

Organización y
Digitalización CSA Ltda



RCI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

10-61147

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: VACUNA DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL Y
COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS, PROCEDIMIENTOS DE USO Y
PROCEDIMIENTOS DE PRODUCCIÓN DE LA MISMA

SOLICITANTE: WYETH FARMA, S.A.

DIRECCIÓN: Ctra. De Madrid-Burgos Km.23, Bifurcación Algete, San
Sebastian de los Reyes, E-28700 Madrid España

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 21 de mayo de 2010

P2010/000072

21-06-2010
No. 1000

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061147- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:55:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 137


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000072

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: WYETH FARMA, S.A.

Dirección: Ctra. De Madrid-Burgos Km.23,
Bifurcación Algete, San Sebastian de los Reyes,
E-28700 Madrid España

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: JOAN PLANA DURAN

Dirección: Ctra. Casmpordan, "La Riba", Vall De Bianya, Olot, E-17813
Gerona España

Nacionalidad o Domicilio: España

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/065993

Fecha Noviembre 21, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/065930

Fecha May 28, 2009

6

Título (54) VACUNA DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL Y COMPOSICIONES
INMUNOGÉNICAS, PROCEDIMIENTOS DE USO Y PROCEDIMIENTOS DE
PRODUCCION DE LA MISMA

Clasificación Internacional (51) A61K 39/15

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Noviembre 21, 2007

(31) Número de Solicitud

07380323.1

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha Mayo de 2010



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



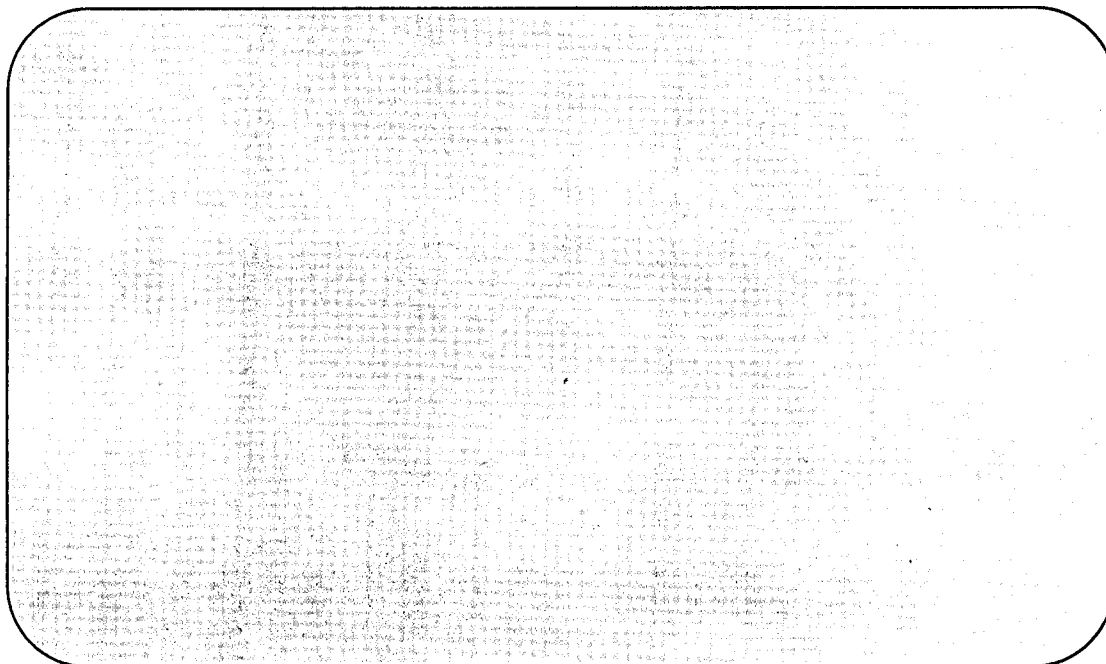
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

11

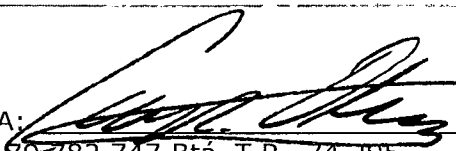
FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 99.782.747 Btá T.P. 74.295

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061147- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:55:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 137

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 41,658
FECHA : MAYO 21 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	6238713	21/05/2010	5,574,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILID	470,000.00
		TOTAL :	\$ 470,000.00

SON: CUATROCIENTOS SETENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 80

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061147- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:55:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 137

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 41,655
FECHA : MAYO 21 DE 2010

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
PARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	6238890	21/05/2010	84,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	84,000.00
		TOTAL :	\$ 84,000.00

SON: OCHENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
28 May 2009 (28.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/065930 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/15 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/065993

(22) International Filing Date:
21 November 2008 (21.11.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07380323.1 21 November 2007 (21.11.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **WYETH FARMA, S.A.** [ES/ES]; Ctra. de Madrid-Burgos Km.23, Bifurcación Algete, San Sebastián de los Reyes, E-28700 Madrid (ES).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **PLANA DURAN, Juan** [ES/ES]; Ctra. Camprodan, "La Riba", Vall De Bianya, Olot, E-17813 Girona (ES).

(74) Agent: **CARPINTERO LOPEZ, Francisco**; Herrero & Asociados, S.L., Alcalá 23, E-28010 Madrid (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(54) Title: **BLUETONGUE VIRUS VACCINE AND IMMUNOGENIC COMPOSITIONS, METHODS OF USE AND METHODS OF PRODUCING SAME**

(57) Abstract: Provided are immunogenic and vaccine compositions and methods for their preparation and use, which compositions are effective in protecting against, minimizing the severity of, preventing, and/or ameliorating infection of ruminants with Bluetongue virus. Administration to an animal of at least one dose of an adjuvanted and twice inactivated Bluetongue virus composition as disclosed herein is effective in providing immunity to the animal and protection from infection with Bluetongue virus, thereby reducing the severity of and/or preventing disease caused by one or more strains or serotypes of Bluetongue virus.



WO 2009/065930 A1

BLUETONGUE VIRUS VACCINE AND IMMUNOGENIC COMPOSITIONS, METHODS
OF USE AND METHODS OF PRODUCING SAME

FIELD OF THE INVENTION

5 The invention relates to a vaccine or immunogenic composition for immunizing ruminants against pathogenic strains or serotypes of Bluetongue Virus (BTV) and a method for making the vaccine and immunizing ruminants with these compositions.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Bluetongue, an arthropod-borne viral disease, occurs in cattle, sheep, goats, and wild ruminants. Bluetongue lesions in affected animals resemble infectious bovine virus diarrhea, vesicular stomatitis virus, malignant catarrhal fever, mycotic stomatitis, rinderpest, photosensitization, and foot and mouth disease. Bluetongue virus (BTV) has been incriminated as a cause of hydranencephaly in cattle and of infertility,
15 abortion, and birth of defective young in cattle and sheep. Twenty four serotypes are reported in the literature as causing problems ranging from inapparent infection to acute fulminating infection. Chronic, persistent virus shedding cattle have also been recognized. With BTV there is a marked loss of body condition and marketing of slaughter animals may be delayed. In BTV-infected sheep, wool growth may be
20 impaired by the development of wool breaks which produce a defective or low yielding fleece. The marked debility following BTV infections may result in a lowering of resistance to secondary bacterial or chlamydial infections and other predatory factors. The reproductive efficiency of infected animals is also adversely affected.

25 Abortions and defective offspring are observed in infected animals, and some animals may be barren for one or more breeding seasons. The most significant damage inflicted by bluetongue infections is economic loss resulting from embargoes and stringent testing requirements imposed on producers who export cattle, cattle semen, and sheep from bluetongue endemic areas.

Under natural conditions, transmission of the virus occurs via the bites of at
30 least four Culicoides species, e.g., sand flies, midges. The biological transmission of BTV between cattle and sheep by the same culicoid vector has been demonstrated experimentally (Luedke et al, 28 AJVR 457 (1967)). Cattle, sheep, and many species of wild ruminants may act as reservoirs of BTV producing a means for the virus to overwinter. A persistent BTV viremia, which can last as long as three years has been
35 identified in cattle (Hourrigan, 51 Aust Vet J 170 (1975)). Once BTV becomes

established in a country, the virus is virtually impossible to eradicate (Erasmus, 51 Aust Vet J 209). The etiologic agent of bluetongue belongs to the family Reoviridae, genus Orbivirus.

The viral etiology of bluetongue was established by Theiler in 1906, (Erasmus, 51 Aust Vet J 165 (1975)). Since then several reports have appeared in the literature which (a) confirm the isolation of bluetongue virus from cattle, sheep, goats, and a number of wild ruminants and (b) the clinical and pathological features of the bluetongue diseases, and (c) describe infections resulting from different BTV serotypes. For example, see Onderstepoort (J Vet Sci Anim Indus 7 (1944); Komarov and Goldsmit, Refuah Vet 96 (1951) ; Price and Hardy, 124 J Am Med Assn 255 (1954); Shope et al, 111 J Exp Med 155 (1960) ; Livingston and Hardy, 25 AJVR 1958 (1964); Luedke et al 30 AJVR 511 (1969) ; Hourrigan et al, 51 Aust Vet J 170 (1975), Immunological control of bluetongue in the United States was first attempted by McKercher et al 118 AJVR 310 (1975), with a BTV International serotype 10 vaccine grown in fertile hen eggs. This product was patterned after that of Alexander, (J Vet Sci Indus 231 (1947)), who first succeeded in propagating the bluetongue virus in chicken embryos.

Early vaccination protocols were routinely carried out in South Africa and Israel using an egg-attenuated polyvalent live virus vaccine containing a number of bluetongue strains. An egg-adapted vaccine produced by Cutter Laboratories and used in the United States has been taken off the market because of severe reactions in vaccinated sheep. Subsequently, Kemeny and Drehle, 22 AJVR 921 (1961), adapted the BTV International type 10 from eggs to bovine kidney cell cultures. This modified live virus vaccine, produced by Colorado Serum Company, is used for sheep in the United States.

There is a need for improvements in development of vaccines for use in immunizing ruminants, in particular, sheep and lambs against Bluetongue virus. The present invention addresses this need. The citation of any reference herein should not be deemed as an admission that such reference is available as prior art to the instant invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, it has been found that bluetongue viruses can be twice inactivated using the methods described herein, and these twice inactivated viruses may be used in the preparation of vaccine and immunogenic

compositions for immunizing ruminants against various strains and pathogenic serotypes of BTV. Moreover, it has been determined that particular combinations of adjuvants and excipients are effective for use in the compositions of the invention to elicit an effective immune response in the ruminants administered the compositions.

5 Accordingly, one aspect of the invention provides a composition for eliciting an immune response against Bluetongue virus (BTV) in an animal, the composition comprising an immunogenically effective amount of at least one strain of a twice inactivated Bluetongue virus and a biologically acceptable adjuvant.

10 In one embodiment, the twice inactivated BTV used in the compositions is inactivated a first time with an inactivating agent at a concentration of about 10 mM and inactivated a second time with an inactivating agent at a concentration of about 5 mM.

In one embodiment, the inactivating agent used to treat the BTV for use in the compositions is binary ethyleneimine (BEI).

15 4. In one embodiment, the composition comprises a strain of BTV that is serotype

In one embodiment, the composition is a vaccine composition or an immunogenic composition.

In one embodiment, the animal to be treated with the composition is a ruminant selected from the group consisting of sheep, lambs, goats, cattle and deer.

20 In one embodiment, the animal to be treated with the composition is a sheep or lamb.

In one embodiment, the biologically acceptable adjuvant to be used with the composition is selected from the group consisting of one or more of aluminum hydroxide, saponin, SL-CD, Carbopol and SP-Oil.

25 In one embodiment, the biologically acceptable adjuvant to be used with the composition comprises a mixture of aluminum hydroxide and saponin. In one embodiment, the aluminum hydroxide is present at a concentration of between about 1% and about 10%. In one embodiment, the aluminum hydroxide is present at a concentration of between about 2% and about 5%. In one embodiment, the aluminum hydroxide is present at a concentration of about 3%.

30 In one embodiment, the immune response elicited with the compositions of the invention protects an animal against infection with, or reduces the severity of at least one symptom associated with an infection by a pathogenic strain of Bluetongue virus.

35 A second aspect of the invention provides a method for enhancing the immune response in an animal to Bluetongue virus, or for preventing or reducing at least one

symptom associated with the disease, the method comprising the step of administering a single or multiple doses of the composition of the invention, as described above.

In one embodiment, the methods for enhancing the immune response in an animal to Bluetongue virus, or for preventing or reducing at least one symptom associated with the disease are useful in achieving such effect in a ruminant selected from the group consisting of sheep, lambs, goats, cattle and deer. In one embodiment, the ruminant is a sheep or lamb.

In one embodiment, the methods for enhancing the immune response in an animal to Bluetongue virus, or for preventing or reducing at least one symptom associated with the disease provide for the step of administering the compositions by parenteral administration. The parenteral administration step may be achieved by intramuscular injection.

In one embodiment, the methods for enhancing the immune response in an animal to Bluetongue virus, or for preventing or reducing at least one symptom associated with the disease provide for the step of administering the compositions by oral administration, which may be achieved by hand delivery or mass application.

A third aspect of the invention provides a method of preventing or ameliorating an outbreak of Bluetongue virus, which comprises the step of administering to an animal a composition of the invention.

In one embodiment, the method of preventing or ameliorating an outbreak of Bluetongue virus provides for treating an animal that is a ruminant selected from the group consisting of sheep, lambs, goats, cattle and deer. In one embodiment, the ruminant is a sheep or a lamb.

In one embodiment, the method of preventing or ameliorating an outbreak of Bluetongue virus provides for the step of administering the compositions of the invention by parenteral administration. The parenteral administration step may be achieved by intramuscular injection.

In one embodiment, the method of preventing or ameliorating an outbreak of Bluetongue virus provides for the step of administering the compositions of the invention by oral administration. The oral administration step may be achieved by hand delivery or mass application.

A fourth aspect of the invention provides a method of producing inactivated whole Bluetongue virus (BTV), the method comprising the steps of:

a) treating the BTV with an inactivating agent using a 1:10 ratio of inactivating agent to BTV;

b) homogenizing the inactivating agent/BTV mixture of step a) for at least 15 minutes;

c) decanting the mixture of step b) into a sterile container and agitating the mixture for about 24 hours;

5 d) treating the BTV a second time with an inactivating agent using a 1:20 ratio of inactivating agent to BTV;

e) homogenizing the inactivating agent/BTV mixture of step d) for at least 15 minutes;

10 f) decanting the mixture of step e) into a sterile container and agitating the mixture for about 48 hours; and

g) neutralizing the inactivating agent to adjust the final pH to about 7.2;

wherein the method results in inactivation of the BTV while maintaining the immunogenicity of the BTV.

15 In one embodiment, the method for preparing twice-inactivated BTV, as described above, provides for the use of binary ethyleneimine (BEI) as an inactivating agent. In one embodiment, the final concentration of inactivating agent in step a), as noted above, is about 10 mM. In one embodiment, the final concentration of inactivating agent in step d), as noted above, is about 5 mM.

20 In one embodiment, the method described above for preparing twice inactivated whole BTV utilizes a Bluetongue virus that is serotype 4.

A fifth aspect of the invention provides for use of at least one twice inactivated strain of BTV for the preparation of a medicament for immunizing ruminants against various strains and serotypes of BTV. In one embodiment, the at least one twice inactivated strain of BTV for use in preparation of the medicament is serotype 4.

25

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

30 Before the present methods and treatment methodology are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular methods, and experimental conditions described, as such methods and conditions may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for purposes of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, references to "the method" includes one or more methods, and/or

steps of the type described herein and/or which will become apparent to those persons skilled in the art upon reading this disclosure and so forth.

Accordingly, in the present application, there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and 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 et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

Definitions

The terms used herein have the meanings recognized and known to those of skill in the art, however, for convenience and completeness, particular terms and their meanings are set forth below.

The term "about" or "approximately" means within a statistically meaningful range of a value. Such a range can be within an order of magnitude, typically within 50%, more typically within 20%, more typically still within 10%, and even more typically within 5% of a given value or range. The allowable variation encompassed by the term "about" or "approximately" depends on the particular system under study, and can be readily appreciated by one of ordinary skill in the art.

"Adjuvant" means a composition comprised of one or more substances that enhances the immunogenicity of an antigen in a composition, typically a vaccine composition. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune response (Hood, et al., *Immunology*, Second Ed., Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p. 384). Often, a primary vaccination with an antigen

alone, in the absence of an adjuvant, will fail to elicit a humoral or cellular immune response. Adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil or hydrocarbon emulsions, keyhole limpet hemocyanins, and potentially useful human adjuvants such as N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine, BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*. Preferably, the adjuvant is biologically acceptable. In one embodiment of the invention, the composition is administered with a combination of two adjuvants, aluminum hydroxide and saponin.

Adjuvants employed in the compositions described herein are typically "biologically acceptable adjuvants" and, thus, may be used in combination with an inactivated BTV, such that the resulting compositions may be administered *in vivo* without concomitant toxicity to an animal. Exemplified herein are compositions including twice inactivated BTV in combination with one or more biologically acceptable adjuvants selected from the group consisting of aluminum hydroxide, saponin, SP-Oil, SL-CD, or Carbopol. In certain embodiments, two adjuvants are used to elicit the preferred immune response to BTV. In other embodiments, a mixture of a metabolizable oil such as one or more unsaturated terpene hydrocarbon(s) may be considered for use, for example squalene or squalane, and a polyoxyethylene-polypropylene block copolymer such as Pluronic®.

An inactivated strain of BTV or molecule derived therefrom is "antigenic" when it is capable of specifically interacting with an antigen recognition molecule of the immune system, such as an immunoglobulin (antibody) or T cell antigen receptor. Typically, an antigenic molecule is a polypeptide, or variant thereof, which contains an "epitope" of at least about five and typically at least about 10 amino acids. An antigenic portion of a polypeptide, also called herein the "epitope," can be that portion that is immunodominant for antibody or T cell receptor recognition, or it can be a portion used to generate an antibody to the molecule by conjugating the antigenic portion to a carrier polypeptide for immunization. A molecule that is antigenic need not be itself immunogenic, *i.e.*, capable of eliciting an immune response without a carrier.

It is noted that in this disclosure, terms such as "comprises", "comprised", "comprising", "contains", "containing" and the like can have the meaning attributed to them in U.S. patent law; *eg.*, they can mean "includes", "included", "including" and the

like. Terms such as "consisting essentially of" and "consists essentially of" have the meaning attributed to them in U.S. patent law, *eg.*, they allow for the inclusion of additional ingredients or steps that do not detract from the novel or basic characteristics of the invention, *ie.*, they exclude additional unrecited ingredients or steps that detract from novel or basic characteristics of the invention, and they exclude ingredients or steps of the prior art, such as documents in the art that are cited herein or are incorporated by reference herein, especially as it is a goal of this document to define embodiments that are patentable, *eg.*, novel, nonobvious, inventive, over the prior art, *eg.*, over documents cited herein or incorporated by reference herein. And, the terms "consists of" and "consisting of" have the meaning ascribed to them in U.S. patent law; namely, that these terms are closed ended.

An "immune response" to a vaccine or immunogenic composition is the development in a subject of a humoral and/or a cell-mediated immune response to molecules present in the antigen or vaccine composition of interest. For purposes of the present invention, a "humoral immune response" is an antibody-mediated immune response and involves the generation of antibodies with affinity for the antigen/vaccine of the invention, while a "cell-mediated immune response" is one mediated by T-lymphocytes and/or other white blood cells. A "cell-mediated immune response" is elicited by the presentation of antigenic epitopes in association with Class I or Class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC). This activates antigen-specific CD4+ T helper cells or CD8+ cytotoxic T lymphocyte cells ("CTLs"). CTLs have specificity for peptide antigens that are presented in association with proteins encoded by the major histocompatibility complex (MHC) and expressed on the surfaces of cells. CTLs help induce and promote the intracellular destruction of intracellular microbes, or the lysis of cells infected with such microbes. Another aspect of cellular immunity involves an antigen-specific response by helper T-cells. Helper T-cells act to help stimulate the function, and focus the activity of, nonspecific effector cells against cells displaying peptide antigens in association with MHC molecules on their surface. A "cell-mediated immune response" also refers to the production of cytokines, chemokines and other such molecules produced by activated T-cells and/or other white blood cells, including those derived from CD4+ and CD8+ T-cells. The ability of a particular antigen or composition to stimulate a cell-mediated immunological response may be determined by a number of assays, such as by lymphoproliferation (lymphocyte activation) assays, CTL cytotoxic cell assays, by assaying for T-lymphocytes specific for the antigen in a sensitized subject, or by measurement of cytokine production by T

cells in response to restimulation with antigen. Such assays are well known in the art. See, e.g., Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

The "immunogenically effective amount" is the amount of whole inactivated BTV that will elicit an immune response in an animal. This amount will depend upon the species, breed, age, size, health status of the recipient animal and will be influenced by the previous exposure of the animal to one or more strain of BTV whether that one or more strain is a virulent strain or an avirulent strain. As used herein, an "immunogenically effective amount" of whole inactivated BTV, when employed in combination with one or more suitable adjuvants, is that amount of BTV that is sufficient to enhance the immunogenicity of the BTV and thus provides for protective immunity against challenge with a pathogenic or virulent BTV strain or serotype.

