido de aluminio y Quil-A. En una realización, el hidróxido de aluminio está presente a una concentración de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10%. En una realización, el hidróxido de aluminio está presente a una concentración de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 5%. En una realización, el hidróxido de aluminio está presente a una concentración de aproximadamente 3%.
- 25 En una realización, la respuesta inmunitaria estimulada con las composiciones de la invención protege a un animal frente a la infección, o reduce la gravedad de al menos un síntoma asociado con una infección por una cepa patógena del virus de la lengua azul.
- Un segundo aspecto de la invención proporciona un procedimiento para potenciar la respuesta inmunitaria en un animal frente al virus de la lengua azul, o para evitar o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una única dosis o múltiples dosis de la composición de la invención, como se ha descrito anteriormente.
- 30 En una realización, los procedimientos para potenciar la respuesta inmunitaria en un animal frente al virus de la lengua azul, o para evitar o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad son útiles para conseguir dicho efecto en un rumiante seleccionado entre el grupo que consiste en ovejas, corderos, cabras, ganado vacuno y ciervos. En una realización, el rumiante es una oveja o un cordero.
- En una realización, los procedimientos para potenciar la respuesta inmunitaria en un animal frente al virus de la lengua azul, o para evitar o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad proporcionan la etapa de administrar las composiciones mediante administración parenteral. La etapa de administración parenteral puede conseguirse mediante inyección intramuscular.
- 35 En una realización, los procedimientos para potenciar la respuesta inmunitaria en un animal frente al virus de la lengua azul, o para evitar o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad proporcionan la etapa de administrar las composiciones mediante administración oral, que se puede conseguir mediante administración manual o aplicación en masa.
- 40 Un tercer aspecto de la invención proporciona un procedimiento de evitar o mejorar un brote del virus de la lengua azul, que comprende la etapa de administrar a un animal una composición de la invención.
- En una realización, el procedimiento para evitar o mejorar un brote del virus de la lengua azul proporciona tratar a un animal que es un rumiante seleccionado entre el grupo que consiste en ovejas, corderos, cabras, ganado vacuno y ciervos. En una realización, el rumiante es una oveja o un cordero.

En una realización, el procedimiento de evitar o mejorar un brote del virus de la lengua azul proporciona la etapa de administrar las composiciones de la invención mediante administración parenteral. La etapa de administración parenteral puede conseguirse mediante inyección intramuscular.

5 En una realización, el procedimiento de evitar o mejorar un brote del virus de la lengua azul proporciona la etapa de administrar las composiciones de la invención mediante administración oral. La etapa de administración oral puede conseguirse mediante administración manual o aplicación en masa.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un procedimiento para producir un virus de la lengua azul completo inactivado (BTV), comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 10 a) tratar el BTV con un agente inactivante utilizando una relación 1:10 de agente inactivante a BTV;  
 b) homogeneizar la mezcla de agente inactivante/BTV de la etapa a) durante al menos 15 minutos;  
 c) decantar la mezcla de la etapa b) en un recipiente estéril y agitar la mezcla durante aproximadamente 24 horas;  
 d) tratar el BTV una segunda vez con un agente inactivante utilizando una relación 1:20 de agente inactivante a BTV;  
 15 e) homogeneizar la mezcla de agente inactivante/BTV de la etapa d) durante al menos 15 minutos;  
 f) decantar la mezcla de la etapa e) en un recipiente estéril y agitar la mezcla durante aproximadamente 48 horas; y  
 g) neutralizar el agente inactivante para ajustar el pH final a aproximadamente 7,2;

20 en el que el procedimiento da como resultado la inactivación del BTV manteniendo a la vez la inmunogenicidad del BTV.

En una realización, el procedimiento de preparar el BTV inactivado dos veces, tal como se describe anteriormente, proporciona el uso de etilenimina binaria (BEI) como agente inactivante. En una realización, la concentración final de agente inactivante en la etapa a), como se ha indicado anteriormente, es aproximadamente 10 mM. En una  
 25 realización, la concentración final de agente inactivante en la etapa d), como se ha indicado anteriormente, es aproximadamente 5 mM.

En una realización, el procedimiento descrito anteriormente para preparar BTV completo inactivado dos veces utiliza un virus de la lengua azul que es un serotipo 4.

Un quinto aspecto de la invención proporciona el uso de al menos una cepa de BTV inactivada dos veces para la preparación de un medicamento para inmunizar rumiantes frente a diversas cepas y serotipos de BTV. En una  
 30 realización, la al menos una cepa de BTV inactivada dos veces para su uso en la preparación del medicamento es un serotipo 4.

### **Descripción detallada de la invención**

35 Antes de que se describan los presentes procedimientos y la metodología de tratamiento, debe entenderse que la presente invención no se limita a procedimientos concretos, y a las condiciones experimentales descritas, ya que dichos procedimientos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene como objeto describir solo realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante.

40 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, las referencias "al procedimiento" incluyen uno o más procedimientos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes a las personas expertas en la materia tras la lectura de esta divulgación y así sucesivamente.

45 Por consiguiente, en la presente solicitud, se puede emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, y de ADN recombinante comprendidas en los conocimientos de los expertos en la materia. Tales técnicas se explican totalmente en las referencias. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en el presente documento "Sambrook y col., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel y col.. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

50 Aunque se pueden usar cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, se describen ahora los procedimientos y materiales preferidos.

55

## Definiciones

Los términos utilizados en el presente documento tienen los significados reconocidos y conocidos por los expertos en la materia, sin embargo, por conveniencia e integridad, se muestran a continuación términos concretos y sus significados.

5 El término "alrededor" o "aproximadamente" significa comprendido en un intervalo de un valor estadísticamente significativo. Dicho intervalo puede estar comprendido en un orden de magnitud, normalmente comprendido en un 50%, más normalmente en un 20%, más normalmente aún en un 10% e incluso más normalmente en un 5% de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por el término "alrededor" o "aproximadamente" depende del sistema concreto bajo estudio, y puede apreciarse fácilmente por una persona normalmente experta en la materia.

10 "Adyuvante" significa una composición comprendida por una o más sustancias que potencia la inmunogenicidad de un antígeno en una composición, normalmente una composición de vacuna. Un adyuvante puede servir como un depósito tisular que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfóide que no potencia específicamente la respuesta inmunitaria (Hood, y col., Immunology, Segunda Ed., Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p. 384). A menudo, una primera vacunación con un único antígeno, en ausencia de un adyuvante, fracasará en estimular una respuesta inmunitaria humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, aunque no de forma limitativa, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas o de hidrocarburos, hemocianinas de lapa californiana, y adyuvantes potencialmente útiles para seres humanos tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina, BCG (*bacilo de Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Preferentemente, el adyuvante es biológicamente aceptable. En una realización de la invención, la composición se administra con una combinación de dos adyuvantes, hidróxido de aluminio y saponina.

25 Los adyuvantes empleados en las composiciones descritas en el presente documento son normalmente "adyuvantes biológicamente aceptables" y, por lo tanto, se pueden usar en combinación con un BTV inactivado, de tal manera que las composiciones resultantes pueden administrarse *in vivo* sin toxicidad concomitante con un animal. Se ilustran en el presente documento composiciones que incluyen BTV inactivado dos veces en combinación con uno o más adyuvantes biológicamente aceptables seleccionados entre el grupo que consiste en hidróxido de aluminio, y Quil-A. En determinadas realizaciones, se utilizan dos adyuvantes para estimular la respuesta inmunitaria preferida a BTV.

35 Una cepa de BTV inactivada o molécula derivada de la anterior es "antigénica" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmunitario, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor de antígeno de linfocitos T. Normalmente, una molécula antigénica es un polipéptido o una de sus variantes, que contiene un "epítipo" de al menos aproximadamente cinco y normalmente al menos aproximadamente 10 aminoácidos. Una porción antigénica de un polipéptido, denominada también en el presente documento el "epítipo", puede ser esa porción que es inmunodominante para el reconocimiento del anticuerpo o el receptor de linfocitos T, o puede ser una porción utilizada para generar un anticuerpo en la molécula conjugando la porción antigénica con un polipéptido transportador para la inmunización. Una molécula que es antigénica no tiene que ser inmunógena por sí misma, es decir, capaz de estimular una respuesta inmunitaria en un transportador.

45 Se señala que, en esta divulgación, términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares pueden tener el significado atribuido en la Ley de Patentes de EE.UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "incluyendo" y similares. Los términos tales como "que consiste esencialmente de" y "consiste esencialmente de" tienen el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de EE.UU., por ejemplo, permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no limitan las características novedosas o básicas de la invención, es decir, excluyen ingredientes o etapas no enumerados adicionales que limitan las características novedosas o básicas de la invención, y excluyen ingredientes o etapas de la técnica anterior, este tipo de documentos de la técnica se citan en el presente documento especialmente, ya que es un objetivo de este documento definir las realizaciones que son patentables, por ejemplo, una invención novedosa no evidente, sobre la técnica anterior, *por ejemplo*, sobre los documentos citados en el presente documento. Y, los términos "-consiste de" y "que consiste de" tienen el significado atribuido a los mismos en la ley de patentes de EE.UU.; a saber, que estos términos son de extremos cerrados.

55 Una "respuesta inmunitaria" a una vacuna o composición inmunógena es el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular en un sujeto a moléculas presentes en el antígeno o en la composición de vacuna de interés. Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" es una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos e implica la generación de anticuerpos con afinidad por el antígeno/vacuna de la invención, mientras que una "respuesta inmunitaria mediada por células" es aquella mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" se desencadena por la presentación de epítopos antigénicos en asociación con moléculas de Clase I o Clase II del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Esta activa los

linfocitos T auxiliares CD4+ específicos de antígenos o los linfocitos T citotóxicos CD8+ ("CTL"). Los CTL tienen especificidad por los antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y expresadas sobre las superficies de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios.

