

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de mayo de 2010 (27.05.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/058236 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/145 (2006.01)

Cerrada Colina No. 113, Col. Jardines del Pedregal,
México, D.F. 01900 (MX).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB2008/003150

(74) Mandatario: **ROMERO-MIRANDA, José Antonio**;
Thiers No. 251, Pisos 9 a 14, Col. Anzures, Del. Miguel
Hidalgo, Distrito Federal, 11590 (MX).

(22) Fecha de presentación internacional:
19 de noviembre de 2008 (19.11.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **LABORATORIO AVI-MEX, S.A. DE C.V.** [MX/
MX]; Maíz No. 18, Col. Granjas Esmeralda, Del.
Iztapalapa, México, D.F. 09810 (MX).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
LOZANO-DUBERNARD, Bernardo [MX/MX];
Circuito Diamantes No. 127, Col. Joyas del Pedregal, Del.
Coyoacán, México, D.F. 04660 (MX). **SARFATI-
MIZRAHI, David** [MX/MX]; Parque de los Pirineos No.
30, Fracc. Parques de la Herradura, Huixquilucan, Estado
De México, 52773 (MX). **SUÁREZ-MARTÍNEZ, Jesús
Alejandro** [MX/MX]; Juan de Dios Peza No. 107, Col.
Obrera, Delegación Cuauhtémoc, México, D.F. 06800
(MX). **GAY-GUTIÉRREZ, Manuel Joaquín**
[MX/MX]; Paseo de Antioquia No. 66, int. 404, Col.
Lomas Estrella, Delegación Iztapalapa, México, D.F.
09850 (MX). **SOTO-PRIANTE, Ernesto** [MX/MX];

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): 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, GD, 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) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (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).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: RECOMBINANT INACTIVATED VIRAL VECTOR VACCINE

(54) Título : VACUNA RECOMBINANTE DE VECTOR VIRAL INACTIVADO

(57) Abstract: A vaccine is described comprising an inactivated viral vector having inserted therein an exogenous nucleotide sequence encoding for a disease of interest, together with a pharmaceutically acceptable vehicle, adjuvant or excipient, providing due protection against the disease of interest through use of a concentration of the viral vector similar to that required for an active virus vaccine based on the same viral vector. Principally viral vectors of paramyxovirus or adenovirus are described.

(57) Resumen: Se describe una vacuna que comprende un vector viral inactivado, que tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para una enfermedad de interés; y, un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable, la cual brinda la debida protección en contra de la enfermedad de interés mediante el uso de un título del vector viral similar al requerido para una vacuna de virus activo basada en el mismo vector viral. Principalmente se describen vectores virales de paramixovirus o adenovirus.



WO 2010/058236 A1

"VACUNA RECOMBINANTE DE VECTOR VIRAL INACTIVADO"**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención está relacionada con las técnicas utilizadas en la
prevención y tratamiento de enfermedades, preferiblemente del tipo aviar y más
particularmente, está relacionada con vacunas recombinantes que comprenden un vector
viral inactivado, que tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica
para una proteína con actividad antigénica de una enfermedad; y, un vehículo, adyuvante
o excipiente farmacéuticamente aceptable.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Es conocido que las vacunas contra agentes patógenos virales se formulan
mediante el aislamiento del virus que corresponda para su posterior utilización para la
producción de una vacuna, administrándola a animales o humanos mediante diversas
formulaciones.

Por una parte, existen formulaciones de vacuna que utilizan virus completos y
activos que en el campo han mostrado una baja patogenicidad, o bien, cuya
patogenicidad se ha atenuado en el laboratorio, pero que sin embargo, al ser
suministradas provocan una reacción antigénica suficiente para proveer la protección
contra cepas virales de su misma especie de mayor patogenicidad.

Por ejemplo, la enfermedad de Newcastle (ENC) es de origen viral y altamente
contagiosa, e inclusive puede ser letal. Dicha enfermedad afecta a las aves domésticas y
silvestres causándoles alta morbilidad y mortalidad. La ENC es causada por un virus de
la familia Paramyxoviridae, del género Avulavirus. De acuerdo con su grado de
patogenicidad y virulencia, las cepas se clasifican en: lentogénicas, mesogénicas y
velogénicas, es decir, de baja, moderada y alta patogenicidad respectivamente (Office
International des Epizooties (2008). Newcastle Disease. OIE Manual of Diagnostic Tests
and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties. France, p. 576-
589).

Las fuentes de transmisión del virus de la ENC son múltiples. Por ejemplo,
directamente a través de aves vivas o muertas y sus productos o subproductos, o
indirectamente a través de vectores como insectos u otros animales infectados,
incluyendo al hombre. El período de incubación para los virus de la ENC de tipo
velogénico (VVENC) causantes de alta mortalidad es de 21 días aproximadamente, y con
signología respiratoria y/o nerviosa como jadeo y estornudo e incoordinación, alas

erizadas, arrastre de las patas, cabeza, cuello torcidos, tics, desplazamientos en círculos, depresión, inapetencia y parálisis completa. Además, se presenta: interrupción parcial o completa de la producción de huevos, huevos deformes o de cáscara rugosa y fina, que contienen albúmina acuosa.

5 Una de las estrategias utilizadas para el control y prevención de la ENC es precisamente el uso de vacunas de virus activos, normalmente elaboradas a partir de cepas lentogénicas. Las vacunas vivas contra ENC inducen protección a nivel de la mucosa respiratoria y han sido usadas por la industria durante más de 50 años. Estas vacunas de virus activo están basadas principalmente en el uso de los virus lentogénicos
10 de las cepas Hitchner B1 y LaSota, esta última siendo la vacuna más popular (Op. Cit., Office International des Epizooties (2008), Newcastle).

No obstante, debido a que los virus activos pueden quedar inactivados debido a los componentes de una emulsión, la estabilidad de vacunas activas en emulsión es limitada, por lo que normalmente se utilizan en otro tipo de formulaciones, o bien, se
15 suministran mediante mezclas in situ, lo cual dificulta su aplicación en avicultura de gran escala.

El problema principal que presentan los virus activos es que no siempre es posible utilizarlos como vacunas por su alta capacidad de variación genética, recombinación con otros virus activos o predisposición a cambios en su patogenicidad, tales como el virus de
20 influenza. La influenza es una enfermedad respiratoria que afecta tanto a mamíferos como a aves. La aparición de una cepa del virus de influenza en una determinada población puede traer consecuencias graves para los individuos, tanto para las aves domésticas así como para los humanos u otros mamíferos. El virus, cuando infecta a gallinas domésticas y mamíferos, muta con rapidez para adaptarse a esta nueva
25 población y durante ese proceso evolutivo de adaptación puede traer como consecuencia cambios biológicos muy importantes en el mismo virus que dan lugar a resultados fatales para el huésped y la población animal o humana.

Particularmente, la influenza aviar (IA) es una enfermedad de etiología viral altamente contagiosa causada por virus que pertenecen al tipo A de la familia
30 *Orthomyxoviridae*. La mayoría de los virus de IA (VIA) han sido aislados a partir de aves silvestres, particularmente de aves acuáticas que sirven como reservorio y son portadoras del virus de IA de baja patogenicidad (VIABP). Cuando estos virus infectan a huéspedes no naturales para el virus, como las aves de corral, principalmente las gallináceas (gallinas, pavos y codornices, entre otras), el virus sufre mutaciones que lo
35 hacen cambiar a la forma altamente patogénica (VIAAP) mediante un proceso de adaptación.

Los VIA se pueden clasificar de acuerdo a dos de las proteínas externas del virus: la primera de ellas es la hemoaglutinina que reviste gran importancia, toda vez que es la responsable de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en las aves infectadas o vacunadas y de la cual se han reportado 16 subtipos o serotipos diferentes; la segunda
5 proteína es la neuraminidasa de la cual se han reportado 9 subtipos diferentes. Particularmente, los virus de mayor importancia para las aves son aquellos cuya hemoaglutinina contiene los serotipos H5 y H7 que al mutar a alta patogenicidad son capaces de producir mortalidades cercanas al 100%.

Asimismo, la enfermedad de IA en aves tiene dos formas de presentación clínica:
10 la primera de ellas es influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) que puede causar enfermedad leve, a veces expresada por mal aspecto del plumaje, reducción en la producción de huevo; pero principalmente la IA reviste importancia en las aves debido a la alta capacidad mutagénica del virus que en estas aves, invariablemente da lugar a la segunda presentación que es la influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) capaz de
15 causar mortalidades cercanas al 100%.

Particularmente, los signos clínicos de la IA son variables y están influenciados por el subtipo de virus implicado, la patogenicidad del mismo, el estado inmune y las especies aviares afectadas. El periodo de incubación para el VIAAP es de 21 días y los signos clínicos van desde conjuntivitis, elevación de la temperatura caracterizada por
20 erizamiento de pluma, depresión, postración y muerte. Las lesiones más frecuentemente descritas son: congestión pulmonar, hemorragias y edemas.

Una vez introducido el VIA dentro de una granja avícola, éste es excretado al medio ambiente por las heces y fluidos respiratorios. La transmisión y difusión del virus a otras aves se produce fundamentalmente mediante el contacto directo con las
25 secreciones de aves infectadas, especialmente heces, alimentos, agua, equipo y ropa contaminados. La susceptibilidad a la infección y la manifestación de signología clínica de la enfermedad es muy variable.

Para este tipo de enfermedades, que tienen un control difícil y en las cuales una vacuna de virus activo puede representar un riesgo para los animales e inclusive un
30 riesgo para la salud humana en caso de perderse el control de la misma durante su aplicación, se prefiere utilizar vacunas de virus inactivado, normalmente en emulsión.

En el arte previo, numerosas vacunas han sido desarrolladas para la prevención de diversas enfermedades virales, tales como la IA que se describió arriba. Respecto de esta última enfermedad, existen vacunas emulsionadas que incluyen al virus completo de
35 IA y se producen en embriones de pollo. Este virus es inactivado y emulsionado en agua-aceite para su aplicación vía subcutánea o intramuscular en las aves comerciales (Office

International des Epizooties (2008). Avian influenza. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties. France, p. 465-481).

Más particularmente, las vacunas elaboradas con virus inactivado de IA estimulan una fuerte respuesta inmune a nivel sistémico y han tenido resultados positivos para el control de ambas formas de IA. La vacunación es utilizada no únicamente para prevenir los signos clínicos de la enfermedad, sino también, para reducir, en la medida de lo posible la excreción viral de las aves infectadas al medio ambiente. La reducción de la excreción viral disminuye la oportunidad de la diseminación del virus de aves vacunadas que se infectan hacia aves susceptibles no infectadas (Swayne, D. y Kapczynski, D. (2008). Vaccines, Vaccination and Immunology for avian influenza viruses in poultry. In Avian Influenza. Ed. By David Swayne. Blackwell Publishing, USA, p. 407-451.)

Adicionalmente, las vacunas de virus inactivado en emulsión tienen una mayor estabilidad, lo cual permite un mejor manejo de la vacuna y una mayor vida de anaquel de la vacuna. Es por este motivo que también las vacunas de la ENC han sido formuladas con virus inactivados en emulsión.