The term "immunogenic" refers to the ability of an antigen or a vaccine to elicit an immune response, either humoral or cell mediated, or both. As used herein, the term "immunogenic" means that the BTV is capable of eliciting a humoral and/or cellular immune response. An immunogenic strain is also antigenic. An immunogenic composition is a composition that elicits a humoral and/or cellular immune response when administered to an animal.

The term "immunogenic composition" relates to any pharmaceutical composition containing an antigen, eg. a microorganism, which composition can be used to elicit an immune response in a mammal. The immune response can include a T cell response, a B cell response, or both a T cell and B cell response. The composition may serve to sensitize the mammal by the presentation of antigen in association with MHC molecules at the cell surface. In addition, antigen-specific T-lymphocytes or antibodies can be generated to allow for the future protection of an immunized host. An "immunogenic composition" may contain a live, attenuated, or killed/inactivated vaccine comprising a whole microorganism or an immunogenic portion derived therefrom that induces either a cell-mediated (T cell) immune response or an antibody-mediated (B cell) immune response, or both, and may protect the animal from one or more symptoms associated with infection by the microorganism, or may protect the animal from death due to the infection with the microorganism.

The term "inactivated" refers to the non-infectious nature of the microorganisms to be used in a vaccine or immunogenic composition of the invention. In particular, those skilled in the art are aware of such materials that may be used to render a microorganism non-infectious for vaccine purposes, for example, BEI. In the present

invention, particular methods have also been developed to render the Bluetongue virus non-infectious, but these methods have also been developed with particular emphasis on retaining the immunogenicity of the vaccine preparation, while at the same time resulting in complete inactivation of the virus preparation.

5 As used herein, the term "isolated" means that the referenced material is removed from its native environment. Thus, an isolated biological material can be free of some or all cellular components, *i.e.*, components of the cells in which the native material occurs naturally (*e.g.*, cytoplasmic or membrane component). A material is isolated if it is present in a cell extract or supernatant. An isolated protein may be associated with other proteins or nucleic acids, or both, with which it associates in the cell, or with cellular membranes if it is a membrane-associated protein. An isolated organelle, cell, or tissue is removed from the anatomical site in which it is found in an organism. An isolated material may be, but need not be, purified.

10 The term "parenteral administration" as used herein means administration by some other means than through the gastrointestinal tract, particularly to the introduction of substances into an organism by intravenous, subcutaneous, intramuscular, or intramedullary injection, but also to other non-oral and non-nasal routes of administration such as intraperitoneal injection or topical application.

15 The term "pathogenic" refers to the ability of any agent of infection, such as a bacterium or a virus, to cause disease. In the manner of the present invention, the term "pathogenic" refers to the ability of a Bluetongue virus (BTV), to cause a disease in ruminants, particularly sheep or lambs. A "non-pathogenic" microorganism refers to a microorganism that lacks the characteristics noted above for the "pathogenic" strains of BTV. The disease caused by BTV is often characterized by lesions in infected animals, which resemble infectious bovine virus diarrhea, vesicular stomatitis virus, malignant catarrhal fever, mycotic stomatitis, rinderpest, photosensitization, and foot and mouth disease. Bluetongue virus (BTV) has been incriminated as a cause of hydranencephaly in cattle and of infertility, abortion, and birth of defective young in cattle and sheep.

20 The term "pharmaceutically acceptable carrier" means a carrier approved by a regulatory agency of a Federal, a state government, or other regulatory agency, or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans as well as non-human mammals. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the pharmaceutical composition is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and

25

30

35

16

oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. The formulation should suit the mode of administration.

The term "protecting" refers to shielding *eg.* a mammal, in particular, a ruminant, for example, a sheep, a lamb, a goat or a cow, from infection or a disease, by inducing an immune response to a particular pathogen, *eg.* Bluetongue virus. Such protection is generally achieved following treating a mammal with the vaccine compositions described herein.

The term "purified" as used herein refers to material that has been isolated under conditions that reduce or eliminate the presence of unrelated materials, *i.e.*, contaminants, including native materials from which the material is obtained. For example, a purified bacteria or protein is typically substantially free of host cell or culture components, including tissue culture or egg proteins, non-specific pathogens, and the like. As used herein, the term "substantially free" is used operationally, in the context of analytical testing of the material. Typically, purified material substantially free of contaminants is at least 50% pure; more typically at least 90% pure, and more typically still at least 99% pure. Purity can be evaluated by chromatography, gel electrophoresis, immunoassay, composition analysis, biological assay, and other methods known in the art. Methods for purification are well-known in the art. The term "substantially pure" indicates the highest degree of purity which can be achieved using conventional purification techniques known in the art.

"Saponins" are taught in: Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386). Saponins are steroid or triterpene glycosides widely distributed in the plant and marine animal kingdoms. Saponins are noted for forming colloidal solutions in water which foam on shaking, and for precipitating cholesterol. When saponins are near cell membranes they create pore-like structures in the membrane which cause the membrane to burst. Hemolysis of erythrocytes is an example of this phenomenon, which is a property of certain, but not all, saponins. Saponins are known as adjuvants in vaccines for systemic administration. The adjuvant and hemolytic activity of individual saponins has been extensively studied in the art (Lacaille-Dubois and Wagner, *supra*). For example, "Quil A" (derived from the bark of the South American tree *Quillaja Saponaria* Molina), and fractions thereof, are described in U.S. Pat. No. 5,057,540 and "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55, and EP 0 362 279 B1. Particulate structures, termed Immune Stimulating Complexes (ISCOMS), comprising fractions of Quil A are haemolytic and have been used in the manufacture of vaccines (Morein, B., EP 0 109 942 B1). These structures have been reported to have adjuvant activity (EP 0 109 942 B1; WO 96/11711). The hemolytic saponins QS21 and QS17 (HPLC purified fractions of Quil A) have been described as potent systemic adjuvants, and the method of their production is disclosed in U.S. Pat. No. 5,057,540 and EP 0 362 279 B1. Also described in these references is the use of QS7 (a non-hemolytic fraction of Quil-A) which acts as a potent adjuvant for systemic vaccines. Use of QS21 is further described in Kensil et al. (1991, *J. Immunology* vol 146, 431-437). Combinations of QS21 and polysorbate or cyclodextrin are also known (WO 99/10008). Particulate adjuvant systems comprising fractions of QuilA, such as QS21 and QS7 are described in WO 96/33739 and WO 96/11711. Other saponins which have been used in systemic vaccination studies include those derived from other plant species such as *Gypsophila* and *Saponaria* (Bomford et al., *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992). Saponins are also known to have been used in mucosally applied vaccine studies, which have met with variable success in the induction of immune responses. Quil-A saponin has previously been shown to have no effect on the induction of an immune response when antigen is administered intranasally (Gizurason et al. 1994 *Vaccine Research* 3, 23-29), while other authors have used this adjuvant with success (Maharaj et al., *Can. J. Microbiol*, 1986, 32(5):414-20. Chavali and Campbell, *Immunobiology*, 174(3):347-59). ISCOMs comprising Quil A saponin have been used in intragastric and intranasal

vaccine formulations and exhibited adjuvant activity (Mcl Mowat et al., 1991, Immunology, 72, 317-322; Mcl Mowat and Donachie, Immunology Today, 12, 383-385). QS21, the non-toxic fraction of Quil A, has also been described as an oral or intranasal adjuvant (Sumino et al., J. Virol., 1998, 72(6):4931-9, WO 98/56415). The use of other saponins in intranasal vaccination studies has been described. For example, Chenopodium quinoa saponins have been used in both intranasal and intragastric vaccines (Estrada et al., Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1998, 21(3):225-36).

The term "SL-CD" refers to a sulpholipo-cyclodextrin that falls within the family of cyclodextrin adjuvants described in U.S. patent numbers 6,610,310 and 6,165,995. Typically, SL-CD is formulated in a mixture with a metabolizable oil such as one or more unsaturated terpene hydrocarbons, for example, squalane and preferably with a non-ionic surfactant, such as polyoxyethylene sorbitan monooleate.

The term "SP-Oil" refers to an adjuvant that is an oil emulsion comprising: 1% to 3% vol/vol of polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer; 2% to 6% vol/vol of squalane; 0.1% to 0.5% vol/vol of polyoxyethylene sorbitan monooleate; and a buffered salt solution.

The term "ruminant" refers to any variety of hoofed, even footed, and usually horned mammals that characteristically have their stomachs divided into four sections, including cows, sheep, giraffes, goats and deer.

As used herein, "treatment" (including variations thereof, for example, "treat" or "treated") refers to any one or more of the following: (i) the prevention of infection or reinfection, as in a traditional vaccine, (ii) the reduction in the severity of, or, in the elimination of symptoms, and (iii) the substantial or complete elimination of the pathogen or disorder in question. Hence, treatment may be effected prophylactically (prior to infection) or therapeutically (following infection). In the present invention, prophylactic treatment is the preferred mode. According to a particular embodiment of the present invention, compositions and methods are provided which treat, including prophylactically and/or therapeutically immunize, a host animal against a viral infection. The methods of the present invention are useful for conferring prophylactic and/or therapeutic immunity to a mammal, preferably a ruminant, such as a sheep, lamb, cow or goat. The methods of the present invention can also be practiced on mammals for biomedical research applications.



The term "twice inactivated" refers to the use of particular methods as described in the present invention, for rendering the BTV non-infectious, while retaining the immunogenicity of the virus preparation. More particularly, the BTV of the present invention is twice inactivated by using two rounds of incubation of BTV with BEI, wherein the first step of inactivation is accomplished by incubating the BTV with BEI at a concentration of 10 mM for 24 hours, and whereby the second round of inactivation is accomplished by incubating the BTV with BEI at a concentration of 5 mM for 48 hours.

The terms "vaccine" or "vaccine composition", which are used interchangeably, refer to pharmaceutical compositions comprising at least one immunogenic composition that induces an immune response in an animal. A vaccine or vaccine composition may protect the animal from disease or possible death due to an infection, and may or may not include one or more additional components that enhance the immunological activity of the active component. A vaccine or vaccine composition may additionally comprise further components typical to pharmaceutical compositions. A vaccine or vaccine composition may additionally comprise further components typical to vaccines or vaccine compositions, including, for example, an adjuvant or an immunomodulator. The immunogenically active component of a vaccine may comprise complete live organisms in either their original form, or as attenuated organisms in a modified live vaccine, or organisms inactivated by appropriate methods in a killed or inactivated vaccine, or subunit vaccines comprising one or more immunogenic components of the virus, or genetically engineered, mutated or cloned vaccines prepared by methods known to those skilled in the art. A vaccine or vaccine composition may comprise one or simultaneously more than one of the elements described above.

General Description

Due to its potential impact on the large animal industry, the development of a vaccine against Bluetongue virus is of major importance, particularly to the cattle and sheep industry. Pathogenic strains, even if attenuated, are likely to be of limited value due to the usual tendency of a live virus to revert to its virulent state. Moreover, it is imperative that if an inactivated vaccine is to be of commercial use, the virus must be fully inactivated to ensure an adequate safety profile for the animal. Furthermore, it is also important that the inactivation does not have a detrimental effect on the immunogenicity of the virus or components of the virus responsible for inducing an immune response.

Accordingly, the present invention relates to compositions and methods for immunizing an animal, in particular a ruminant, such as a sheep, or lamb, or cow against a Bluetongue virus (BTV) infection, or for reducing the severity of at least one symptom of the disease. The composition comprises at least one twice inactivated strain of BTV and a biologically acceptable adjuvant. In certain embodiments, a combination of at least two biologically acceptable adjuvants is utilized.

In one embodiment of the present invention, the methods provide for immunizing a ruminant against a pathogenic BTV and for protecting the animal against such infection.

In particular, the methods of the present invention provide for the use of a vaccine or immunogenic composition comprising at least one whole and twice inactivated strain of BTV for immunizing a ruminant against infection with BTV. In one embodiment, the methods of the present invention provide for the use of a vaccine or immunogenic composition comprising serotype 4 of BTV for immunizing a ruminant against infection with BTV.

The Bluetongue virus to be used in the compositions and methods of the invention may be obtained from any known depository, which retains stocks of the various serotypes of BTV, such as the American Type Culture Collection (ATCC). For example, the ATCC maintains several different strains of BTV, which are listed in their catalogue with the following designated accession numbers: VR-187 (serotype 10), VR-872 (serotype 11), VR-873 (serotype 13), VR-875 (serotype 17), VR-983 (serotype 2), VR-1231 (serotype 10), VR-1231AF (serotype 10) and VR-1231CAF (murine serotype 10). Furthermore, serotype 4 has been described by Mertens *et al.* (Mertens, PP, *et al.* (Virology, 161(2): 438-447, (1987)) and Breard *et al.* (Breard, E. *et al.* Virus Res., 125(2): 191-197, (2007)).

Methods of Inactivation

Inactivated virus vaccines or immunogenic compositions may be prepared by treating the BTV with inactivating agents such as formalin or hydrophobic solvents, acids, etc., by irradiation with ultraviolet light or X-rays, by heating, etc. Inactivation is conducted in a manner understood in the art. For example, in chemical inactivation, a suitable virus sample or serum sample containing the virus is treated for a sufficient length of time with a sufficient amount or concentration of inactivating agent at a sufficiently high (or low, depending on the inactivating agent) temperature or pH to inactivate the virus. Inactivation by heating is conducted at a temperature and for a

length of time sufficient to inactivate the virus. Inactivation by irradiation is conducted using a wavelength of light or other energy source for a length of time sufficient to inactivate the virus. The virus is considered inactivated if it is unable to infect a cell susceptible to infection. In one particular embodiment, binary ethyleneimine (BEI) is the means used for inactivation.

In certain aspects of the invention, methods for producing the twice inactivated form of at least one whole BTV are provided. The method comprises the steps of:

- a) treating the BTV with an inactivating agent using a 1:10 ratio of inactivating agent to BTV;
- b) homogenizing the inactivating agent/BTV mixture of step a) for at least 15 minutes;
- c) decanting the mixture of step b) into a sterile container and agitating the mixture for about 24 hours;
- d) treating the BTV a second time with an inactivating agent using a 1:20 ratio of inactivating agent to BTV;
- e) homogenizing the inactivating agent/BTV mixture of step d) for at least 15 minutes;
- f) decanting the mixture of step e) into a sterile container and agitating the mixture for about 48 hours; and
- g) neutralizing the inactivating agent to adjust the final pH to about 7.2;

wherein the method results in inactivation of the BTV while maintaining the immunogenicity of the BTV.

In one embodiment, the method for preparing twice inactivated BTV, as described above, provides for the use of binary ethyleneimine (BEI) as an inactivating agent. In one embodiment, the final concentration of inactivating agent in step a), as noted above, is about 10 mM. In one embodiment, the final concentration of inactivating agent in step d), as noted above, is about 5 mM.

In one embodiment, the method described above for preparing twice inactivated whole BTV utilizes a Bluetongue virus that is serotype 4.

Vaccine or Immunogenic Compositions and Methods of Use

An immunogenically effective amount of the vaccines of the present invention is administered to a ruminant in need of protection against infection with Bluetongue virus (BTV). The immunogenically effective amount or the immunogenic amount that inoculates the ruminant can be easily determined or readily titrated by routine testing.

An effective amount is one in which a sufficient immunological response to the vaccine is attained to protect the animal exposed to the virus. Preferably, the animal is protected to an extent in which one to all of the adverse physiological symptoms or effects of the viral disease are significantly reduced, ameliorated or totally prevented.

5 The vaccine or immunogenic composition can be administered in a single dose or in repeated doses. Methods are known in the art for determining or titrating suitable dosages of active antigenic agent based on the weight of the animal, concentration of the antigen and other typical factors.

Desirably, the vaccine or immunogenic composition is administered to a
10 ruminant not yet exposed to the virus. The vaccine containing the whole and twice inactivated virus or other antigenic forms thereof can conveniently be administered intranasally, transdermally (i.e., applied on or at the skin surface for systemic absorption), parenterally, etc. The parenteral route of administration includes, but is not limited to, intramuscular, intravenous, intraperitoneal, intradermal (i.e., injected or
15 otherwise placed under the skin) routes and the like. Since the intramuscular and intradermal routes of inoculation have been successful in other studies using viral infectious DNA clones (E. E. Sparger et al., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," Virology 238:157-160 (1997); L. Willems et al., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," Virology
20 189:775-777 (1992)), these routes are most preferred, in addition to the practical intranasal route of administration.

When administered as a liquid, the present vaccine may be prepared in the form of an aqueous solution, syrup, an elixir, a tincture and the like. Such formulations are known in the art and are typically prepared by dissolution of the antigen and other
25 typical additives in the appropriate carrier or solvent systems. Suitable "physiologically acceptable" carriers or solvents include, but are not limited to, water, saline, ethanol, ethylene glycol, glycerol, etc. Typical additives are, for example, certified dyes, flavors, sweeteners and antimicrobial preservatives such as thimerosal (sodium ethylmercurithiosalicylate). Such solutions may be stabilized, for example, by addition
30 of partially hydrolyzed gelatin, sorbitol or cell culture medium, and may be buffered by conventional methods using reagents known in the art, such as sodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, a mixture thereof, and the like.

Liquid formulations also may include suspensions and emulsions that contain
35 suspending or emulsifying agents in combination with other standard co-formulants.

These types of liquid formulations may be prepared by conventional methods. Suspensions, for example, may be prepared using a colloid mill. Emulsions, for example, may be prepared using a homogenizer.

Parenteral formulations, designed for injection into body fluid systems, require proper isotonicity and pH buffering to the corresponding levels of porcine body fluids. Isotonicity can be appropriately adjusted with sodium chloride and other salts as needed. Suitable solvents, such as ethanol or propylene glycol, can be used to increase the solubility of the ingredients in the formulation and the stability of the liquid preparation. Further additives that can be employed in the present vaccine include, but are not limited to, dextrose, conventional antioxidants and conventional chelating agents such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). Parenteral dosage forms must also be sterilized prior to use.

Adjuvants

The twice inactivated Bluetongue virus may be delivered with an adjuvant. In one embodiment, the vaccine is a whole and twice killed/inactivated BTV, which is administered with an adjuvant. An adjuvant is a substance that increases the immunological response of the animal to the vaccine. The adjuvant may be administered at the same time and at the same site as the vaccine, or at a different time, for example, as a booster. Adjuvants also may advantageously be administered to the ruminant in a manner or at a site different from the manner or site in which the vaccine is administered. Suitable adjuvants include, but are not limited to, aluminum hydroxide (alum), Alhydrogel® (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), immunostimulating complexes (ISCOMS), non-ionic block polymers or copolymers, cytokines (like IL-1, IL-2, IL-7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.), saponins (including Quillaia A; or Quil A ((Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), monophosphoryl lipid A (MLA), muramyl dipeptides (MDP) and the like. Other suitable adjuvants include, for example, aluminum potassium sulfate, heat-labile or heat-stable enterotoxin isolated from Escherichia coli, cholera toxin or the B subunit thereof, diphtheria toxin, tetanus toxin, pertussis toxin, Freund's incomplete or complete adjuvant, etc. Toxin-based adjuvants, such as diphtheria toxin, tetanus toxin and pertussis toxin may be inactivated prior to use, for example, by treatment with formaldehyde. In one embodiment, the vaccine composition is delivered with a combination of at least two adjuvants. In one embodiment, the vaccine composition is delivered with a combination of both aluminum hydroxide (Alhydrogel®) and saponin (Quil A).