5 Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y se centran en la actividad de, células efectoras no específicas frente a células presentadoras de antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC en su superficie. Una "respuesta inmunitaria mediada por células" también se refiere a la producción de citoquinas, quimiocinas y otras moléculas de este tipo, producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, incluyendo aquellos derivados de linfocitos T CD4+ y CD8+. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante numerosos ensayos, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de linfocitos citotóxicos CTL, evaluando los linfocitos T específicos del antígeno en un sujeto sensibilizado, o mediante la medida de la producción de citoquinas por los linfocitos T en respuesta a una reestimulación con antígenos. Tales ensayos son muy conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Erickson y col., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe y col., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

La "cantidad inmunogénicamente eficaz" es la cantidad de BTV inactivado completo que estimulará una respuesta inmunitaria en un animal. Esta cantidad dependerá de la especie, raza, edad, tamaño, estado de salud del animal receptor y estará afectada por la exposición previa del animal a una o más cepas de BTV tanto si una o más cepas de BTV son una cepa virulenta o una cepa avirulenta. Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad inmunológicamente eficaz" de BTV inactivado completo, cuando se emplea en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, es la cantidad de BTV que es suficiente para aumentar la inmunogenicidad del BTV y de esta manera proporciona inmunidad protectora contra el estímulo con una cepa o serotipo de BTV patógeno o virulento.

25 El término "inmunógeno" se refiere a la capacidad de un antígeno o una vacuna de estimular una respuesta inmunitaria, tanto humoral como mediada por células, o ambas. Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunógeno" significa que el BTV es capaz de estimular una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Una cepa inmunógena es también antigénica. Una composición inmunógena es una composición que estimula una respuesta inmunitaria humoral y/o celular cuando se administra a un animal.

30 El término "composición inmunógena" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo, un microorganismo, cuya composición puede utilizarse para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero. La respuesta inmunitaria puede incluir una respuesta de linfocitos T, una respuesta de linfocitos B, o una respuesta de linfocitos T y linfocitos B. La composición puede servir para sensibilizar al mamífero mediante la presentación de un antígeno asociado con moléculas del MHC en la superficie celular. Además, se pueden generar linfocitos T o anticuerpos específicos de antígeno para permitir la futura protección de un hospedador inmunizado. Una "composición inmunógena" puede contener una vacuna viva, atenuada, o muerta/inactivada que comprende un microorganismo completo o una porción inmunógena derivada del anterior que induce tanto una respuesta inmunitaria mediada por células (linfocitos T) como una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos (linfocitos B), o ambas, y puede proteger al animal de uno o más síntomas asociados con la infección por el microorganismo, o puede proteger al animal de la muerte debida a la infección con el microorganismo.

45 El término "inactivado" se refiere a la naturaleza no infecciosa de los microorganismos que se van a usar en una vacuna o composición inmunógena de la invención. En particular, los expertos en la materia son conscientes de dichos materiales que se pueden usar para volver a un microorganismo no infeccioso para fines de vacuna, por ejemplo, BEI. En la presente invención, se han desarrollado procedimientos concretos para convertir el virus de la lengua azul en no infeccioso, pero estos procedimientos se han desarrollado con énfasis concreto para retener la inmunogenicidad de la preparación de vacuna, aunque dando como resultado al mismo tiempo una completa inactivación de la preparación del virus.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" significa que el material al que se hace referencia se retira de su entorno natural. De este modo, un material biológico aislado puede estar exento de alguno o todos los componentes celulares, es decir, los componentes de las células en los que el material natural se produce naturalmente (por ejemplo, componente citoplásmico o de membrana). Un material está aislado si está presente en un extracto o sobrenadante celular. Una proteína aislada puede asociarse con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los que está asociada en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a membrana. Un orgánulo, célula, o tejido aislado se extrae del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede estar, pero no es necesario que esté, purificado.

El término "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa la administración por algún otro medio que a través del tracto gastrointestinal, particularmente a la introducción de sustancias en un organismo mediante inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, o intramedular, pero también a otras rutas de administración no orales y no nasales tales como inyección intraperitoneal o aplicación tópica.

60 El término "patógeno" se refiere a la capacidad de cualquier agente de infección, tal como una bacteria o un virus, de

producir una enfermedad. En la manera de la presente invención, el término "patógeno" se refiere a la capacidad de un virus de la lengua azul (BTV), para producir una enfermedad en rumiantes, particularmente ovejas o corderos. Un microorganismo no patógeno se refiere a un microorganismo que carece de las características señaladas anteriormente para las cepas "patógenas" de BTV. La enfermedad producida por el BTV se caracteriza a menudo por lesiones en los animales infectados, que se asemejan a la diarrea infecciosa por virus bovino, virus de la estomatitis vesicular, fiebre catarral maligna, estomatitis micótica, peste bovina, fotosensibilización y fiebre aftosa. El virus de la lengua azul (BTV) se ha considerado como causa de la hidranencefalia en ganado vacuno y de infertilidad, aborto, y nacimiento de crías defectuosas en ganado vacuno y ovejas.

El término "transportador farmacéuticamente aceptable" significa un transportador homologado por un organismo regulador de un gobierno federal, un gobierno estatal, u otro organismo regulador, o relacionado en la U.S. Pharmacopeia u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, incluyendo tanto seres humanos como mamíferos no humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos cuyo origen es petróleo, animal, vegetal o de origen sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un transportador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticamente adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoesterato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y transportadores convencionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir transportadores normalizados tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. La formulación debe continuar el modo de administración.

El término "proteger" se refiere a apantallar, por ejemplo, un mamífero, en particular, un rumiante, por ejemplo, una oveja, un cordero, una cabra o una vaca, de una infección o una enfermedad, induciendo una respuesta inmunitaria a un patógeno concreto, por ejemplo, el virus de la lengua azul. Dicha protección se consigue generalmente tras el tratamiento de un mamífero con las composiciones de vacuna descritas en el presente documento.

El término "purificado" como se usa en el presente documento se refiere a un material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, **es decir**, contaminantes, incluyendo materiales naturales a partir de los cuales se obtiene el material. Por ejemplo, una bacteria o proteína purificada está sustancialmente exenta de células hospedadoras o componentes de cultivo, incluyendo cultivo de tejido o proteínas de huevo, patógenos no específicos, y similares. Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente exento" se usa operativamente, en el contexto del ensayo analítico del material. Normalmente, el material purificado sustancialmente exento de contaminantes es al menos un 50% puro; más normalmente al menos un 90% puro, y más normalmente deberá ser al menos un 99% puro. La pureza puede evaluarse mediante cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico, y otros procedimientos conocidos en la materia. Los procedimientos de purificación son bien conocidos en la materia. El término "prácticamente puro" indica el mayor grado de pureza que se puede conseguir utilizando las técnicas de purificación convencionales conocidas en la materia.

Las "saponinas" se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386). Las saponinas son esteroides de glucósidos de triterpeno ampliamente distribuidos en las plantas y en los reinos de los animales marinos. Las saponinas se señalan por formar soluciones coloidales en agua con espuma en agitación, y por precipitar el colesterol. Cuando las saponinas están próximas a membranas celulares crean estructuras similares a poros en la membrana que hacen que la membrana estalle. La hemólisis de los eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de determinadas, pero no todas, las saponinas. Las saponinas son conocidas como adyuvantes en vacunas para la administración sistémica. El adyuvante y la actividad hemolítica de las saponinas individuales se han estudiado extensamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, más arriba). Por ejemplo, "Quil A" (derivada de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina de América del sur), y sus fracciones, se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.057.540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55, y documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras particuladas, denominadas complejos estimulantes inmunitarios (ISCOM), que comprenden fracciones de Quil A son hemolíticas y se han utilizado en la fabricación de vacunas (Morein, B., documento EP 0 109 942 B1). Se ha notificado que estas estructuras tienen actividad adyuvante (documento EP 0 109 942 B1; documento WO 96/11711). Se han descrito las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas mediante HPLC de Quil A) como potentes adyuvantes sistémicos, y el procedimiento de su producción se divulga en la patente de EE.UU. n.º 5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1. Se describen también en estas referencias el uso de QS7 ( una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como un potente adyuvante para vacunas sistémicas. Se describe además el uso de QS21 en Kensil y col.. (1991, J.

5 Immunology vol 146, 431-437). Se conocen también combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Se describen sistemas adyuvantes particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 en el documento WO 96/33739 y WO 96/11711. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen aquellas derivadas de otras especies de plantas tales Gypsophila y Saponaria (Bomford y col., Vaccine, 10(9):572-577, 1992). Se conocer también saponinas que se han usado en estudios de vacunas aplicadas mucosalmente, que han tenido éxito variable en la inducción de respuestas inmunitarias. Se había mostrado anteriormente que la saponina Quil-A no tiene efecto sobre la inducción de una respuesta inmunitaria cuando el antígeno se administra por vía intranasal (Gizurarson y col., 1994 Vaccine Research 3, 23-29), aunque otros autores han utilizado este adyuvante con éxito (Maharaj y col., Can. J. Microbiol, 1986, 32(5):414-20. Chavali and Campbell, Immunobiology, 174(3):347-59). Los ISCOM que comprenden la saponina Quil A se han utilizado en formulaciones de vacunas intragástricas e intranasales y presentaron actividad adyuvante (Mcl Mowat y col., 1991, Immunology, 72, 317-322; Mcl Mowat y Donachie, Immunology Today, 12, 383-385). QS21, la fracción no tóxica de Quil A, se ha descrito también como un adyuvante oral o intranasal (Sumino y col., J. Virol., 1998, 72(6):4931-9, documento WO 98/56415). Se ha descrito el uso de otras saponinas en estudios de vacunación intranasal. Por ejemplo, se han utilizado las saponinas de Chenopodium quinoa en vacunas intranasales e intragástricas (Estrada y col., Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1998, 21(3):225-36).