Es importante considerar que una de las diferencias principales entre una vacuna de virus activo y una de virus inactivado, es la cantidad de virus que se requiere para lograr una respuesta antigénica al ser suministradas.

Debido a que los virus activos tienen intacta su capacidad de replicar en las células, se requiere en la vacuna cantidades menores del virus en cuestión a la dosis que genere la actividad antigénica, para evitar que los individuos a los que se aplica la vacuna se enfermen, considerando que el virus se replicará de manera natural y alcanzará una vez dentro del organismo cantidades suficientes para lograr la respuesta antigénica esperada.

Por su parte, las vacunas de virus inactivado requieren una concentración de virus mucho mayor que un virus activo, normalmente de por lo menos 10 veces más, para lograr la misma actividad antigénica, puesto que precisamente el virus ha sido manipulado para eliminar su capacidad de replicarse, de manera que la totalidad del antígeno que se requerirá para provocar la respuesta inmune debería estar presente desde el momento en el que se suministra la vacuna, pues el organismo no replicará de manera normal al virus y en consecuencia, no se incrementará su cantidad.

En otro orden de ideas, el uso de vacunas recombinantes es uno de los avances más significativos en el campo de la biotecnología. La habilidad para aislar y empalmar (o recombinar) fragmentos específicos de ADN de un organismo, del tamaño de un gen y transferirlos a otro por medio de un vector o plásmido de ADN para hacer que se produzca un antígeno capaz de inducir la formación de anticuerpos protectores ha

conducido a la introducción de nuevas vacunas. A diferencia de las vacunas convencionales, la tecnología recombinante proporciona ventajas muy importantes para el caso de enfermedades, como la IA anteriormente descrita, en las que no existe la posibilidad de emplear virus activos completos debido a su alta capacidad mutagénica y donde el uso del virus completo inactivado constituye siempre un riesgo si el proceso de inactivación fue inadecuado. Precisamente las vacunas recombinantes, en su forma activa, al tener insertados los nucleótidos necesarios para la expresión de los antígenos en contra de la enfermedad de interés, pueden ser administradas con seguridad para inducir inmunidad local a nivel de la mucosa respiratoria en un vector viral activo de una enfermedad de baja patogenicidad, lo cual resultaría imposible de realizar mediante el uso del virus vivo no recombinante por los riesgos que esto conllevaría.

Otra ventaja de las vacunas recombinantes es que, el vector viral que se utiliza, normalmente no corresponde a la enfermedad respecto de la que protegen, lo cual facilita su utilización en el área veterinaria de técnicas de diagnóstico y prevención del tipo que permiten diferenciar animales vacunados de animales infectados, mejor conocidas como DIVA (Capua, I. et. al. "Development of a DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza". Avian Pathology 32(1) pp. 47-55)

Así pues, las vacunas que actualmente se usan para el control de la IA (virus completos inactivados y emulsionados en aceite) y otras enfermedades similares, previenen la mortalidad causada por VIAAP pero no evitan la infección y replicación de los VIA en las aves, por lo que la disminución de la excreción y diseminación del virus se logran parcialmente.

Por este motivo, se han desarrollado en el arte previo vectores virales de enfermedades de baja patogenicidad, como Newcastle, que tienen insertados genes que codifican para sitios antigénicos de enfermedades de difícil control, como la influenza aviar. Tal es el caso del documento de Ge, Deng, Tian et al. "Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice", J. Vir. Vol. 81, No. 1, p. 150-158, que describe una vacuna recombinante que se encuentra en forma activa. Particularmente dicho documento describe el resultado de pruebas clínicas utilizando la cepa LaSota con un gen de influenza aviar subtipo H5N1.

Otro documento del arte previo, perteneciente a este campo es aquel de Park, Man Seong et al. "Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian Influenza and Newcastle disease". PNAS Vol. 103, No. 21, May 12, 2006 p. 8203-8208. Dicho documento se refiere a una tecnología para incrementar la expresión de genes de influenza aviar, tecnología que será denominada en adelante como "anclaje".

Aunque algunas vacunas recombinantes han sustituido a vacunas de virus activo dadas las ventajas arriba mencionadas, las vacunas recombinantes aún no han logrado las ventajas de las vacunas inactivadas de virus completo, y sobre todo, no han logrado inducir la inmunidad adecuada respecto del gen exógeno insertado, principalmente debido a que las vacunas recombinantes, como la arriba descrita de Newcastle con influenza, provocan actividad antigénica contra ambas enfermedades, pero requieren de una exposición mayor de los sitios antigénicos exógenos que se encuentran insertados en el vector. De ahí que se haya intentado el desarrollo de tecnologías, como la del anclaje, que mediante modificaciones genéticas, como el caso de la influenza arriba descrito, logren una mejor expresión del antígeno en el vector viral, tecnologías que no han tenido el éxito esperado.

Por este motivo, las vacunas recombinantes de virus activo tradicionalmente se formulan con concentraciones de virus aproximadamente 10 veces mayores a la utilizada para la vacuna no recombinante de virus activo correspondiente al vector viral que se utiliza, con la finalidad de lograr una exposición adecuada de los sitios antigénicos del microorganismo de interés.

De igual manera, las vacunas recombinantes no se han utilizado inactivadas, pues ello implicaría el lograr concentraciones de vector viral 100 veces mayores a las que se requieren para el virus normal (10 veces mayor a la del virus recombinante activo), lo cual es industrialmente muy complicado. Consecuentemente, estas vacunas de virus recombinante activo tampoco se han utilizado en emulsión de manera generalizada, debido a que la estabilidad está limitada y la emulsión no representa ventajas en este aspecto debido a la naturaleza activa del vector viral activo.

En resumen, se puede apreciar de lo anterior que existe una gran necesidad de vacunas para combatir enfermedades diversas mediante tecnología recombinante, de una manera más segura y eficiente, de manera que se logre una mayor estabilidad en las vacunas obtenidas con resultados de control y eficacia adecuados.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Durante el desarrollo de la presente invención, se descubrió de manera inesperada que una vacuna que comprende un vector viral recombinante inactivado, que tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para un sitio antigénico de una enfermedad de interés; y, un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable en emulsión, brinda la debida protección en contra de dicha enfermedad de interés mediante el uso de un título del vector viral similar al requerido para una vacuna recombinante de virus activo basada en el mismo vector viral.

En una modalidad de la invención, la secuencia de nucleótidos exógena se selecciona entre secuencias para sitios antigénicos en contra de influenza, laringotraqueitis infecciosa, bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio (Gumboro), hepatitis, rinotraqueítis viral, coriza infecciosa, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pastereiosis, Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), circovirus, bordeteliosis, parainfluenza o cualquier otro antígeno cuyo tamaño permita su inserción en el vector viral correspondiente. Preferiblemente, se utiliza un antígeno seleccionado entre influenza aviar, laringotraqueítis, bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio (Gumboro), hepatitis, PRRS y circovirus.

En una modalidad específica de la presente invención, la secuencia de nucleótidos exógena consiste en el gen que codifica para la hemoaglutinina (HA) del virus de influenza aviar, seleccionado entre los 16 subtipos de hemoaglutinina o variante inmunogénica del virus de influenza, el cual más preferiblemente codifica para por lo menos uno de los subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7 o H9 de dicha proteína.

En una modalidad específica de la invención, el gen de la proteína H5 se obtiene del virus de influenza aviar subtipo H5N2 mexicano o del subtipo H5N1 de origen asiático, observándose excelente protección de ambas modalidades hacia la mortalidad generada por VIAAP subtipo H5N2.

Para la presente invención, por lo que se refiere al vector viral, en la modalidad preferida en la que dicho vector viral en donde se encuentra insertada la secuencia de nucleótidos exógena, es el virus de la enfermedad de Newcastle (rNDV), dicho vector viral se selecciona preferiblemente de cepas vacunales, tal como las cepas LaSota, Ulster, QV4, B1, CA 2002, Roakin, Komarov, Clone 30, VGGA o cepas de los grupos genéticos I a V de la enfermedad de Newcastle. De manera preferida, el virus recombinante es de la cepa LaSota (rNDV/LS).

De igual manera, en otra modalidad específica en la que el vector viral es un adenovirus, el adenovirus se selecciona entre adenovirus aviares y porcinos, y más

preferiblemente entre el adenovirus aviar tipo 9 (rFAdV/9) y el adenovirus porcino tipo 5 (rSAdV/5).

De acuerdo con los resultados obtenidos y que se detallarán más adelante, se deduce que mediante la presente invención es posible emplear una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para determinantes antigénicas específicas de una enfermedad de interés en un vector viral para obtener una vacuna de virus inactivado recombinante en emulsión u otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

El resultado logrado mediante la vacuna de la presente invención (rNDV/LS-H5) es inesperado, toda vez que en el caso de vacunas recombinantes en vector viral, tradicionalmente se piensa que es necesaria la replicación del vector viral en las células del hospedador para que se exprese la proteína recombinante en una cantidad suficiente a fin de estimular una adecuada respuesta inmunogénica, sin embargo, en la presente invención, el resultado obtenido indica que la proteína antigénica de la enfermedad de interés se expresa adecuadamente y en cantidad suficiente en la superficie del virus vector, y su sola presencia en forma inactiva hace posible una adecuada respuesta antigénica y protectora contra dicha enfermedad de interés.

Particularmente, para el caso de enfermedades de difícil control y alta patogenicidad, tal como la influenza aviar, una las ventajas de la vacuna recombinante de la presente invención es que no se utiliza el virus completo, eliminando el riesgo de un brote debido a una inadecuada inactivación del virus vacunal. Asimismo, la vacuna de la presente invención logra una respuesta inmune local a nivel de la mucosa respiratoria de la aves, así como una respuesta inmune a nivel sistémico, que puede ser diferenciada mediante pruebas específicas de laboratorio, de respuestas inmunes inducidas por el contacto de las aves con virus completos, sean vacunales o de campo, lo que representa un avance importante para efectos epidemiológicos.

La vacuna está formulada para ser administrada por vía subcutánea, sin embargo cualquier vía sistémica como intramuscular o intradérmica podría ser utilizada con éxito. El vehículo utilizado preferiblemente para la vacuna es un vehículo líquido, más preferiblemente, se utiliza una emulsión agua en aceite, pero también es posible emplear con éxito otros tipos de adyuvantes o moduladores de la respuesta inmune.

Con la vacuna recombinante de la presente invención, la excreción de virus de campo al medio ambiente se reduce, contribuyendo de esta manera a disminuir radicalmente la diseminación del virus.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los aspectos novedosos que se consideran característicos de la presente invención, se establecerán con particularidad en las reivindicaciones anexas. Sin embargo, la vacuna de la presente invención, conjuntamente con otros objetos y ventajas de la misma, se comprenderá mejor en la siguiente descripción detallada de ciertas modalidades específicas, cuando se lea en relación con los dibujos anexos, en los cuales:

La Figura 1 es una gráfica de los resultados de mortalidad (M) y del índice de morbilidad (IM) del Ejemplo 6A generada por el desafío con un virus velogénico de la ENC (VVENC).

La Figura 2 es una gráfica de los resultados de mortalidad (M) y del índice de morbilidad (IM) del Ejemplo 6A generada por el desafío con un virus de IA de alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H5N2.