Assays for Measuring Immune Responses

The functional outcome of vaccinating a ruminant against BTV can be assessed by suitable assays that monitor induction of cellular or humoral immunity or T cell activity. These assays are known to one skilled in the art, but may include measurement of cytolytic T cell activity using for example, a chromium release assay. Alternatively, T cell proliferative assays may be used as an indication of immune reactivity or lack thereof. In addition, *in vivo* studies can be done to assess the level of protection in a mammal vaccinated against a pathogen using the methods of the present invention. Typical *in vivo* assays may involve vaccinating an animal with an antigen, such as the virus described herein. After waiting for a time sufficient for induction of an antibody or T cell response to occur, generally from about one to two weeks after injection, the animals will be challenged with the antigen, such as either a virus, and amelioration of one or more symptoms associated with the viral infection, or survival of the animals is monitored. A successful vaccination regimen against BTV will result in significant decrease in one or more symptoms associated with the viral infection, or a decrease in viremia, or a decrease in the number or severity of lesions associated with a viral infection, or survival when compared to the non-vaccinated controls. Serum may also be collected to monitor levels of antibodies generated in response to the vaccine injections, as measured by methods known to those skilled in the art.

EXAMPLES

The following examples demonstrate certain aspects of the present invention. However, it is to be understood that these examples are for illustration only and do not purport to be wholly definitive as to conditions and scope of this invention. It should be appreciated that when typical reaction conditions (e.g., temperature, reaction times, etc.) have been given, the conditions both above and below the specified ranges can also be used, though generally less conveniently. All parts and percents referred to herein are on a weight basis and all temperatures are expressed in degrees centigrade unless otherwise specified.

EXAMPLE 1: THE MANUFACTURING PROCESS

GENERAL DESCRIPTION

The manufacturing process is carried out in conditions of sterility, following the instructions of the Standard Manufacturing Method described below. Before the start of the operations defined as aseptic in the Standard Manufacturing Method, the correct operation condition of the air filtration installations and laminar flow cabinets is verified, and it is confirmed that the materials used in the process have been duly sterilized in autoclave or by filtration, or disinfected according to the established methods. Aseptic operations are conducted following established sterile manipulation techniques.

DESCRIPTION OF EACH STEP OF THE MANUFACTURING PROCESS

MANUFACTURING METHOD OF THE FINAL ANTIGEN (PASSAGE 3)

Obtainment of BHK-21 Cell Cultures

The BHK-21 cells (working cell stock or WCS) are stored frozen in liquid nitrogen. The WCS cryotubes are thawed by means of rapid thawing to +37°C and then it is inoculated in a culture flask containing culture medium (MEM-Glasgow + irradiated bovine calf serum).

The culture flask is incubated at +37±1°C. After at least 5 hours from the moment of inoculation, the medium is removed from the flask and new culture medium of the same composition is added, previously brought to a temperature of +37±1°C.

The culture is observed periodically, and its evolution (confluence) and cell morphology are recorded

From this culture flask, in order to obtain the necessary flasks for production, the required subcultures are carried out at intervals of 3-5 days.

Subcultures are carried out by means of trypsinization of the culture with a solution of freshly prepared trypsin; a cell suspension count is done by vital staining (Trypan Blue) in Neubauer chamber. The cell suspension is then diluted in sterile culture medium contained in tanks or flasks, by means of magnetic agitation, and it is distributed in culture flasks.

The culture medium is adjusted to pH 7.2 ± 0.2 at the start of the culture operation in roller flasks.

Once the last culture has been trypsinized and centrifuged, the cell suspension is delivered to the section where antigens are manufactured.

MANUFACTURE OF FINAL ANTIGEN (PASSAGE 3)

Production of passage 2 antigen (inoculum)

For the production of a batch of final antigen (passage 3), the inoculum (passage 2 antigen) is prepared according to the following method:

The working seed virus (WSV) is stored frozen at $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$. From the WSV, 2 passages are done in order to obtain the inoculum. On the first passage a potency control is conducted, and on the second one sterility and potency controls are done after the freezing operation.

Passage 1 antigen (Pre-inoculum)

In one flask with BHK-21 cells at 2-3 days of culture, the culture medium is removed and substituted with infection medium (suspension of WSV in MEM-Glasgow).

The culture is incubated at $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

When the cytopathic effect (CPE) is over 60%, the flask is placed in agitation in order to facilitate cell monolayer detachment, and then frozen at $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$.

Passage 2 antigen (Inoculum)

Passage 1 antigen is diluted in MEM-Glasgow. The culture medium of necessary growth flasks with BHK-21 cells at 2-3 days' culture is removed and substituted with the prepared virus suspension, and then placed in an incubator at $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

When the CPE is over 60%, the flasks are placed in agitation in order to facilitate cell monolayer detachment, and then frozen at $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$.

Culture inoculation, infection and collection of final antigen (passage 3)

MEM-Glasgow, BHK-21 cell suspension from the culture flasks and irradiated bovine calf serum are mixed and homogenized in a sterile container, under agitation.

Once the suspension is homogenized, a cell count is done in a Neubauer chamber.

With this suspension, the necessary flasks are inoculated and incubated at $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

At 2-3 days of culture, the culture medium is removed from each flask and substituted with the infection medium: MEM-Glasgow + passage 2 antigen (inoculum). The infected flasks are then incubated under rotation movement at $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

When CPE is over 60%, the flasks are placed in agitation in order to facilitate cell monolayer detachment, cultures are collected and homogenized, and the pH is verified. If necessary, adjusting with hydrochloric acid is done to obtain a pH of 7.2 ± 0.2 , and the collected final antigen (passage 3) is then inactivated.

5

Culture process characteristics

- Culture is done in roller flasks.
- Cell counts are done in a Neubauer chamber, after the sample has been diluted 1/2 with Trypan Blue.
- 10 - Cultures are incubated at $+37 \pm 1^\circ\text{C}$, turning over 12-14 times per hour.
- The state and evolution of the culture is observed periodically, and cell morphology is observed with an inverted microscope.
- Throughout the manufacturing process of the final antigen (passage 3), environmental controls are carried out in the work rooms by means of taking air samples during rest periods and manufacturing periods, and also exposition and contact plaques are analyzed in order to control the working equipment.
- 15

SAMPLING

20 Passage 1 antigen: Samples are taken of passage 1 antigen for a potency control by the Quality Control Department.

Passage 2 antigen: Samples are taken of passage 2 antigen for potency and sterility controls by the Quality Control Department.

Passage 3 antigen: Samples are taken of passage 3 antigen for potency, sterility and identity controls by the Quality Control Department.

25

MANUFACTURE OF THE INACTIVATED ANTIGEN

The process of inactivation of the final antigen lasts for a total of 72 hours, and the concentration of BEI used is 15 mM.

30 Final antigen is inactivated by adding BEI 0.1M at a proportion of 100 ml per liter of antigen being inactivated (final concentration 10 mM).

After the addition of the BEI, the mixture is homogenized for at least 15 minutes and the pH is verified. After the homogenization process, the mixture is decanted into a sterile container where it is kept in agitation, at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, for 24 hours.

35 After 24 hours, a second inactivation of the final antigen is carried out by means of adding BEI 0.1M at a proportion of 50 ml per liter of antigen being inactivated (final

concentration 5 mM). After the second addition of BEI, the process is repeated under the same conditions as described above for the first addition, but maintaining the mixture in agitation for 48 hours.

5 NEUTRALIZATION OF RESIDUAL BEI

NEUTRALIZATION

Once the inactivation process has been completed, 1M sodium thiosulphate solution is added at the proportion of 5 ml per liter of inactivated antigen (final
10 concentration 5 mM), in order to neutralize the BEI.

After the mixture has been homogenized, the pH is verified. If necessary, an adjustment is done with hydrochloric acid, to obtain a pH of 7.2 ± 0.2 .

15 CALCULATION OF THE THEORETICAL TITER OF THE INACTIVATED AND NEUTRALIZED ANTIGEN

To calculate the theoretical titer of the inactivated and neutralized antigen, the titer of the antigen previous to inactivation and the dilution factor that represent the additions of BEI in the inactivation process and of sodium thiosulphate in the neutralization process are taken into account.

20 For each liter of antigen, 100 ml of a solution of BEI 0.1 M are added to the first inactivation, and an additional 55 ml to the second inactivation. This way, 1000 ml of final antigen become 1155 ml of inactivated antigen. Immediately, in the process of neutralization, 5 ml of a solution of 1M sodium thiosulphate is added per liter of inactivated antigen. This way, the 1155 ml of inactivated antigen become 1161 ml of
25 inactivated and neutralized antigen.

The inactivation and neutralization processes represent a total dilution of final antigen of 1/1.16 (1000 ml of final antigen become 1161 ml of inactivated and neutralized antigen). For this reason, it is considered that antigen with a standard titer previous to inactivation of $10^{7.2}$ TCID₅₀/ml, has a theoretical titer after inactivation and
30 neutralization of $10^{7.2}/1.16$.

SAMPLING

Samples are taken of the inactivated and neutralized antigen for the Quality Control Department, for sterility and inactivation controls.

EXAMPLE 2: ADJUVANT SELECTION ACCORDING TO THE EFFECT ON VIREMIA REDUCTION AFTER CHALLENGE

PRE-IMMUNOGENICITY EXPERIMENT IN 2-MONTH OLD LAMBS

5 Animals were vaccinated by the subcutaneous route (2 mL) and revaccinated 3 weeks later.

10 Animals vaccinated with vaccines A-3, B-3 and C-3 were challenged 7-8 weeks after re-vaccination (challenge dose = 10^7 TCID₅₀ of live virus / animal). None of the challenged animals were protected. However, a viremia reduction was observed only in animals vaccinated with Alhydrogel (aluminium hydroxide) and Quil-A (saponin) as adjuvant.

TABLE 1. BTV PRE-IMMUNO VACCINES COMPOSITION

*Inactivated BTV (TCID ₅₀ /ml)	Adjuvant	Batch
10^6		A-1
$10^{6.7}$ (5×10^6)	Alhydrogel/Quil-A (2 mg Al ²⁺ /dose)	A-2
10^7		A-3
10^6		B-1
$10^{6.7}$ (5×10^6)	SL-CD adjuvant 20%	B-2
10^7		B-3
10^6		C-1
$10^{6.7}$ (5×10^6)	SP oil 5%	C-2
10^7		C-3

15 *Cell culture supernatant. Total inactivation process 144h [(10 mM BEI x 72h) x 2]

20

25

30

ANTIBODY RESPONSE AFTER VACCINATION

5 **TABLE 2. PERCENTAGE OF POSITIVE ANIMALS (ELISA TEST)**

GROUP	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	Control
No. ANIMALS	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%

*Blocking ELISA using a VP7 specific MAb

WPV = Weeks post-vaccination

WPRV =

Weeks post-revaccination

10

CHALLENGE RESULTS

Animals vaccinated with batches A-3, B-3 and C-3 were challenged (5 animals of each group) at 7-8 weeks after re-vaccination. Two non-vaccinated controls were also challenged.

15

Bluetongue virus (BTV) was detected in blood samples by a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay performed in the Laboratorio Central de Veterinaria (Algete, Spain). (Miguel Angel Jiménez-Clavero *et al.* (2006). J Vet Diagn Invest 18:7-17). Blood samples were taken at 4 and 7 days after infection (D+4 p.i. and D+7 p.i.). Blood samples treatment, total nucleic acid extraction following a 96-well nucleic acid extraction method and real-time RT-PCR, were performed as described by Miguel Angel Jiménez-Clavero *et al.*, 2006 (J. Vet. Diagn. Invest. 18:7-17). For the PCR analysis the threshold cycle was provided (Ct). Samples were considered positive for BTV if they yielded Ct values lower than 36. Samples that yielded Ct values between 36 and 40 were considered uncertain.

25

31

Ct = Threshold cycle		Ct results interpretation:	
SD= Standard deviation	TC<36	Positive	(Detection of virus)
CV%= Coefficient of variation	36<TC<40	Uncertain	
Group A3	10 ⁷ TCID ₅₀ of BtiV/Dose - Adjuvant: Alhydrogel/Quil-A		
Group B3	10 ⁷ TCID ₅₀ of BtiV/Dose - Adjuvant: SL-CD		
Group C3	10 ⁷ TCID ₅₀ of BtiV/Dose - Adjuvant: SP oil		
Group Cont	Control group (non-vaccinated)		

5

Table 3

Real-time fluorogenic RT-PCR results at 4 days post-challenge (D+4 p.i.)			
		(Blood samples)	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
A3	179	37,12	Uncertain
A3	190	32,24	Positive
A3	198	30,33	Positive
A3	211	30,30	Positive
A3	219	29,87	Positive
TC Mean		31,97	
SD		3,02	
CV%		9,45	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
B3	183	28,24	Positive
B3	206	27,94	Positive
B3	223	29,07	Positive
B3	243	27,47	Positive
TC Mean		28,18	
SD		0,67	
CV%		2,39	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
C3	162	30,15	Positive
C3	174	26,15	Positive
C3	175	30,67	Positive
C3	241	30,07	Positive

C3	254	29,27	Positive
TC Mean		29,26	
SD		1,81	
CV%		6,19	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
Cont.	225	31,67	Positive
TC Mean		31,67	
SD		-	
CV%		-	

Ref. FDV= Reference number of the animal

Table 4

Real-time fluorogenic RT-PCR results at 7 days post-challenge (D+7 p.i.)			
		(Blood samples)	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
A3	179	32,99	Positive
A3	190	29,21	Positive
A3	198	-	Negative
A3	211	31,7	Positive
A3	219	28,66	Positive
TC Mean		30,64	
SD		2,05	
CV%		6,69	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
B3	183	26,62	Positive
B3	206	31,17	Positive
B3	223	26,88	Positive
B3	243	26,94	Positive
TC Mean		27,90	
SD		2,18	
CV%		7,82	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
C3	162	29,61	Positive
C3	174	27,12	Positive
C3	175	-	Negative
C3	241	29,86	Positive



C3	254	28,26	Positive
TC Mean		28,71	
SD		1,27	
CV%		4,43	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
Cont.		-	
Cont.	225	29,02	Positive
TC Mean		29,02	
SD		-	
CV%		-	

Ref. FDV= Reference number of the animal

5 For comparison between vaccinated and non-vaccinated animals taking into
account real-time RT-PCR results, the mean Ct from the control group were subtracted
from the mean Ct from each of the different vaccinated groups. (Miguel Angel Jiménez-
Clavero *et al.* (2006)). J Vet Diagn Invest 18:7-17) demonstrated that the detection
10 achieved by the real-time RT-PCR assay showed a linear relationship between signal
and the quantity of viral RNA present in the sample (equivalent TCID₅₀ infectious units
per milliliter) on a log scale (correlation coefficient of 0.9948, and a slope of -3.334).
For that reason, the Ct mean difference between each vaccinated group and the
control group was divided by 3.334 and the log of the resultant number was calculated.

15

20

25

Table 5

Comparison between vaccinated and non-vaccinated animals according to the real-time RT-PCR results at 4 days post-challenge (D+4 p.i.)			
Group	Ct Mean/Group	SD	CV
A3	31,97	3,02	9,45
B3	28,18	0,67	2,39
C3	29,26	1,81	6,19
Control	31,67	-	-
Ct differences	Ct differences	Ct dif / 3,334	log (Ct dif / 3,334)
A3-Control	0,30	0,09	1,23
B3-Control	-3,49	-1,05	0,09
C3-Control	-2,41	-0,72	0,19
Comparison between vaccinated and non-vaccinated animals according to the real-time RT-PCR results at 7 days post-challenge (D+7 p.i.)			
Group	Ct Mean/Group	SD	CV
A3	30,64	2,05	6,69
B3	27,90	2,18	7,82
C3	28,71	1,27	4,43
Control	29,02		
Ct differences	Ct differences	Ct dif / 3,334	log (Ct dif / 3,334)
A3-Control	1,62	0,49	3,06
B3-Control	-1,12	-0,34	0,46
C3-Control	-0,31	-0,09	0,81

CONCLUSIONS

5 The calculated numbers [$\log (\text{Ct dif}/3,334)$] express the relationship between control and vaccinated groups. At 7 days post-challenge:

1. Animals vaccinated with the adjuvant Alhydrogel and Quil-A had 3-fold less virus in blood than the control group (there are data of only 1 non-vaccinated animal)
2. Animals vaccinated with SP-oil or SL-CD adjuvant did not show any viremia reduction in comparison with the control group (there are data of only 1 non-vaccinated animal)

3. Alhydrogel (aluminium hydroxide) and Quil-A (saponin) is a better adjuvant than SP-oil or SLCD

EXAMPLE 3: ANTIGEN CONCENTRATION EFFECT ON VIREMIA REDUCTION

5 PRE-IMMUNOGENICITY EXPERIMENT IN 2-MONTH OLD LAMBS

Animals were vaccinated by the subcutaneous route (2 mL) and revaccinated 3 weeks later.

Animals vaccinated with vaccines A-1, A-2 and A-3 were challenged 5-6 weeks after re-vaccination (challenge dose = 10^7 TCID₅₀ of live virus / animal). None of the
10 challenged animals were protected. However, a viremia antigen dose dependent reduction was observed.

TABLE 6. BTV PRE-IMMUNO VACCINES COMPOSITION

*Inactivated BTV (TCID ₅₀ /ml)	Adjuvant	Batch
10^6	Alhydrogel/Quil-A (2 mg Al ²⁺ /dose)	A-1
$10^{6.7}$ (5×10^6)		A-2
10^7		A-3
10^6	SL-CD adjuvant 20%	B-1
$10^{6.7}$ (5×10^6)		B-2
10^7		B-3
10^6	SP oil 5%	C-1
$10^{6.7}$ (5×10^6)		C-2
10^7		C-3

15 *Cell culture supernatant. Total inactivation process 144h [(10 mM BEI x 72h) x 2]

20

25

30

36

5 **ANTIBODY RESPONSE AFTER VACCINATION****TABLE 7. PERCENTAGE OF POSITIVE ANIMALS (ELISA TEST)**

GROUP	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	Control
No. ANIMALS	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%

10 *Blocking ELISA using a VP7 specific MAb
 WPV = Weeks post-vaccination WPRV = Weeks post-revaccination

15 **CHALLENGE RESULTS**

Animals vaccinated with batches A-1, A-2 and A-3 were challenged (5 animals of each group) at 5-6 weeks after re-vaccination. Two non-vaccinated controls were also challenged.

20 Bluetongue virus (BTV) was detected in blood samples by a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay performed in the Laboratorio Central de Veterinaria (Algete, Spain). (Miguel Angel Jiménez-Clavero *et al.* (2006). J Vet Diagn Invest 18:7-17). Blood samples were taken at 3 and 5 days after infection (D+3 p.i. and D+5 p.i.). Blood samples treatment, total nucleic acid extraction following a 96-well nucleic acid extraction method and real-time RT-PCR, were performed as
 25 described by Miguel Angel Jiménez-Clavero *et al.*, 2006 (J. Vet. Diagn. Invest. 18:7-17). For the PCR analysis the threshold cycle was provided (Ct). Samples were were

considered positive for BTV if they yielded Ct values lower than 36. Samples that yielded Ct values between 36 and 40 were considered uncertain.