20 El término "SL-CD" se refiere a una sulfolipo-ciclodextrina que se encuentra comprendida en la familia de adyuvantes de la ciclodextrina descritos en las patentes de EE.UU. números 6.610.310 y 6.165.995. Normalmente, la SL-CD se formula en una mezcla con un aceite metabolizable tal como uno o más hidrocarburos de terpeno insaturados, por ejemplo, escualeno y preferentemente con un tensioactivo no iónico, tal como monooleato de sorbitán polioxietileno.

El término "SP-Oil" se refiere a un adyuvante que es una emulsión oleosa que comprende: de 1% al 3% vol/vol de copolímero en bloques de polioxietileno-polioxipropileno; de 2% al 6% vol/vol de escualeno; de 0,1% al 0,5% vol/vol de monooleato de sorbitán polioxietileno; y una solución salina tamponada.

25 El término "rumiante" se refiere a cualquier variedad de ungulado, con un número par de patas, y normalmente mamíferos con cuernos que tienen característicamente sus estómagos divididos en cuatro secciones, incluyendo vacas, ovejas, jirafas, cabras y ciervos.

30 Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (incluyendo sus variaciones, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a uno cualquiera o más de lo siguiente: (i) la prevención de la infección o la reinfección, como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción en la gravedad, o, en la eliminación de los síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o el trastorno en cuestión. De este modo, el tratamiento puede efectuarse de forma profiláctica (antes de la infección) o terapéutica (tras la infección). En la presente invención, el tratamiento profiláctico es el modo preferido. De acuerdo con una realización concreta de la presente invención, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo inmunizar profiláctica y/o terapéuticamente, un animal hospedador contra una infección vírica. Los procedimientos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un mamífero, preferentemente un rumiante, tal como una oveja, cordero, vaca o cabra. Los procedimientos de la presente invención pueden llevarse a la práctica también en mamíferos para aplicaciones de investigación biomédica.

40 El término "inactivado dos veces" se refiere al uso de procedimientos concretos como se describe en la presente invención, para convertir el BTV en no infeccioso, aunque reteniendo la inmunogenicidad de la preparación del virus. Más en particular, el BTV de la presente invención se inactiva dos veces utilizando dos ciclos de incubación del BTV con BEI, en el que la primera etapa de inactivación se lleva a cabo incubando el BTV con BEI a una concentración de 10 mM durante 24 horas, y por que el segundo ciclo de inactivación se lleva a cabo incubando el BTVG con BEI a una concentración de 5 mM durante 48 horas.

45 Los términos "vacuna" o "composición de vacuna", que se usan de manera indistinta, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunógena que induce una respuesta inmunitaria en un animal. Una vacuna o composición de vacuna puede proteger al animal de la enfermedad o posible muerte debida a la infección, y puede incluir uno o más componentes adicionales que potencian la actividad inmunológica del principio activo. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender adicionalmente componentes típicos en composiciones farmacéuticas. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender adicionalmente componentes típicos en vacunas o composiciones de vacunas, que incluyen, por ejemplo, un adyuvante o un inmunomodulador. El componente inmunogénicamente activo de una vacuna puede comprender organismos vivos completos, bien en su forma original, o como organismos atenuados en una vacuna viva modificada, u organismos inactivados mediante procedimientos adecuados en una vacuna muerta o inactivada, o vacunas subunitarias, que comprenden uno o más componentes inmunógenos del virus, o diseñados mediante ingeniería genética, vacunas mutadas o clonadas preparadas mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender uno o simultáneamente más de uno de los elementos descritos anteriormente.

**Descripción general**

Debido a su potencial impacto sobre la industria de animales grandes, el desarrollo de una vacuna contra el virus de la lengua azul es de mayor importancia, particularmente en la industria del ganado vacuno y ovino. Las cepas patógenas, incluso si están atenuadas, pueden ser de valor limitado debido a la tendencia usual de un virus vivo a revertir a su estado virulento. Además, es imperativo que, si una vacuna inactivada va a tener uso comercial, el virus debe inactivarse completamente para asegurar un perfil de seguridad adecuado para el animal. Además, es también importante que la inactivación no tenga un efecto perjudicial sobre la inmunogenicidad del virus o los componentes del virus responsables de inducir una respuesta inmunitaria.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para inmunizar un animal, en particular un rumiante, tal como una oveja, o un cordero, o una vaca frente a la infección del virus de la lengua azul (BTV), o para reducir la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad. La composición comprende al menos una cepa de BTV inactivada dos veces y un adyuvante biológicamente aceptable. En determinadas realizaciones, se utiliza una combinación de al menos dos adyuvantes biológicamente aceptables.

En una realización de la presente invención, los procedimientos proporcionan inmunizar un rumiante frente a un BTV patógeno y para proteger al animal frente a dicha infección.

En particular, los procedimientos de la presente invención proporcionan el uso de una vacuna de una composición inmunógena que comprende al menos una cepa de BTV completa y una cepa de BTV inactivada dos veces para inmunizar a un rumiante frente a la infección con BTV. En una realización, los procedimientos de la presente invención proporcionan el uso de una vacuna o composición inmunógena que comprende el serotipo 4 de BTV para inmunizar un rumiante frente a la infección con BTV.

El virus de la lengua azul que se va a usar en las composiciones y procedimientos de la invención puede obtenerse de cualquier depósito conocido, que retenga reservas de los diversos serotipos de BTV, tales como la American Type Culture Collection (ATCC). Por ejemplo, la ATCC mantiene diversas cepas diferentes de BTV, que se relacionan en su catálogo con los siguientes números de acceso designados: VR-187 (serotipo 10), VR-872 (serotipo 11), VR-873 (serotipo 13), VR-875 (serotipo 17), VR-983 (serotipo 2), VR-1231 (serotipo 10), VR-1231AF (serotipo 10) y VR-1231CAF (serotipo 10 de murino). Además, se ha descrito el serotipo 4 por Mertens *y col.* (Mertens, PP, y col. (Virology, 161(2): 438-447, (1987)) y Breard *y col.* (Breard, E. y col. Virus Res., 125(2): 191-197, (2007)).

**Procedimientos de inactivación**

Las vacunas de virus o composiciones inmunógenas inactivados pueden prepararse tratando el BTV con agentes inactivantes tales como formalina o disolventes hidrófobos, ácidos, etc., mediante irradiación con luz ultravioleta o rayos X, mediante calentamiento, etc. La inactivación se lleva a cabo de una manera como se conoce en la técnica. Por ejemplo, en una inactivación química, una muestra de virus adecuada o muestra de suero que contiene el virus se trata durante un plazo de tiempo suficiente con una cantidad o concentración suficiente de agente inactivante a una temperatura o pH suficientemente alto (o bajo, dependiendo del agente inactivante) para inactivar el virus. La inactivación mediante calentamiento se lleva a cabo a una temperatura y durante un plazo de tiempo suficiente para inactivar el virus. La inactivación mediante irradiación se lleva a cabo usando una longitud de onda de luz u otra fuente de energía durante un lapso de tiempo suficiente para inactivar el virus. Se considera al virus inactivado si es incapaz de infectar una célula susceptible a la infección. En una realización particular, la etilenimina binaria (BEI) es el medio utilizado para la inactivación.

En determinados aspectos de la invención, se proporcionan procedimientos para producir la forma inactivada dos veces de al menos un BTV completo. El procedimiento comprende las etapas de:

- a) tratar el BTV con un agente inactivante utilizando una relación 1:10 de agente inactivante a BTV;
- b) homogeneizar la mezcla de agente inactivante/BTV de la etapa a) durante al menos 15 minutos;
- c) decantar la mezcla de la etapa b) en un recipiente estéril y agitar la mezcla durante aproximadamente 24 horas;
- d) tratar el BTV una segunda vez con un agente inactivante utilizando una relación 1:20 de agente inactivante a BTV;
- e) homogeneizar la mezcla de agente inactivante/BTV de la etapa d) durante al menos 15 minutos;
- f) decantar la mezcla de la etapa e) en un recipiente estéril y agitar la mezcla durante aproximadamente 48 horas; y
- g) neutralizar el agente inactivante para ajustar el pH final a aproximadamente 7,2;

en el que el procedimiento da como resultado la inactivación del BTV manteniendo a la vez la inmunogenicidad del BTV.

En una realización, el procedimiento de preparar el BTV inactivado dos veces, tal como se describe anteriormente, proporciona el uso de etilenimina binaria (BEI) como agente inactivante. En una realización, la concentración final de agente inactivante en la etapa a), como se ha indicado anteriormente, es aproximadamente 10 mM. En una realización, la concentración final de agente inactivante en la etapa d), como se ha indicado anteriormente, es

aproximadamente 5 mM.

En una realización, el procedimiento descrito anteriormente para preparar BTV completo inactivado dos veces utiliza un virus de la lengua azul que es un serotipo 4.