La Figura 3 es una gráfica de los resultados de mortalidad (M) y del índice de morbilidad (IM) del Ejemplo 6B, generada por el desafío con un VVENC.

La Figura 4 es una gráfica de los resultados de mortalidad (M) y del índice de morbilidad (IM) del Ejemplo 6B, generada por el desafío con un VIAAP subtipo H5N2.

La Figura 5 es una gráfica de los resultados de mortalidad (M) y del índice de morbilidad (IM) del Ejemplo 6C, generada por el desafío con un VVENC.

La Figura 6 es una gráfica de los resultados de mortalidad (M) y del índice de morbilidad (IM) del Ejemplo 6C, generada por el desafío con un VIAAP subtipo H5N2.

La Figura 7 es una gráfica de los resultados de mortalidad (M) y del índice de morbilidad (IM) del Ejemplo 6D, generada por el desafío con un VVENC.

La Figura 8 es una gráfica de los resultados de mortalidad (M) y del índice de morbilidad (IM) del Ejemplo 6D, generada por el desafío con un VIAAP subtipo H5N2.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Durante el desarrollo de la presente invención, se verificó de manera inesperada que una vacuna que comprende un vector viral inactivado, que tiene insertada una
5 secuencia de nucleótidos que codifica para una enfermedad de interés; y, un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable, brinda la debida protección en contra de la enfermedad de interés mediante el uso de un título del vector viral similar al requerido para una vacuna de virus activo basada en el mismo vector viral.

En la presente invención es básico que el vector viral se encuentre inactivado,
10 entendiéndose por inactivado que el virus recombinante que funciona como vector viral y contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para el sitio antigénico de la enfermedad de interés haya perdido la propiedad de replicarse. La inactivación se logra mediante procedimientos físicos o químicos bien conocidos en el estado de la técnica, preferiblemente mediante inactivación química con formaldehído o beta-propiolactona
15 (Office International des Epizooties (2008). Newcastle Disease. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties. France, p. 576-589). En el sentido opuesto, se entiende que un virus activo o vivo, mantiene su capacidad para replicarse.

El vector viral, preferiblemente seleccionado entre adenovirus o paramixovirus, se
20 encuentra inactivado y tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para por lo menos un sitio antigénico de una enfermedad de interés, preferiblemente de por lo menos una enfermedad seleccionada entre influenza, laringotraqueitis infecciosa, bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio (Gumboro), hepatitis, rinotraqueítis viral, coriza infecciosa, *Mycoplasma hyopneumoniae*,
25 pastereiosis, Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), circovirus, bordeteliosis, parainfluenza o cualquier otro antígeno cuyo tamaño permita su inserción en el vector viral correspondiente. Más preferiblemente, se utiliza un antígeno seleccionado entre influenza aviar, laringotraqueítis, bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio (Gumboro), hepatitis, PRRS y circovirus.

En una modalidad específica de la presente invención, la secuencia de
30 nucleótidos exógena consiste en el gen que codifica para la hemoaglutinina (HA) del virus de influenza aviar, seleccionado entre los 16 subtipos de hemoaglutinina o variante inmunogénica del virus de influenza, el cual más preferiblemente codifica para por lo menos uno de los subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7 o H9 de dicha proteína.

Para la presente invención, por lo que se refiere al vector viral, en la modalidad
35 preferida en la que dicho vector viral en donde se encuentra insertada la secuencia de

nucleótidos exógena, es el virus de la enfermedad de Newcastle (rNDV), dicho vector viral se selecciona preferiblemente de cepas vacunales, tal como las cepas LaSota, Ulster, QV4, B1, CA 2002, Roakin, Komarov, Clone 30, VGGA o cepas de los grupos genéticos I a V de la enfermedad de Newcastle. De manera preferida, el virus recombinante es de la cepa LaSota (rNDV/LS).

De igual manera, en otra modalidad específica en la que el vector viral es un adenovirus, el adenovirus se selecciona entre adenovirus aviares y porcinos, y más preferiblemente entre el adenovirus aviar tipo 9 (rFAdV/9) y el adenovirus porcino tipo 5 (rSAdV/5).

Por lo que se refiere al sitio antigénico, cuando la enfermedad de interés es influenza, se prefiere que sea el correspondiente a la proteína de hemoaglutinina (HA) de influenza aviar, obteniéndose el gen preferiblemente del virus de influenza aviar, y codifica para cualquiera de los 16 subtipos existentes, preferiblemente H5, H7 y H9, preferiblemente codifica para el subtipo H5, el cual se obtiene preferiblemente de las cepas: Bive, 435 y Viet (VT), que se describen más adelante. En este sentido, se puede inferir que la cepa fuente del gen que codifica para la HA del subtipo H5, no es crítica para la presente invención puesto que los resultados experimentales muestran que cualquier cepa puede proporcionar el material genético para lograr el objetivo de la presente invención.

Volviendo a las fuentes del gen preferidas, se puede mencionar con respecto al gen H5 de la cepa Bive, que la misma corresponde a un VIABP-H5N2 aislado en México en 1994 a partir de muestras biológicas de pollos de engorda y que ha sido identificado por el gobierno mexicano como (A/chicken/Mexico/232/CPA). Dicha cepa de virus se encuentra autorizada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) para su uso en la elaboración de vacunas inactivadas en emulsión, por lo que de esta manera el recombinar este virus con el gen de interés también asegura una bioseguridad en la vacuna recombinante de la presente invención.

Con referencia a la segunda fuente preferida del material genético que es el gen H5-435, el mismo se obtuvo de un aislamiento de VIABP-H5N2 aislado en México en 2005 a partir de muestras biológicas de pollo de engorda.

El vector viral de la vacuna de la presente invención se puede preparar amplificando mediante PCR la secuencia de nucleótidos de interés, a partir de la identificación de los sitios antigénicos de un aislamiento del patógeno de origen, para poder insertarlos posteriormente, amplificados dentro del vector viral, preferiblemente seleccionado entre adenovirus o paramixovirus. La inserción se realiza utilizando técnicas estándares de biología molecular tales como enzimas de restricción y ligasas de ADN,

entre otras. La clona infecciosa así producida es introducida en una línea celular para la generación del virus recombinante de acuerdo con el vector viral.

Dependiendo de la naturaleza del vector viral, el virus se replica en cualquier sistema adecuado para su crecimiento, tales como embrión de pollo SPF, o líneas
5 celulares comerciales o diseñadas expresamente para hacer crecer virus.

Una vez alcanzada la concentración del virus que se requiere para lograr la respuesta antigénica, preferiblemente entre 10^2 y 10^{10} DI50%/ml, dependiendo del vector viral utilizado, se procede con la inactivación del virus. Preferiblemente la inactivación se realiza mediante procedimientos físicos o químicos bien conocidos en el estado de la
10 técnica, preferiblemente mediante inactivación química con formaldehído o beta-propiolactona.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la vacunas de la presente invención son preferentemente soluciones acuosas o emulsiones. Más particularmente, se prefiere que el vehículo utilizado sea una emulsión agua-aceite. La formulación
15 específica de la vacuna dependerá del vector viral utilizado, así como de la secuencia de nucleótidos exógena que se le haya insertado. Sin embargo, en la modalidad preferida en la que el vector viral es un virus de la enfermedad de Newcastle se prefiere que la dosis sea entre 10^4 y 10^{10} DIEP50%/ml. En la modalidad en la que el vector viral es un adenovirus, se prefiere que la dosis sea entre 10^2 y 10^8 DIEP50%/ml.

Por lo que se refiere a la aplicación de la vacuna, ésta se realiza preferiblemente
20 vía subcutánea en la parte media y posterior del cuello de las aves. La vacuna de la presente invención se aplica en aves de corral, tales como pollos de engorda, aves de postura, aves reproductoras, pavos, gallos de pelea, gallinas de Guinea, perdices, codornices, patos, gansos, cisnes o avestruces. Preferiblemente, la vacuna se aplica por
25 vía subcutánea, aunque en ciertas especies puede ser por vía intramuscular en aves de cualquier edad.

Cuando la vacuna se aplica en pollos en vector de Newcastle en emulsión, la vacuna preferiblemente contiene 10^8 a 10^9 DIEP50%/0.5 ml por pollo, y más preferiblemente la vacuna contiene $10^{8.5}$ DIEP50%/0.5 ml por pollo. La vacunación en
30 pollos puede ser realizada con mayor facilidad a los 10 días de edad.

La presente invención brinda ventajas competitivas muy importantes. La vacuna recombinante inactiva de la presente invención, hace posible instaurar programas de vacunación con el uso exclusivo de vacunas recombinantes en vector viral y con inserción de genes de agentes patógenos de difícil control, lo que da lugar a un método
35 de identificación de animales infectados de animales que solamente recibieron una

vacuna (DIVA), útil en el control y la erradicación de enfermedades, caracterizado porque comprende:

a) Someter a un primer método de detección de anticuerpos, por lo menos una muestra de por lo menos un animal al que le fue aplicada una vacuna recombinante de vector viral inactivado que tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para un antígeno de una enfermedad provocada por un patógeno, para detectar si existen anticuerpos presentes en dicha muestra que correspondan a dicho antígeno;

b) Someter a un segundo método de detección de anticuerpos, por lo menos una muestra del mismo animal cuya muestra se sometió al primer método de detección de anticuerpos, para detectar si existen anticuerpos presentes en dicha muestra que correspondan al patógeno que causa la enfermedad;

c) Determinar si el animal está infectado o vacunado a partir del resultado del primer y segundo métodos de detección de antígenos.

Por ejemplo, cuando el patógeno tiene un difícil control, tal como el VIA, principalmente H5 y H7, que son causa de alta mortalidad en aves de corral, con la vacuna inactivada recombinante de la presente invención se logra una excelente protección a nivel sistémico, que ofrece además un alto grado de bioseguridad comparativamente al uso de virus completos de IA que constituyen un grave riesgo en caso de que no hayan sido inactivados adecuadamente. Este riesgo se incrementa durante el proceso de elaboración en que los virus se encuentran activos. La presente invención permite además la diferenciación epidemiológica de aves vacunadas con respecto a otras aves expuestas a virus completos (sistema DIVA) ya que cuando únicamente se inserta el gen de la hemoaglutinina (HA) del virus de influenza aviar, la prueba de laboratorio que se utiliza para detectar los anticuerpos inducidos por la vacuna contra la influenza aviar es la inhibición de la hemoaglutinación (HI). Las pruebas inmunológicas actuales, tales como ELISA y otras pruebas como la difusión en gel de agar, resultan negativas a la detección de anticuerpos contra la influenza aviar inducidos por la vacuna recombinante de la presente invención, ya que están diseñadas para detectar anticuerpos inducidos por otro tipo de antígenos contenidos en los virus completos. Cuando las aves vacunadas con la vacuna recombinante de la presente invención, se infectan con el virus de campo, estas últimas pruebas resultan positivas a la detección de anticuerpos contra la influenza aviar, con lo cual se puede distinguir a las aves infectadas.

De manera adicional, la presente invención permite establecer programas con uso exclusivo conjunto de vacunas recombinantes en forma inactiva y activa, la primera que brindará la inmunidad sistémica ya señalada y la vacuna activa recombinante que

complementará la inmunidad a nivel de las mucosas llevándola a protecciones iguales o cercanas al 100% a nivel de campo. Con este programa también se utiliza el sistema DIVA comentado anteriormente.