Ct = Threshold cycle		Ct results interpretation:	
SD= Standard deviation		TC<36	Positive
CV%= Coefficient of variation		36<TC<40	Uncertain
Group A1	10 ⁶ TCID ₅₀ of BTiV/Dose - Adjuvant: Alhydrogel/Quil-A		
Group A2	10 ^{6.7} TCID ₅₀ of BTiV/Dose - Adjuvant: Alhydrogel/Quil-A		
Group A3	10 ⁷ TCID ₅₀ of BTiV/Dose - Adjuvant: Alhydrogel/Quil-A		
Group Cont	Control group (non-vaccinated)		

5

Table 8

Real-time fluorogenic RT-PCR results at 3 days post-challenge (D+3 p.i.)			
(Blood samples)			
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
A1	155	36,68	Uncertain
A1	167	35,11	Positive
A1	202	37,68	Uncertain
A1	232	33,46	Positive
A1	246	36,20	Uncertain
TC Mean		35,83	
SD		1,61	
CV%		4,50	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
A2	224	-	Negative
A2	233	37,96	Uncertain
A2	255	35,04	Positive
A2	257	-	Negative
A2	259	38,76	Uncertain
TC Mean		37,25	
SD		1,96	
CV%		5,26	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
A3	210	35,79	Positive
A3	220	37,56	Uncertain

A3	245	36,03	Uncertain
A3	251	37,65	Uncertain
A3	260	34,45	Positive
TC Mean		36,30	
SD		1,34	
CV%		3,69	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
Cont.	203	33,10	Positive
Cont.	208	38,85	Uncertain
TC Mean		35,98	
SD		18,86	
CV%		52,43	

Ref. FDV= Reference number of the animal

5

Table 9

Real-time fluorogenic RT-PCR results at 5 days post-challenge (D+5 p.i.)			
(Blood samples)			
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
A1	155	28,54	Positive
A1	167	31,85	Positive
A1	202	27,72	Positive
A1	232	29,04	Positive
A1	246	26,12	Positive
TC Mean		28,65	
SD		2,10	
CV%		7,34	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
A2	224	30,63	Positive
A2	233	26,46	Positive
A2	255	28,04	Positive
A2	257	35,96	Positive
A2	259	30,20	Positive
TC Mean		30,26	
SD		3,61	
CV%		11,92	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation

A3	210	28,83	Positive
A3	220	30,82	Positive
A3	245	32,31	Positive
A3	251	36,04	Positive
A3	260	28,90	Positive
TC Mean		31,38	
SD		2,98	
CV%		9,50	
Group	Ref. FDV	Ct	Interpretation
Cont.	203	26,73	Positive
Cont.	208	28,55	Positive
TC Mean		27,64	
SD		10,51	
CV%		38,03	

Ref. FDV= Reference number of the animal

For comparison between vaccinated and non-vaccinated animals taking into account real-time RT-PCR results, the mean Ct from the control group were subtracted from the mean Ct from each of the different vaccinated groups. Miguel Angel Jiménez-Clavero *et al.* (2006). J Vet Diagn Invest 18:7–17) demonstrated that the detection achieved by the real-time RT-PCR assay showed a linear relationship between signal and the quantity of viral RNA present in the sample (equivalent TCID₅₀ infectious units per milliliter) on a log scale (correlation coefficient of 0.9948, and a slope of -3.334). For that reason, the Ct mean difference between each vaccinated group and the control group was divided by 3.334 and the log of the resultant number was calculated.

Table 10

Comparison between vaccinated and non-vaccinated animals
according to the real-time RT-PCR results at 3 days post-challenge (D+3 p.i.)

Group	Ct Mean/Group	SD	CV
A1	35,83	1,61	4,50
A2	37,25	1,96	5,26
A3	36,30	1,34	3,69
Cont.	35,98	18,86	52,43
Ct differences	Ct differences	Ct dif / 3,334	log (Ct dif / 3,334)
A1-Cont	-0,15	-0,04	0,90
A2-Cont	1,27	0,38	2,40
A3-Cont	0,32	0,10	1,25

Table 11

Comparison between vaccinated and non-vaccinated animals
according to the real-time RT-PCR results at 5 days post-challenge (D+5 p.i.)

Group	Ct Mean/Group	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
Ct differences	Ct differences	Ct dif / 3,334	log (Ct dif / 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

CONCLUSIONS

The calculated numbers $[\log (\text{Ct dif}/3,334)]$ express the relationship between control and vaccinated groups. At 5 days post-challenge:

1. Animals vaccinated with $10^6 \text{TCID}_{50}/\text{dose}$ had 2-fold less virus in blood than the control group (non-vaccinated animals)
2. Animals vaccinated with $10^{6.7} \text{TCID}_{50}/\text{dose}$ had 6-fold less virus in blood than the control group (non-vaccinated animals)
3. Animals vaccinated with $10^7 \text{TCID}_{50}/\text{dose}$ had 13-fold less virus in blood than the control group (non-vaccinated animals)

EXAMPLE 4: ADJUVANT AND DOSE COMPOSITION**IMMUNOGENICITY EXPERIMENT IN 1-MONTH OLD LAMBS**

5 Animals were vaccinated by subcutaneous route (2 mL) and revaccinated 3 weeks later.

Animals vaccinated with vaccines K1, K2, K6 and K8 were challenged 3-4 weeks after re-vaccination (challenge dose = 10^7 TCID₅₀ of live virus / animal). Only animals vaccinated with vaccines K1 and K2 were protected.

10

Table 12. BTV PRE-IMMUNO VACCINES BATCH K COMPOSITION

*Vaccine Batch	TCID ₅₀ (2 mL dose)	ADJUVANT CONCENTRATION (2 mL dose)	LAMBS	SEPT 06 CHALLENGE
K1	3×10^6	4 mg Al ³⁺ 0.4mg Quil-A	7	7
K2	1×10^7	4 mg Al ³⁺ 0.4mg Quil-A	10	5
K3	3×10^6	SP-Oil 5%	7	-
K4	1×10^7	SP-Oil 5%	10	-
K5	3×10^6	Montanide™ ISA 206 50%	7	-
K6	1×10^7	Montanide™ ISA 206 50%	10	-
K7	3×10^6	Montanide™ ISA 207 50%	7	7
K8	1×10^7	Montanide™ ISA 207 50%	10	5
K9	1×10^7	Drakeol 5- Arlacel 83V 60%	10	-
Non vaccinated	-	-	12	5

15

- BTVi antigen: Complete culture, total inactivation process 72h (10 mM BEI x 24h + 5 mM BEI x 48 h)

20

5

ANTIBODY RESPONSE AFTER VACCINATION
Table 13. *ELISA serological results

Vaccine Batch	TCID₅₀ (2 mL dose)	ADJUVANT CONCENTRATION (2 mL dose)	LAMBS	ELISA D+35 (2 WPRV) (% positives)
K1	3×10^6	4 mg Al ³⁺ 0.4mg Quil-A	7	<u>86%</u> (+1 doubtful)
K2	1×10^7	4 mg Al ³⁺ 0.4mg Quil-A	10	<u>90%</u> (+1 doubtful)
K3	3×10^6	SP-Oil 5%	7	<u>14%</u> (+1 doubtful)
K4	1×10^7	SP-Oil 5%	10	<u>20%</u>
K5	3×10^6	Montanide™ ISA 206 50%	7	<u>86%</u>
K6	1×10^7	Montanide™ ISA 206 50%	10	<u>80%</u> (+1 doubtful)
K7	3×10^6	Montanide™ ISA 207 50%	7	<u>56%</u> (+2 doubtful)
K8	1×10^7	Montanide™ ISA 207 50%	10	<u>60%</u> (+1 doubtful)
K9	1×10^7	Drakeol 5- Arlancel 83V 60%	10	<u>20%</u> (+3 doubtful)
Non vaccinated	-	-	12	0%

10

*Blocking ELISA using a VP7 specific MAb
WPRV = Weeks post-revaccination

15

Table 14. *Seroneutralization (SN) test results

Vaccine Batch ⁽¹⁾	ADJUVANT/ 2 mL dose	LAMB	D+42/45		Vaccine Batch ⁽¹⁾	ADJUVANT/ 2 mL dose	LAMB	D+42/45	
			3- 4WPRV 100% 90%					3- 4WPRV 100% 90%	
K1 3 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /2 mL dose	4 mg Al ³⁺ 0.4 mg Quil- A	9	<2/2	4	K2 1 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /2 mL dose	4 mg Al ³⁺ 0.4 mg 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
		29	2	2			73	<2	4
							75	<2-2	4
							79	2	4
							84	<2-2	8
K7 3 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /2 mL dose	Montanide™ ISA 207 50%	2	<2	8- 16	K8 1 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /2 mL dose	Montanide™ ISA 207 50%	34	4	
		3	<2	<2			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	
Control	-	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					

In bold and italics: Challenged animals bled at 45 days post-revaccination

- 5 * SN test: Based on the SN test in Vero cells described by the OIE with small modifications. The objective of the technique is to determine the highest sera dilution that is able to block the infection of 100 TCID₅₀ of BTV in Vero cells. Two lectures were done: considering a 100% of cytopathic effect reduction and a 90% of cytopathic effect reduction.

CHALLENGE

According to ELISA results, vaccines formulated with SP-oil and Drakeol were not considered for a challenge. Based on safety results from previous experiments, vaccines formulated with Montanide™ ISA 206 were also discarded.

Lambs vaccinated with batches K1, K2, K7 and K8 were challenged at 24 days after re-vaccination. A group of 5 non-vaccinated controls were included.

Table 15. Challenge results

Vaccine Batch	TCID ₅₀ (2 mL dose)	ADJUVANT CONCENTRATION (2 mL dose)	NO. CHALLENGED ANIMALS	% ANIMALS SHOWING VIREMIA
K1	3 x 10 ⁶	4 mg Al ³⁺ 0.4mg Quil-A	7	*14%
K2	1 x 10 ⁷	4 mg Al ³⁺ 0.4mg Quil-A	5	0%
K3	3 x 10 ⁶	SP-Oil 5%	-	-
K4	1 x 10 ⁷	SP-Oil 5%	-	-
K5	3 x 10 ⁶	Montanide™ ISA 206 50%	-	-
K6	1 x 10 ⁷	Montanide™ ISA 206 50%	-	-
K7	3 x 10 ⁶	Montanide™ ISA 207 50%	7	71%
K8	1 x 10 ⁷	Montanide™ ISA 207 50%	5	80%
K9	1 x 10 ⁷	Drakeol 5- Arlacel 83V 60%	-	-
Non vaccinated	-	-	5	80%

Bluetongue virus (BTV) was detected in blood samples by a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

*2 consecutive non conclusive results

CONCLUSIONS

The only vaccine able to prevent viremia was batch K2 formulated with 1 x 10⁷ TCID₅₀/dose and Alhydrogel and Quil-A as adjuvant. Viremia was detectable in only 1

out of 5 animals vaccinated with batch K1 formulated with the same adjuvant but with a lower antigen concentration (3×10^6 TCID₅₀/dose).

Results obtained with vaccines batches K7 and K8 formulated with Montanide™ ISA 206 (Seppic) were not satisfactory.

- 5 No challenge results are available for Montanide™ ISA 207 (Seppic) showing similar serological results.

EXAMPLE 5. FINAL VACCINE COMPOSITION

10 Table 16

Ingredients	Quantity / ml	Function	Reference to the standards
Active substances			
Inactivated and neutralized Bluetongue Virus (VLAi), minimum	1.5×10^6 TCID ₅₀	Antigen	Internal monograph
Adjuvant components:			
Alhydrogel 2%	192.6 mg (2 mg Al ³⁺)	Adjuvant	Internal monograph
Quil-A	200 µg	Adjuvant	Internal monograph
Excipient components:			
Thiomersal	0.1 mg	Preservative	Ph. Eur. Monograph n°1625, Current edition
Saline solution	qs 1 ml	Diluent/excipient	Internal monograph

What is claimed is:

- 5 1. A composition for eliciting an immune response against Bluetongue virus (BTV) in an animal, the composition comprising an immunogenically effective amount of at least one strain of a twice inactivated Bluetongue virus and a biologically acceptable adjuvant.
- 10 2. The composition of claim 1, wherein the twice inactivated BTV is inactivated a first time with an inactivating agent at a concentration of about 10 mM and inactivated a second time with an inactivating agent at a concentration of about 5 mM.
- 15 3. The composition of either of claims 1 or 2, wherein the inactivating agent is binary ethyleneimine (BEI).
4. The composition of claim 1, wherein the strain is serotype 4.
- 20 5. The composition of any of claims 1-4, wherein the composition is a vaccine composition or an immunogenic composition.
6. The composition of any of claims 1-5, wherein the animal is a ruminant selected from the group consisting of sheep, lambs, goats, cattle and deer.
- 25 7. The composition of claim 6, wherein the ruminant is a sheep or lamb.
8. The composition of any of claims 1-7, wherein the biologically acceptable adjuvant is selected from the group consisting of one or more of aluminum hydroxide, saponin, SL-CD, Carbopol and SP-Oil.
- 30 9. The composition of claim 8, wherein the biologically acceptable adjuvant comprises a mixture of aluminum hydroxide and saponin.
10. The composition of claim 9, wherein the aluminum hydroxide is present at a concentration of between about 1% and about 10%.

11. The composition of claim 10, wherein the aluminum hydroxide is present at a concentration of between about 2% and about 5%.
- 5 12. The composition of claim 11, wherein the aluminum hydroxide is present at a concentration of about 3%.
- 10 13. The composition of any of claims 1-12, wherein the immune response elicited protects an animal against infection with, or reduces the severity of at least one symptom associated with an infection by a pathogenic strain of Bluetongue virus.
- 15 14. A method for enhancing the immune response in an animal to Bluetongue virus, or for preventing or reducing at least one symptom associated with the disease, the method comprising the step of administering a single or multiple doses of the composition of any of claims 1-13.
- 20 15. The method of claim 14, wherein the animal is a ruminant selected from the group consisting of sheep, lambs, goats, cattle and deer.
- 25 16. The method of claim 15, wherein the ruminant is a sheep or lamb.
- 30 17. The method of any of claims 14-16, wherein the step of administering is achieved by parenteral administration.
18. The method of claim 17, wherein the parenteral administration step is achieved by intramuscular injection.
19. The method of any of claims 14-16, wherein the step of administering is achieved by oral administration.
20. The method of claim 19, wherein the oral administration step is achieved by hand delivery or mass application.

21. A method of preventing or ameliorating an outbreak of Bluetongue virus, which comprises the step of administering to an animal a composition of any one of claims 1-13.

5 22. The method of claim 21, wherein the animal is a ruminant selected from the group consisting of sheep, lambs, goats, cattle and deer.

23. The method of claim 22, wherein the ruminant is a sheep or a lamb.

10 24. The method of either of claims 22 or 23, wherein the step of administering is achieved by parenteral administration.

25. The method of claim 24, wherein the parenteral administration step is achieved by intramuscular injection.

15 26. The method of any of claims 21-23, wherein the step of administering is achieved by oral administration.

20 27. The method of claim 26, wherein the oral administration step is achieved by hand delivery or mass application.

28. A method of producing inactivated whole Bluetongue virus (BTV), the method comprising the steps of:

- 25 a) treating the BTV with an inactivating agent using a 1:10 ratio of inactivating agent to BTV;
- b) homogenizing the inactivating agent/BTV mixture of step a) for at least 15 minutes;
- c) decanting the mixture of step b) into a sterile container and agitating the mixture for about 24 hours;
- 30 d) treating the BTV a second time with an inactivating agent using a 1:20 ratio of inactivating agent to BTV;
- e) homogenizing the inactivating agent/BTV mixture of step d) for at least 15 minutes;
- 35 f) decanting the mixture of step e) into a sterile container and agitating the mixture for about 48 hours; and

g) neutralizing the inactivating agent to adjust the final pH to about 7.2;
wherein the method results in inactivation of the BTV while maintaining the immunogenicity of the BTV.

5 29. The method of claim 28, wherein the inactivating agent is binary ethyleneimine (BEI).

10 30. The method of either of claims 28 or 29, wherein the final concentration of inactivating agent in step a) is about 10 mM.

31. The method of either of claims 28 or 29, wherein the final concentration of inactivating agent in step d) is about 5 mM.

15 32. The method of any of claims 28-31, wherein the whole Bluetongue virus is serotype 4.



VACUNA DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL Y COMPOSICIONES
INMUNOGÉNICAS, PROCEDIMIENTOS DE USO Y PROCEDIMIENTOS DE
PRODUCCIÓN DE LA MISMA

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a una vacuna o composición inmunogénica para inmunizar rumiantes contra cepas o serotipos patógenos del virus de la lengua azul (VLA) y a un procedimiento para preparar la vacuna e inmunizar a rumiantes con estas composiciones.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La lengua azul, una enfermedad viral transmitida por artrópodos, aparece en bovinos, ovejas, cabras y rumiantes salvajes. Las lesiones de la lengua azul en animales afectados se parecen a las de la diarrea por el virus infeccioso bovino, virus de la estomatitis vesicular, fiebre catarral maligna, estomatitis micótica, peste bovina, fotosensibilización y enfermedad de pie y boca. Al virus de la lengua azul (VLA) se le ha incriminado como una causa de hidranencefalia en bovinos y de infertilidad, aborto y nacimiento de crías defectuosas en bovinos y ovejas. En la bibliografía se describen veinticuatro serotipos como causantes de problemas que varían desde infección no aparente hasta infección fulminante aguda. También se ha reconocido el desprendimiento de virus persistentes, crónico, en bovinos. Con el VLA existe una notable pérdida de la condición corporal y puede retrasarse la comercialización de los animales destinados al matadero. En ovejas infectadas por VLA, el crecimiento de la lana puede verse afectado por el desarrollo de aberturas en la lana que producen una lana defectuosa o de bajo rendimiento.

51

La notable debilidad después de infecciones por VLA puede dar como resultado una disminución de la resistencia a infecciones secundarias por bacterias o clamidias y otros factores agresivos. La eficacia reproductora de los animales infectados también se ve afectada de manera adversa.

5 En animales infectados se observan abortos y descendencia defectuosa y algunos animales pueden ser estériles durante una o más estaciones reproductoras. El daño más significativo causado por infecciones de la lengua azul es la pérdida económica debida a las prohibiciones y los rigurosos requisitos de ensayo impuestos a los productores que exportan bovinos, semen
10 bovino y ovejas de áreas endémicas de la lengua azul.

En condiciones naturales, la transmisión del virus se produce mediante las picaduras de al menos cuatro especies del género Culicoides, por ejemplo, jejenes y mosquitos. La transmisión biológica del VLA entre bovinos y ovejas por el mismo vector culicoide se ha demostrado experimentalmente (Luedke y
15 col, 28 AJVR 457 (1967)). Bovinos, ovejas y muchas especies de rumiantes salvajes pueden actuar como depósitos del VLA produciendo un medio para que el virus hiberne. En bovinos se ha identificado una viremia de VLA persistente, que puede durar hasta tres años (Hourrigan, 51 Aust V y J 170 (1975)). Una vez que el VLA se establece en un país, es prácticamente
20 imposible erradicar el virus (Erasmus, 51 Aust Vet y J 209). El agente etiológico de la lengua azul pertenece a la familia Reoviridae, género Orbivirus.

La etiología viral de la lengua azul se estableció por Theiler en 1906, (Erasmus, 51 Aust Vet J 165 (1975)). Desde entonces han aparecido diversos informes en la bibliografía que (a) confirman el aislamiento del virus de la
25 lengua azul a partir de bovinos, ovejas, cabras y varios rumiantes salvajes y (b)

SV

las características clínicas y patológicas de las enfermedades de la lengua azul y (c) describen infecciones que resultan de diferentes serotipos del VLA. 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 y col, 111 J Exp 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 lengua azul en los Estados Unidos se consiguió por primera vez por McKercher y col 118 AJVR 310 (1975), con una vacuna Internacional del VLA del serotipo 10 desarrollada en huevos fértiles de gallina. Este producto se diseñó después del de Alexander (J V y Sci Indus 231 (1947)), que fue el primero que tuvo éxito en propagar el virus de la lengua azul en embriones de pollo.

Los primeros protocolos de vacunación se realizaron rutinariamente en Sudáfrica e Israel usando una vacuna del virus vivo polivalente atenuada en huevo que contenía varias cepas de lengua azul. Se ha retirado del mercado una vacuna adaptada en huevo producida por Cutter Laboratories y usada en los Estados Unidos debido a reacciones graves en ovejas vacunadas. Posteriormente, Kemeny y Drehle, 22 AJVR 921 (1961), adaptaron el tipo 10 Internacional del VLA de huevos a cultivos de células de riñón bovino. Esta vacuna de virus vivo modificada, producida por Colorado FERUM Company, se usa para ovejas en los Estados Unidos.

Existe la necesidad de mejoras en el desarrollo de vacunas para su uso en inmunización de rumiantes, en particular, ovejas y corderos, contra el virus de la lengua azul. La presente invención trata esta necesidad. La cita de cualquier referencia en el presente documento no debe considerarse una

S3

admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior para la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que los virus
5 de la lengua azul pueden inactivarse dos veces usando los procedimientos
descritos en el presente documento, y estos virus inactivados dos veces
pueden usarse en la preparación de composiciones de vacunas e
inmunogénicas para inmunizar rumiantes contra diversas cepas y serotipos
patógenos del VLA. Además, se ha determinado que combinaciones
10 particulares de adyuvantes y excipientes son eficaces para su uso en las
composiciones de la invención para provocar una respuesta inmune eficaz en
los rumiantes a los que se administran las composiciones.

Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona una
composición para provocar una respuesta inmune contra el virus de la lengua
15 azul (VLA) 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 una realización, el VLA inactivado dos veces usado en las
composiciones se inactiva una primera vez con un agente inactivante a una
20 concentración de aproximadamente 10 mM y se inactiva una segunda vez con
un agente inactivante a una concentración de aproximadamente 5 mM.

En una realización, el agente inactivante usado para tratar el VLA para
su uso en las composiciones es etilenimina binaria (EIB).

En una realización, la composición comprende una cepa del VLA que es
25 de serotipo 4.

