



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 679**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06795148 .3**

96 Fecha de presentación : **17.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1912665**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **Vacuna contra calicivirus felino (FCV) que comprende una proteína de cápsida de un FCV o una proteína de la cápsida de un FCV aislada que comprende una secuencia proteica sec ID nº: 13 o secuencias proteicas con, al menos, 95 % de identidad con ella.**

30 Prioridad: **28.07.2005 US 703109 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73 Titular/es: **Pfizer Products Inc.
Eastern Point Road
Groton, Connecticut 06340, US**

72 Inventor/es: **Lowery, David Earl;
Rong, Sing;
Guimond, Paul Mark;
Clare, Paula Munns;
Tucker, Cassius McAllister y
Newby, Thomas Jack**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 679 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra calicivirus felino (FCV) que comprende una proteína de la cápsida de un FCV o una proteína de la cápsida de un FCV aislada que comprende una secuencia proteica sec ID nº: 13 o secuencias proteicas con, al menos, 95% de identidad con ella.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a proporcionar nuevas vías para administrar diversas vacunas a diversos animales. Divulga varios calicivirus felinos aislados (FCV). Divulga nuevos procedimientos para presentar vacunas de FCV a gatos. También se divulgan clones de ácidos nucleicos que codifican calicivirus felinos, proteínas de la cápsida de FCV, vacunas vivas o muertas, una vacuna de subunidad que comprende la proteína de la cápsida, una vacuna de ácido nucleico, y una vacuna de vector de virus recombinante que comprende ácidos nucleicos que codifican la proteína de la cápsida del calicivirus felino aislado. También se divulgan un procedimiento para identificar un calicivirus felino útil para producir una composición de vacuna y ensayos para diagnosticar gatos infectados con calicivirus felino. También se divulgan nuevas vías para administrar vacunas de FCV nuevas y antiguas a felinos.

Antecedentes de la invención

Se conoce que los calicivirus son una importante causa de enfermedades en gatos. Se observan una amplia diversidad de síntomas tales como fiebre, rinitis, estornudos, conjuntivitis leve, descarga ocular, vesículas en los orificios nasales externos, mucosa oral o en la lengua, neumonía, bronquitis traqueal, diarrea, dolores musculares, paso rígido, e hiperestesia. Las infecciones bacterianas oportunistas acompañan a menudo a las infecciones por FCV, lo que complica el tratamiento y la recuperación. Las infecciones por FCV graves pueden conducir a la muerte, especialmente en crías de gato. Se debe observar que dichos síntomas, aunque considerados comunes en casos naturales, no siempre son prominentes en las infecciones experimentales. Podría parecer que diversas cepas de campo de calicivirus felino (FCV) difieren en su potencial para causar enfermedad, o que la infección concurrente con otros agentes influye en los síntomas de la enfermedad.

Las vacunas contra calicivirus felino han estado disponibles durante más de dos décadas. Aunque existen numerosos serotipos de FCV, ciertas cepas, tales como F9, se descubrieron como inductoras de anticuerpos contra una amplia variedad de cepas de FCV. Véase J. L. Bittle y W.J. Rubic, Am. J. Vet. Res. 37:275-78 (1976). Como resultado, las primeras vacunas contra calicivirus felino emplearon una versión modificada o atenuada de la cepa FCV-F9. Véase Patente de Estados Unidos N° 3.937.812 de J. L. Bittle y W.J. Rubic. Aunque las vacunas de FCV-F9 y otras vacunas disponibles en el mercado proporcionan protección contra muchos aislados de campo, no es verdad que estas vacunas eviten la infección por todas las cepas. Es más, a medida que el FCV sigue evolucionando, la vacuna basada en FCV-F9 proporciona protección contra cada vez menos aislados de campo (Lauritzen y col., 1997, Vet Microbiology, 56:55-63). Además, los veterinarios han expresado su preocupación sobre la eficacia de las vacunas basadas en un único serotipo. De hecho, los estudios de campo sugieren que las vacunas obtenidas de la cepa FCV-F9 proporcionan inmunidad insuficiente contra muchas cepas de calicivirus felino. Véase, por ejemplo, N.C. Pederson y col., *Feline Pract.* 13(1):26-35 (1983); S. Dawson y col., Vet. Rec. 132:346-50 (1993). Los veterinarios también han planteado su preocupación acerca de la administración de un virus vivo modificado que puede, en algunas circunstancias, causar la enfermedad en animales de otra manera sanos. Los investigadores han informado de que la dosificación oral inadvertida de una vacuna de FCV administrada por vía subcutánea dio como resultado una enfermedad aguda. Véase R.C. Povey, *Feline Pract.* 7(5): 12-16 (1977). Hay, por lo tanto, un interés continuo en desarrollar una vacuna, que por sí misma o en combinación con otras vacunas, pudiera proporcionar la protección deseada después de la vacunación de un gato. Se divulgan varios aislados en este documento, que se han aislado de gatos y que proporcionan un medio para proporcionar amplia protección en gatos inmunizados.