En la modalidad preferida de la invención en la que el vector recombinante de la vacuna inactivada en emulsión es Newcastle con un gen de influenza insertado, tanto para desafíos con VVENC como de VIAAP, ésta se puede aplicar de manera simultánea con una vacuna activa con el mismo vector y antígeno, directamente en la mucosa respiratoria, ya sea por vía ocular, por aspersión, o en agua de bebida, de manera que se estimule fuertemente la respuesta a nivel local (en las mucosas respiratoria y digestiva) generando la producción de inmunoglobulinas secretorias de tipo A (IgA), con lo que se disminuye de forma importante la replicación de virus de campo y se reduce significativamente su excreción y diseminación.

Por otra parte, la vacuna de la presente invención permite establecer programas de control y posible erradicación por diferenciación de aves vacunadas de infectadas, ya que al aplicar las vacunas recombinantes inactivadas de la presente invención es posible la diferenciación de aves vacunadas de aves infectadas con virus de campo (Sistema DIVA) ya que las vacunas recombinantes solamente contienen como antígeno a la hemoaglutinina de los VIA haciendo posible el uso de pruebas de diagnóstico como ELISA que detectan anticuerpos inducidos por otros antígenos del virus y no los inducidos únicamente por la hemoaglutinina.

La vacuna recombinante contra influenza de la presente invención, será más claramente ilustrada por medio de los ejemplos que a continuación se describen, los cuales se presentan con propósitos meramente ilustrativos, pero no limitativos de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Generación del vector Newcastle LaSota.

Para clonar el genoma del virus de Newcastle cepa LaSota y generar así un vector viral, primeramente se elaboró un vector intermedio denominado "pNDV/LS". Para ello se llevó a cabo la extracción de ARN viral total de Newcastle cepa LaSota por el método de triazol. A partir del ARN purificado, se llevó a cabo la síntesis de ADNc (ADN complementario) del genoma viral, usando como molde el ARN total purificado anteriormente. Con el objetivo de clonar todos los genes del genoma de Newcastle (15, 183 pares de bases (pb)), se amplificaron por PCR, 7 fragmentos con extremos "traslapantes" y sitios de restricción cohesivos. El fragmento 1(F1) abarca del nucleótido (nt) 1-1755, F2 va de nt 1-3321, F3 comprende del nt 1755-6580, F4 va de 6,151-10, 210,

F5 abarca del nt 7,381-11,351, F6 va de 11,351-14,995 y F7 comprende del nt 14,701-15, 186. El ensamble de los 7 fragmentos fue realizado dentro de un vector de clonación denominado pGEM-T usando técnicas estándares de ligación, lo que permitió reconstruir el genoma de Newcastle LaSota, el cual después de la clonación contiene un sitio de restricción único SacII, entre los genes P y M, el cual sirve para la clonación de cualquier gen de interés en esta región viral del vector.

Ejemplo 2

Clonación del gen HA del VIA subtipo H5N2 cepa 435.

Para clonar el gen HA del VIA cepa 435, se llevó a cabo la extracción de ARN total viral, por el método de Triazol. Este ARN total purificado fue usado posteriormente para sintetizar ADNc (ADN complementario) y mediante el uso de oligonucleótidos específicos con la técnica de PCR se amplificó el gen HA de virus de IA. El gen HA de 435, fue posteriormente insertado en el vector pGEM-T usando técnicas estándares de clonación y generando así el plásmido: pGEMT-435.

Ejemplo 3

Clonación del gen HA de IA 435 dentro del sitio SacII del vector pNDV/LS para la generación del plásmido: pNDV/LS-435.

A: Generación del vector intermediario pSacII GE/GS :

Con el objeto de introducir las secuencias de transcripción de Newcastle denominadas GE/GS en el extremo 5' prima del gen HA 435, se construyó un nuevo vector intermediario denominado pSacII GE/GS, mediante la amplificación inicial por PCR de las secuencias GE/GS tomando como molde el genoma de Newcastle y la posterior inserción de estas secuencias en pGEM-T.

B: Subclonación del gen HA al vector pSacII GE/GS :

El plásmido pGEMT-435 fue digerido con HpaI-NdeI y posteriormente clonado dentro del pSacII GE/GS, para generar el plásmido pSacII GE/GS-HA435.

C: Subclonación de GE/GS-HA435 al vector: pNDV-LS.

Ambos plásmidos: pSacII GE/GS-HA435 y pNDV/LS, fueron digeridos con SacII, los productos de la digestión fueron purificados y la región GE/GS-HA435, fue purificada e insertada dentro del sitio SacII de pNDV/LS, generando así la clona infectiva denominada: pNDV/LS-435.

Ejemplo 4

Generación del virus recombinante rNDV/LS-HA435 en cultivo celular.

Células Hep-2 y A-549 fueron inicialmente infectadas con virus MAV-7 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Después de 1 hora de incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, las células fueron transfectadas con 1 microgramo (μg) de ADN de la clona pNDVLS-435, junto con 0.2 μg de ADN de los plásmidos de expresión: pNP, pP y pL los cuales codifican para las proteínas virales P, NP y L, necesarias para la generación del recombinante en ambos tipos celulares. 12 horas después de la transfección, el virus recombinante generado en ambos tipos celulares fue cosechado e inyectado a embriones de pollo SPF de 10 días de edad para amplificar el virus generado. El líquido alantoideo cosechado 48 horas después, fue titulado por ensayo en placa en células Vero, generando de esta manera el virus recombinante final, utilizado en la preparación de la vacuna.

Los virus recombinantes conteniendo los genes obtenidos de las cepas Bive y Viet fueron generados de la forma descrita anteriormente.

Ejemplo 5

Método de elaboración de vacuna emulsionada inactivada con virus recombinante de Newcastle LaSota con inserto H5 del virus de la Influenza Aviar: rNDV/LS-H5.

Elaboración del antígeno

A partir de la semilla de producción, se inocularon huevos embrionados de pollo, libres de patógenos específicos (SPF), con la dosis infectante previamente determinada. Los embriones se incubaron a 37°C por un periodo de 72 horas, revisando diariamente la mortalidad. Transcurrido este periodo, se refrigeran los embriones vivos de un día para otro, preferentemente 24 horas, y se cosechó el fluido amnioalantoideo (FAA) en condiciones asépticas. El FAA se clarificó por centrifugación y se procedió a su inactivación con formaldehído aunque también se puede usar cualquier otro agente inactivante conocido, regularmente utilizado en la producción de vacunas de este tipo. El FAA es sometido a pruebas que determinen su inactivación, pureza, esterilidad y título tanto DIEP como HA.

Elaboración de la emulsión

La vacuna se preparó en una emulsión del tipo agua en aceite. Para la preparación de la fase oleosa se utilizó aceite mineral y surfactantes del tipo Span 80 y Tween 80. Para la preparación de la fase acuosa se mezcló el FAA con una solución conservadora (timerosal). Para la elaboración de la emulsión, se agregó lentamente la

fase acuosa a la fase oleosa bajo agitación constante. Para alcanzar el tamaño de partícula especificado, se utilizó un homogenizador o un molino coloidal.

Contenido antigénico.

La vacuna se formuló para aportar un mínimo de $10^{8.5}$ DIEP_{50%}/0.5 ml a fin de utilizar una dosis por ave de 0.5 ml.

Con base en este procedimiento se elaboraron seis vacunas recombinantes: tres con el vector Newcastle cepa LaSota (rNDV/LS) con anclaje para la HA de los virus de IA denominadas (Rd) y tres más con el mismo vector pero sin anclaje denominadas (Re); el genoma de cada uno de los dos vectores Rd y Re fue clonado con tres diferentes genes de HA que se indican a continuación para obtener las 6 vacunas:

1. **Gen H5-Bive:** El cual se obtuvo del VIABP subtipo H5N2 cepa (A/chicken/Mexico/232/CPA), aislado en México en 1994 a partir de muestras biológicas de pollos de engorda, y que corresponde a la cepa de virus autorizada por SAGARPA para la elaboración de vacunas inactivadas en emulsión.
2. **Gen H5-435:** Se obtuvo de un aislamiento de VIABP subtipo H5N2 aislado en México en 2005 a partir de muestras biológicas de pollo de engorda. La cepa 435 demostró tener características antigénicas diferenciales en pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (HI) con la cepa Bive y en estudios de secuenciación de nucleótidos mostró cambios importantes.
3. **Gen H5-Vt:** Este gen fue aislado en Vietnam y corresponde al gen H5 de un virus de IA subtipo H5N1.

Ejemplo 5A

De conformidad con el método descrito en el ejemplo 5, se elaboró una vacuna experimental recombinante en vector (rNDV/LS) con anclaje (Rd) con gen H5-Bive inactivada y emulsionada en fórmula farmacéutica agua/aceite, la cual se denominó Emi Rd-Bive.

Ejemplo 5B

De acuerdo al método descrito en el ejemplo 5, fue elaborada una vacuna experimental recombinante en vector (rNDV/LS) con anclaje (Rd) con gen H5-435 inactivada y emulsionada en fórmula farmacéutica agua/aceite, denominada Emi Rd-435.

Ejemplo 5C

De conformidad con el método descrito en el ejemplo 5, se elaboró una vacuna experimental recombinante en vector (rNDV/LS) con anclaje con gen H5-Vt inactivada y emulsionada en fórmula farmacéutica agua/aceite, la cual se denominó Emi Rd-Vt.

Ejemplo 5D

De conformidad con el método descrito en el ejemplo 5, se elaboró una vacuna experimental recombinante en vector (rNDV/LS) sin anclaje con gen H5-Bive inactivada y emulsionada en fórmula farmacéutica agua/aceite, la cual fue denominada Emi Re-Bive.

Ejemplo 5E

De acuerdo al método descrito en el ejemplo 5, fue elaborada una vacuna experimental recombinante en vector (rNDV/LS) sin anclaje con gen H5-435 inactivada y emulsionada en fórmula farmacéutica agua/aceite, denominada Emi Re-435.

Ejemplo 5F

De conformidad con el método descrito en el ejemplo 5, se elaboró una vacuna experimental recombinante en vector (rNDV/LS) sin anclaje con gen H5-Vt inactivada y emulsionada en fórmula farmacéutica agua/aceite, denominada Emi Re-Vt.

Ejemplo 6**Evaluación *in vivo* de la potencia de las vacunas recombinantes en vector****ENC-LaSota con y sin anclaje para el gen HA de virus de IA**

Con el propósito de determinar la efectividad de las vacunas recombinantes inactivadas en emulsión de la presente invención y demostrar que las mismas pueden ser elaboradas con diferentes genes de hemoaglutinina clonados a partir de diferentes subtipos y variantes antigénicas de los virus de IA, se probó la efectividad de las mismas para prevenir la mortalidad generada por virus de IAAP subtipo H5N2 y VVENC en aves SPF y por otra parte en pollos comerciales de engorda con inmunidad materna hacia los VIA y la ENC.