Vacunas o composiciones inmunógenas y procedimientos de uso

- 5 Una cantidad inmunogénicamente eficaz de las vacunas de la presente invención se administra a un rumiante que necesita protección frente a la infección con el virus de la lengua azul (BTV). La cantidad inmunogénicamente eficaz o la cantidad inmunógena que se inocula al rumiante puede determinarse fácilmente o titularse fácilmente mediante una prueba rutinaria. Una cantidad eficaz es aquella en la que se alcanza una respuesta inmunológica suficiente a la vacuna para proteger al animal expuesto al virus. Preferentemente, el animal está protegido en una amplitud en la que uno a todos los síntomas o efectos fisiológicos adversos de la enfermedad vírica se reducen significativamente, se mejoran o se evitan totalmente.

La vacuna o composición inmunógena se puede administrar en una única dosis o en dosis repetidas. Se conocen en la técnica procedimientos para determinar o titular las dosificaciones adecuadas de agente antigénico activo basándose en el peso del animal, la concentración del antígeno y otros factores típicos.

- 15 De forma deseable, la vacuna o composición inmunógena se administra a un rumiante no expuesto aún al virus. La vacuna que contiene el virus completo y el virus inactivado u otras de sus formas antigénicas puede administrarse convenientemente de forma intranasal, transdérmica (es decir, aplicada sobre o en la superficie de la piel para la absorción sistémica), parenteralmente, etc. La ruta de administración parenteral incluye, aunque no de forma limitativa, las rutas intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica (es decir, inyectada o colocada de otra forma bajo la piel) y similares. Como las rutas de inoculación intramuscular e intradérmica han sido satisfactorias en otros estudios utilizando clones de ADN infecciosos víricos (E. E. Sparger y col., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," *Virology* 238:157-160 (1997); L. Willems y col., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep", *Virology* 189:775-777 (1992)), estas rutas son las más preferidas, además de la ruta de administración intranasal práctica.

- 25 Cuando se administra como líquido, la presente vacuna puede prepararse en forma de una solución acuosa, jarabe, un elixir, una tintura y similares. Se conocen dichas formulaciones en la técnica y se preparan normalmente mediante disolución del antígeno y otros aditivos típicos en el transportador o los sistemas disolventes adecuados. Los transportadores o disolventes "fisiológicamente aceptables" adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, agua, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, etc. Los aditivos típicos son, por ejemplo, colorantes certificados, aromas, edulcorantes y conservantes antimicrobianos tales como timerosal (etilmercuriotiosalicilato de sodio). Se pueden estabilizar dichas soluciones, por ejemplo, mediante la adición de gelatina parcialmente hidrolizada, sorbitol o un medio de cultivo celular, y puede tamponarse mediante procedimientos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato potásico, dihidrogenofosfato potásico, una de sus mezclas y similares.

- 35 Las formulaciones líquidas pueden incluir también suspensiones y emulsiones que contienen agentes suspensores o emulsionantes en combinación con otras coformulaciones normalizadas. Estos tipos de formulaciones líquidas pueden prepararse mediante procedimientos convencionales. Las suspensiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un molino de coloides. Las emulsiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un homogeneizador.

- 40 Las formulaciones parenterales, diseñadas para su inyección en los sistemas de fluidos corporales, requieren una isotonicidad adecuada y una amortiguación del pH a los niveles correspondientes de los fluidos corporales de porcino. La isotonicidad puede ajustarse adecuadamente con cloruro de sodio y otras sales según sea necesario. Los disolventes adecuados, tales como etanol o propilenglicol, pueden utilizarse para aumentar la solubilidad de los ingredientes en la formulación y la estabilidad de la preparación líquida. Los aditivos adicionales que se pueden emplear en la presente vacuna incluyen, aunque no de forma limitativa, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales tales como ácido etilendiamina tetraacético (EDTA). Las formas farmacéuticas parenterales deben también esterilizarse antes del uso.

Adyuvantes

- 50 El virus de la lengua azul inactivado dos veces puede administrarse con un adyuvante. En una realización, la vacuna es un BTV completo y un BTV muerto/inactivado dos veces, que se administra con un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmunológica del animal a la vacuna. El adyuvante puede administrarse al mismo tiempo y en el mismo sitio que la vacuna, o en un momento diferente, por ejemplo, como un refuerzo. Los adyuvantes también pueden administrarse ventajosamente al rumiante de una manera o en un sitio diferente de la manera o sitio en el que se administra la vacuna. Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, hidróxido de aluminio (alum), Alhydrogel® (Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca), o Quil A ((Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca). En una realización, la composición de vacuna se administra con una combinación de al menos dos adyuvantes. En una realización, la composición de vacuna se administra con una combinación de hidróxido de aluminio (Alhydrogel®) y saponina Quil-A.

## Ensayos para medir respuestas inmunes

El resultado funcional de la vacunación de un rumiante contra el BTV se puede evaluar mediante ensayos adecuados que controlan la inducción de la inmunidad celular o humoral o la actividad de los linfocitos T. Los expertos en la materia conocen estos ensayos, pero pueden incluir la medición de la actividad de los linfocitos T citotóxicos utilizando por ejemplo, un ensayo de liberación de cromo. Como alternativa, se pueden utilizar ensayos proliferativos de linfocitos T como indicación de reactividad inmunitaria o de su carencia. Además, se puede llevar a cabo estudios *in vivo* para evaluar el nivel de protección en un mamífero vacunado frente a un patógeno utilizando los procedimientos de la presente invención. Los ensayos típicos *in vivo* pueden implicar la vacunación de un animal con un antígeno, tal como el virus descrito en el presente documento. Tras esperar durante un tiempo suficiente para que se produzca la inducción de un anticuerpo o una respuesta de linfocitos T, generalmente, entre aproximadamente una a dos semanas después de la inyección, los animales se estimularán con el antígeno, tal como un virus, y se vigilará la mejora de uno o más síntomas asociados con la infección vírica, o la supervivencia de los animales. Un régimen de vacunación satisfactorio contra el BTV dará como resultado una significativa disminución en uno o más síntomas asociados con la infección vírica, o una disminución en la viremia, o una disminución en el número o la gravedad de las lesiones asociadas con una infección vírica, o la supervivencia cuando se compara con los controles no vacunados. Se puede recoger también el suero para vigilar los niveles de anticuerpos generados en respuesta a las inyecciones de vacuna, como se mide mediante los procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran determinados aspectos de la presente invención. Debería apreciarse que cuando se han proporcionado las condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.), se pueden usar también las condiciones anteriores y siguientes de los intervalos especificados, aunque es generalmente menos conveniente. Todas las partes y porcentajes referidos en el presente documento son en una base de peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a no ser que se especifique lo contrario.

### 25 **Ejemplo 1: el proceso de fabricación**

#### DESCRIPCIÓN GENERAL

El proceso de fabricación se lleva a cabo en condiciones de esterilidad, siguiendo las instrucciones del Procedimiento de fabricación normalizado descrito a continuación. Antes de iniciar las operaciones definidas como asépticas en el Procedimiento de fabricación normalizado, se verifica el estado operativo correcto de las instalaciones de filtración de aire y de las cabinas de flujo laminar, y se confirma que los materiales utilizados en el proceso se han esterilizado debidamente en un autoclave o mediante filtración, o se desinfecta de acuerdo con los procedimientos establecidos. Las operaciones asépticas se llevan a cabo siguiendo las técnicas de manipulación estéril normalizadas.

#### 35 DESCRIPCIÓN DE CADA ETAPA DEL PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DEL ANTÍGENO FINAL (PASO 3)

##### Obtención de cultivos de células BHK-21

Las células BHK-21 (reserva de células de trabajo o WSC) se almacenan congeladas en nitrógeno líquido. Los criotubos de WSC se descongelan por medio de una rápida descongelación a +37°C y a continuación se inoculan en un matraz de cultivo que contiene medio de cultivo (MEM-Glasgow irradiado con suero de bovino joven).

40 El matraz de cultivo se incubó a +37±1°C. Después de al menos 5 horas desde el momento de la inoculación, el medio se retiró del matraz y se añadió un nuevo medio de cultivo de la misma composición, llevado previamente a una temperatura de +37±1°C.

El cultivo se observó periódicamente, y se registró su evolución (confluencia) y morfología celular.

45 A partir de este matraz de cultivo, a fin de obtener los matraces necesarios para la producción, los subcultivos requeridos se llevaron a cabo en intervalos de 3-5 días.

Los subcultivos se llevaron a cabo por medio de la tripsinización del cultivo con una solución de tripsina preparada recientemente; se realizó un recuento de la suspensión celular mediante tinción vital (Azul Tripán) en una cámara de Neubauer. A continuación se diluyó la suspensión celular en un medio de cultivo estéril contenido en depósitos o matraces, por medio de agitación magnética, y se distribuyó en matraces de cultivo.

50 El medio de cultivo se ajustó a pH 7,2 ± 0,2 al inicio de la operación de cultivo en matraces giratorios.

Una vez que el último cultivo se ha tripsinizado y centrifugado, se administra la suspensión celular a la sección donde se fabricaron los antígenos.

#### FABRICACIÓN DEL ANTÍGENO FINAL (PASO 3)

Producción del antígeno del paso 2 (inóculo)

Para la producción de un lote de antígeno final (paso 3), se preparó el inóculo (antígeno del paso 2) de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 5 La semilla del virus de trabajo (WSV) se almacenó congelada a  $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ . A partir del WSV, se realizaron 2 pasos a fin de obtener el inóculo. En el primer paso se realizó un control de potencia, y en el segundo se realizaron controles de la esterilidad y la potencia después de la operación de congelación.