Descripción de la información

DOCUMENTOS DE PATENTES DE ESTADOS UNIDOS 3937812 febrero/1976 Bittle y col., 3944469 marzo/1976 Bittle y col., EE.UU. 45 228 10 4486530 diciembre/1984 David y col., 4786589 noviembre/1988 Rounds y col.,

5169789 diciembre/1992 Bernstein y col., 5229293 julio/1993 Matsuura y col.

5266313 noviembre/1993 Esposito y col., 5338683 agosto/1994 Paoletti y col.

5494807 febrero/1996 Paoletti y col., 5559041 septiembre/1996 Kang y col.

5561064 octubre/1996 Marquet y col., 5580859 diciembre/1996 Felgner.

5585100 diciembre/1996 Mond y col., 5589384 diciembre/1996 Liscombe.

5589466 diciembre/1996 Felgner, 5620845 abril/1997 Gould y col.

ES 2 357 679 T3

- 5656448 agosto/1997 Kang y col., 5693761 diciembre/1997 Queen y col.
5693762 diciembre/1997 Queen y col., 5695928 diciembre/1997 Stewart y col.
5 5703055 diciembre/1997 Felgner, 5716784 febrero/1998 DiCesare.
5716822 febrero/1998 Wardley, 5718901 febrero/1998 Wardley.
5725863 marzo/1998 Daniels y col., 5728587 marzo/1998 Kang y col.
10 5800821 septiembre/1998 Acheson y col., 5977322 noviembre/1999 Marks y col.
6010703 enero/2000 Maes y col., 6355246 marzo/2002 Kruger y col.;
15 6.534.066 B 1 marzo/2003 Poulet y col.

Documentos de patentes extranjeras

- 20 0484382 marzo/1995 EP, WO2004/083390, WO 91/01332 (The up john company)

Otras publicaciones

- 25 **Burroughs, J. N y Brown, F.**, *J. Gen. Virol.*, 22, pp. 281-285 (1974).
Clarke y Lambden en *J. Gen. Virol.* 78: 291-301 (1997).
Griest, N. R., 1979, Diagnostic methods in clinical virology (3ª ed.), páginas. 84-85, *Blackwell*.
30 **J. L. Bittle y W. J. Rubic**, *Am. J. Vet. Res.* 37:275-78 (1976).
Lauritzen y col., *Vet Microbiology* 56: 55-63 (1997).
35 **Maky, Brian W. J. y Kangro, Hillar O.** 1996, Virology methods manual, pp. 35-37, *Academic Press, New York*.
Motin y col., *Infect. Immun.* 64: 4313-4318 (1996).
N. C. **Pederson y col.**, *Feline Pract.* 13(1):26-35 (1983).
40 **Oglesby, A. S.**, y col., *Virology* 44, páginas. 329-341 (1971).
Poulet y col., *Veterinary Microbiology* 106: 17-31 (2005).
45 **Poulet y col.**, *Archives of Virology* 145: 243-261 (2000).
R. C. Povey, *Feline Pract.* 7(5):12-16 (1977).
S. Dawson y col., *Vet. Rec.* 132:346-50 (1993). *Scientific Publishers, Oxford, UK*.
50 **Soergel, M. E.**, y col., *Intervirology*, 5, páginas 239-244 (1975).
Yokoyama, N., y col., *Vaccine*, vol. 14, No. 17/18, pp. 1657-1663 (1996).