54

En una realización, la composición es una composición de vacuna o una composición inmunogénica.

En una realización, el animal a tratar con la composición es un rumiante seleccionado del grupo constituido por ovejas, corderos, cabras, bovinos y
5 ciervos.

En una realización, el animal a tratar con la composición es una oveja o cordero.

En una realización, el adyuvante biológicamente aceptable a usar con la composición se selecciona del grupo constituido por uno o más de hidróxido de
10 aluminio, saponina, SL-CD, Carbopol y SP-Oil.

En una realización, el adyuvante biológicamente aceptable a usar con la composición comprende una mezcla de hidróxido de aluminio y saponina. En una realización, el hidróxido de aluminio está presente a una concentración de entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 10 %. En una
15 realización, el hidróxido de aluminio está presente a una concentración de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 5 %. En una realización, el hidróxido de aluminio está presente a una concentración de aproximadamente el 3 %.

En una realización, la respuesta inmune provocada con las
20 composiciones de la invención protege a un animal contra 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 inmune en un animal contra el virus de la lengua azul, o
25 para prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad,



comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una sola o múltiples dosis de la composición de la invención, como se describe anteriormente.

En una realización, los procedimientos para potenciar la respuesta inmune en un animal contra el virus de la lengua azul o para prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad son útiles para conseguir dicho efecto en un rumiante seleccionado del grupo constituido por ovejas, corderos, cabras, bovinos y ciervos. En una realización, el rumiante es una oveja o un cordero.

En una realización, los procedimientos para potenciar la respuesta inmune en un animal contra el virus de la lengua azul o para prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad proporciona la etapa de administrar las composiciones por administración parenteral. La etapa de administración parenteral puede conseguirse por inyección intramuscular.

En una realización, los procedimientos para potenciar la respuesta inmune en un animal contra el virus de la lengua azul, o para prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad proporcionan la etapa de administrar las composiciones por administración oral, que puede conseguirse por suministro manual o aplicación masiva.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un procedimiento para prevenir 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 de prevención o mejora de un brote del virus de la lengua azul proporciona el tratamiento de un animal que es un animal rumiante seleccionado del grupo constituido por ovejas, corderos,

cabras, bovinos y ciervos. En una realización, el rumiante es una oveja o un cordero.

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

En una realización, el procedimiento de prevención o mejora de un brote del virus de la lengua azul proporciona la etapa de administrar las composiciones de la invención por administración oral. La etapa de administración oral puede conseguirse por suministro manual o aplicación masiva.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un procedimiento de producción del virus de la lengua azul (VLA) completo inactivado, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- a) tratar el VLA con un agente inactivante usando una proporción 1:10 de agente inactivante con respecto al VLA;
- b) homogeneizar la mezcla de agente inactivante/VLA 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 VLA una segunda vez con un agente inactivante usando una proporción 1:20 de agente inactivante frente a VLA;
- e) homogeneizar la mezcla de agente inactivante/VLA 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;

5 en el que el procedimiento da como resultado la inactivación del VLA manteniendo al mismo tiempo la inmunogenicidad del VLA.

En una realización, el procedimiento para preparar el VLA inactivado dos veces, como se describe anteriormente, proporciona el uso de etileneimina binaria (EIB) como un agente inactivante. En una realización, la concentración
10 final de agente inactivante en la etapa a), como se ha indicado anteriormente, es de aproximadamente 10 mM. En una realización, la concentración final de agente inactivante de la etapa d), como se ha indicado anteriormente, es de aproximadamente 5 mM.

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Antes de describir los procedimientos y la metodología del tratamiento, debe entenderse que la presente invención no se limita a procedimientos
25 particulares, y las condiciones experimentales descritas, así como dichos

56

procedimientos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene la finalidad de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitante.

Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dictamine claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de esta divulgación, y así sucesivamente.

Por consiguiente, en la presente solicitud, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro de la destreza en la técnica. Dichas técnicas se explican con detalle en la bibliografía. 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 este 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).

Aunque en la práctica o ensayo de la invención puede usarse cualquier procedimiento y material similares o equivalentes a los descritos en el presente

documento, a continuación se describen los materiales y procedimientos preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

Definiciones

- 5 Los términos usados en el presente documento tienen los significados reconocidos y conocidos por los expertos en la materia, sin embargo, por comodidad y mayor detalle, a continuación se exponen los términos particulares y sus significados.

- 10 La expresión "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Dicho intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, típicamente dentro del 50 %, más típicamente dentro del 20 %, más típicamente aún dentro del 10 % y aún más típicamente dentro del 5 % de un valor o intervalo determinado. La variación admisible incluida en la expresión "alrededor de" o "aproximadamente" depende del
- 15 sistema particular sometido a estudio, y un experto en la materia puede apreciarlo fácilmente.

- "Adyuvante" significa una composición que comprende una o más sustancias que potencian la inmunogenicidad de un antígeno en una composición, típicamente una composición de vacuna. Un adyuvante puede
- 20 servir como un depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfoide que potencia de manera no específica la respuesta inmune (Hood, y col., *Immunology, Second Ed.*, Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984. p. 384). A menudo, una vacunación primaria con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, fracasará para provocar una
- 25 respuesta inmune humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, pero sin



limitación, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o de hidrocarburos, hemocianinas de lapa californiana y adyuvantes humanos potencialmente útiles 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-hidroxifosforiloxi)-etilamina, BCG (*bacilo 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.

Los adyuvantes empleados en las composiciones descritas en el presente documento son típicamente "adyuvantes biológicamente aceptables" y, por tanto, pueden usarse en combinación con un VLA inactivado, de manera que las composiciones resultantes pueden administrarse *in vivo* sin toxicidad concomitante para un animal. En el presente documento se ejemplifican composiciones que incluyen el VLA inactivado dos veces en combinación con uno o más adyuvantes biológicamente aceptables seleccionados del grupo constituido por hidróxido de aluminio, saponina, SP-Oil, SL-CD, o Carbopol. En determinadas realizaciones, se usan dos adyuvantes para provocar la respuesta inmune preferida contra el VLA. En otras realizaciones, puede considerarse para su uso una mezcla de un aceite metabolizable tal como uno o más hidrocarburos de terpeno insaturados, por ejemplo escualeno o escualano, y un copolímero de bloque de polioxietileno-polipropileno tal como Pluronic®.

el

Una cepa inactivada del VLA o molécula derivada de la misma es "antigénica" cuando es capaz de interaccionar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmune, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor antigénico de células T. Típicamente,

5 una molécula antigénica es un polipéptido, o variante del mismo, que contiene un "epítotope" o al menos aproximadamente cinco y típicamente al menos aproximadamente 10 aminoácidos. Una parte antigénica de un polipéptido, también denominada en el presente documento el "epítotope", puede ser la parte que es inmunodominante para el reconocimiento de anticuerpo o del receptor

10 de células T o puede ser una parte usada para generar un anticuerpo contra la molécula conjugando la parte antigénica con un polipéptido portador para la inmunización. Una molécula que es antigénica no es necesariamente inmunogénica, es decir, capaz de provocar una respuesta inmune sin un portador, en sí misma.

15 Debe tenerse en cuenta que en esta divulgación, términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares. Términos tales como "que está constituido esencialmente

20 por" y "constituido esencialmente por" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten la inclusión de etapas o ingredientes adicionales que no devalúen características nuevas o básicas de la invención, es decir, excluyen ingredientes o etapas adicionales no indicados que devalúen características nuevas o básicas de la invención y

25 excluyen ingredientes o etapas de la técnica anterior, tales como documentos

62

en la técnica que se citan en el presente documento o se incorporan por referencia en el presente documento, especialmente ya que es un objetivo del presente documento definir realizaciones que son patentables, por ejemplo, nuevas, no obvias, inventivas con respecto a la técnica anterior, por ejemplo, con respecto a documentos citados o incorporados en el presente documento por referencia. Y los términos “que está constituido por” y “constituido por” tienen el significado adscrito a ellos en la ley de patentes de Estados Unidos, concretamente, que estos términos no son ampliables.

Una “respuesta inmune” contra una composición de vacuna o inmunogénica es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o mediada por células contra moléculas presentes en la composición del antígeno o vacuna de interés. Para los fines de la presente invención, una “respuesta inmune humoral” es una respuesta inmune mediada por anticuerpos e implica la generación de anticuerpos con afinidad por el antígeno/vacuna de la invención, mientras que una “respuesta inmune mediada por células” es una mediada por linfocitos T y/u otros leucocitos. Una “respuesta inmune mediada por células” se provoca por la presentación de epítopes antigénicos en asociación con moléculas de Clase I o Clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Esto activa a las células T auxiliares CD4+ específicas de antígeno o a las células T linfocíticas citotóxicas CD8+ (“CTL”). Las CTL tienen especificidad por los antígenos peptídicos que se presentan junto con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y se expresan en las superficies de las células. Las CTL ayudan a inducir y a promover la destrucción intracelular de microbios intracelulares o la lisis de células infectadas por dichos microbios. Otro aspecto de la inmunidad

celular implica una respuesta específica de antígeno por células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan ayudando a estimular la función y centran la actividad de células efectoras no específicas contra células que presentan antígenos peptídicos junto con moléculas del CMH en su superficie. Una

5 “respuesta inmune mediada por células” también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas similares producidas por células T activadas y/u otros leucocitos, incluyendo las derivadas de células T CD4+ y CD8+. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse por

10 varios ensayos, tal como por ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, ensayando linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado o midiendo la producción de citocinas por células T en respuesta a la re-estimulación con antígeno. Dichos ensayos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo,

15 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 todo el VLA inactivado que provocará una respuesta inmune en un animal. Esta cantidad dependerá de la especie, raza, edad, tamaño, estado de salud del animal

20 receptor y estará influenciada por la exposición previa del animal a una o más cepas del VLA tanto si esta una o más cepas es una cepa virulenta como si es una cepa no virulenta. Como se usa en este documento, una “cantidad inmunogénicamente eficaz” de todo el VLA inactivado, cuando se empela en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, es esa cantidad de VLA

25 que es suficiente para potenciar la inmunogenicidad del VLA y por tanto

proporciona inmunidad protectora contra la exposición a un patógeno o cepa o serotipo del VLA virulento.

La expresión “inmunogénico” se refiere a la capacidad de un antígeno o una vacuna para provocar una respuesta inmune, humoral o mediada por célula o ambas. Como se usa en este documento, el término “inmunogénico” significa que el VLA es capaz de provocar una respuesta inmune humoral y/o celular. Una cepa inmunogénica también es antigénica. Una composición inmunogénica es una composición que provoca una respuesta inmune humoral y/o celular cuando se administra a un animal.

La expresión “composición inmunogénica” se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, por ejemplo un microorganismo, cuya composición puede usarse para provocar una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune puede incluir una respuesta de células T, una respuesta de células B, o ambas respuestas de células B y células T. La composición puede servir para sensibilizar al mamífero mediante la presentación del antígeno junto con moléculas MHC en la superficie celular. Además, pueden generarse linfocitos T o anticuerpos específicos de antígenos para permitir protección futura de un huésped inmunizado. Una “composición inmunogénica” puede contener una vacuna viva, atenuada o eliminada/inactivada que comprende un microorganismo completo o una parte inmunogénica derivada del mismo que induce o una respuesta inmune mediada por células (célula T) o una respuesta inmune mediada por anticuerpos (células 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 debido a la infección con el microorganismo.

65

La expresión "inactivado" se refiere a la naturaleza no infecciosa de los microorganismos a usar en una composición de vacuna o inmunogénica de la invención. En particular, los expertos en la materia saben que dichos materiales pueden usarse para hacer que el microorganismo no sea infeccioso para los fines de la vacuna, por ejemplo, EIB. En la presente invención, también se han desarrollado procedimientos particulares para hacer que el virus de la lengua azul no sea infeccioso, pero estos procedimientos también se han desarrollado con énfasis particular manteniendo la inmunogenicidad de la preparación de la vacuna, dando como resultado al mismo la inactivación completa de la preparación del virus.

Como se usa en este documento, el término "aislado" significa que el material indicado se extrae de su medio nativo. Por tanto, un material biológico aislado puede carecer de algunos o todos los componentes celulares, *es decir*, componentes de las células en los que se produce naturalmente el material nativo (por ejemplo, componentes citoplásmicos 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 esta se asocia en la célula o con membranas celulares si esta 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 necesariamente, purificado.

La expresión "administración parenteral" como se usa en este documento significa la administración por algunos otros medios que no son a través del tracto gastrointestinal, particularmente a la introducción de sustancias en un organismo por inyección intravenosa, subcutánea,

6

intramuscular o intramedular, pero también a otras vías de administración no oral y no nasal tales como inyección intraperitoneal o aplicación tópica.

El término "patógeno" se refiere a la capacidad de cualquier agente de infección, tal como una bacteria o un virus, para causar enfermedad. En la
5 manera de la presente invención, el término "patógeno" se refiere a la capacidad de un virus de lengua azul (VLA), para causar una enfermedad en rumiantes, particularmente en ovejas o corderos. Un microorganismo "no patógeno" se refiere a un microorganismo que carece de las características indicadas anteriormente para las cepas "patógenas" del VLA. La enfermedad
10 causada por VLA frecuentemente se caracteriza por lesiones en animales infectados, que se parecen a la diarrea del virus bovino infeccioso, al virus de la estomatitis vesicular, a la fiebre catarral maligna, a la estomatitis micótica, peste bovina, fotosensibilización y enfermedad de pie y boca. Al virus de la lengua azul VLA se le atribuye como una causa de hidranencefalia en bovinos
15 y de infertilidad, aborto y nacimiento de crías defectuosas en bovinos y ovejas.

La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" significa un portador aprobado por una agencia reguladora de un gobierno Federal o de estado, u otra agencia reguladora o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra Farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales,
20 incluyendo seres humanos así como mamíferos no humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de petróleo, animal, vegetal o de origen sintético tal como aceite de cacahuete, aceite de
25 soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similar. El agua es un portador

preferido cuando la composición farmacéutica se aplica por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, glicerol monoestearato, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similar. La composición, si se desea también puede contener menores cantidades de agentes humectantes o emulsificantes o agentes tamponantes de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similar. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados. La formulación debe ajustarse al modo de administración.

El término "protección" se refiere a defender *por ejemplo* a un mamífero, en particular, un rumiante, por ejemplo, una oveja, un cordero, una cabra o una vaca, de una infección o enfermedad, induciendo una respuesta inmune contra un patógeno particular, por ejemplo el virus de la lengua azul. Dicha protección se consigue generalmente después de tratar a un mamífero con las composiciones de la vacuna descritas en este documento.

56

El término “purificado” como se usa en este documento se refiere al material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales nativos a partir de los que se obtiene el material. Por ejemplo, una bacteria o proteína purificada carece sustancialmente de células huéspedes o componentes de cultivo, incluyendo cultivo de tejido o proteínas de huevo, patógenos no específicos y similar. Como se usa en este documento, la expresión “carece sustancialmente” se usa operacionalmente, en el contexto del ensayo analítico del material. Típicamente, el material purificado que carece sustancialmente de contaminantes tiene una pureza de al menos el 50 %, más típicamente tiene una pureza de al menos el 90 % y más típicamente aún tiene una pureza de al menos el 99 %. La pureza puede evaluarse por cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayo biológico y otros procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos de purificación se conocen bien en la técnica. La expresión “sustancialmente puro” indica el mayor grado de pureza que puede conseguirse usando técnicas de purificación convencionales conocidas en la técnica.

Las “saponinas” se enseñan en: Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 págs 363-386). Las saponinas son glucósidos esteroides o triterpenos ampliamente distribuidos en los reinos vegetal y marino animal. Las saponinas se conocen por formar soluciones coloidales en agua con espuma agitando y por precipitar el colesterol. Cuando las saponinas están próximas a las membranas celulares crean estructuras porosas en la membrana que causan la rotura de la membrana. La hemólisis de eritrocitos es un ejemplo de

este fenómeno, que es una propiedad de determinadas, pero no de todas, las saponinas. Las saponinas se conocen como adyuvantes en vacunas para administración sistémica. La actividad adyuvante y hemolítica de saponinas individuales se ha estudiado ampliamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, anteriormente). Por ejemplo, la "Quil A" (derivada de la corteza del árbol Sudamericano Quillaja Saponaria Molina) y fracciones de las mismas, se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55, y en el documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras particuladas, denominadas Complejos Estimulantes Inmunes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A son hemolíticas y se han usado en la preparación de vacunas (Morein, B., EP 0 109 942 B1). Se ha indicado que estas estructuras tienen actividad adyuvante (documentos EP 0 109 942 B1 y WO 96/11711). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones de Quil A purificadas por HPLC) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos y el procedimiento de su producción se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.057.540 y en el documento EP 0 362 279 B1. En estas referencias también se describe el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como un potente adyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe adicionalmente en Kensil y col. (1991, J. Immunology vol 146, 431-437). También se conocen combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (en el documento WO 99/10008). Los sistemas adyuvantes particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas

- de otras especies vegetales tales como Gypsophila y Saponaria (Bomford y col., Vaccine, 10(9):572-577, 1992). Las saponinas también se conocen por haberse usado en estudios de vacunas aplicadas por la vía mucosa, que se han adaptado con éxito variable en la inducción de respuestas inmunes.
- 5 Anteriormente se ha demostrado que la saponina Quil-A no tiene efecto induciendo una respuesta inmune cuando el antígeno se administra por vía intranasal (Gizurarson y col. 1994 Vaccine Research 3, 23-29), aunque otros autores han usado este adyuvante con éxito (Maharaj y col., Can. J. Microbiol, 1986, 32(5):414-20. Chavali and Campbell, Immunobiology, 174(3):347-59).
- 10 Las ISCOM que comprenden saponina Quil A se han usado en formulaciones de vacunas intragástricas e intranasales y han mostrado actividad adyuvante (Mcl Mowat y col., 1991, Immunology, 72, 317-322; Mcl Mowat and Donachie, Immunology Today, 12, 383-385). También se ha descrito la QS21, la fracción no tóxica de Quil A, como un adyuvante oral o intranasal (Sumino y col., J.
- 15 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 usado saponinas de *Chenopodium quinoa* tanto en vacunas intranasales como 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 dentro de la familia de adyuvantes de ciclodextrina descrita en las patentes de Estados Unidos números 6.610.310 y 6.165.995. Típicamente, la SL-CD se formula en una mezcla con un aceite metabolizable tal como uno o más hidrocarburos de terpeno insaturados, por ejemplo, escualano y

preferiblemente con un tensioactivo no iónico tal como monooleato de polioxietileno sorbitán.

La expresión "SP-Oil" se refiere a un adyuvante que es una emulsión en aceite que comprende: del 1 % al 3 % vol/vol de copolímero de bloque
5 polioxietileno-polioxipropileno; del 2 % al 6 % vol/vol de escualano; del 0,1 % al 0,5 % vol/vol de monooleato de polioxietileno sorbitán; y una solución salina tamponada.

El término "rumiante" se refiere a cualquier variedad de mamífero ungulado, artiodáctilo y generalmente provisto de cuernos que de modo
10 característico tiene su estómago dividido en cuatro partes, incluyendo bovinos, oveja, jirafas, cabras y ciervos.

Como se usa en este documento, el término "tratamiento" (incluyendo variaciones del mismo, por ejemplo, "tratar" o "tratado") se refiere a cualquiera de uno o más de los siguientes: (i) la prevención de infección o reinfección,
15 como en una vacuna tradicional, (ii) la reducción de la gravedad de, o, la eliminación de síntomas, y (iii) la eliminación sustancial o completa del patógeno o enfermedad en cuestión. Por tanto, el tratamiento puede efectuarse profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (después de la infección). En la presente invención, el tratamiento profiláctico es el modo
20 preferido. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, se proporcionan composiciones y procedimientos que tratan, incluyendo inmunizar profilácticamente y/o terapéuticamente, a un animal huésped contra una infección viral. Los procedimientos de la presente invención son útiles para conferir la inmunidad profiláctica y/o terapéutica a un mamífero, preferiblemente
25 un rumiante, tal como una oveja, cordero, bovino o cabra. Los procedimientos

92✓

de la presente invención también pueden practicarse en mamíferos en aplicaciones de investigación biomédica.