Paso 1, antígeno (Previo al inóculo)

En un matraz con células BHK-21 a los 2-3 días de cultivo, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó con medio de infección (suspensión de WSV en MEM-Glasgow).

- 10 El cultivo se incubó a  $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Cuando el efecto citopático (CPE) está sobre el 60%, el matraz se colocó en agitación a fin de facilitar el desprendimiento de la monocapa de células, y se congeló a continuación a  $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ .

Antígeno del paso 2 (inóculo)

- 15 El antígeno del paso 1 se diluyó en MEM-Glasgow. El medio de cultivo de los matraces de crecimiento necesario con células BHK-21 a los 2-3 días de cultivo se retiró y se sustituyó con la suspensión del virus preparada y se colocó a continuación en una incubadora a  $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Cuando el CPE está sobre el 60%, los matraces se colocaron en agitación a fin de facilitar el desprendimiento de la monocapa de células y a continuación se congeló a  $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ .

Inoculación del cultivo, infección y recogida del antígeno final (paso 3)

- 20 MEM-Glasgow, la suspensión de células BHK-21 procedente de matraces de cultivo irradiados con suero de bovino joven, se mezclaron y homogeneizaron en un recipiente estéril, con agitación.

Una vez que la suspensión se homogeneizó, se realizó un recuento celular en una cámara de Neubaer.

Con esta suspensión, los matraces necesarios se inocularon e incubaron a  $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

- 25 A los 2-3 días de cultivo, se retiró el medio de cultivo de cada matraz y se sustituyó con el medio de infección: MEM-Glasgow + antígeno del paso 2 (inóculo). Los matraces infectados se incubaron a continuación bajo movimiento rotatorio a  $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

- 30 Cuando el CPE es superior al 60%, los matraces se colocaron en agitación a fin de facilitar el desprendimiento de la monocapa de células, los cultivos se recogieron y homogeneizaron y se verificó el pH. Si fuese necesario, se llevó a cabo el ajuste con ácido clorhídrico para obtener un pH de  $7,2\pm 0,2$  y el antígeno final recogido (paso 3) se inactivó a continuación.

Características del proceso de cultivo

- El cultivo se llevó a cabo en matraces giratorios.
- Se realizaron los recuentos celulares en una cámara de Neubauer, una vez que la muestra se ha diluido 1/2 con Azul Tripán.
- 35 - Se incubaron los cultivos a  $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , volteándolos 12-14 veces por hora.
- Se observó periódicamente el estado y la evolución del cultivo, y se observó la morfología celular con un microscopio de inversión.
- A lo largo del proceso de fabricación del antígeno final (paso 3), se llevaron a cabo controles ambientales en las salas de trabajo tomando muestras de aire durante los periodos restantes y los periodos de fabricación, y se analizaron las placas de exposición y contacto a fin de controlar el equipo de trabajo.
- 40

MUESTREO

Antígeno del paso 1: El Departamento de Control de Calidad tomó muestras del antígeno del paso 1 para un control de la potencia.

- 45 Antígeno del paso 2: El Departamento de Control de Calidad tomó muestras del antígeno del paso 2 para un control de potencia y esterilidad.

Antígeno del paso 3: El Departamento de Control de Calidad tomó muestras del antígeno del paso 3 para los controles de potencia, esterilidad e identidad.

FABRICACIÓN DEL ANTÍGENO INACTIVADO

El proceso de inactivación del antígeno final tarda un total de 72 horas, y la concentración BEI utilizada es de 15 mM.

El antígeno final se inactivó añadiendo BEI 0,1 M en una proporción de 100 ml por litro de antígeno que se inactiva (concentración final 10 mM).

5 Tras la adición de la BEI, la mezcla se homogeneizó durante al menos 15 minutos y se verificó el pH. Tras el proceso de homogeneización, la mezcla se decantó en un recipiente estéril donde se mantuvo en agitación, a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 24 horas.

10 Después de 24 horas, se llevó a cabo una segunda inactivación del antígeno final por medio de la adición de BEI 0,1 M en una proporción de 50 ml por litro de antígeno que se inactiva (concentración final 5 mM). Tras la segunda adición de BEI, se repitió el proceso bajo las mismas condiciones que se han descrito anteriormente para la primera adición, pero manteniendo la mezcla en agitación durante 48 horas.

#### NEUTRALIZACIÓN DE BEI RESIDUAL

##### NEUTRALIZACIÓN

Una vez que se ha completado el proceso de inactivación, se añadió una solución de tiosulfato de sodio 1 M en la proporción de 5 ml por litro de antígeno inactivado (concentración final 5 mM), a fin de neutralizar la BEI.

15 Después que la mezcla se ha homogeneizado, se verificó el pH. Si fuese necesario, se realizó un ajuste con ácido clorhídrico, para obtener un pH de  $7,2 \pm 0,2$ .

#### CÁLCULO DEL TÍTULO TEÓRICO DEL ANTÍGENO INACTIVADO Y NEUTRALIZADO

20 Para calcular el título teórico del antígeno inactivado y neutralizado, se tuvieron en cuenta el título del antígeno previo a la inactivación y el factor de dilución que representan las adiciones de BEI en el proceso de inactivación y del tiosulfato sódico en el proceso de neutralización.

25 Por cada litro de antígeno, se añadieron 100 ml de una solución de BEI 0,1 M a la primera inactivación, y 55 ml más a la segunda inactivación. De este modo, 1000 ml del antígeno final se convirtieron en 1155 ml del antígeno inactivado. Inmediatamente, en el proceso de neutralización, se añadieron 5 ml de una solución de tiosulfato sódico 1 M por litro de antígeno inactivado. De este modo, los 1155 ml de antígeno inactivado se convirtieron en 1161 ml de antígeno inactivado y neutralizado.

Los procesos de inactivación y neutralización representan una dilución total de antígeno final de 1/1,16 (1000 ml de antígeno final que se convirtieron en 1161 ml de antígeno inactivado y neutralizado). Por este motivo, se considera que dicho antígeno con un título normalizado previo a la inactivación de  $10^{7,2}$  CTDI<sub>50</sub>/ml, tiene un título teórico tras la inactivación y neutralización de  $10^{7,2}/1,16$ .

#### 30 MUESTREO

El Departamento de Control de Calidad tomó muestras del antígeno inactivado y neutralizado, para los controles de esterilidad e inactivación.

#### Ejemplo 2: selección del adyuvante de acuerdo con el efecto sobre la viremia

##### REDUCCIÓN TRAS EL ESTÍMULO

#### 35 EXPERIMENTOS DE INMUNOGENICIDAD PREVIA EN CORDEROS DE 2 MESES DE EDAD

Se vacunaron los animales mediante la ruta subcutánea (2 ml) y se volvieron a vacunar 3 semanas después.

40 Se vacunaron los animales con vacunas A-3, B-3 y C-3 y se estimularon 7-8 semanas después de la revacunación (dosis de estímulo =  $10^7$  CTDI<sub>50</sub> de virus / animal vivo). No se protegieron ninguno de los animales estimulados. Sin embargo, se observó una reducción de la viremia solo en animales vacunados con Alhydrogel (hidróxido de aluminio) y Quil-A (saponina) como adyuvante.

**TABLA 1. COMPOSICIÓN PREVIA DE INMUNOVACUNAS DE BTV**

'BTV inactivado (CTDI <sub>50</sub> /ml)	Adyuvante	Lote
$10^6$		A-1
$10^{6,7}$ ( $5 \times 10^6$ )	Alhydrogel/Quil-A (2 mg Al <sup>2+</sup> /dosis)	A-2
$10^7$		A-3

(continuación)

'BTV inactivado (CTDI50/ml)	Adyuvante	Lote
10 <sup>6</sup>		B-1
10 <sup>6,7</sup> (5x10 <sup>6</sup> )	adyuvante SL-CD al 20%	B-2
10 <sup>7</sup>		B-3
10 <sup>6</sup>		C-1
10 <sup>6,7</sup> (5x10 <sup>6</sup> )	aceite SP al 5%	C-2
10 <sup>7</sup>		C-3
'Sobrenadante del cultivo celular. Proceso de inactivación total 144h [( BEI 10 mM x 72h) x 2]		

**RESPUESTA DE ANTICUERPOS TRAS LA VACUNACIÓN**

**TABLA 2. PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS (ENSAYO ELISA)**

GRUPO	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	Control
N.º ANIMALES DE	11	11	11	10	11	11	11	9	11	11
D + 3 WPV	0%	27%	0%	10%	9%	0%	0%	0%	0%	0%
D + 1 WPRV	82%	73%	100%	40%	64%	82%	9%	44%	64%	0%
D + 2 WPRV	55%	64%	82%	30%	36%	27%	9%	22%	55%	0%
D + 3 WPRV	64%	82%	100%	10%	45%	36%	9%	33%	64%	0%
D + 4 WPRV	27%	45%	73%	40%	27%	27%	9%	13%	30%	0%
'ELISA de bloqueo utilizando un Mab específico de VP7 WPV = Semanas después de la vacunación WPRV = Semanas después de la revacunación										

5

**RESULTADOS DEL ESTÍMULO**

Se estimularon los animales vacunados con los lotes A-3, B-3 y C-3 (5 animales de cada grupo) a las 7-8 semanas después de la revacunación. Se estimularon también dos controles no vacunados.