55 Sumario de la invención

La presente solicitud proporciona nuevas cepas de y se refiere a, varios calicivirus felinos aislados (FCV). También divulga nuevos procedimientos para presentar vacunas a animales y particularmente, vacunas de FCV a gatos. La presente solicitud también divulga clones de ácidos nucleicos que codifican calicivirus felinos, proteínas de la cápsida de FCV, vacunas vivas o muertas, una vacuna de subunidad que comprende la proteína de la cápsida, una vacuna de ácido nucleico, y una vacuna de vector de virus recombinante que comprende ácidos nucleicos que codifican la proteína de la cápsida del calicivirus felino aislado. La presente solicitud también divulga un procedimiento para identificar un calicivirus felino útil para producir una composición de vacuna y ensayos para diagnosticar gatos infectados con calicivirus felino. También se divulgan nuevas vías para administrar vacunas de FCV nuevas y antiguas a felinos. En este documento también se divulgan procedimientos y materiales para tratar e inmunizar animales con vacuna, y en particular gatos, contra FPV o Parvovirus Felino, que también se han denominado Panleucopenia o FPL y contra otra enfermedad, FHV o Herpesvirus Felino, que también se denomina Virus

ES 2 357 679 T3

de la Rinotraqueítis Felina. Más adelante se divulgan nuevas combinaciones de vacunas, que cuando se presentan a un felino de la forma descrita permiten administraciones eficaces oral/oral y subc/oral de vacunas contra FPV y/o FHV.

5 En particular, la presente invención divulga las siguientes vacunas para inmunizar gatos contra calicivirus felino. Una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada (SEC ID 13) y secuencias que tienen al menos aproximadamente el 95% y el 99% de identidad. También se divulgan en el presente documento secuencias de una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada con una identidad de al menos aproximadamente un 91,2% con la secuencia SEQ ID 13. Lo siguiente constituye información adicional asociada con la aplicación práctica de la presente invención (no es parte de ella) Una vacuna de ADN que comprende 10 secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada en la que dicho ADN comprende una secuencia (SEC ID 12) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 78,7% y 79,2% de identidad de secuencia y que permiten sustituciones conservativas.

15 Una vacuna que comprende una proteína de la cápsida de FCV-49, o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada en la que dicha proteína de la cápsida comprende una secuencia de proteína de la cepa FCV-49 (SEC ID 15) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 92,7%, 95% y 99% de identidad; en la que dicha proteína de la cápsida se proporciona en una cantidad eficaz. Una vacuna de ADN que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV-49 o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada en la que dicho ADN 20 comprende una secuencia (SEC ID 14) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 78,9%, en concreto, 79,4% (78,9 + 0,5) de identidad de secuencia y que permiten sustituciones conservativas.

Una vacuna que comprende una proteína de la cápsida de FCV-26391-4, o una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende secuencias de proteínas de la cepa FCV-26391-4. Una vacuna que comprende una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 en la que dicha proteína de la cápsida 25 comprende una secuencia de proteína (SEC ID 17) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 91,8%, 95% y 99% de identidad. Una vacuna de ADN que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 o una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 aislada en la que dicho ADN comprende una secuencia (SEC ID 16) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 78,4%, en concreto 78,9% (78,4 + 0,5) de 30 identidad de secuencia.

Una vacuna donde el polinucleótido se selecciona entre el grupo que consiste esencialmente en SEC ID N^{os}: 12, 14, 16. Las vacunas pueden estar solas o en cualquier combinación de las siguientes: donde contenga un adyuvante, en la que el componente de FCV esté vivo, en la que el componente de FCV esté atenuado, en la que el componente de FCV esté inactivado, que puede incluir al menos una cepa de calicivirus felino diferente seleccionada entre el grupo 35 que consiste en FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255 y FCV-2280.

Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una secuencia de nucleótidos de una proteína de la cápsida de FCV seleccionada entre el grupo que consiste en un polipéptido que tiene 93% o más identidad con SEC ID N^{os}: 13, 15 ó 17, en la que el FCV aislado no es la cepa 213-95, y en la que la secuencia de ácido nucleico se une de forma operativa a una secuencia promotora heteróloga, en cantidad eficaz para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una secuencia de nucleótidos de una proteína de la cápsida de FCV seleccionada entre el grupo constituido esencialmente por SEC ID N^{os}: 12, 14 y 16. Una vacuna en la que la secuencia de nucleótidos está en cualquiera de los siguientes: un plásmido, un vector de virus recombinante, o cualquier otro vector de 45 nucleótidos.

Una vacuna en la que el vector de virus recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en herpesvirus felino, poxvirus de mapache, poxvirus de canario, adenovirus, virus Semliki Forest, virus Sindbis y virus vaccinia. 50

También hay descripciones de composiciones inmunogénicas que comprenden un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable y una cepa aislada de FCV, que se une a un anticuerpo monoclonal seleccionado de los anticuerpos monoclonales descritos en este documento como 23, 26, 41, 44 y 56. La composición inmunogénica que comprende un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable y una cepa aislada de FCV, puede unirse *de forma selectiva* a un anticuerpo monoclonal seleccionado de los anticuerpos monoclonales descritos en este documento como 23, 26, 41, 44 y 56. Estas composiciones inmunogénicas incluyen composiciones donde la cepa de FCV está inactivada, donde dicha cepa de FCV es una vacuna, y donde la composición comprende un adyuvante. 55

Las vacunas descritas en este documento pueden incluir al menos un patógeno felino distinto, seleccionado entre el grupo que consiste en herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, *Chlamydia psittaci*, y parvovirus felino, virus de la rabia y *Bordetella bronchiseptica*. La vacuna puede también comprender adicionalmente o puede administrarse con un adyuvante. 60

65 *Lo siguiente representa la presente invención*

En una primera realización, la presente invención proporciona una vacuna para la inmunización de gatos contra calicivirus felino (FCV) que comprende una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de cápsida de FCV-21 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende una secuencia proteica SEC ID N^o: 13 o secuencias proteicas

ES 2 357 679 T3

que tengan, al menos, un 95% de identidad con ella. Preferentemente, dicha proteína de la cápsida comprende la secuencia proteica SEC ID N°: 13 o secuencias proteicas que tengan, al menos, un 99% de identidad con ella.

5 En una segunda realización, la presente invención proporciona una vacuna de acuerdo con la primera y preferida realización, en la que dicha proteína de la cápsida se proporciona en una cantidad efectiva para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En una tercera realización, la presente invención proporciona una vacuna de acuerdo con cualquier realización previa, que comprende además un adyuvante y/o un componente de FCV, ya sea vivo, atenuado o inactivado y que puede incluir al menos otra cepa de FCV distinta. Preferentemente, dicha cepa de FCV distinta se selecciona del grupo que consiste en FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255 y FCV-2280.

15 En una cuarta realización, la presente invención proporciona una vacuna de acuerdo con la tercera y preferida realización, en la que la vacuna incluye además una vacuna para la inmunización de gatos contra uno o más patógenos felinos. Preferentemente, dichos uno o más patógenos felinos se seleccionan del grupo constituido por herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, Clamidia felina y virus de panleucopenia felina.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un régimen de vacunación que reduce de forma significativa la mortalidad asociada con calicivirus felino (FCV) y potencia el perfil de seguridad de las vacunas de FCV. Además, el régimen de vacunación reivindicado induce un perfil de neutralización cruzada en suero más amplio que los protocolos de vacuna de FCV-F9 existentes, que debe proporcionar mejor inmunidad a través de diferentes cepas de calicivirus felino.

30 Se divulga un procedimiento para inmunizar animales con vacunas, en particular, un gato contra calicivirus felino. Otras dos enfermedades felinas, FPV y FHV, también tienen nuevos tratamientos descritos en este documento. El procedimiento comprende administrar al gato cantidades terapéuticamente eficaces de una primera vacuna, una segunda vacuna y, opcionalmente una tercera vacuna que pueden también darse dentro de 120 días como anteriormente, o más a menudo, después de aproximadamente 1 año como un refuerzo anual. La primera vacuna se administra por vía parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intramuscular, etc.). La segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal aproximadamente N días después de la administración de la primera vacuna, y la tercera vacuna se administra por vía parenteral, por vía oral, o por vía oronasal aproximadamente M días después de la administración de la primera o la segunda vacuna. En este documento, N y M son números enteros independientes de 3 a 120, ambos inclusive. También se prefiere cuando N es aproximadamente 3 semanas y aproximadamente 2-4 semanas. Además, se presenta un aspecto de la invención en el que ciertas vacunas identificadas pueden administrarse en forma de dos dosis orales, sin necesidad de una primera administración parenteral. Se aconsejan también refuerzos anuales.