Las cepas utilizadas para desafío en los diferentes experimentos a fin de medir la efectividad de las vacunas fueron las siguientes:

1. Influenza Aviar (VIAAP-H5N2): Virus de alta patogenicidad subtipo-H5N2 cepa A/chicken/Querétaro/14588-19/95 con título $10^{8.0}$ DIEP50%/ml, equivalentes a 100 DLP50%/0.3ml/pollo.
2. Virus VVENC: cepa Chimalhuacán conteniendo $10^{8.0}$ DIEP50%/ml, equivalentes a $10^{6.5}$ DIEP50%/0.03ml/pollo.

Los desafíos se realizaron a los 35 días de edad de las aves (21 días pos-vacunación –DPV-) en unidades de aislamiento del INIFAP-CENID–Microbiología, en gabinetes aisladores de acrílico de bioseguridad nivel 3. Para realizar los desafíos cada grupo experimental se subdividió en dos subgrupos y cada subgrupo se colocó en las unidades de aislamiento correspondientes siguiendo los procedimientos de bioseguridad preestablecidos.

El VIAAP-H5N2 se diluyó en proporción 1:10 con PBS pH 7.2 y se aplicó a cada pollo 0.06 ml (2 gotas) en cada ojo y 0.09 ml (3 gotas) en cada narina, equivalente 0.3 ml o 100 DLP50%.

El desafío con virus VVENC se realizó aplicando a cada pollo por vía ocular 0.03 ml de una suspensión viral conteniendo $10^{8.0}$ DIEP50% / ml, equivalente a $10^{6.5}$ DIEP50% / ave.

Para realizar la evaluación pos-desafío (PD), todos los grupos se observaron diariamente para registrar la mortalidad y la morbilidad que incluyó la severidad del cuadro clínico, por lo que cada día PD (DPD) se revisaron individualmente las aves de cada grupo, dándoles un valor numérico de acuerdo al criterio de la tabla 1:

TABLA 1 – Valores para registro de mortalidad y morbilidad

Signos clínicos	Ligero	Severo
Sin signos clínicos aparentes	0	
Conjuntivitis	1	2
Conjuntivitis + pluma erizada	3	4
Conjuntivitis + pluma erizada + postración	5	6
Muerte	7	

La valoración PD con VVENC fue realizada durante 14 días, mientras que la valoración PD con VIAAP-H5N2 fue realizada durante 10 días de acuerdo a los lineamientos sugeridos por la OIE.

El índice de morbilidad (IM) de cada grupo se calculó mediante una ecuación que se obtiene tomando los datos del día en que mostró la mayor gravedad de signología clínica durante el periodo de observación PD.

$$(A) (100)$$

$$IM = \frac{\text{-----}}{\text{-----}}$$

B

Donde

A= Suma de todos los valores individuales de la severidad de las lesiones en el día de observación.

B= Valor de la severidad máxima posible del cuadro clínico en un día.

A continuación se describen los experimentos realizados.

5

Ejemplo 6A

Se llevaron a cabo desafíos con un VVENC y VIAAP-H5N2 a 21 DPV en grupos de aves SPF, las cuales fueron inmunizadas, como se indica en la Tabla 2, con las vacunas inactivadas de la presente invención obtenidas conforme a los Ejemplos 5A (Emi Rd-Bive), 5B (Emi-Rd-435) y 5C (Emi-Rd-Vt). Para fines de comparación, otros dos grupos fueron inmunizados con dos vacunas comerciales emulsionadas contra la influenza aviar y la enfermedad de Newcastle elaboradas con virus completos inactivados y emulsionados, que fueron denominadas como E. ENC/IA-435 y E. ENC/IA-Bive, respectivamente.

15

TABLA 2 - Potencia en aves SPF inmunizadas con vacunas inactivadas elaboradas con el virus recombinante rNDV/LS-H5 con anclaje (Rd)

Grupo	No. de aves	Vacunas aplicadas a los 14 días de edad por vía SC	Número de aves SPF por cepa de desafío aplicada a los 21 DPV	
			VIAAP-H5N2	VVENC
1	50	Emi Rd-Bive	25	25
2	50	Emi Rd- 435	25	25
3	50	Emi Rd- Vt	25	25
4	50	E. ENC/IA-435	25	25
5	50	E. ENC/IA-Bive	25	25
6	50	Control positivo	25	25
7	20	Control negativo	----	----

Los resultados de potencia hacia VVENC y VIAAP-H5N2 se muestran gráficamente en las Figuras 1 y 2 respectivamente.

20

Los resultados indican que las tres vacunas recombinantes inactivadas rNDV/LS-H5 con anclaje de la presente invención son capaces de conferir en pollos SPF 100% de protección a la mortalidad (M) inducida por el virus de desafío VVENC (Figura 1). Asimismo, e independientemente del gen H5 con que fueron clonadas, las tres vacunas recombinantes inactivadas confirieron también 100% de protección a la mortalidad (M) inducida por el VIAAP-H5N2 (Figura 2) al igual que las vacunas convencionales

25

inactivadas elaboradas con virus completos que actualmente están autorizadas a nivel mundial para su uso en el control de la ENC y la IA, las cuales están elaborados conteniendo en su fórmula normalmente virus de la enfermedad de Newcastle cepa LaSota con un título de $10^{8.6}$ DIEP50%/ml y virus de la influenza aviar de baja patogenicidad con un título de $10^{8.0}$ DIEP50%/ml, inactivados químicamente con formaldehído y emulsionados en aceite. Los resultados de protección indican que las vacunas recombinantes inactivadas rNDV/LS-H5 con anclaje cumplen con las Normas Mexicanas e internacionales para su uso en el control de la ENC y la IA, con lo que se demuestra que la presente invención resultó ser exitosa para esta la versión recombinante con anclaje.

Ejemplo 6B

Con la finalidad de determinar el efecto del anclaje, como un segundo diseño experimental, se llevaron a cabo desafíos con un VVENC y un VIAAP-H5N2 a 21 DPV en grupos de aves SPF, las cuales fueron inmunizadas, como se indica en la Tabla 3, con dos vacunas comerciales emulsionadas contra la influenza aviar y la enfermedad de Newcastle elaboradas con virus completos inactivados y emulsionados que fueron denominadas como **E. ENC/IA-435** y **E. ENC/IA-Bive**, así como con tres vacunas inactivadas en emulsión de la presente invención, sin anclaje, obtenidos a partir de los ejemplos 5D (**Emi-Re-Bive**), 5E (**Emi-Re-435**) y 5F (**Emi-Re-Vt**).

TABLA 3. Potencia en aves SPF inmunizadas con vacunas inactivadas elaboradas con el virus recombinante rNDV/LS-H5 sin anclaje (Re)

Grupo	No. de aves	Vacunas aplicadas a los 14 días de edad por vía SC	Número de aves SPF por cepa de desafío aplicada a los 21 DPV	
			VIAAP-H5N2	VVENC
1	50	Emi Re-Bive	25	25
2	50	Emi Re 435	25	25
3	50	Emi Re- VT	25	25
4	50	E. ENC/IA-435	25	25
5	50	E. ENC/IA-Bive	25	25
6	50	Control positivo	25	25
7	20	Control negativo	----	----

Los resultados de potencia hacia VVENC y VIAAP-H5N2 se muestran gráficamente en las Figuras 3 y 4 respectivamente.

Los resultados indican que, inesperadamente, las tres vacunas recombinantes inactivadas rNDV/LS-H5 sin anclaje de la presente invención son también capaces de conferir en aves SPF 100% de protección a la mortalidad (M) inducida por el virus de desafío VVENC (Figura 3). Igualmente, e independientemente del gen H5 con que fueron clonadas, las tres vacunas recombinantes inactivadas confirieron también 100% de protección a la mortalidad (M) inducida por el VIAAP-H5N2 al igual que las vacunas recombinantes inactivadas rNDV/LS-H5 con anclaje y las vacunas emulsionadas convencionales elaboradas con virus completos inactivados ENC/IA-Bive y ENC/IA-435.

Los resultados de los ejemplos 6A y 6B indican que las vacunas recombinantes inactivadas elaboradas en vector con anclaje o sin anclaje y con genes del VIA H5 de diferente origen y características antigénicas en las pruebas de HI (H5N2 o H5N1), son capaces de conferir una misma protección hacia el desafío con VIAAP-H5N2. Los resultados sugieren que las vacunas recombinantes inactivadas elaboradas con cualquier gen H5 del VIA pueden conferir protección hacia el desafío con VIAAP con cualquiera de los subtipos de virus de influenza que contengan la hemoaglutinina H5, no siendo relevante el tipo de neuraminidasa.

Por lo tanto, queda demostrado que la presente invención es efectiva inclusive para diversos tipos de neuraminidasa, lo cual es consistente con lo encontrado para vacunas de virus completo inactivado tradicionales (Soto et al., *Inactivated mexican H5N2 avian influenza vaccine protects chickens from the asiatic highly pathogenic H5N1 avian influenza virus*. Proceedings of the 56th Western Poultry Disease Conference (WPDC). USA, p. 79. (2007) y Swayne, D. and Kapczynski, D. (2008). *Vaccines, Vaccination and Immunology for avian influenza viruses in poultry*. In Avian Influenza. Ed. By David Swayne. Blackwell Publishing, USA, p. 407-451).

Ejemplo 6C

Con la finalidad de probar las vacunas de la presente invención en aves comerciales para simular condiciones de campo, se realizó un tercer experimento en el cual se llevaron a cabo desafíos con un VVENC y un VIAAP-H5N2 a 21 DPV en grupos de pollos de engorda comerciales con inmunidad materna hacia la ENC y la IA, los cuales fueron inmunizados, como se indica en la Tabla 4, con dos vacunas comerciales emulsionadas contra la influenza aviar y la enfermedad de Newcastle elaboradas con virus completos inactivados y emulsionados que fueron denominadas como **E. ENC/IA-435** y **E. ENC/IA-Bive**, así como las vacunas inactivadas de la presente invención obtenidas conforme a los Ejemplos 5A (**Emi Rd-Bive**), 5B (**Emi-Rd-435**) y 5C (**Emi-Rd-Vt**).

TABLA 4. Potencia en pollos de engorda comerciales con inmunidad materna hacia la ENC y la IA, inmunizados con vacunas inactivadas elaboradas con el virus recombinante rNDV/LS-H5 con anclaje (Rd)

Grupo	No. de pollos	Vacunas aplicadas a los 14 días de edad por vía SC	Número de pollos de engorda comerciales por cepa de desafío aplicada a los 21 DPV	
			VIAAP-H5N2	VVENC
1	50	Emi Rd-Bive	25	25
2	50	Emi Rd- 435	25	25
3	50	Emi Rd- VT	25	25
4	50	E. ENC/IA-435	25	25
5	50	E. ENC/IA-Bive	25	25
6	50	Control positivo	25	25
7	20	Control negativo	----	----

Los resultados de potencia hacia VVENC y VIAAP-H5N2 se ilustran gráficamente en las Figuras 5 y 6 respectivamente.