10 Se detectó el virus de la lengua azul (BTV) en muestras de sangre mediante un ensayo de una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real en el Laboratorio Central de Veterinaria (Algete, España). (Miguel Angel Jiménez-Clavero y col.. (2006). J Vet Diagn Invest 18:7-17). Se tomaron muestras de sangre a los 4 y 7 días después de la infección (D+4 p.i. y D+7 p.i.). El tratamiento de las muestras de sangre, la extracción del ácido nucleico total según un procedimiento de extracción del ácido nucleico en 96 pocillos y la RT-PCR en tiempo real, se realizaron como se describe en Miguel Angel Jiménez-Clavero y col., 2006 (J. Vet. Diagn. Invest. 18:7-17). Para el análisis de la PCR se proporcionó el ciclo umbral (Ct). Las muestras se consideraron positivas para BTV si dieron como resultado valores de Ct menores de 36. Las muestras que dieron como resultado valores de Ct entre 36 y 40 se consideraron dudosas.

15

Ct = Ciclo umbral	Interpretación de los resultados de Ct:		
SD= Desviación estándar	TC<36	Positivo	(Detección de virus)
CV%= Coeficiente de variación	36<TC<40	Dudoso	

ES 2 629 992 T3

(continuación)

<b>Ct = Ciclo umbral</b>		<b>Interpretación de los resultados de Ct:</b>	
<b>Grupo A3</b>	10 <sup>7</sup> CTDI <sub>50</sub> de BTiV/Dosis - Adyuvante: Alhidrogel/Quil-A		
<b>Grupo B3</b>	10 <sup>7</sup> CTDI <sub>50</sub> de BTiV/Dosis - Adyuvante: SL-CD		
<b>Grupo C3</b>	10 <sup>7</sup> CTDI <sub>50</sub> de BTiV/Dosis - Adyuvante: Aceite SP		
<b>Grupo Cont</b>	Grupo del control (no vacunado)		

Tabla 3

<b>Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 4 días posteriores al estímulo (D+4 p.i.)</b>			
		(Muestras de sangre)	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>A3</b>	179	37,12	Dudoso
<b>A3</b>	190	32,24	Positivo
<b>A3</b>	198	30,33	Positivo
<b>A3</b>	211	30,30	Positivo
<b>A3</b>	219	29,87	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>31,97</b>	
<b>SD</b>		<b>3,02</b>	
<b>CV%</b>		<b>9,45</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>B3</b>	183	28,24	Positivo
<b>B3</b>	206	27,94	Positivo
<b>B3</b>	223	29,07	Positivo
<b>B3</b>	243	27,47	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>28,18</b>	
<b>SD</b>		<b>0,67</b>	
<b>CV%</b>		<b>2,39</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>C3</b>	162	30,15	Positivo
<b>C3</b>	174	26,15	Positivo

(continuación)

<b>Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 4 días posteriores al estímulo (D+4 p.i.)</b>			
		(Muestras de sangre)	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
C3	175	30,67	Positivo
C3	241	30,07	Positivo
C3	254	29,27	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>29,26</b>	
<b>SD</b>		<b>1,81</b>	
<b>CV%</b>		<b>6,19</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
Cont.	225	31,67	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>31,67</b>	
<b>SD</b>		-	
<b>CV%</b>		-	
Ref.= Número de referencia del animal			

Tabla 4

<b>Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 7 días posteriores al estímulo (D+7 p.i.)</b>			
		(Muestras de sangre)	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
A3	179	32,99	Positivo
A3	190	29,21	Positivo
A3	198	-	Negativo
A3	211	31,7	Positivo
A3	219	28,66	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>30,64</b>	
<b>SD</b>		<b>2,05</b>	
<b>CV%</b>		<b>6,69</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>

(continuación)

<b>Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 7 días posteriores al estímulo (D+7 p.i.)</b>			
		(Muestras de sangre)	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
B3	183	26,62	Positivo
B3	206	31,17	Positivo
B3	223	26,88	Positivo
B3	243	26,94	Positivo
<b>CT promedio</b>	<b>27,90</b>	<b>27,90</b>	
<b>SD</b>		<b>2,18</b>	
<b>CV%</b>		<b>7,82</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
C3	162	29,61	Positivo
C3	174	27,12	Positivo
C3	175	-	Negativo
C3	241	29,86	Positivo
C3	254	28,26	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>28,71</b>	
<b>SD</b>		<b>1,27</b>	
<b>CV%</b>		<b>4,43</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
Cont.		-	
Cont.	225	29,02	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>29,02</b>	
<b>SD</b>		-	
<b>CV%</b>		-	
Ref.= Número de referencia del animal			

5 Para comparación entre animales vacunados y no vacunados teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR en tiempo real, los Ct promedio del grupo del control se sustrajeron de los Ct promedio de cada uno de los diferentes grupos vacunados. (Miguel Angel Jiménez-Clavero y col.. (2006)). J Vet Diagn Invest 18:7-17) demostraron que la detección conseguida en el ensayo de la RT-PCR en tiempo real mostró una relación lineal entre la señal y la cantidad de ARN vírico presente en la muestra (unidades infecciosas de CTID<sub>50</sub> equivalentes por mililitro) en una escala log (coeficiente de correlación de 0,9948 y una pendiente de -3,334). Por este motivo, la diferencia promedio de Ct entre cada grupo vacunado y el grupo del control se dividió por 3,334 y se calculó el log del número resultante.

Tabla 5

<b>Comparación entre animales vacunados y no vacunados</b>			
<b>de acuerdo con los resultados de la RT-PCR en tiempo real en los 4 días posteriores al estímulo (D+4 p.i.)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Ct promedio/Grupo</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
A3	31,97	3,02	9,45
B3	28,18	0,67	2,39
C3	29,26	1,81	6,19
Control	31,67	-	-
<b>diferencias de Ct</b>	<b>diferencias de Ct</b>	<b>dif de Ct / 3,334</b>	<b>log (dif de Ct / 3,334)</b>
A3-Control	0,30	0,09	1,23
B3-Control	-3,49	-1,05	0,09
C3-Control	-2,41	-0,72	0,19
<b>Comparación entre animales vacunados y no vacunados</b>			
<b>de acuerdo con los resultados de la RT-PCR en tiempo real en los 7 días posteriores al estímulo (D+7 p.i.)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Ct promedio/Grupo</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
A3	30,64	2,05	6,69
B3	27,90	2,18	7,82
C3	28,71	1,27	4,43
Control	29,02		
<b>diferencias de Ct</b>	<b>diferencias de Ct</b>	<b>dif de Ct / 3,334</b>	<b>log (Ct dif / 3,334)</b>
A3-Control	1,62	0,49	3,06
B3-Control	-1,12	-0,34	0,46
C3-Control	-0,31	-0,09	0,81

CONCLUSIONES

5 Los números calculados [log (dif de Ct /3,334)] expresan la relación entre los grupos del control y los grupos vacunados. En los 7 días posteriores al estímulo:

1. Los animales vacunados con el adyuvante Alhydrogel y Quil-A tuvieron 3 veces menos virus en sangre que el grupo del control (existen datos de solo 1 animal no vacunado)

2. Los animales vacunados con aceite de SP-aceite o adyuvante SL-CD no muestran ninguna reducción de la viremia en comparación con el grupo del control (existen datos de solo 1 animal no vacunado)
3. Alhidrogel (hidróxido de aluminio) y Quil-A (saponina) es mejor adyuvante que SP-aceite o SLCD.

**Ejemplo 3: efecto de la concentración de antígenos sobre la reducción de la viremia**

5 EXPERIMENTOS DE INMUNOGENICIDAD PREVIA EN CORDEROS DE 2 MESES DE EDAD

Se vacunaron los animales mediante la ruta subcutánea (2 ml) y se volvieron a vacunar 3 semanas después.

Se vacunaron los animales con vacunas A-1, A-2 y A-3 y se estimularon 5-6 semanas después de la revacunación (dosis de estímulo =  $10^7$  CTDI<sub>50</sub> de virus vivo / animal). No se protegieron ninguno de los animales estimulados. Sin embargo, se observó una reducción de la viremia dependiente de la dosis de antígeno.

10

**TABLA 6. COMPOSICIÓN PREVIA DE INMUNOVACUNAS DE BTV**

BTV inactivado (CTDI <sub>50</sub> /ml)	Adyuvante	Lote
$10^6$	Alhidrogel/Quil-A (2 mg Al <sup>2+</sup> /dosis)	A-1
$10^{6.7}$ (5x10 <sup>6</sup> )		A-2
$10^7$		A-3
$10^6$	adyuvante SL-CD al 20%	B-1
$10^{6.7}$ (5x10 <sup>6</sup> )		B-2
$10^7$		B-3
$10^6$	aceite SP al 5%	C-1
$10^{6.7}$ (5x10 <sup>6</sup> )		C-2
$10^7$		C-3

\*Sobrenadante del cultivo celular. Proceso de inactivación total 144h [( BEI 10 mM x 72h) x 2]

**RESPUESTA DE ANTICUERPOS TRAS LA VACUNACIÓN**

**TABLA 7. PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS (ENSAYO ELISA)**

GRUPO	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	Control
No. ANIMALES	11	11	11	10	11	11	11	9	11	11
D + 3 WPV	0%	27%	0%	10%	9%	0%	0%	0%	0%	0%
D + 1 WPRV	82%	73%	100%	40%	64%	82%	9%	44%	64%	0%
D + 2 WPRV	55%	64%	82%	30%	36%	27%	9%	22%	55%	0%
D + 3 WPRV	64%	82%	100%	10%	45%	36%	9%	33%	64%	0%
D + 4 WPRV	27%	45%	73%	40%	27%	27%	9%	13%	30%	0%

\*ELISA de bloqueo utilizando un Mab específico de VP7  
 WPV = Semanas después de la vacunación WPRV = Semanas después de la revacunación

15 RESULTADOS DEL ESTÍMULO

Se estimularon los animales vacunados con los lotes A-1, A-2 y A-3 (5 animales de cada grupo) a las 5-6 semanas después de la revacunación. Se estimularon también dos controles no vacunados.