Breve descripción de la lista de secuencias

45 **SEC ID N° 1:** Oligonucleótido cebador: DEL-653

SEC ID N° 7: Oligonucleótido cebador: FCV-SR N6

SEC ID N° 2: Oligonucleótido cebador: DEL-651

SEC ID N° 8: Oligonucleótido cebador: FCV-SR N9

SEC ID N° 3: Oligonucleótido cebador: FCV-SR N2

SEC ID N° 9: Oligonucleótido cebador: cebador 2

50 **SEC ID N° 4:** Oligonucleótido cebador: FCV-SR N3

SEC ID N° 10: Oligonucleótido cebador: FCV-SR C4

SEC ID N° 5: Oligonucleótido cebador: FCV-SR N4

SEC ID N° 11: Oligonucleótido cebador: FCV-SR C8

55 **SEC ID N°6:** Oligonucleótido cebador: FCV-SR N5

SEC ID N° 12:

Secuencia de ADN del gen de la cápsida de FCV-21

Secuencia codificada de aminoácidos del gen de la cápsida de FCV-49

60 **SEC ID N° 13:** Secuencia de aminoácidos codificada del gen de la cápsida de FCV-21

SEC ID N° 6: Secuencia de ADN del gen de la cápsida de FCV-26391-4

SEC ID N° 14: Secuencia de ADN del gen de la cápsida de FCV-49

SEC ID N° 17: Secuencia de aminoácidos codificada del gen de la cápsida de FCV-26391-4

65 **SEC ID N° 15:**

ES 2 357 679 T3

Definiciones y abreviaturas

5 “Aproximadamente”, cuando se usa con respecto a una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95% para la media) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, el que sea mayor de los dos, a menos que se use aproximadamente con respecto a los intervalos de tiempo en semanas donde “aproximadamente 3 semanas”, es 17-25 días, y aproximadamente 2-4 semanas es 10-40 días.

10 “Inmunidad activa” incluye la inmunidad humoral y/o la inmunidad mediada por células contra virus felinos inducida vacunando a un gato con la vacuna de la presente invención.

15 “Anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse a un antígeno específico como resultado de una respuesta inmune a ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas del suero compuestas de cadenas de polipéptidos “ligeras” y “pesadas” que tienen regiones “constantes” y “variables” y se dividen en clases (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) en base a la composición de las regiones constantes. Un anticuerpo que es “específico” para un antígeno dado indica que las regiones variables del anticuerpo reconocen y se unen exclusivamente a un antígeno específico - por ejemplo, el anticuerpo es capaz de distinguir una proteína particular de la cápsida de otras proteínas conocidas en virtud de diferencias medibles en la afinidad de unión, a pesar de la existencia de una identidad de secuencia localizada, homología, o similitud entre proteínas de la cápsida y otros polipéptidos. Los anticuerpos 20 específicos pueden también interactuar con otras proteínas (por ejemplo, la proteína A de *Staphylococcus aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA), a través de interacciones con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos, y, en particular, en las regiones constantes de la molécula. Se conocen bien ensayos de selección para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo. Para una descripción exhaustiva de dichos ensayos, véase, Harlow y col., (ed.) *Antibodies: A Laboratory Manual* Capítulo 6 (1988). Los anticuerpos pueden también reconocer y unirse a fragmentos de proteínas de la cápsida de FCV, con la condición de que los anticuerpos sean específicos para proteínas de la cápsida de FCV. Los anticuerpos pueden producirse usando procedimientos conocidos en la técnica.