Los resultados indican que las tres vacunas recombinantes inactivadas rNDV/LS-H5 con anclaje de la presente invención son capaces de conferir en pollos de engorda comerciales con inmunidad materna hacia los virus de la ENC y la IA, protecciones iguales o superiores al 90% a la mortalidad (M) inducida por el virus de desafío VVENC (Figura 5). De manera adicional, e independientemente del gen H5 con que fueron clonadas, las tres vacunas recombinantes inactivadas confirieron también protecciones iguales o superiores al 80% de protección a la mortalidad (M) inducida por el VIAAP-H5N2, al igual que las vacunas convencionales emulsionadas elaboradas con virus completos inactivados para su uso en el control de la ENC y la IA.

Los resultados de protección indican que las vacunas recombinantes inactivadas rNDV/LS-H5 con anclaje de la presente invención, pueden ser empleadas con éxito para el control de la IAAP en pollos de engorda comerciales con inmunidad materna hacia los virus de IA y de la ENC con protecciones similares a las conferidas por vacunas convencionales elaboradas con virus completos inactivados de la IA, pero además con las ventajas de que al usar exclusivamente vacunas recombinantes activas e inactivas la bioseguridad es total y se puede establecer el sistema DIVA posibilitando el uso conjunto de programas de vacunación y erradicación de la IA.

Ejemplo 6D

Con la finalidad de determinar el efecto del anclaje en condiciones reales de campo, se llevaron a cabo desafíos con un VVENC y un VIAAP-H5N2 a 21 DPV en grupos de pollos de engorda comerciales con inmunidad materna hacia la ENC y la IA, los cuales fueron inmunizados, como se indica en la Tabla 5, con dos vacunas comerciales emulsionadas contra la influenza aviar y la enfermedad de Newcastle elaboradas con virus completos inactivados y emulsionados que fueron denominadas como **E. ENC/IA-435** y **E. ENC/IA-Bive**, tres vacunas inactivadas en emulsión de la presente invención, sin anclaje, obtenidos a partir de los ejemplos 5D (**Emi-Re-Bive**), 5E (**Emi-Re-435**) y 5F (**Emi-Re-Vt**).

TABLA 5. Potencia en pollos de engorda comerciales con inmunidad materna hacia la ENC y la IA, inmunizados con vacunas inactivadas elaboradas con el virus recombinante rNDV/LS-H5 sin anclaje (Re)

Grupo	No. de pollos	Vacunas aplicadas a los 14 días de edad por vía SC	Número de pollos de engorda comerciales por cepa de desafío aplicada a los 21 DPV	
			VIAAP-H5N2	VVENC
1	50	Emi Re-Bive	25	25
2	50	Emi Re- 435	25	25
3	50	Emi Re- VT	25	25
4	50	E. ENC/IA-435	25	25
5	50	E. ENC/IA-Bive	25	25
6	50	Control positivo	25	25
7	20	Control negativo	----	----

Los resultados de potencia hacia VVENC y VIAAP-H5N2 se ilustran gráficamente en las Figuras 7 y 8 respectivamente.

Los resultados indican que las tres vacunas recombinantes inactivadas rNDV/LS-H5 sin anclaje, inesperadamente, fueron también capaces de conferir en pollos de engorda comerciales con inmunidad materna protecciones iguales o superiores al 90% a la mortalidad (M) inducida por el virus de desafío VVENC (Figura 7), igualmente, e independientemente del gen H5 con que fueron clonadas las tres vacunas recombinantes inactivadas, todas confirieron también protecciones iguales o superiores al 80% a la mortalidad (M) inducida por el VIAAP-H5N2 al igual que las vacunas recombinantes

inactivadas rNDV/LS-H5 con anclaje y las vacunas emulsionadas convencionales elaboradas con virus completos inactivados ENC/IA-Bive y ENC/IA-435.

Estos estudios ratifican el éxito de la presente invención ya que se demuestra que las vacunas recombinantes contra la IA en forma inactivada empleando una emulsión o
5 vehículo, adyuvante o excipiente farmacéutico aceptable para su uso en aves susceptibles permite una excelente respuesta de inmunidad capaz de conferir protecciones del 100% hacia desafíos con VIAAP en pollos SPF y superiores al 80% en pollos de engorda con inmunidad materna hacia los virus de la ENC y la IA, lo cual es algo contrario y de manera no sugerida por lo que se pensaba en relación a que se
10 considera indispensable la replicación del virus recombinante en el ave inmunizada para que la proteína de interés se expresara en cantidad suficiente para poder inducir una respuesta inmune adecuada en el ave.

El uso de vacunas inactivadas es indispensable para alcanzar una adecuada protección a nivel de campo para prevenir la mortalidad generada por VIAAP y virus
15 VVENC, ya que bajo condiciones de campo en explotaciones avícolas industriales el sólo uso de vacunas activas convencionales contra la ENC o activas recombinantes contra la IA pueden no ser suficientes.

Aún cuando se ha ilustrado y descrito modalidades específicas de la invención, debe hacerse hincapié en que son posibles numerosas modificaciones a la misma, como
20 puede ser la cepa utilizada del virus de IA, el tipo de emulsión o vehículos ocupada. Por lo tanto, la presente invención no deberá considerarse como restringida excepto por lo que exija la técnica anterior y las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna recombinante que comprende un vector viral y un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable, caracterizada porque el vector viral se encuentra inactivado y tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para un antígeno de una enfermedad de interés.

2. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque la secuencia de nucleótidos exógena codifica para un antígeno seleccionado entre influenza, laringotraqueitis infecciosa, bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio (Gumboro), hepatitis, rinotraqueítis viral, coriza infecciosa, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pastereiosis, Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), circovirus, bordeteliosis o parainfluenza.

3. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada además porque la secuencia de nucleótidos exógena consiste en el gen que codifica para la hemoaglutinina (HA) del virus de influenza aviar.

4. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada además porque el gen que codifica para la hemoaglutinina (HA) se selecciona entre por lo menos uno de los subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7 o H9 de la hemoaglutinina (HA) del virus de influenza aviar.

5. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada además porque el gen que codifica para la hemoaglutinina (HA) es el del subtipo H5.

6. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque el vector viral es seleccionado entre adenovirus o paramixovirus.

7. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada además porque el vector viral es seleccionado entre paramixovirus.

8. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada además porque el paramixovirus es el virus de la enfermedad de Newcastle.

9. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada además el virus de la enfermedad de Newcastle se selecciona entre las cepas LaSota, Ulster, QV4, B1, CA 2002, Roakin, Komarov, Clone 30, VGGA o cepas de los grupos genéticos I a V de la enfermedad de Newcastle.

10. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada además porque el vector viral se selecciona entre adenovirus.

11. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada además porque el adenovirus se selecciona entre adenovirus aviares o porcinos.

12. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 11,
5 caracterizada además porque el adenovirus es un adenovirus aviar del tipo 9.

13. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada además porque el adenovirus es un adenovirus porcino del tipo 5.

14. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque los vehículos farmacéuticamente aceptables para la
10 vacuna son preferentemente soluciones acuosas o emulsiones.

15. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada además porque se utiliza como vehículo una emulsión agua-aceite.

16. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque el título requerido para el vector viral es similar al requerido
15 para una vacuna recombinante de virus activo.

17. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada además porque la concentración del virus que se requiere para lograr la respuesta antigénica es de entre 10^2 y 10^{10} DI50%/ml.

18. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 7,
20 caracterizada además porque la concentración del virus que se requiere para lograr la respuesta antigénica es de entre 10^4 y 10^{10} DIEP50%/ml.

19. Una vacuna recombinante de conformidad con la reivindicación 18, caracterizada además porque, cuando la vacuna se prepara para su aplicación en pollos, la concentración del virus es entre 10^8 a 10^9 DIEP50%/0.5 ml por pollo.

20. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 19,
25 caracterizada además porque la vacuna contiene $10^{8.5}$ DIEP50%/0.5 ml por pollo.

21. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada además porque la concentración del virus que se requiere para lograr la respuesta antigénica es de entre 10^2 y 10^8 DIEP50%/ml.

22. Una vacuna recombinante, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque la vacuna está preparada para aplicarse por vía subcutánea o por vía intramuscular.

23. Un método de vacunación contra enfermedades en animales, caracterizado porque comprende suministrar a un animal una vacuna recombinante que comprende un
35 vector viral inactivado que tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para un antígeno de dicha enfermedad.

24. Un método de vacunación contra enfermedades en animales, de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque se suministra al animal adicionalmente una vacuna recombinante que comprende un vector viral activo idéntico al vector viral inactivado, que tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para un antígeno de dicha enfermedad.

25. Un método para la identificación de animales infectados de animales vacunados, útil en el control y la erradicación de enfermedades, caracterizado porque comprende:

a) Someter a un primer método de detección de anticuerpos, por lo menos una muestra de por lo menos un animal al que le fue aplicada una vacuna recombinante de vector viral inactivado que tiene insertada una secuencia de nucleótidos exógena que codifica para un antígeno de una enfermedad provocada por un patógeno, para detectar si existen anticuerpos presentes en dicha muestra que correspondan a dicho antígeno;

b) Someter a un segundo método de detección de anticuerpos, por lo menos una muestra del mismo animal cuya muestra se sometió al primer método de detección de anticuerpos, para detectar si existen anticuerpos presentes en dicha muestra que correspondan al patógeno que causa la enfermedad;

c) Determinar si el animal está infectado o vacunado a partir del resultado del primer y segundo métodos de detección de antígenos.