Se detectó el virus de la lengua azul (BTV) en muestras de sangre mediante un ensayo de una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real en el Laboratorio Central de Veterinaria (Algete,

5 España). (Miguel Angel Jiménez-Clavero y col.. (2006). J Vet Diagn Invest 18:7-17). Se tomaron muestras de sangre a los 3 y 5 días después de la infección (D+3 p.i. y D+5 p.i.). El tratamiento de las muestras de sangre, la extracción del ácido nucleico total según un procedimiento de extracción del ácido nucleico en 96 pocillos y la RT-PCR en tiempo real, se realizaron como se describe en Miguel Angel Jiménez-Clavero y col., 2006 (J. Vet. Diagn. Invest. 18:7-17). Para el análisis de la PCR se proporcionó el ciclo umbral (Ct). Las muestras se consideraron positivas para BTV si dieron como resultado valores de Ct menores de 36. Las muestras que dieron como resultado valores de Ct entre 36 y 40 se consideraron dudosas.

Ct = Ciclo umbral	Interpretación de los resultados de Ct:		
SD= Desviación estándar	TC<36	Positivo	(DETECCIÓN DE VIRUS)
CV%= Coeficiente de variación	36<TC<40	Dudoso	
<b>Grupo A1</b>	10 <sup>6</sup> CTDI <sub>50</sub> de BTiV/Dosis - Adyuvante: Alhidrogel/Quil-A		
<b>Grupo A2</b>	10 <sup>6.7</sup> CTDI <sub>50</sub> de BTiV/Dosis - Adyuvante: Alhidrogel/Quil-A		
<b>Grupo A3</b>	10 <sup>7</sup> CTDI <sub>50</sub> de BTiV/Dosis - Adyuvante: Alhidrogel/Quil-A		
<b>Grupo Cont</b>	Grupo del control (no vacunado)		

Tabla 8

Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 3 días posteriores al estímulo (D+3 p.i.)			
(Muestras de sangre)			
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
A1	155	36,68	Dudoso
A1	167	35,11	Positivo
A1	202	37,68	Dudoso
A1	232	33,46	Positivo
A1	246	36,20	Dudoso
<b>CT promedio</b>		<b>35,83</b>	
<b>SD</b>		<b>1,61</b>	
<b>CV%</b>		<b>4,50</b>	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
A2	224	-	Negativo
A2	233	37,96	Dudoso
A2	255	35,04	Positivo
A2	257	-	Negativo
A2	259	38,76	Dudoso
<b>CT promedio</b>		<b>37,25</b>	

(continuación)

<b>Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 3 días posteriores al estímulo (D+3 p.i.)</b>			
<b>(Muestras de sangre)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>SD</b>		<b>1,96</b>	
<b>CV%</b>		<b>5,26</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>A3</b>	210	35,79	Positivo
<b>A3</b>	220	37,56	Dudoso
<b>A3</b>	245	36,03	Dudoso
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>A3</b>	251	37,65	Dudoso
<b>A3</b>	260	34,45	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>36,30</b>	
<b>SD</b>		<b>1,34</b>	
<b>CV%</b>		<b>3,69</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>Cont.</b>	203	33,10	Positivo
<b>Cont.</b>	208	38,85	Dudoso
<b>CT promedio</b>		<b>35,98</b>	
<b>SD</b>		<b>18,86</b>	
<b>CV%</b>		<b>52,43</b>	
Ref.= Número de referencia del animal			

**Tabla 9**

<b>Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 5 días posteriores al estímulo (D+5 p.i.)</b>			
<b>(Muestras de sangre)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>A1</b>	155	28,54	Positivo
<b>A1</b>	167	31,85	Positivo
<b>A1</b>	202	27,72	Positivo
<b>A1</b>	232	29,04	Positivo

ES 2 629 992 T3

(continuación)

<b>Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 5 días posteriores al estímulo (D+5 p.i.)</b>			
<b>(Muestras de sangre)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
A1	246	26,12	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>28,65</b>	
<b>SD</b>		<b>2,10</b>	
<b>CV%</b>		<b>7,34</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
A2	224	30,63	Positivo
A2	233	26,46	Positivo
A2	255	28,04	Positivo
A2	257	35,96	Positivo
A2	259	30,20	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>30,26</b>	
<b>SD</b>		<b>3,61</b>	
<b>CV%</b>		<b>11,92</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
A3	210	28,83	Positivo
A3	220	30,82	Positivo
A3	245	32,31	Positivo
A3	251	36,04	Positivo
A3	260	28,90	Positivo
<b>CT promedio</b>		<b>31,38</b>	
<b>SD</b>		<b>2,98</b>	
<b>CV%</b>		<b>9,50</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
Cont.	203	26,73	Positivo
Cont.	208	28,55	Positivo
<b>CT promedio</b>	<b>27,64</b>	<b>27,64</b>	

(continuación)

<b>Resultados de la RT-PCR fluorogénica en tiempo real en los 5 días posteriores al estímulo (D+5 p.i.)</b>			
<b>(Muestras de sangre)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Ref. FDV</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
<b>SD</b>		<b>10,51</b>	
<b>CV%</b>		<b>38,03</b>	
Ref.= Número de referencia del animal			

5 Para comparación entre animales vacunados y no vacunados teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR en tiempo real, los Ct promedio del grupo del control se sustrajeron de los Ct promedio de cada uno de los diferentes grupos vacunados. Miguel Angel Jimenez-Clavero y col.. (2006). J Vet Diagn Invest 18:7-17) demostraron que la detección conseguida en el ensayo de la RT-PCR en tiempo real mostró una relación lineal entre la señal y la cantidad de ARN vírico presente en la muestra (unidades infecciosas de CTID<sub>50</sub> equivalentes por mililitro) en una escala log (coeficiente de correlación de 0,9948 y una pendiente de -3,334). Por este motivo, la diferencia promedio de Ct entre cada grupo vacunado y el grupo del control se dividió por 3,334 y se calculó el log del número resultante.

<b>Tabla 10</b>			
<b>Comparación entre animales vacunados y no vacunados</b>			
<b>de acuerdo con los resultados de la RT-PCR en tiempo real en los 3 días posteriores al estímulo (D+3 p.i.)</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Ct promedio/Grupo</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
<b>A1</b>	35,83	1,61	4,50
<b>A2</b>	37,25	1,96	5,26
<b>A3</b>	36,30	1,34	3,69
<b>Cont.</b>	35,98	18,86	52,43
<b>diferencias de Ct</b>	<b>diferencias de Ct</b>	<b>dif de Ct / 3,334</b>	<b>log (dif de Ct / 3,334)</b>
<b>A1-Cont</b>	-0,15	-0,04	0,90
<b>A2-Cont</b>	1,27	0,38	2,40
<b>A3-Cont</b>	0,32	0,10	1,25

Tabla 11			
Comparación entre animales vacunados y no vacunados			
de acuerdo con los resultados de la RT-PCR en tiempo real en los 5 días posteriores al estímulo (D+5 p.i.)			
Grupo	Ct promedio/Grupo	SD	CV
A1	28,65	2,10	7,34
A2	30,26	3,61	11,92
A3	31,38	2,98	9,50
Ct	27,64	10,51	38,03
diferencias de Ct	diferencias de Ct	dif de Ct / 3,334	log (dif de Ct / 3,334)
A1-Cont	1,01	0,30	2,01
A2-Cont	2,62	0,79	6,11
A3-Cont	3,74	1,12	13,24

**CONCLUSIONES**

5 Los números calculados [log (dif de Ct / 3,334)] expresan la relación entre los grupos del control y los grupos vacunados. En los 5 días posteriores al estímulo:

- 1. Los animales vacunados con  $10^5$ CTDI<sub>50</sub>/dosis tuvieron 2 veces menos virus en sangre que el grupo del control (animales no vacunados)
- 2. Los animales vacunados con  $10^{6.7}$ CTDI<sub>50</sub>/dosis tuvieron 6 veces menos virus en sangre que el grupo del control (animales no vacunados)
- 10 3. Los animales vacunados con  $10^7$ CTDI<sub>50</sub>/dosis tuvieron 13 veces menos virus en sangre que el grupo del control (animales no vacunados)

**Ejemplo 4: composición adyuvante y dosis**

**EXPERIMENTO DE INMUNOGENICIDAD EN CORDEROS DE 1 MES DE EDAD**

Se vacunaron los animales mediante la ruta subcutánea (2 ml) y se volvieron a vacunar 3 semanas después.

15 Se vacunaron los animales con vacunas K1, K2, K6 y K8 y se estimularon 3-4 semanas después de la revacunación (dosis de estímulo =  $10^7$  CTDI<sub>50</sub> de virus vivo / animal). Solo se protegieron los animales vacunados con K1 y K2.