30 “Antígeno” o “inmunógeno”, se refiere a una molécula que contiene uno o más epítomos (lineal, conformacional o ambos), que después de la exposición a un sujeto inducirán una respuesta inmune que es específica para ese antígeno. Un epítomo es el sitio específico del antígeno que se une al receptor de células T o al anticuerpo específico, y típicamente comprende de aproximadamente 3 restos de aminoácido a aproximadamente 20 restos de aminoácido. El término antígeno se refiere a subunidades de antígenos - antígenos discretos y separados de un organismo completo con el que se asocia el antígeno en la naturaleza - así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros 35 microbios muertos, atenuados o inactivados. El término antígeno también se refiere a anticuerpos, tales como anticuerpos anti-idiotipo o sus fragmentos, y a mimótopos sintéticos de péptidos que pueden imitar a un antígeno o a un determinante antigénico (epítomo). El término antígeno también se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico *in vivo*, tales como en aplicaciones de inmunización con ADN.

40 “Excipiente” se refiere a cualquier componente de una vacuna que no es un antígeno.

FELOCELL 3 es FELOCELL 4 sin *Chlamydia psittaci*.

45 FELOCELL 4 contiene el virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-F9], virus de la panleucopenia [FPV] y *Chlamydia psittaci* [FCp]. FELOCELL 4A contiene el virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-F21], virus de la panleucopenia [FPV] y *Chlamydia psittaci* [FCp]. FELOCELL 4 A es FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21. FELOCELL 3 A es FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21. Felocell[®] 4, Felocell 4 o FELOCELL 4 o estas palabras seguidas por los números “3” ó “4” son vacunas en las 50 que cualquier variación del nombre Felocell es propiedad de Pfizer.

55 “Primera vacuna”, “segunda vacuna”, “tercera vacuna” y similares, se refieren a vacunas administrables de forma independiente, que pueden ser la misma o diferentes, y que en general pueden administrarse en cualquier orden. Por tanto, una tercera vacuna puede administrarse a un sujeto antes o después de una segunda vacuna.

60 “Identidad” con respecto al porcentaje de “identidad” de secuencia de aminoácidos con respecto a polipéptidos se define en este documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los restos en las secuencias diana después de alinear ambas secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante procedimientos convencionales. En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar los valores de alineamiento usando el algoritmo ClustalW (Thompson y col., Nuc. Ac. Res. 22:4673-4680; 1994) y la matriz de peso PAM250 (Dayhoff y col., “Atlas of Protein Sequence and Structure.”, National Biomedical Research Foundation. Washington, DC 5:345-358 (1978) y los parámetros por defecto como se proporcionan por el programa MegAlign (DNASTAR, Inc.; Madison, WI). La tabla de la matriz de peso PAM250 se presenta como TABLA 1-1 (los 65 aminoácidos se indican mediante los códigos convencionales de una letra).

ES 2 357 679 T3

TABLA 1-1

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	
5	C	12																			
	S	0	2																		
10	T	-2	1	3																	
	P	-3	1	0	6																
	A	-2	1	1	1	2															
15	G	-3	1	0	-1	1	5														
	N	-4	1	0	-1	0	0	2													
	D	-5	0	0	-1	0	1	2	4												
20	E	-5	0	0	-1	0	0	1	3												
	Q	-5	-1	-1	0	0	-1	1	2	2	4										
25	H	-3	-1	-1	0	-1	-2	2	1	1	3	6									
	R	-4	0	-1	0	-2	-3	0	-1	-1	1	2	6								
	K	-5	0	0	-1	-1	-2	1	0	0	1	0	3	5							
30	M	-5	-2	-1	-2	-1	-3	-2	-3	-2	-1	-2	0	0	6						
	I	-2	-1	0	-2	-1	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	5						
	L	-6	-3	-2	-3	-2	-4	-3	-4	-3	-2	-3	-3	4	2	6					
35	V	-2	-1	0	-1	0	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	4	2	4				
	F	-4	-3	-3	-5	-4	-5	-4	-6	-5	-5	-2	-4	-5	0	1	2	-1	9		
40	Y	0	-3	-3	-5	-3	-5	-2	-4	-4	-4	0	-4	-4	-2	-1	-1	-2	7	10	
	W	-8	-2	-5	-6	-6	-7	-4	-7	-7	-5	-3	2	-3	-4	-5	-2	-6	0	0	17