1/4

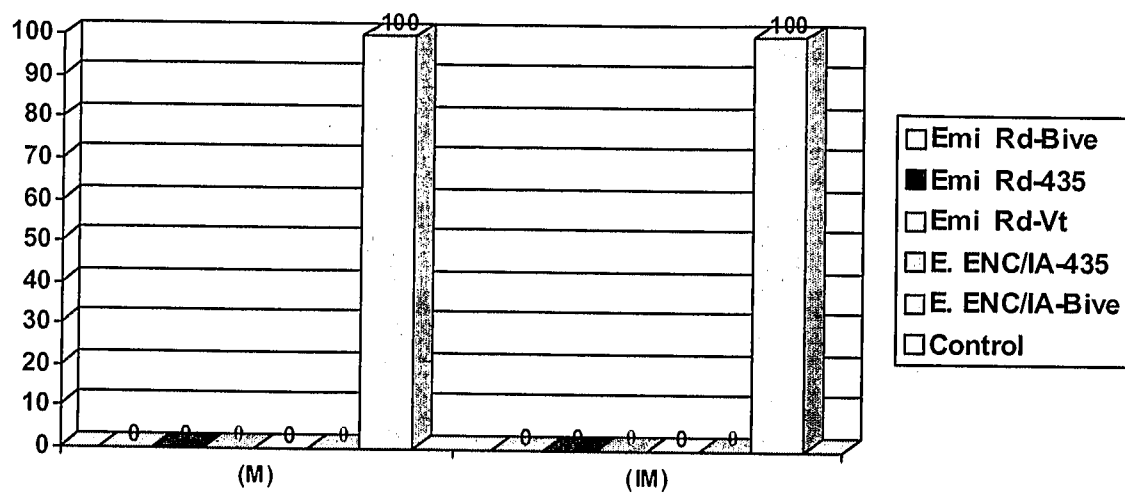


Fig. 1

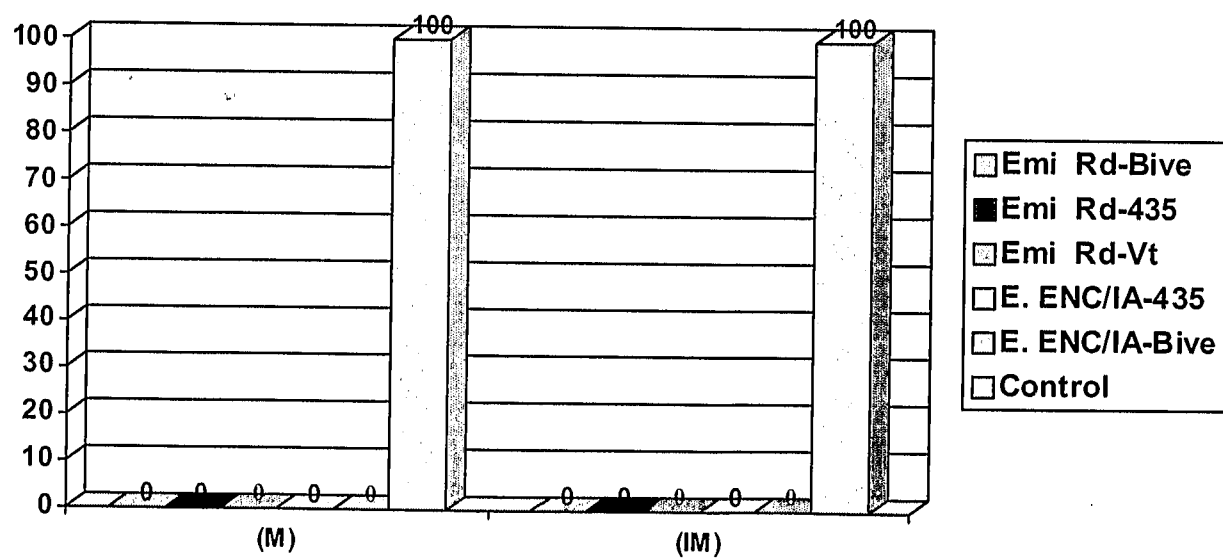


Fig. 2

2/4

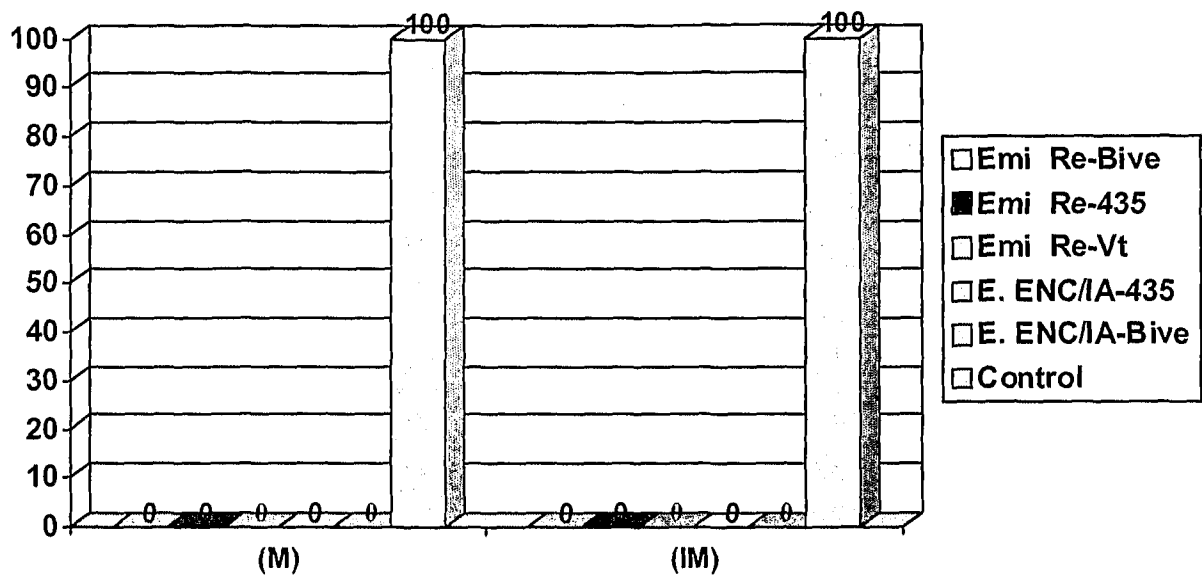


Fig. 3

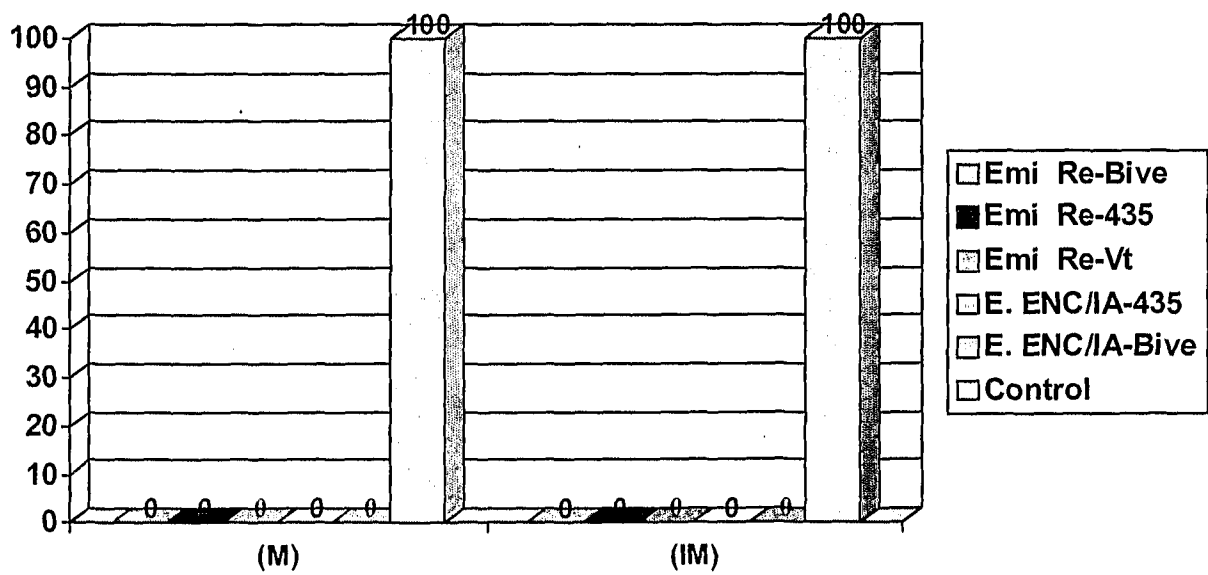


Fig. 4

3/4

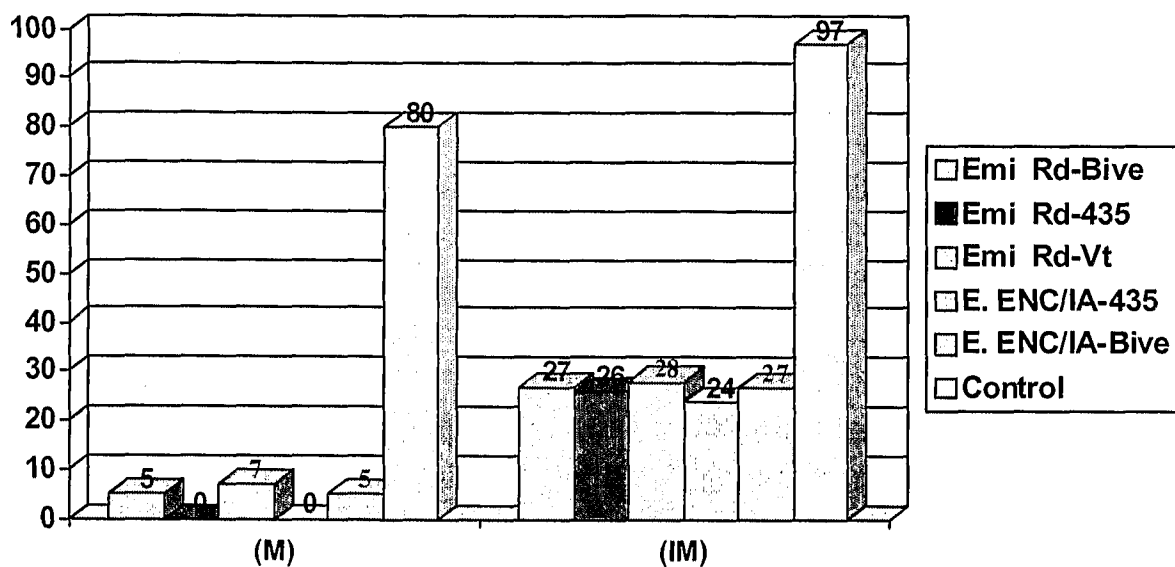


Fig. 5

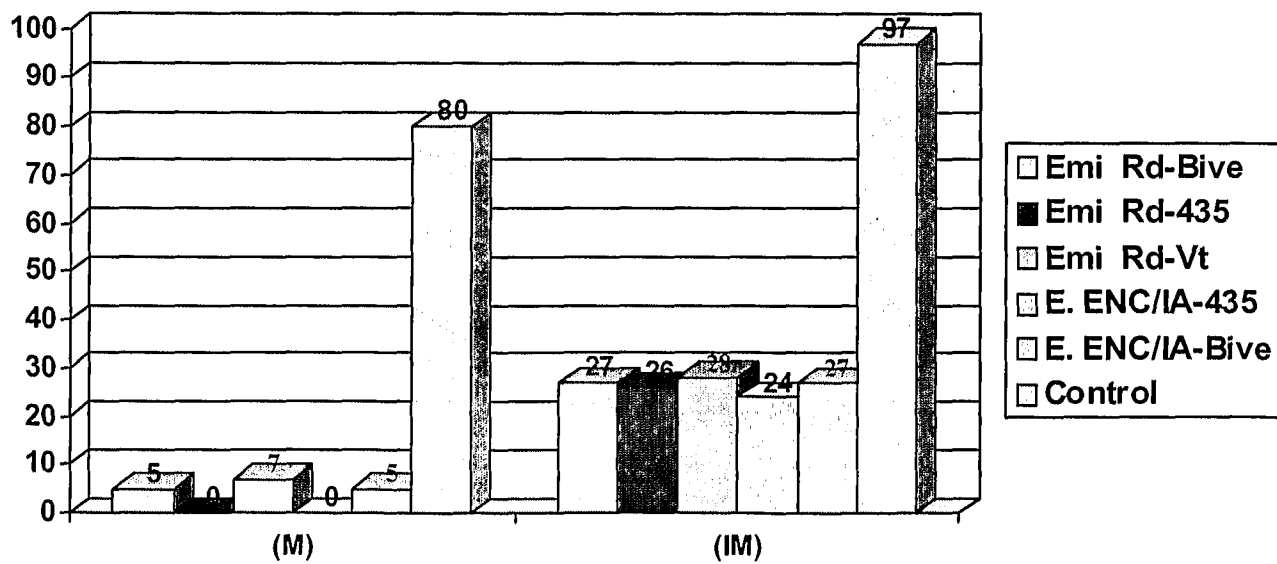


Fig. 6

4/4

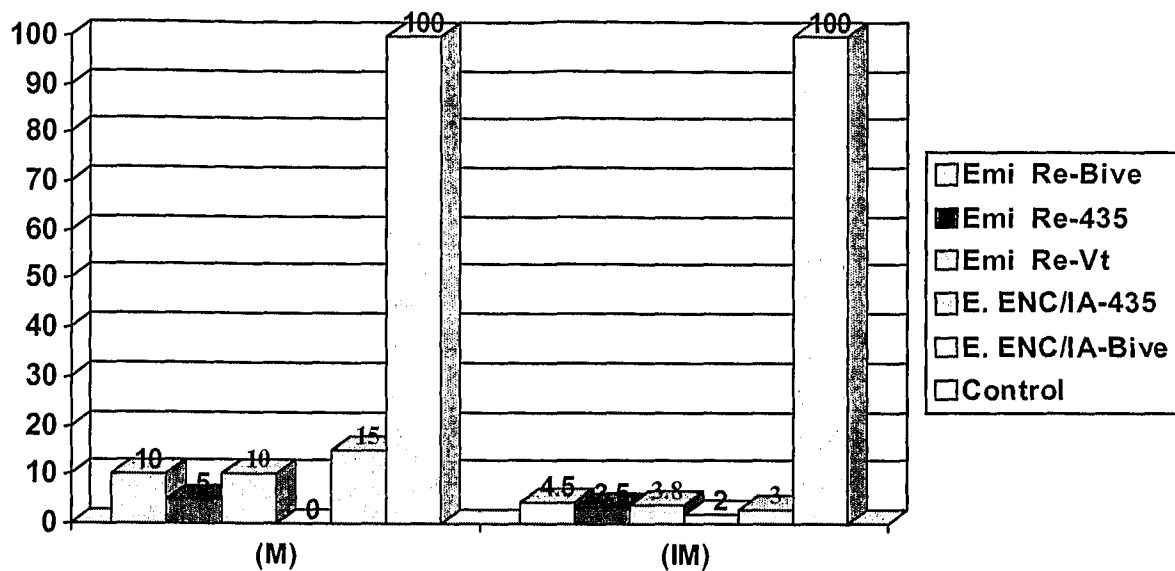


Fig. 7

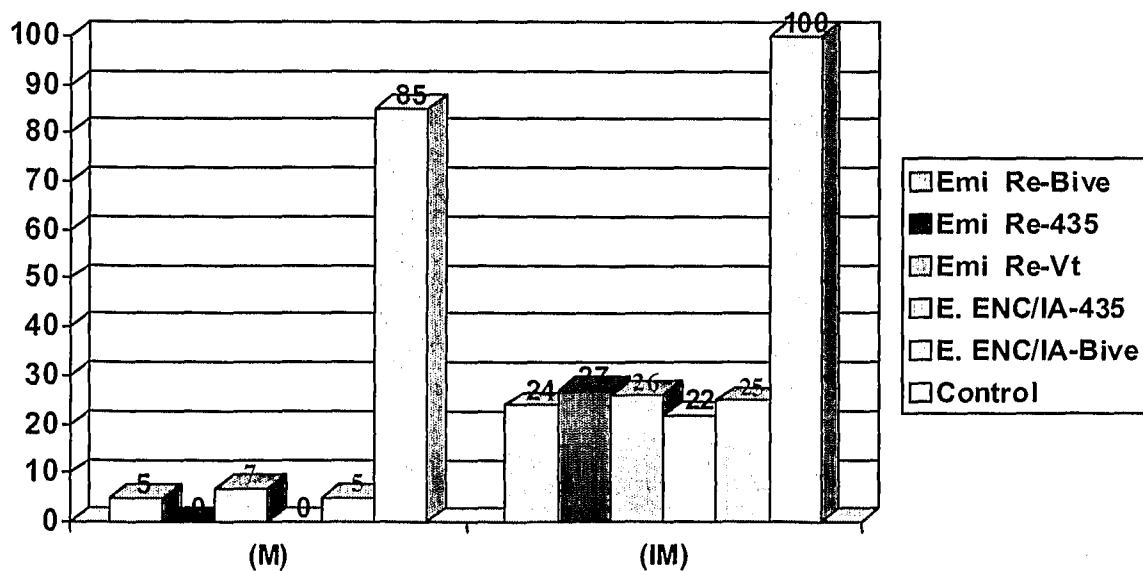


Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ IB 2008/003150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/145 (2006.01)

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 39

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 practicable, search terms used)

EPODOC,WPI,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HULSKOTTE E . ET AL., "Chemical inactivation of recombinant vaccinia viruses and the effects on antigenicity and immunogenicity of recombinant simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins" Vaccine (1997), vol. 15, n° 17/18, pp.1839-1845. the whole document	1
X	ZAJAC, P. ET AL., "Enhanced generation of cytotoxic T lymphocytes using recombinant vaccinia virus expressing human tumor-associated antigens and B7 costimulatory molecules". Cancer Research (1998), 58, pp.4567-4571. the whole document	1
A	DataBase WPI, Thomson Scientific, London, GB [retrieved on 18.01.2010]Retrieved from EPOQUE; Número of acceso 2006-729989 & WO 2007025420 (HARBIN VETERINARY MEDICINE INST. CHINESE) 08.03.2007	2-25

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"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 documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2010 (21.01.2010)

Date of mailing of the international search report

(09/02/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Hernández Cuéllar

Telephone No. 34 91 349 84 09

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ IB 2008/003150

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **2-25 (all partially)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 2008/003150

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DataBase WPI, Thomson Scientific, London, GB [retrieved on 18.01.2010]Retrieved from EPOQUE; Número of acceso 2007-344805 & WO 2007128169 (HARBIN VETERINARY MEDICINE INST. CHINESE) 15.11.2007	2-25
A	WO 2007104782 A1 (INTERVET INTERNATIONAL B.V.) 20.10.2007,the whole document	2-25
A	US 20070178115 A1 (TANG et al.) 02.08.2007,the whole document	2-25
A	CAPUA I. ET AL., "Development of DIVA (Differentiating Infected from vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza" Avian Pathology (2002), 32, 47-55. the whole document.	25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ IB 2008/003150

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007025420 A	08.03.2007	CN 1772887 A CN 1298845 C	17.05.2006 07.02.2007 07.02.2007
WO 2007128169 A	15.11.2007	CN 1869234 A CN 100487119 C	29.11.2006 13.05.2009
WO 2007104782 A	20.09.2007	CA 2638975 A AU 2007224430 A EP 1996610 A EP 20070726920 MX 2008011728 A KR 20090007706 A CN 101421294 A ZA 200807553 A JP 2009529861 T US 2010008945 A	20.09.2007 20.09.2007 03.12.2008 15.03.2007 10.12.2008 20.01.2009 29.04.2009 24.06.2009 27.08.2009 14.01.2010
US 2007178115 A	02.08.2007	WO 2007022151 A CA 2619174 A AU 2006279612 A EP 1924282 A EP 20060813446 KR 20080093405 A CN 101365484 A JP 2009512421 T	22.02.2007 22.02.2007 22.02.2007 28.05.2008 15.08.2006 21.10.2008 11.02.2009 26.03.2009

Box III

Claims 2-25 (all in part)

The stated claims do not meet the requirements of clarity, concision and support (PCT Articles 5 and 6). These claims encompass multiple potential vaccines by combining multiple antigens and vectors, whilst the application discloses in line with PCT Articles 5 and 6 only one alternative. Consequently, the search was limited to the vaccine identified by the applicants as rNDV/LS-H5 based on an inactive Newcastle viral recombinant vector that expresses the haemagglutinin H5 of the avian influenza virus.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ IB 2008/003150