La expresión "inactivada dos veces" se refiere al uso de procedimientos particulares como se describe en la presente invención, para volver al VLA no infeccioso, conservando al mismo tiempo la inmunogenicidad de la preparación del virus. Más particularmente, el VLA de la presente invención se inactiva dos veces usando dos rondas de incubación del VLA con EIB, en el que la primera etapa de inactivación se consigue incubando el VLA con EIB a una concentración de 10 mM durante 24 horas y en el que la segunda ronda de inactivación se consigue incubando el VLA con EIB a una concentración de 5 mM durante 48 horas.

Las expresiones "vacuna" o "composición de vacuna", como se usa de manera intercambiable, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune en un animal. Una composición de vacuna o vacuna puede proteger al animal de la enfermedad o posible muerte debido a una infección, y puede o no inducir uno o más componentes adicionales que potencian la actividad inmunológica del componente activo. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender adicionalmente otros componentes típicos para composiciones farmacéuticas. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender adicionalmente otros componentes típicos para vacunas o composiciones de vacunas, incluyendo, por ejemplo, un adyuvante o un inmunomodulador. El componente inmunogénicamente activo de una vacuna puede comprender organismos completos vivos en su forma original o como organismos atenuados en una vacuna viva modificada u organismos

inactivados por procedimientos apropiados en una vacuna desactivada o inactivada o vacunas de subunidades que comprenden uno o más componentes inmunogénicos del virus o modificados por ingeniería genética, vacunas mutadas o clonadas preparadas por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Una vacuna o composición de vacuna puede comprender uno o simultáneamente más de uno de los elementos descritos anteriormente.

Descripción General

Debido a su impacto potencial en la industria animal a gran escala, el desarrollo de una vacuna contra el virus de la lengua azul es de gran importancia, particularmente para la industria del ganado bovino y ovino. Las cepas patógenas, incluso si están atenuadas, son probablemente de valor limitado debido a la tendencia usual de un virus vivo a invertir su estado virulento. Además, es imprescindible que si una vacuna inactivada es de uso comercial, el virus debe estar completamente inactivado para garantizar un perfil de seguridad adecuado para el animal. Adicionalmente, también es importante que la inactivación no tenga efectos perjudiciales en la inmunogenicidad del virus o en los componentes de los virus responsables de inducir una respuesta inmune.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para inmunizar un animal, particularmente un rumiante, tal como una oveja o cordero o bovino contra a una infección por virus de la lengua azul (VLA), o para reducir la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad. La composición comprende al menos una cepa del VLA dos veces inactivada y un adyuvante biológicamente aceptable. En determinadas



realizaciones, se usa una combinación de al menos dos adyuvantes biológicamente aceptables.

En una realización de la presente invención, los procedimientos proporcionan a un rumiante inmunización contra un VLA patógeno y protección al animal frente a dicha infección.

En particular, los procedimientos de la presente invención proporcionan el uso de una vacuna o composición inmunogénica que comprende al menos una cepa completa y dos veces inactivadas del VLA para inmunizar a un rumiante contra la infección por el VLA. En una realización, los procedimientos de la presente invención proporcionan el uso de una vacuna o composición inmunogénica que comprende el serotipo 4 del VLA para inmunizar a un rumiante contra la infección por el VLA.

El virus de la lengua azul que se usa en las composiciones y procedimientos de la invención puede obtenerse a partir de cualquier almacén, que conserve reservas de diversos serotipos del VLA, tal como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Por ejemplo, la ATCC conserva varias cepas del VLA diferentes, que se enumeran en su catálogo con los siguientes números de acceso indicados: 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 murino). Adicionalmente, 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)) han descrito el serotipo 4.

Procedimientos de Inactivación

Las vacunas o composiciones inmunogénicas de virus inactivados

pueden prepararse tratando el VLA con agentes inactivantes tales como formalina o disolventes, ácidos, hidrófobos, etc., por radiación con luz ultravioleta o rayos X, por calentamiento, etc. La inactivación se realiza de una manera conocida en la técnica. Por ejemplo, en la inactivación química, una muestra de virus o muestra de suero adecuada que contiene el virus se trata durante un tiempo suficiente con una cantidad o concentración suficiente de ingrediente inactivante a una temperatura suficientemente elevada (o baja, dependiendo del agente inactivante) o pH para inactivar el virus. La inactivación por calor se realiza a una temperatura y durante un tiempo suficiente para inactivar el virus. La inactivación por radiación se realiza usando una longitud de onda de luz u otra fuente de energía durante un tiempo suficiente para inactivar el virus. El virus se considera inactivado si no es capaz de infectar una célula susceptible de infección. En una realización particular, la etileneimina binaria (EIB) es el medio usado para la inactivación.

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

- a) tratar el VLA con un agente inactivante usando una proporción 1:10 de agente inactivante con respecto al VLA;
- b) homogeneizar la mezcla de agente inactivante/VLA 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 VLA una segunda vez con un agente inactivante usando una proporción 1:20 de agente inactivante frente a VLA;

- e) homogeneizar la mezcla agente inactivante/VLA 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
- 5 g) neutralizar el agente inactivante para ajustar el pH final a aproximadamente 7,2; en el que el procedimiento da como resultado la activación del VLA manteniendo al mismo tiempo la inmunogenicidad del VLA.

En una realización, el procedimiento para preparar el VLA inactivado dos
10 veces, como se describe anteriormente, proporciona el uso de etileneimina binaria (EIB) como un agente inactivante. En una realización, la concentración final de agente inactivante en la etapa a), como se ha indicado anteriormente, es de aproximadamente 10 mM. En una realización, la concentración final de agente inactivante de la etapa d), como se ha indicado anteriormente, es de
15 aproximadamente de 5 mM.

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

Composiciones de Vacunas o Inmunogénicas y Procedimientos de Uso

20 Una cantidad inmunogénicamente eficaz de las vacunas de la presente invención se administra a un rumiante que necesita protección contra la infección por el virus de la lengua azul (VLA). La cantidad inmunogénicamente eficaz o la cantidad inmunogénica que se inocular en el rumiante puede determinarse fácilmente o titularse rápidamente por ensayo rutinario. Una
25 cantidad eficaz es una en la que se consigue una respuesta inmunológica

suficiente contra la vacuna para proteger al animal expuesto al virus. Preferiblemente, el animal se protege hasta un grado en el que uno o todos los síntomas o efectos fisiológicamente adversos de la enfermedad viral se reducen, mejoran o impiden totalmente de manera significativa.

- 5 La vacuna o composición inmunogénica puede administrarse en una sola dosis o en dosis repetidas. En la técnica se conocen procedimientos para determinar o titular dosificaciones adecuadas del agente antigénico activo basándose en el peso del animal, concentración del antígeno u otros factores típicos.
- 10 Deseablemente, la vacuna o composición inmunogénica se administra a un rumiante que aún no se ha expuesto al virus. La vacuna que contiene el virus completo y dos veces inactivado u otras formas antigénicas del mismo pueden administrarse convenientemente por vía intranasal, vía transdérmica (es decir, aplicarse sobre o en la superficie de la piel para absorción sistémica),
- 15 vía parenteral, etc. La vía de administración parenteral incluye, pero sin limitación, vías intramusculares, intravenosas, intraperitoneales, intradérmicas (es decir, inyectadas o de otra manera puestas bajo la piel) y similar. Dado que las vías de inoculación intramuscular e intradérmica han tenido éxito en otros estudios que usan clones de ADN infecciosos virales (E. E. Sparger y col.,
- 20 "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 vías son las más preferidas, junto con la vía de administración intranasal práctica.
- 25 Cuando se administra como un líquido, la presente vacuna puede

- prepararse en forma de una solución acuosa, jarabe, un elixir, un pigmento y similar. Dichas formulaciones se conocen en la técnica y se preparan típicamente disolviendo el antígeno y otros aditivos típicos en el portador o sistemas disolventes adecuados. Los portadores o disolventes adecuados
- 5 “fisiológicamente aceptables” incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, etc. Los aditivos típicos son, por ejemplo, colorantes certificados, saporíferos, edulcorantes y conservantes antimicrobianos tales como timerosal (etilmercuritiosalicilato de sodio). Dichas soluciones pueden estabilizarse, por ejemplo, añadiendo gelatina parcialmente
- 10 hidrolizada, sorbitol o medio de cultivo celular y pueden tamponarse por procedimientos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como fosfato de hidrógeno sódico, fosfato de dihidrógeno sódico, fosfato de hidrógeno de potasio, fosfato de dihidrógeno de potasio, una mezcla de los mismos y similares.
- 15 Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión y emulsificantes en combinación con otros co-formulantes convencionales. Estos tipos de formulaciones líquidas pueden prepararse por procedimientos convencionales. Las suspensiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un molino coloidal.
- 20 Las emulsiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un homogeneizador.
- Las formulaciones parenterales, diseñadas para inyectar en los sistemas fluidos corporales, requieren isotonicidad apropiada y tamponamiento de pH adecuados en relación con los niveles correspondientes de los fluidos corporales de los porcinos. La isotonicidad puede ajustarse apropiadamente
- 25 con cloruro de sodio y otras sales según se necesite. Los disolventes

adecuados, tales como etanol o propilenglicol, pueden usarse para aumentar la solubilidad de los ingredientes en la formulación y la estabilidad de la preparación líquida. Los aditivos adicionales que pueden emplearse en la presente vacuna incluyen, pero sin limitación, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las formas farmacéuticas parenterales también deben esterilizarse antes del uso.

Adyuvantes

El virus de la lengua azul dos veces inactivado puede suministrarse con un adyuvante. En una realización, la vacuna es un VLA completo y dos veces desactivado/inactivado, que se administra con un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmunológica del animal contra la vacuna. El adyuvante puede prepararse 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 del sitio en el que se administra la vacuna. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, hidróxido de aluminio (alum), Alhydrogel® (Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca), complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), polímeros o copolímeros de bloque no iónicos, citocinas (de tipo IL-1, IL-2, IL-7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.), saponinas (incluyendo Quillaja A o Quil A ((Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca), lípido monofosforil A (MLA), muramil dipéptidos (MDP) y similares. Otros adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, sulfato de potasio y aluminio, enterotoxina termoinestable o termoestable aislada de *Escherichia coli*, toxina del cólera o la subunidad B de la misma, toxina de la

difteria, toxina del tétano, toxina pertussis, adyuvante completo o incompleto de Freund, etc. Los adyuvantes basados en toxinas, tales como la toxina de la difteria, toxina del tétano y toxina pertussis pueden activarse antes del uso, por ejemplo, por tratamiento con formaldehído. En una realización, la composición de la vacuna se suministra con una combinación de al menos dos adyuvantes. En una realización, la composición de la vacuna se administra con una combinación de hidróxido de aluminio (Alhydrogel®) y saponina (Quil A).

Ensayos de Medición de Respuestas Inmunes

El resultado funcional de la vacunación de un rumiante contra el VLA puede realizarse por ensayos adecuados que controlan la inducción de la inmunidad celular o humoral o la actividad de las células T. Los expertos en la materia conocen estos ensayos, pero pueden incluir mediciones de la actividad de células T citolíticas usando por ejemplo, un ensayo de liberación de cromo. Alternativamente, pueden usarse ensayos proliferativos de células T como una indicación de la reactividad inmune o carencia de la misma. Además, se han realizado estudios *in vivo* para ensayar el nivel de protección en un mamífero vacunado contra un patógeno usando los procedimientos de la presente invención. Los ensayos típicos *in vivo* pueden implicar vacunar a un animal con un antígeno, tal como el virus descrito en este documento. Después de esperar un tiempo suficiente para que ocurra la inducción de un anticuerpo o la respuesta de las células T, generalmente de aproximadamente una a dos semanas después de la inyección, los animales se expondrán al antígeno, tal como un virus, y se controla la mejora de uno o más síntomas asociados a la infección viral o a la supervivencia de los animales. Un régimen de vacunación exitoso contra el VLA dará como resultado un aumento significativo de uno o

81

más síntomas asociados con la infección viral o una disminución de la viremia o una disminución del número o gravedad de lesiones asociadas con una infección viral o la supervivencia cuando se compara con los controles no vacunados. También puede recogerse suero para controlar niveles de anticuerpos generados en respuesta a las inyecciones de la vacuna, como se mide por los procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos demuestran determinados aspectos de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son únicamente para ilustrar y no pretenden ser completamente definitivos en cuanto a las condiciones y alcance de esta invención. Debe apreciarse que cuando se proporcionan las condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.), también pueden usarse las condiciones por encima y por debajo de los intervalos especificados, aunque generalmente es menos conveniente. Todas las partes y porcentajes indicados en este documento están basadas en peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifique otra cosa.

EJEMPLO 1: EL PROCESO DE PREPARACIÓN

DESCRIPCIÓN GENERAL

El proceso de preparación se realiza en condiciones de esterilidad, siguiendo las instrucciones del Procedimiento de Preparación Convencional descrito a continuación. Antes de comenzar las operaciones definidas como asépticas en el Procedimiento de Preparación Convencional, se verifica el estado de funcionamiento correcto de las instalaciones de filtros de aire y las cabinas de flujo laminar, y se confirma que los materiales usados en el proceso

se han esterilizado debidamente en autoclave o por filtración o desinfectado de acuerdo con los procedimientos establecidos. Las operaciones asépticas se realizan siguiendo técnicas de manipulación estériles establecidas.

DESCRIPCIÓN DE CADA ETAPA DEL PROCESO DE PREPARACIÓN

5 PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO FINAL (3 PASES)

Obtención de Cultivos de Células BHK-21

Las células BHK-21 (reserva de células de trabajo o RCT) se almacenan congeladas en nitrógeno líquido. Los criotubos con RCT se descongelan por descongelación rápida a $+37^{\circ}\text{C}$ y después ésta se inocula en un matraz de cultivo que contiene medio de cultivo (MEM-Glasgow + suero de ternero bovino irradiado).

El matraz de cultivo se incuba a $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Después de al menos 5 horas desde el momento de la inoculación, el medio se retira del matraz y se añade nuevo medio de cultivo de la misma composición, previamente llevado a una temperatura de $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

El cultivo se observa periódicamente y se registra su evolución (confluencia) y morfología celular.

A partir de este matraz de cultivo, para obtener los matraces necesarios para la producción, se realizan los cultivos necesarios a intervalos de 3-5 días.

Los subcultivos se realizan por medio de tripsinización del cultivo con una solución de tripsina recién preparada; se realiza un recuento de suspensión celular por tinción vital (azul tripán) en la cámara Neubauer. La suspensión celular se diluye posteriormente medio de cultivo estéril contenido en tanques o matraces, por medio de agitación magnética y se distribuye en matraces de cultivo.

El medio de cultivo se ajusta a pH $7,2 \pm 0,2$ al inicio de la operación de cultivo en matraces rotativos.

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

5 PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO FINAL (3 PASES)

Producción del antígeno de pase 2 (inoculación)

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

El virus de semilla de trabajo (VST) se almacena congelado a -70 ± 10 °C.

- 10 A partir del VST, se realizan 2 pases para obtener el inóculo. En el primer pase se realiza un control de potencia y en el segundo se realiza un control de esterilidad y de potencia después de la operación de congelado.

Antígeno de Pase 1 (Pre-inóculo)

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

El cultivo se incuba a $+37 \pm 1$ °C.

- 20 Cuando el efecto citopático (CEP) es superior al 60 %, el matraz se agita para facilitar el desprendimiento de la monocapa celular y después se congela a -70 ± 10 °C.

Antígeno de Pase 2 (Inóculo)

- 25 El antígeno de pase 1 se diluye en MEM-Glasgow. El medio de cultivo de matraces de crecimiento necesarios con células BHK-21 a los 2-3 días de cultivo se retira y se sustituye con la suspensión de virus preparada y después se coloca en una incubadora a $+37 \pm 1$ °C.

Cuando el CEP es superior al 60 %, los matraces se agitan para facilitar el desprendimiento de la monocapa celular y después se congela a -70 ± 10 °C.

Inoculación de cultivo, infección y recolección del antígeno final (pase 3)

Se mezcla, MEM-Glasgow, la suspensión de células BHK-21 de los
5 matraces de cultivo y suero de ternero de bovino irradiado y se homogeneizan en un recipiente estéril, con agitación.

Una vez homogeneizada la suspensión, se realiza un recuento celular en una cámara Neubauer.

Con esta suspensión, los matraces necesarios se inoculan y se incuban
10 a $+37 \pm 1$ °C.

A los 2-3 días de cultivo, se extrae el medio de cultivo de cada matraz y se sustituye por el medio de infección: MEM-Glasgow + antígeno de pase 2 (inóculo). Los matraces infectados después se incuban con movimiento rotacional a $+37 \pm 1$ °C.

15 Cuando el CPE es superior al 60 %, los matraces agitan para facilitar el desprendimiento de la monocapa celular, los cultivos se recogen y se homogenizan y se verifica el pH. Si es necesario, se realiza el ajuste con ácido clorhídrico para obtener un pH de $7,2 \pm 0,2$ y después se inactiva el antígeno final recogido (pase 3).

20 Características del proceso de cultivo

- El cultivo se realiza en matraces rotativos.
- Los recuentos celulares se realizan en una cámara Neubauer, después de haber diluido las muestras 1/2 con azul tripán.
- Los cultivos se incuban a $+37 \pm 1$ °C, girándolos de 12-14 veces por hora.
- 25 - El estado y evolución del cultivo se observa periódicamente y la

morfología celular se observa con un microscopio de imagen invertida.

- A través del proceso de preparación del antígeno final (pase 3), se realizan controles ambientales en las salas de trabajo por medio de tomas de muestras de aire durante periodos de descanso y periodos de fabricación y también se analiza la exposición y las placas de contacto para controlar el equipo de trabajo.

MUESTREO

Antígeno de pase 1: Para realizar un control de potencia, el Departamento de Control de Calidad toma muestras del antígeno de pase 1.

- 10 Antígeno de pase 2: Para realizar controles de potencia y esterilidad, el Departamento de Control de Calidad toma muestras del antígeno de pase 2.

Antígeno de pase 3: Para realizar controles de identidad, esterilidad y potencia, el Departamento de Control de Calidad toma muestras del antígeno de pase 3.

15 PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO INACTIVADO

El procedimiento de inactivación del antígeno final dura aproximadamente un total de 72 horas y la concentración de EIB usada es de 15 mM.

- 20 El antígeno final se inactiva añadiendo EIB 0,1 M a una proporción de 100 ml por litro de antígeno a inactivar (concentración final 10 mM).

Después de la adición de la EIB, la mezcla se homogeneiza durante al menos 15 minutos y se verifica el pH. Después del procedimiento de homogeneización, la mezcla se decanta en un recipiente estéril en el que se mantiene con agitación a 37 ± 1 °C durante 24 horas.

- 25 Después de 24 horas, se realiza una segunda inactivación del antígeno

final por medio de la adición de EIB 0,1 M a una proporción de 50 ml por litro de antígeno a inactivar (concentración final 5 mM). Después de la segunda adición de EIB, el procedimiento se repite en las mismas condiciones descritas anteriormente para la primera adición, pero manteniendo la mezcla en agitación

5 durante 48 horas.

NEUTRALIZACIÓN DE EIB RESIDUAL

NEUTRALIZACIÓN

Una vez completado el procedimiento de inactivación, se añade solución de tiosulfato sódico 1 M a la proporción de 5 ml por litro de antígeno inactivado

10 (concentración final 5 mM), para neutralizar la EIB.

Después de que la mezcla se homogeneice, se verifica el pH. Si es necesario, se realiza un ajuste con ácido clorhídrico para obtener un pH de $7,2 \pm 0,2$.

CÁLCULO DEL TÍTULO TEÓRICO DEL ANTÍGENO INACTIVADO Y

15 NEUTRALIZADO

Para calcular el título teórico del antígeno inactivado y neutralizado, se tienen en cuenta el título teórico del antígeno antes de la inactivación y el factor de dilución que representa las adiciones de EIB en el procedimiento de inactivación y de tiosulfato de sodio en el procedimiento de neutralización.

20 Para cada litro de antígeno, se añaden 100 ml de una solución de EIB 0,1 M a la primera inactivación, y 55 ml adicionales a la segunda inactivación. De esta manera, 1000 ml de antígeno final se convierten en 1155 ml de antígeno inactivado. Inmediatamente, en el procedimiento de neutralización, se añaden 5 ml de una solución de tiosulfato de sodio 1 M por litro de antígeno

25 inactivado. De esta manera, los 1155 ml de antígeno inactivado se convierten

en 1161 ml de antígeno inactivado y neutralizado.

El procedimiento inactivación y neutralización representa una dilución total de antígeno final de 1/1,16 (1000 ml de antígeno final se convierten en 1161 ml de antígeno inactivado y neutralizado). Por esta razón, se considera
5 que el antígeno con un título estándar anterior a la inactivación de $10^{7,2}$ TCID₅₀/ml, tiene un título teórico después de la inactivación y neutralización de $10^{7,2}/1,16$.