45 El porcentaje de identidad se calcula entonces como:

$$\begin{aligned}
 & \text{Número total de coincidencias idénticas} \text{ _____ } \times 100 \\
 & \text{[longitud de la secuencia más larga + el número de huecos} \\
 & \text{introducidos en la secuencia más larga para alinear} \\
 & \text{las dos secuencias]}
 \end{aligned}$$

60 “Respuesta inmune” en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmune humoral, una respuesta inmune celular, o una respuesta inmune humoral y una celular a un antígeno. Una “respuesta inmune humoral” se refiere a una que está mediada por anticuerpos. Una “respuesta inmune celular” es una mediada por linfocitos T u otros glóbulos blancos o ambos, e incluye la producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas similares producidas por células T activadas, glóbulos blancos, o ambos. Las respuestas inmunes pueden determinarse usando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización, que se conocen en la técnica.

65 “Cantidad inmunológicamente protectora” o “cantidad eficaz para producir una respuesta inmune”, de un antígeno es una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor que sea adecuada para evitar o mejorar signos o síntomas de enfermedad, incluyendo efectos adversos para la salud o sus complicaciones, causados por infección con el agente de la enfermedad y en particular con calicivirus felino. Puede inducirse inmunidad humoral o

inmunidad mediada por células o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal a una composición de vacuna puede evaluarse, por ejemplo, indirectamente a través de la medición de los títulos de anticuerpo, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente controlando los signos y síntomas después de la exposición a la cepa de tipo silvestre. La inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción en los signos clínicos tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, y estado de salud general y actuación del sujeto. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del virus particular usado, o del estado del gato, y puede determinarse por el veterinario.

10 Administración “intranasal” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante la nariz, e implica el transporte de la sustancia principalmente a través de la mucosa nasal.

15 “Aislado”, cuando se usa para divulgar cualquier sustancia definida particularmente, tal como un polinucleótido o un polipéptido, se refiere a la sustancia separada del entorno celular original en el que la sustancia tal como un polipéptido o un ácido nucleico se encuentra normalmente. Como se usa en este documento, por lo tanto, a modo de ejemplo únicamente, una línea celular recombinante construida con un polinucleótido de la invención hace uso del ácido nucleico “aislado”. Como alternativa, la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico puede usarse como tal o como una vacuna y por tanto puede considerarse como aislado puesto que ha sido identificado, separado y hasta cierto punto purificado en comparación a cómo puede existir en la naturaleza. Si la proteína de la cápsida o un fragmento específico inmunogénico suyo se produce en una bacteria recombinante o en un vector de expresión eucariota que produce el antígeno, se considera que existe como una proteína o ácido nucleico aislado. Por ejemplo, una línea celular recombinante construida con un polinucleótido hace uso de un ácido nucleico “aislado”.

25 “Anticuerpo monoclonal” se refiere a anticuerpos producidos por una única línea de células de hibridoma, todas dirigidas hacia un epítipo de un antígeno particular. El antígeno usado para fabricar el anticuerpo monoclonal puede proporcionarse como proteína aislada del patógeno o el patógeno completo. Un hibridoma es una línea celular clonal que está constituida por células híbridas formadas mediante la fusión de una célula de mieloma y una célula productora de anticuerpo específica. En general, los anticuerpos monoclonales son de origen de ratón; sin embargo, anticuerpo monoclonal también se refiere a una población clonal de un anticuerpo fabricado contra un epítipo particular de un antígeno producido por tecnología de exposición in fago o un procedimiento que sea equivalente a la exposición in fago, o células híbridas de origen no de ratón.

35 “N días”, el intervalo o periodo de tiempo “N” o “M días” después de un suceso, se refiere, respectivamente, a cualquier momento en el enésimo o emésimo día después del suceso. Por ejemplo, vacunar a un sujeto con una segunda vacuna 3 días después de la administración de una primera vacuna significa que la segunda vacuna se administra en cualquier momento del tercer día después de la primera vacuna. Esta descripción suele aplicarse al intervalo entre la primera y segunda vacunación. Típicamente el intervalo N preferido es de aproximadamente 3 semanas, o 17-25 días, aunque también es común aproximadamente 2-4 semanas o 10-40 días, y las invenciones de este documento son eficaces con el período de tiempo “N” de entre 3 y 120 días.