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 39/145 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K 39

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC,WPI,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	HULSKOTTE E . ET AL., "Chemical inactivation of recombinant vaccinia viruses and the effects on antigenicity and immunogenicity of recombinant simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins" Vaccine (1997), vol. 15, n° 17/18, pp.1839-1845. Todo el documento	1
X	ZAJAC, P. ET AL., "Enhanced generation of cytotoxic T lymphocytes using recombinant vaccinia virus expressing human tumor-associated antigens and B7 costimulatory molecules". Cancer Research (1998), 58, pp.4567-4571. Todo el documento	1
A	Base de Datos WPI, Thomson Scientific, Londres, GB [recuperado el 18.01.2010]Recuperado de EPOQUE; Número de acceso 2006-729989 & WO 2007025420 (HARBIN VETERINARY MEDICINE INST. CHINESE) 08.03.2007	2-25

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

21 Enero 2010 (21.01.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09-FEBRERO-2010 (09/02/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Hernández Cuéllar

N° de teléfono 34 91 349 84 09

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ IB 2008/003150

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones N°s: 2-25 (todas parcialmente)
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
Ver hoja adicional.
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB 2008/003150

C (continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Base de Datos WPI, Thomson Scientific, Londres, GB [recuperado el 18.01.2010]Recuperado de EPOQUE; Número de acceso 2007-344805 & WO 2007128169 (HARBIN VETERINARY MEDICINE INST. CHINESE) 15.11.2007	2-25
A	WO 2007104782 A1 (INTERVET INTERNATIONAL B.V.) 20.10.2007, Todo el documento	2-25
A	US 20070178115 A1 (TANG et al.) 02.08.2007, Todo el documento	2-25
A	CAPUA I. ET AL., "Development of DIVA (Differentiating Infected from vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza" Avian Pathology (2002), 32, 47-55. Todo el documento.	25

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/IB 2008/003150

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2007025420 A	08.03.2007	CN 1772887 A CN 1298845 C	17.05.2006 07.02.2007 07.02.2007
WO 2007128169 A	15.11.2007	CN 1869234 A CN 100487119 C	29.11.2006 13.05.2009
WO 2007104782 A	20.09.2007	CA 2638975 A AU 2007224430 A EP 1996610 A EP 20070726920 MX 2008011728 A KR 20090007706 A CN 101421294 A ZA 200807553 A JP 2009529861 T US 2010008945 A	20.09.2007 20.09.2007 03.12.2008 15.03.2007 10.12.2008 20.01.2009 29.04.2009 24.06.2009 27.08.2009 14.01.2010
US 2007178115 A	02.08.2007	WO 2007022151 A CA 2619174 A AU 2006279612 A EP 1924282 A EP 20060813446 KR 20080093405 A CN 101365484 A JP 2009512421 T	22.02.2007 22.02.2007 22.02.2007 28.05.2008 15.08.2006 21.10.2008 11.02.2009 26.03.2009

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ IB 2008/003150

Las reivindicaciones indicadas no cumplen los requisitos de claridad, concisión y soporte establecidos en los Art.5 y 6 PCT. Estas reivindicaciones engloban múltiples potenciales vacunas mediante la combinación de múltiples antígenos y vectores, mientras que en la solicitud solo se divulga en el sentido de los Art. 5 y 6 PCT una única alternativa. En consecuencia, la búsqueda se ha limitado a la vacuna identificada por los solicitantes como rNDV/LS-H5 basada en un vector recombinante viral Newcastle inactivado que expresa la hemaglutinina H5 del virus de influenza aviar.