MUESTREO

Para realizar controles de esterilidad e inactivación, el Departamento de
10 Control de Calidad toma muestras del antígeno inactivado y neutralizado.

EJEMPLO 2: SELECCIÓN DE ADYUVANTE DE ACUERDO CON EL EFECTO SOBRE LA REDUCCIÓN DE VIREMIA DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN

EXPERIMENTO DE PRE-INMUNOGENICIDAD EN CORDEROS DE 2 MESES
15 DE EDAD

Los animales se vacunaron por vía subcutánea (2 ml) y se revacunaron tres semanas después.

Animales vacunados con vacunas A-3, B-3 y C-3 se expusieron 7-8 semanas después de la revacunación (dosis de exposición = 10^7 TCID₅₀ de
20 virus vivo / animal). Ninguno de los animales expuestos se protegió. Sin embargo, se observó una reducción de la viremia únicamente en animales vacunados con Alhydrogel (hidróxido de aluminio) y Quil-A (saponina) como adyuvante.

TABLA 1. COMPOSICIÓN DE PRE-INMUNOVACUNAS DE VLA

*VLA Inactivado (TCID ₅₀ /ml)	Adyuvante	Lote
10 ⁶		A-1
10 ^{6,7} (5x10 ⁶)	Alhydrogel/Quil-A (2 mg de Al ²⁺ /dosis)	A-2
10 ⁷		A-3
10 ⁶		B-1
10 ^{6,7} (5x10 ⁶)	Adyuvante SL-CD al 20 %	B-2
10 ⁷		B-3
10 ⁶		C-1
10 ^{6,7} (5x10 ⁶)	SP oil al 5 %	C-2
10 ⁷		C-3

*Sobrenadante de cultivo celular. Procedimiento total de inactivación 144 h
[(EIB 10 mM x 72 h) x 2]

RESPUESTA DE ANTICUERPOS DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN

TABLA 2. 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 SDV	0 %	27 %	0 %	10 %	9 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
D + 1 SDRV	82 %	73 %	100 %	40 %	64 %	82 %	9 %	44 %	64 %	0 %

Handwritten signature

GRUPO	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	Control
D + 2 SDRV	55 %	64 %	82 %	30 %	36 %	27 %	9 %	22 %	55 %	0 %
D + 3 SDRV	64 %	82 %	100 %	10 %	45 %	36 %	9 %	33 %	64 %	0 %
D + 4 SDRV	27 %	45 %	73 %	40 %	27 %	27 %	9 %	13 %	30 %	0 %

* ELISA de bloqueo usando un MAb específico de VP7

SDV = Semanas después de la vacunación

SDRV = Semanas después de la revacunación

RESULTADOS DE EXPOSICIÓN

5 Los animales vacunados con lotes A-3, B-3 y C-3 se expusieron (5 animales de cada grupo) a las 7-8 semanas después de la revacunación. También se expusieron dos controles no vacunados.

Se detectó virus de lengua azul (VLA) en muestras de sangre por ensayo de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) realizado en el Laboratorio Central de Veterinaria (Algete, España). (Miguel Ángel 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 de ácido nucleico total después de un procedimiento de extracción de ácido nucleico de 96 pocillos y la RT-PCR en tiempo real se realizaron como se describe por Miguel Ángel Jiménez-Clavero y col., 2006 (J. Vet. Diagn. Invest. 18: 7–17). Para el análisis de PCR se proporcionó el Ciclo umbral (Ct). Las muestras se consideraron positivas para VLA si proporcionaban valores de

[Handwritten signature]

Ct inferiores a 36. Las muestras que proporcionaban valores Ct entre 36 y 40 se consideraron dudosas.

Ct = ciclo umbral		Interpretación de los resultados de Ct:		
DT= Desviación típica		CT<36	Positivo	(Detección de virus)
CV %= Coeficiente de variación		36<CT<40	Indeterminado	
Grupo A3	10 ⁷ de TCID ₅₀ de BTiV/Dosis - Adyuvante: Alhydrogel/Quil-A			
Grupo B3	10 ⁷ de TCID ₅₀ de BTiV/Dosis - Adyuvante: SL-CD			
Grupo C3	10 ⁷ de TCID ₅₀ de BTiV/Dosis - Adyuvante: SP oil			
Grupo Cont	Grupo de control (no vacunado)			

Tabla 3

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 4 días después de la exposición (D+4 p.i.)			
		(Muestras de sangre)	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
A3	179	37,12	Indeterminado
A3	190	32,24	Positivo
A3	198	30,33	Positivo

el

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 4 días después de la exposición (D+4 p.i.)			
		(Muestras de sangre)	
A3	211	30,30	Positivo
A3	219	29,87	Positivo
TC Media		31,97	
DT		3,02	
VC %		9,45	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
B3	183	28,24	Positivo
B3	206	27,94	Positivo
B3	223	29,07	Positivo
B3	243	27,47	Positivo
TC Media		28,18	
DT		0,67	
VC %		2,39	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
C3	162	30,15	Positivo
C3	174	26,15	Positivo
C3	175	30,67	Positivo
C3	241	30,07	Positivo
C3	254	29,27	Positivo

92

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 4 días después de la exposición (D+4 p.i.)			
		(Muestras de sangre)	
TC Media		29,26	
DT		1,81	
VC %		6,19	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
Cont.	225	31,67	Positivo
TC Media		31,67	
DT		-	
VC %		-	

Ref. FDV= Número de referencia del animal

Tabla 4

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 7 días después de la exposición (D+7 p.i.)			
		(Muestras de sangre)	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
A3	179	32,99	Positivo
A3	190	29,21	Positivo
A3	198	-	Negativo
A3	211	31,7	Positivo
A3	219	28,66	Positivo

[Handwritten signature]

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 7 días después de la exposición (D+7 p.i.)			
		(Muestras de sangre)	
TC Media		30,64	
DT		2,05	
VC %		6,69	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
B3	183	26,62	Positivo
B3	206	31,17	Positivo
B3	223	26,88	Positivo
B3	243	26,94	Positivo
TC Media		27,90	
DT		2,18	
VC %		7,82	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
C3	162	29,61	Positivo
C3	174	27,12	Positivo
C3	175	-	Negativo
C3	241	29,86	Positivo
C3	254	28,26	Positivo
TC Media		28,71	
DT		1,27	

94

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 7 días después de la exposición (D+7 p.i.)			
		(Muestras de sangre)	
VC %		4,43	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
Cont.		-	
Cont.	225	29,02	Positivo
TC Media		29,02	
DT		-	
VC %		-	

Ref. FDV= Número de referencia del animal

Para realizar una comparación entre los animales vacunados y no vacunados teniendo en cuenta los resultados de RT-PCR en tiempo real, la media de Ct del grupo de control se restó de la media de Ct de cada uno de los diferentes grupos vacunados. (Miguel Ángel Jiménez-Clavero y col., (2006)). J. Vet. Diagn. Invest. 18: 7–17) demostraron que la detección conseguida por el ensayo de RT-PCR en tiempo real mostró una relación lineal entre la señal y la cantidad de ARN viral presente en la muestra (unidades infecciosas de TCID₅₀ equivalentes por mililitro) en una escala logarítmica (coeficiente de correlación de 0,9948 y una pendiente de -3,334). Por esta razón, la diferencia media de Ct entre cada grupo vacunado y el grupo de control se dividió entre 3,334 y se calculó el logaritmo del número resultante.

Tabla 5

Comparación entre animales vacunados y no vacunados			
de acuerdo con los resultados de RT-PCR en tiempo real a los 4 días después de la exposición (D+4 p.i.)			
Grupo	Media de Ct/Grupo	DT	VC
A3	31,97	3,02	9,45
B3	28,18	0,67	2,39
C3	29,26	1,81	6,19
Control	31,67	-	-
Diferencias de Ct	Diferencias de Ct	dif de Ct / 3,334	log (dif de Ct / 3,334)
A3-Control	0,30	0,09	1,23
B3-Control	-3,49	-1,05	0,09
C3-Control	-2,41	-0,72	0,19
Comparación entre animales vacunados y no vacunados			
de acuerdo con los resultados de RT-PCR en tiempo real a los 7 días después de la exposición (D+7 p.i.)			
Grupo	Media de Ct/Grupo	DT	VC
A3	30,64	2,05	6,69
B3	27,90	2,18	7,82

96

C3	28,71	1,27	4,43
Control	29,02		
Diferencias de Ct	Diferencias de Ct	dif de Ct / 3,334	log (dif de Ct / 3,334)
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

Los números calculados [log (dif Ct/3,334)] expresan la relación entre los grupos de control y vacunados. A los 7 días después de la exposición:

- 5
- 10
1.

2.

3.
- Los animales vacunados con el adyuvante Alhydrogel y Quil-A tenían 3 veces menos virus en sangre que el grupo de control (únicamente hay datos de 1 animal no vacunado).
- Los animales vacunados con adyuvante SP-oil o SL-CD no mostraron ninguna reducción de viremia en comparación con el grupo de control (únicamente hay datos de 1 animal no vacunado).
- Alhydrogel (hidróxido de aluminio) y Quil-A (saponina) es un mejor adyuvante que SP-oil o SLCD.

EJEMPLO 3: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENO SOBRE LA REDUCCIÓN DE VIREMIA

- 15
- EXPERIMENTO DE PRE-INMUNOGENICIDAD EN CORDEROS DE 2 MESES DE EDAD.

Los animales se vacunaron por vía subcutánea (2 ml) y se revacunaron

[Handwritten signature]

3 semanas después.

Los animales vacunados con vacunas A-1, A-2 y A-3 se expusieron 5-6 semanas después de la revacunación (dosis de exposición = 10^7 TCID₅₀ de virus vivo /animal). Ninguno de los animales expuestos se protegió. Sin embargo, se observó una reducción de la viremia dependiente de la dosis del antígeno.

TABLA 6. COMPOSICIÓN DE PRE-INMUNO VACUNAS VLA

*VLA Inactivada (TCID ₅₀ /ml)	Adyuvante	Lote
10^6	Alhydrogel/Quil-A (2 mg de Al ²⁺ /dosis)	A-1
$10^{6,7}$ (5×10^6)		A-2
10^7		A-3
10^6	adyuvante SL-CD al 20 %	B-1
$10^{6,7}$ (5×10^6)		B-2
10^7		B-3
10^6	SP oil al 5 %	C-1
$10^{6,7}$ (5×10^6)		C-2
10^7		C-3

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

10 **RESPUESTA DE ANTICUERPOS DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN**

TABLA 7. PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS (ENSAYO ELISA)

GRUPO	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	Control
Nº	11	11	11	10	11	11	11	9	11	11

Handwritten signature or initials.

ANIMALES										
D + 3 SDV	0 %	27 %	0 %	10 %	9 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
D + 1 SDRV	82 %	73 %	100 %	40 %	64 %	82 %	9 %	44 %	64 %	0 %
D + 2 SDRV	55 %	64 %	82 %	30 %	36 %	27 %	9 %	22 %	55 %	0 %
D + 3 SDRV	64 %	82 %	100 %	10 %	45 %	36 %	9 %	33 %	64 %	0 %
D + 4 SDRV	27 %	45 %	73 %	40 %	27 %	27 %	9 %	13 %	30 %	0 %

* ELISA de bloqueo usando un MAb específico de VP7

SDV = Semanas después de la vacunación

SDRV = Semanas después de la revacunación

RESULTADOS DE LA EXPOSICIÓN

5 Los animales vacunados con lotes A1, A2 y A-3 se expusieron (5 animales de cada grupo) a las 5-6 semanas después de la revacunación. También se expusieron dos controles no vacunados.

El virus de lengua azul (VLA) se detectó en las muestras de sangre mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) realizado en el Laboratorio Central de Veterinaria (Algete, España). (Miguel Ángel 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 de ácido nucleico total después de un procedimiento de

10

extracción de ácido nucleico de 96 pocillos y la PCR-RT en tiempo real se realizaron como se describe por Miguel Ángel Jiménez-Clavero y col., 2006 (J. Vet. Diagn. Invest. 18: 7–17). Para el análisis de PCR se proporcionó el ciclo umbral (Ct). Las muestras se consideraron positivas para VLA si se obtenían

5 valores de Ct inferiores a 36. Las muestras que producían valores de Ct entre 36 y 40 se consideraron dudosas.

Ct = Ciclo umbral		Interpretación de los resultados de Ct:		
DT= Desviación típica		CT<36	Positivo	(DETECCIÓN DE VIRUS)
CV %= Coeficiente de variación		36<CT<40	Indeterminado	
Grupo A1	10 ⁶ de TCID ₅₀ de BTiV/Dosis - Adyuvante: Alhydrogel/Quil-A			
Grupo A2	10 ^{6,7} TCID ₅₀ de BTiV/Dosis - Adyuvante: Alhydrogel/Quil-A			
Grupo A3	10 ⁷ TCID ₅₀ de BTiV/Dosis - Adyuvante: Alhydrogel/Quil-A			
Grupo Cont	Grupo de control (no vacunado)			

[Handwritten signature]

Tabla 8

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 3 días después de la exposición (D+3 p.i.)			
(Muestras de sangre)			
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
A1	155	36,68	Indeterminado
A1	167	35,11	Positivo
A1	202	37,68	Indeterminado
A1	232	33,46	Positivo
A1	246	36,20	Indeterminado
TC Media		35,83	
DT		1,61	
VC %		4,50	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
A2	224	-	Negativo
A2	233	37,96	Indeterminado
A2	255	35,04	Positivo
A2	257	-	Negativo
A2	259	38,76	Indeterminado
TC Media		37,25	
DT		1,96	
VC %		5,26	

101

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 3 días después de la exposición (D+3 p.i.)			
(Muestras de sangre)			
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
A3	210	35,79	Positivo
A3	220	37,56	Indeterminado
A3	245	36,03	Indeterminado
A3	251	37,65	Indeterminado
A3	260	34,45	Positivo
TC Media		36,30	
DT		1,34	
VC %		3,69	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
Cont.	203	33,10	Positivo
Cont.	208	38,85	Indeterminado
TC Media		35,98	
DT		18,86	
VC %		52,43	

Ref. FDV= Número de referencia del animal

Tabla 9

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 5 días después de la exposición (D+5 p.i.)			
(Muestras de sangre)			

102

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 5 días después de la exposición (D+5 p.i.)			
(Muestras de sangre)			
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
A1	155	28,54	Positivo
A1	167	31,85	Positivo
A1	202	27,72	Positivo
A1	232	29,04	Positivo
A1	246	26,12	Positivo
TC Media		28,65	
DT		2,10	
VC %		7,34	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
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
TC Media		30,26	
DT		3,61	
VC %		11,92	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación

103

Resultados de RT-PCR fluorogénicos en tiempo real a los 5 días después de la exposición (D+5 p.i.)			
(Muestras de sangre)			
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
TC Media		31,38	
DT		2,98	
VC %		9,50	
Grupo	Ref. FDV	Ct	Interpretación
Cont.	203	26,73	Positivo
Cont.	208	28,55	Positivo
TC Media		27,64	
DT		10,51	
VC %		38,03	

Ref. FDV= Número de referencia del animal

Para la comparación entre los animales vacunados y no vacunados teniendo en cuenta los resultados de RT-PCR en tiempo real, el Ct medio del grupo de control se restó del Ct medio de cada uno de los grupos vacunados diferentes. Miguel Ángel Jiménez-Clavero y col. (2006). J Vet Diagn Invest 18: 7–17) demostraron que la detección conseguida por el ensayo RT-PCR en tiempo real mostró una relación lineal entre la señal y la cantidad de ARN viral

104

presente en la muestra (unidades infecciosas TCID₅₀ equivalentes por mililitro) en una escala logarítmica (coeficiente de correlación de 0,9948 y una pendiente de -3,334). Por esta razón, la diferencia del Ct medio entre cada grupo vacunado y el grupo de control se dividió por 3,334 y se calculó el

5 logaritmo del número resultante.

Tabla 10

Comparación entre animales vacunados y no vacunados			
de acuerdo con los resultados de RT-PCR en tiempo real a los 3 días después de la exposición (D+3 p.i.)			
Grupo	Media de Ct/Grupo	DT	VC
A1	35,83	1,61	4,50
A2	37,25	1,96	5,26
A3	36,30	1,34	3,69
Cont.	35,98	18,86	52,43
Diferencias de Ct	Diferencias de Ct	dif de Ct / 3,334	log (dif de Ct / 3,334)
A1-Cont	-0,15	-0,04	0,90
A2-Cont	1,27	0,38	2,40
A3-Cont	0,32	0,10	1,25

103

Tabla 11

Comparación entre animales vacunados y no vacunados			
de acuerdo con los resultados de RT-PCR en tiempo real a los 5 días después de la exposición (D+5 p.i.)			
Grupo	Media de Ct/Grupo	DT	VC
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

Los números calculados [log (dif de Ct/3,334)] expresan la relación entre los grupos de control y vacunados. A los 5 días después de la exposición:

1. Los animales vacunados con 10^6 TCID₅₀/dosis tenían 2 veces menos virus en sangre que el grupo de control (animales no vacunados).
2. Los animales vacunados con $10^{6,7}$ TCID₅₀/dosis tenían 6 veces menos virus en sangre que el grupo de control (animales no vacunados).
3. Los animales vacunados con 10^7 TCID₅₀/dosis tenían 13 veces menos

106

virus en sangre que el grupo de control (animales no vacunados).

EJEMPLO 4: ADYUVANTE Y COMPOSICIÓN DE LA DOSIS

EXPERIMENTO DE INMUNOGENICIDAD EN CORDEROS DE 1 MES DE EDAD.

5 Los animales se vacunaron por vía subcutánea (2 ml) y se revacunaron 3 semanas después.

Los animales vacunados con vacunas K1, K2, K6 y K8 se expusieron 3-4 semanas después de la revacunación (dosis de exposición = 10⁷ TCID₅₀ de virus vivo/animal). Únicamente se protegieron los animales vacunados con las

10 vacunas K1 y K2.