**Tabla 12. COMPOSICIÓN PREVIA DE INMUNOVACUNAS DE BTV DEL LOTE K**

*Lote de vacunas	CTDI <sub>50</sub> (dosis de 2 ml)	CONCENTRACIÓN DE ADYUVANTE (dosis de 2 ml)	CORDEROS	ESTÍMULO DE SEPT
				06
K1	$3 \times 10^6$	4 mg de Al <sup>3+</sup> + 0,4mg de Quil-A	7	7
K2	$1 \times 10^7$	4 mg de Al <sup>3+</sup> + 0,4mg de Quil-A	10	5
K3	$3 \times 10^6$	SP-aceite al 5%	7	-
K4	$1 \times 10^7$	SP-aceite al 5%	10	-
K5	$3 \times 10^6$	Montanide™ ISA 206 al 50%	7	-

(continuación)

*Lote de vacunas	CTDI <sub>50</sub> (dosis de 2 ml)	CONCENTRACIÓN DE ADYUVANTE (dosis de 2 ml)	CORDEROS	ESTÍMULO DE SEPT 06
K6	1 x 10 <sup>7</sup>	Montanide™ ISA 206 al 50%	10	-
K7	3 x 10 <sup>6</sup>	Montanide™ ISA 207 al 50%	7	7
K8	1 x 10 <sup>7</sup>	Montanide™ ISA 207 al 50%	10	5
K9	1 x 10 <sup>7</sup>	Drakeol 5- Arlancel 83V al 60%	10	-
No vacunado	-	-	12	5

• antígeno de BTVi: Cultivo completo, proceso de inactivación total 72h ( BEI 10 mM x 24h+ BEI 5 mM 48 h)

**RESPUESTA DE ANTICUERPOS TRAS LA VACUNACIÓN**

Tabla 13. 'Resultados serológicos de ELISA

Lote de vacunas	CTDI <sub>50</sub> (dosis de 2 ml)	CONCENTRACIÓN DE ADYUVANTE (dosis de 2 ml)	CORDEROS	ELISA D+35 (2 WPRV) (% de positivos)
K1	3 x 10 <sup>6</sup>	4 mg de Al <sup>3+</sup> 0,4mg de Quil-A	7	86% (+1 dudoso)
K2	1 x 10 <sup>7</sup>	4 mg de Al <sup>3+</sup> 0,4mg de Quil-A	10	90%
K3	3 x 10 <sup>6</sup>	SP-aceite al 5%	7	14% (+1 dudoso)
K4	1 x 10 <sup>7</sup>	SP-aceite al 5%	10	20%
K5	3 x 10 <sup>6</sup>	Montanide™ ISA 206 al 50%	7	86%
K6	1 x 10 <sup>7</sup>	Montanide™ ISA 206 al 50%	10	80% (+1 dudoso)
K7	3 x 10 <sup>6</sup>	Montanide™ ISA 207 al 50%	7	56% (+2 dudoso)
K8	1 x 10 <sup>7</sup>	Montanide™ ISA 207 al 50%	10	60% (+1 dudoso)
K9	1 x 10 <sup>7</sup>	Drakeol 5-Arlancel 83V 60%	10	20% (+3 dudoso)
No vacunado	-	-	12	0%

\*ELISA de bloqueo utilizando un MAb específico de VP7 WPRV= semanas posteriores a la revacunación

5

Tabla 14. Resultados de la prueba de seroneutralización (SN)

Lote de vacunas <sup>(1)</sup>	ADYUVANTE/dosis de 2 ml	CORDERO	D+42/45 4WPRV al 100% 90%	3-4WPRV al 100% 90%	Lote de vacunas <sup>(1)</sup>	ADYUVANTE/dosis de 2 ml	CORDERO	D+42/45 4WPRV al 100% 90%	3-4WPRV al 100% 90%
K1 3x10 <sup>6</sup>	CTDI <sub>50</sub> /dosis de 2 ml 4 mg de Al <sup>3+</sup> 0,4 mg de Quil-A	9	<2/2	4	K2 1 x 10 <sup>7</sup>	CTDI <sub>50</sub> /dosis 2 ml 4 mg de Al <sup>3+</sup> 0,4 mg de Quil-A	33	2	16
		11	2	8			40	<2	8
		12	<2	4			43	<2	8
		19	<2	4			53	<2/2	8
		22	<2	8			59	<2	2
		25	<2	8			65	8	16

(continuación)

Lote de vacunas <sup>(1)</sup>	ADYUVANTE/dosis de 2 ml	CORDERO	D+42/45 3-4WPRV al 100% 90%		Lote de vacunas <sup>(1)</sup>	ADYUVANTE/dosis de 2 ml	CORDERO	D+42/45 3-4WPRV al 100% 90%	
		29	2	2			73	<2	4
							75	<2-2	4
							79	2	4
							84	<2-2	8
<b>K7 3 x 10<sup>6</sup></b> CTDI <sub>50</sub> /dosis 2 ml	<b>Montanide™</b> <b>ISA 207 al 50%</b>	3	<2	<2	<b>K8 1 x 10<sup>7</sup></b> CTDI <sub>50</sub> /dosis 2 ml	<b>Montanide™</b> <b>ISA 207 al 50%</b>	36	2	
		5	<2	<2			52	<2	2
		6	<2	2			54	<2	
		15	<2	<2			58	<2	2
		16	<2	<2			62	2	
		18	<2	<2			63	<2	4
							68	<2	<2
							76	<2	2
							86	<2	
		<b>Control</b>		38			<2	<2	
41	<2			<2					
50	<2			<2					
51	<2			<2					
55	<2			<2					
60	<2			<2					
64	<2			<2					
77	<2			<2					
82	<2			<2					
88	<2			<2					
1	<2			<2					
90	<2			<2					

En negrita y cursiva: Se extrajo sangre de los animales estimulados a los 45 días después de la revacunación  
 \*Prueba de SN: Basándose en la prueba de SN en células Vero descrita por la OIE con pequeñas modificaciones. El objetivo de la técnica es determinar la dilución en suero más alta que es capaz de bloquear la infección de 100 CTDI<sub>50</sub> de BTV en células Vero. Se realizaron dos lecturas: considerando un 100% de reducción del efecto citopático y un 90% de reducción del efecto citopático.

ESTÍMULO

De acuerdo con los resultados del ELISA, las vacunas formuladas con SP-aceite y Drakeol no se consideraron para un estímulo. Basándose en los resultados de seguridad de los experimentos anteriores, las vacunas formuladas con Montanide™ ISA 206 se descartaron también.

- 5 Los corderos vacunados con los lotes K1, K2, K7 y K8 se estimularon a las 24 días de la revacunación. Se incluyó un grupo de 5 controles no vacunados.

**Tabla 15. Resultados del estímulo**

Lote de vacunas	CTDI <sub>50</sub> (dosis de 2 ml)	CONCENTRACIÓN ADYUVANTE (dosis de 2 ml)	DENO. ANIMALES ESTIMULADOS	% DE ANIMALES QUE MUESTRAN VIREMIA
K1	3 x 10 <sup>6</sup>	4 mg de Al <sup>3+</sup> + 0,4mg de Quil-A	7	*14%
K2	1 x 10 <sup>7</sup>	4 mg de Al <sup>3+</sup> + 0,4mg de Quil-A	5	0%
K3	3x10 <sup>6</sup>	SP-aceite al 5%	-	-
K4	1 x 10 <sup>7</sup>	SP-aceite al 5%	-	-
K5	3 x 10 <sup>6</sup>	Montanide™ ISA 206 al 50%	-	-
K6	1 x 10 <sup>7</sup>	Montanide™ ISA 206 al 50%	-	-
K7	3 x 10 <sup>6</sup>	Montanide™ ISA 207 al 50%	7	71%
K8	1 x 10 <sup>7</sup>	Montanide™ ISA 207 al 50%	5	80%
K9	1 x 10 <sup>7</sup>	Drakeol 5-Arlacel 83V 60%	-	-
No vacunado	-	-	5	80%

*Se detectó el virus de la lengua azul (BTV) en muestras de sangre mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) \*2 resultados no concluyentes consecutivos*

CONCLUSIONES

- 10 La única vacuna capaz de evitar la viremia era la del lote K2 formulada con 1 x 10<sup>7</sup> CTDI<sub>50</sub>/dosis y Alhidrogel y Quil-A como adyuvante. La viremia fue detectable en solo 1 de 5r animales vacunados con el lote K1 formulado con el mismo adyuvante pero con una concentración menor de antígeno (3 x 10<sup>6</sup> CTDI<sub>50</sub>/dosis).

Los resultados obtenidos con los lotes de vacunas K7 y K8 formulados con Montanide™ ISA 206 (Seppic) no fueron satisfactorio.

- 15 No están disponibles los resultados del estímulo para Montanide™ ISA 207 (Seppic) que muestran resultados serológicos similares.

**Ejemplo 5. composición de vacuna final**

**Tabla 16**

Ingredientes	Cantidad / ml	Función	Referencia a los estándares
<b>Sustancias activas</b>			
Virus de la lengua azul inactivado y neutralizado (VLAi), mínimo	1,5 x 10 <sup>6</sup> CTDI <sub>50</sub>	Antígeno	Monografía interna
<b>Componentes adyuvantes:</b>			

(continuación)

Ingredientes	Cantidad / ml	Función	Referencia a los estándares
<b>Sustancias activas</b>			
Alhidrogel al 2%	192,6 mg (2 mg de Al <sup>3+</sup> )	Adyuvante	Monografía interna
Quil-A	200 µg	Adyuvante	interno
<b>Componentes excipientes:</b>			
Tiomersal	0,1 mg	Conservante	Ph. Eur. Monografía nº 1625, Edición actual
Solución salina	cs 1 ml	Diluyente/excipient e	Monografía interna

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de vacuna para su uso en la prevención o mejora de un brote del virus de la lengua azul (BTV), comprendiendo la composición

- 5 (i) al menos una cepa de un BTV inactivado dos veces,  
(ii) hidróxido de aluminio y  
(iii) Quil-A,

en la que el BTV se inactiva una primera vez con etilenimina binaria (BEI) a una concentración de 10 mM durante 24 horas y se inactiva una segunda vez con BEI a una concentración de 5 mM durante 48 horas.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que la cepa es del serotipo 4.