Tabla 12. COMPOSICIÓN DEL LOTE K DE PRE-INMUNOVACUNAS DE VLA

*Lote de la Vacuna	TCID ₅₀ (dosis 2 ml)	<u>CONCENTRACIÓN</u> <u>DE ADYUVANTE</u> (dosis 2 ml)	<u>CORDEROS</u>	<u>EXPOSICIÓN</u> <u>SEPT 06</u>
K1	3 x 10 ⁶	4 mg de Al ³⁺ 0,4 mg de Quil-A	7	7
K2	1 x 10 ⁷	4 mg de Al ³⁺ 0,4 mg de Quil-A	10	5
K3	3 x 10 ⁶	SP-Oil al 5 %	7	-
K4	1 x 10 ⁷	SP-Oil al 5 %	10	-
K5	3 x 10 ⁶	Montanide™ ISA 206 al 50 %	7	-
K6	1 x 10 ⁷	Montanide™ ISA 206 al 50 %	10	-

*Lote de la Vacuna	TCID ₅₀ (dosis 2 ml)	<u>CONCENTRACION DE ADYUVANTE</u> (dosis 2 ml)	<u>CORDEROS</u>	<u>EXPOSICIÓN SEPT 06</u>
K7	3 x 10 ⁶	Montanide™ ISA 207 al 50 %	7	7
K8	1 x 10 ⁷	Montanide™ ISA 207 al 50 %	10	5
K9	1 x 10 ⁷	Drakeol 5- Arlancel 83V al 60 %	10	-
No vacunado	-	-	12	5

- Antígeno de VLAi: Cultivo completo, procedimiento de inactivación total 72 h (EIB 10 mM x 24 h + EIB 5 mM x 48 h)

RESPUESTA DE ANTICUERPOS DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN

Tabla 13. *Resultados serológicos del ELISA

*Lote de la Vacuna	TCID ₅₀ (dosis 2 ml)	<u>CONCENTRACIÓN DE ADYUVANTE</u> (dosis 2 ml)	<u>CORDEROS</u>	ELISA D+35 (2 SDRV) (% positivos)
K1	3 x 10 ⁶	4 mg de Al ³⁺ 0,4 mg de Quil-A	7	<u>86 %</u> (+1 dudoso)

1006

*Lote de la Vacuna	TCID ₅₀ (dosis 2 ml)	<u>CONCENTRACIÓN DE ADYUVANTE</u> (dosis 2 ml)	<u>CORDEROS</u>	ELISA D+35 (2 SDRV) (% positivos)
K2	1 x 10 ⁷	4 mg de Al ³⁺ 0,4 mg de Quil-A	10	<u>90 %</u> (+1 dudoso)
K3	3 x 10 ⁶	SP-Oil al 5 %	7	<u>14 %</u> (+1 dudoso)
K4	1 x 10 ⁷	SP-Oil al 5 %	10	<u>20 %</u>
K5	3 x 10 ⁶	Montanide™ ISA 206 al 50 %	7	<u>86 %</u>
K6	1 x 10 ⁷	Montanide™ ISA 206 al 50 %	10	<u>80 %</u> (+1 dudoso)
K7	3 x 10 ⁶	Montanide™ ISA 207 al 50 %	7	<u>56 %</u> (+2 dudoso)
K8	1 x 10 ⁷	Montanide™ ISA 207 al 50 %	10	<u>60 %</u> (+1 dudoso)

Vol

*Lote de la Vacuna	TCID ₅₀ (dosis 2 ml)	CONCENTRACIÓN DE ADYUVANTE (dosis 2 ml)	CORDEROS	ELISA D+35 (2 SDRV) (% positivos)
K9	1 x 10 ⁷	Drakeol 5- Arlancel 83V al 60 %	10	20 % (+3 dudoso)
No vacunado	-	-	12	0 %

*ELISA de bloqueo usando un MAb específico para VP7

SDRV = Semanas después de la revacunación

Tabla 14. *Resultados del ensayo de seroneutralización (SN)

Lote de Vacuna ⁽¹⁾	ADYUVANTE/ dosis 2 ml	CORDERO	D+42/45		Lote de Vacuna ⁽¹⁾	ADYUVANTE/ dosis 2 ml	CORDERO	D+42/45	
			3-4SDRV	100 % 90 %				3-4SDRV	100 % 90 %
K1 3 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /dosis de 2 ml	4 mg Al ³⁺ 0,4 mg Quil-A	9	<2/2	4	K2 1 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /dosis de 2 ml	4 mg Al ³⁺ 0,4 mg 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
		29	2	2			73	<2	4
							75	<2- 2	4
							79	2	4

100

Lote de Vacuna ⁽¹⁾	ADYUVANTE/ dosis 2 ml	CORDERO	D+42/45		Lote de Vacuna ⁽¹⁾	ADYUVANTE/ dosis 2 ml	CORDERO	D+42/45	
			3-4SDRV	100 % 90 %				3-4SDRV	100 % 90 %
							84	<2-2	8
K7 3 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /dosis 2 ml	Montanide™ ISA 207 al 50 %	2	<2	8-16	K8 1 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /dosis 2 ml	Montanide™ ISA 207 al 50 %	34	4	
		3	<2	<2			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	
Control	-	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 letra negrita y cursiva: se extrajo la sangre de los animales expuestos a los 45 días después de la revacunación.

W

* ensayo SN: Basado en el ensayo SN en células Vero descrito por el OIE con pequeñas modificaciones. El objetivo de esta técnica es determinar la mayor dilución en suero que es capaz de bloquear la infección de 100 TCID₅₀ de VLA en células Vero. Se realizaron dos lecturas: considerando un 100 % de reducción de efecto citopático y un 90 % de reducción de efecto citopático.

EXPOSICIÓN

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

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

Tabla 15. Resultados de exposición

Lote de Vacuna	TCID ₅₀ (dosis de 2 ml)	CONCENTRACIÓN DE ADYUVANTE (dosis de 2 ml)	Nº DE ANIMALES EXPUESTOS	ANIMALES QUE MUESTRAN VIREMIA EN %
K1	3 x 10 ⁶	4 mg de Al ³⁺ 0,4 mg de Quil-A	7	*14 %
K2	1 x 10 ⁷	4 mg de Al ³⁺ 0,4 mg de Quil-A	5	0 %
K3	3 x 10 ⁶	SP-Oil al 5 %	-	-
K4	1 x 10 ⁷	SP-Oil al 5 %	-	-

112

Lote de Vacuna	TCID ₅₀ (dosis de 2 ml)	CONCENTRACIÓN DE ADYUVANTE (dosis de 2 ml)	Nº DE ANIMALES EXPUESTOS	ANIMALES QUE MUESTRAN VIREMIA EN %
K5	3 x 10 ⁶	Montanide™ ISA 206 al 50 %	-	-
K6	1 x 10 ⁷	Montanide™ ISA 206 al 50 %	-	-
K7	3 x 10 ⁶	Montanide™ ISA 207 al 50 %	7	71 %
K8	1 x 10 ⁷	Montanide™ ISA 207 al 50 %	5	80 %
K9	1 x 10 ⁷	Drakeol 5- Arlacel 83V al 60 %	-	-
No vacunado	-	-	5	80 %

Se detectó virus de lengua azul (VLA) en muestras de sangre por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR)

*2 resultados no concluyentes consecutivos

CONCLUSIONES

5 La única vacuna capaz de prevenir la viremia era el lote K2 formulado con 1 x 10⁷ TCID₅₀/dosis y Alhydrogel y Quil-A como adyuvante. La viremia fue detectable solamente en 1 de 5 animales vacunados con el lote K1 formulado con el mismo adyuvante pero con una menor concentración de antígeno (3 x

VB

10⁶ TCID₅₀/dosis).

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

No se dispone de resultados de exposición para Montanide™ ISA 207
5 (Seppic) que muestren resultados serológicos similares.

EJEMPLO 5. COMPOSICIÓN DE VACUNA FINAL

Tabla 16

Ingredientes	Cantidad / ml	Función	Referencia con respecto a los patrones
Sustancias activas	1,5 x 10 ⁶ TCID ₅₀	Antígeno	Monografía Interna
Virus de lengua azul inactivado y neutralizado (VLAi), mínimo			
Componentes del Adyuvante	192,6 mg (2 mg de Al ³⁺) 200 µg	Adyuvante	Monografía Interna
Alhydrogel al 2 % Quil-A		Adyuvante	Monografía Interna
Componentes del Excipiente:	0,1 mg	Conservante	Monografía de la Farmacopea Europea n°1625, Edición actual
Thiomersal			
Solución salina	cs hasta 1 ml	Diluyente/excipiente	Monografía Interna

114

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para provocar una respuesta inmune contra el virus de la lengua azul (VLA) en un animal, comprendiendo la composición una cantidad inmunogénicamente eficaz de al menos una cepa de un virus de la lengua azul dos veces inactivado y un adyuvante biológicamente aceptable.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el VLA dos veces inactivado se inactiva una primera vez con un agente inactivante a una concentración de aproximadamente 10 mM y se inactiva una segunda vez con un agente inactivante a una concentración de aproximadamente 5 mM.
- 15 3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el agente inactivante es etileneimina binaria (EIB).
4. La composición de la reivindicación 1, en la que la cepa es del serotipo
- 20 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición es una composición de vacuna o una composición inmunogénica.

115

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el animal es un rumiante seleccionado del grupo constituido por ovejas, corderos, cabras, bovinos y ciervos.
- 5 7. La composición de la reivindicación 6, en el que el rumiante es una oveja o un cordero.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el adyuvante biológicamente aceptable se selecciona del grupo constituido por
10 uno o más de hidróxido de aluminio, saponina, SL-CD, Carbopol y SP-Oil.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que el adyuvante biológicamente aceptable comprende una mezcla de hidróxido de aluminio y saponina.
- 15 10. La composición de la reivindicación 9, en la que el hidróxido de aluminio está presente en una concentración de entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 10 %.
- 20 11. La composición de la reivindicación 10, en la que el hidróxido de aluminio está presente a una concentración de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 5 %.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que el hidróxido de
25 aluminio está presente a una concentración de aproximadamente el 3 %.

13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la respuesta inmune provocada protege a un animal contra infección con, o reduce la gravedad de al menos un síntoma asociado con una infección por
5 una cepa patógena del virus de la lengua azul.

14. Un procedimiento para potenciar la respuesta inmune en un animal contra el virus de la lengua azul o para prevenir o reducir al menos un síntoma asociado con la enfermedad, comprendiendo el procedimiento la etapa de
10 administrar una dosis única o múltiple de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el animal es un rumiante seleccionado del grupo constituido por ovejas, corderos, cabras,
15 bovinos y ciervos.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el rumiante es una oveja o un cordero.

20 17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que la etapa de administración se consigue por administración parenteral.

18. El procedimiento de la reivindicación 17 en el que la etapa de administración parenteral se consigue por inyección intramuscular.

19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que la etapa de administración se consigue por administración oral.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la etapa de administración oral se consigue por suministro manual o aplicación masiva.
21. Un procedimiento para prevenir o aliviar un brote del virus de la lengua azul, que comprende la etapa de administrar a un animal una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el animal es un rumiante seleccionado del grupo constituido por ovejas, corderos, cabras, bovinos y ciervos.
23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el rumiante es una oveja o un cordero.
24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23 en el que la etapa de administración se consigue por administración parenteral.
25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que la etapa de administración parenteral se consigue por inyección intramuscular.
26. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 21-23, en el que la etapa de administración se consigue por administración oral.

118

27. El procedimiento de la reivindicación 26, en el que la etapa de administración oral se consigue por suministro manual o aplicación masiva.

5 28. Un procedimiento de producción del virus de la lengua azul (VLA), completo inactivado comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) tratar el VLA con un agente inactivante usando una proporción 1:10 de agente inactivante con respecto al VLA;

10 b) homogeneizar la mezcla de agente inactivante/VLA 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 VLA una segunda vez con un agente inactivante usando una proporción 1:20 de agente inactivante con respecto al VLA;

15 e) homogeneizar la mezcla del agente inactivante/VLA 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

20 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 VLA manteniendo al mismo tiempo la inmunogenicidad del VLA.

29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que el agente inactivante es etileneimina binaria (EIB).

25

119

30. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 28 ó 29, en el que la concentración final de agente inactivante en la etapa a) es de aproximadamente 10 mM.

5 31. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 28 ó 29 en el que la concentración final de agente inactivante en la etapa d) es de aproximadamente 5 mM.

10 32. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 28-31, en el que el virus completo de la lengua azul es de serotipo 4.

10

RESUMEN

Se proporcionan composiciones inmunogénicas y de vacunas y procedimientos para su preparación y uso, cuyas composiciones son eficaces para proteger contra, minimizar la gravedad de, prever y/o aliviar la infección de rumiantes con el virus de la lengua azul. La administración a un animal de al menos una dosis de un adyuvante y una composición del virus de la lengua azul dos veces inactivado, tal como se describe en este documento, es eficaz proporcionando al animal inmunidad y protección frente a la infección por el virus de la lengua azul, reduciendo por lo tanto la gravedad y/o evitando la enfermedad causada por una o más cepas o serotipos del virus de la lengua azul.

121

UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY
IN THE INTERNATIONAL BUREAU

IN RE APPLICATION OF: **WYETH FARMA, S.A.**
INTERNATIONAL APPLICATION No: **PCT/EP2008/065993**
INTERNATIONAL FILING DATE: **21 November 2008**
PRIORITY DATE(S) CLAIMED: **21 November 2007**
FOR: *Bluetongue Virus Vaccine And Immunogenic Compositions, Methods Of Use*
And Methods Of Producing Same
OUR REF.: PC56654A

World Intellectual Property Organization
34 chemin des Colombettes
CH-1211 Geneva 20
Switzerland

RE: REQUEST TO CORRECT INVENTORS DETAILS ON THE PCT
APPLICATION

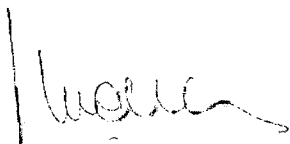
We request that the following applicant/inventor's name be corrected in the above mentioned PCT Application:

JOAN PLANA DURAN please correct the name **PLANA DURAN, Juan** to read **PLANA DURAN, Joan**

Please make the correction to this application and forward the IB/PCT/306 when this has been completed.

We look forward to receiving confirmation that this change has been recorded.

Respectfully submitted,



Date 20th May 2010

Vicente Morales, Company Secretary
For Wyeth Farma, S.A., and as agent for all other applicants

Apartado 471
28080
Madrid
Spain

PCT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

HERRERO & ASOCIADOS, S.L.
Attn. Carpintero Lopez, F.
Alcalá 23
E - 28010 Madrid
ESPAGNE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year) 27/04/2009	
Applicant's or agent's file reference PX 22.2/08	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/EP2008/065993	International filing date (day/month/year) 21/11/2008
Applicant WYETH FARMA, S.A.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Julia Severin

RECEIVED

MAY 08 2009

SHEILA McBRIDE

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the international Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the international Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed.

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/PEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1b/s(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43b/s.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PX 22.2/08	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2008/065993	International filing date (day/month/year) 21/11/2008	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 21/11/2007
Applicant WYETH FARMA, S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/065993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAMAKRISHNAN M A ET AL: "Immune Responses and Protective Efficacy of Binary Ethylenimine (BEI)-Inactivated Bluetongue Virus Vaccines in Sheep" VETERINARY RESEARCH COMMUNICATIONS ; AN INTERNATIONAL JOURNAL PUBLISHING TOPICAL REVIEWS AND RESEARCH ARTICLES ON ALL ASPECTS OF THE VETERINARY SCIENCES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 30, no. 8, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 873-880, XP019455083 ISSN: 1573-7446 the whole document	1-32
X	US 4 545 987 A (GILES RICHARD E [US] ET AL) 8 October 1985 (1985-10-08) claims 1-11	1-7, 14-27
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2009

Date of mailing of the international search report

27/04/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weigl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/065993

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAVINI ET AL: "An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy" VETERINARY MICROBIOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 124, no. 1-2, 20 September 2007 (2007-09-20), pages 140-146, XP022190624 ISSN: 0378-1135 the whole document	1-7, 14-27
A	MATTION N ET AL: "Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 31-32, 22 October 2004 (2004-10-22), pages 4149-4162, XP004594108 ISSN: 0264-410X page 4152, column 1, paragraph 1	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/065993

Patent document cited in search report	Publication data	Patent family member(s)	Publication date
US 4545987	A	08-10-1985	AU 561134 B2 30-04-1987
			AU 3569384 A 27-06-1985
			NZ 210132 A 29-05-1989
			ZA 8408857 A 31-07-1985

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

129

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2008/065993

International filing date (day/month/year)
21.11.2008

Priority date (day/month/year)
21.11.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/15

Applicant
WYETH FARMA, S.A.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Weigl, Martina

Telephone No. +49 89 2399-7518



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **2008/065993**
PCT/EP2008/065993

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2008/065993

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>4,10-12,17,19,24,26,28-32</u>
	No: Claims	<u>1-3,5-9,13-16,18,20-23,25,27</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-32</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-32</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No. 32

PCT/EP2008/065993

Re Item V.

1. Subject-matter of the application

The application relates to the preparation of a Bluetongue virus vaccine by twice inactivating the virus with an inactivating agent (e.g. binary ethyleneimine). A combination of aluminium hydroxide and saponin is identified as the most suitable adjuvant.

2. Documents

The following documents (D) are made reference to:

- D1: RAMAKRISHNAN M A ET AL: "Immune Responses and Protective Efficacy of Binary Ethyleneimine (BEI)-Inactivated Bluetongue Virus Vaccines in Sheep" VETERINARY RESEARCH COMMUNICATIONS ; AN INTERNATIONAL JOURNAL PUBLISHING TOPICAL REVIEWS AND RESEARCH ARTICLES ON ALL ASPECTS OF THE VETERINARY SCIENCES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 30, no. 8, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 873-880, XP019455083 ISSN: 1573-7446
- D2: US-A-4 545 987 (GILES RICHARD E [US] ET AL) 8 October 1985 (1985-10-08)
- D3: SAVINI ET AL: "An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy" VETERINARY MICROBIOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 124, no. 1-2, 20 September 2007 (2007-09-20), pages 140-146, XP022190624 ISSN: 0378-1135
- D4: MATTION N ET AL: "Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 31-32, 22 October 2004 (2004-10-22), pages 4149-4162, XP004594108 ISSN: 0264-410X

33

3. Methods of treatment

Claims 14-27 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

4. Novelty (Article 33(2) PCT)

- 4.1 D1 discloses a binary ethyleneimine (BEI)-inactivated Bluetongue virus for use as a vaccine in sheep. Total inactivation of the virus is confirmed on Vero cell monolayers.

The totally inactivated Bluetongue virus of D1 does not seem to be different from the Bluetongue virus obtained according to the protocol of the present application and a novel method of manufacture can not serve to render subject-matter which had already been described novel.

Hence, the subject-matter of claims 1-3, 5-7 and 13 is not novel over D1.

(Please note that a similar objection could be based on D2 or D3).

- 4.2 D1 furthermore discloses a combination of aluminium hydroxide and saponin as adjuvants.

Hence, claims 8 and 9 are not novel over D1.

- 4.3 D1 furthermore discloses vaccination of sheep by intramuscular injection with the inactivated Bluetongue virus. Hence, the subject-matter of claims 14-16, 18, 20-23, 25 and 27 is not novel over D1.

5. Inventive Step (Article 33(3) PCT)

- 5.1 Dependent claims 45, 10-12, 17, 19, 24 and 26 do not disclose additional features which are on their own sufficient to establish patentability of the claimed subject-matter,

- 5.2 Claims 28-32 relate to a method of inactivating Bluetongue virus by treating the virus solution with an inactivating agent (BEI in claim 29) twice.
The difference to the teaching of D1 thus only consists in the fact that the inactivation step is repeated.

However, the application does not present evidence that this repeated inactivation procedure has a technical effect compared to single inactivation. No comparative examples have been performed which would demonstrate that repetition of the inactivation leads to improved safety or enhanced efficacy of the immunogenic Bluetongue virus composition.

Secondly, even if such an effect could be demonstrated, no inventive step could be acknowledged. The double-inactivation of virus compositions in order to improve the safety of the composition has been practiced in the art before and is an obvious measure that the skilled person **would** take in order to ensure safety of a particular vaccine composition. In particular, double-inactivation has already been disclosed in the context of virus inactivation with BEI (in D4, see page 4152, first column, first paragraph).

It follows that the inactivation of Bluetongue virus with BEI **twice** (even if it produced a technical effect) was obvious over the cited prior art (D1 in combination with e.g. D4).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/065993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAMAKRISHNAN M A ET AL: "Immune Responses and Protective Efficacy of Binary Ethylenimine (BEI)-Inactivated Bluetongue Virus Vaccines in Sheep" VETERINARY RESEARCH COMMUNICATIONS ; AN INTERNATIONAL JOURNAL PUBLISHING TOPICAL REVIEWS AND RESEARCH ARTICLES ON ALL ASPECTS OF THE VETERINARY SCIENCES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 30, no. 8, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 873-880, XP019455083 ISSN: 1573-7446 the whole document	1-32
X	US 4 545 987 A (GILES RICHARD E [US] ET AL) 8 October 1985 (1985-10-08) claims 1-11	1-7, 14-27
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2009

Date of mailing of the international search report

27/04/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weikl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/065993

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAVINI ET AL: "An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy" VETERINARY MICROBIOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 124, no. 1-2, 20 September 2007 (2007-09-20), pages 140-146, XP022190624 ISSN: 0378-1135 the whole document	1-7, 14-27
A	MATTION N ET AL: "Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 31-32, 22 October 2004 (2004-10-22), pages 4149-4162, XP004594108 ISSN: 0264-410X page 4152, column 1, paragraph 1	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/065993

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4545987	A	08-10-1985	AU 561134 B2	30-04-1987
			AU 3569384 A	27-06-1985
			NZ 210132 A	29-05-1989
			ZA 8408857 A	31-07-1985



No. 10-061147- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:55:21
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 137

Decision 486/00

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTI

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
 - ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH FARMA S.A

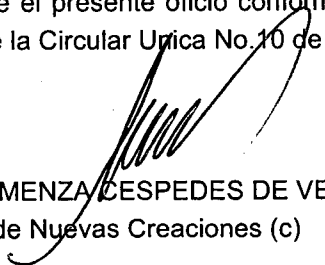
REFERENCIA	Radicación No.	10 061147
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/065993
	Fecha inicio fase nacional	21/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>Nº 09385</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 30 JUL. 2010
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH FARMA S.A

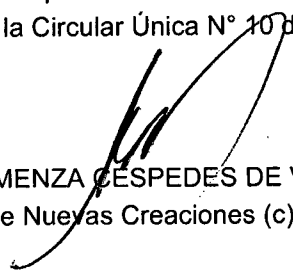
REFERENCIA	Radicación No.	10 061147
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/065993
	Fecha inicio fase nacional	21/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

09386

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

30 JUL 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11