45 Administración “oral” o “peroral” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante la boca e implica ingestión o transporte a través de la mucosa oral (por ejemplo, absorción sublingual o bucal) o ambas.

Administración “oronasal” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante la nariz y la boca, como podría producirse, por ejemplo, colocando una o más gotas en la nariz. La administración oronasal implica procesos de transporte asociados con administración oral e intranasal.

50 “Administración parenteral” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante una vía que no incluya el tracto digestivo. Administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intramuscular, administración transcutánea, administración intradérmica, administración intraperitoneal, administración intraocular, y administración intravenosa. Para los propósitos de esta descripción, la administración parenteral excluye vías de administración que implican principalmente el transporte de la sustancia a través del tejido de la mucosa en la boca, nariz, tráquea y pulmones.

60 “Inmunidad pasiva” se refiere a la protección contra calicivirus felino proporcionada a un gato como resultado de vacunar al gato con una vacuna que comprende anticuerpos contra la cepa FCV o un componente inmunogénico o fragmento de un componente suyo.

65 “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a sustancias, que están dentro del alcance del juicio médico sensato, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de sujetos sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, que se corresponden con una proporción razonable beneficio - riesgo, y eficaces para el uso pretendido.

“Anticuerpo policlonal” se refiere a una población mezclada de anticuerpos fabricada contra un patógeno o antígeno particular. En general, la población contiene una diversidad de grupos de anticuerpos, cada grupo dirigido contra un epítipo particular del patógeno o antígeno. Para fabricar anticuerpos policlonales, el patógeno completo o un antígeno

ES 2 357 679 T3

aislado se introduce por inoculación o infección en un huésped, lo que induce al huésped a fabricar anticuerpos contra el patógeno o antígeno.

Administración “por vía respiratoria” se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante inhalación de una sustancia nebulizada (atomizada). En administración por vía respiratoria el principal mecanismo de transporte implica la absorción de la sustancia atomizada a través de la mucosa en la tráquea, bronquios, y pulmones y es, por lo tanto, diferente de la administración intranasal o peroral.

“Dosificación de administración única” significa administrada el mismo o aproximadamente el mismo día, es decir, todos los componentes administrados en aproximadamente 1 día. Los componentes pueden o no estar en un único recipiente.

“Específico para”, cuando se usa para divulgar anticuerpos, indica que las regiones variables de los anticuerpos reconocen y se unen a una cepa específica de virus exclusivamente (es decir, son capaces de distinguir una proteína de la cápsida de FCV particular de otras proteínas conocidas en virtud a diferencias medibles en la afinidad de unión, a pesar de la existencia de identidad de secuencia localizada, homología o similitud entre proteínas de la cápsida de FCV y tales polipéptidos). Se entenderá que anticuerpos específicos pueden también interactuar con otras proteínas (por ejemplo, proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA) a través de interacción con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos, y, en particular, en la región constante de la molécula. Ensayos de selección para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo de la invención se conocen bien y se practican de forma rutinaria en la técnica. Para una descripción exhaustiva de dichos ensayos, véase Harlow y col., (Eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6. Los anticuerpos que reconocen y se unen a fragmentos de las proteínas de la cápsida de FCV de la invención también se contemplan, siempre que los anticuerpos sean específicos para proteínas de la cápsida de FCV. Los anticuerpos pueden producirse usando cualquier procedimiento bien conocido y practicado de forma rutinaria en la técnica.

“Fragmento inmunogénico específico” se entiende como una parte de una secuencia que es reconocible por un anticuerpo que es específico para la secuencia, como se define en detalle a continuación.

“Sujeto” se refiere a cualquier animal que tiene un sistema inmune, lo que incluye mamíferos tales como gatos.

“Vacuna de subunidad” se refiere a un tipo de vacuna que incluye uno o más antígenos, pero no todos los antígenos, que se obtienen de o son homólogos a antígenos de un patógeno de interés, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Tal composición está sustancialmente libre de células de patógenos intactas o partículas patogénicas, o el lisado de dichas células o partículas. Por tanto, una vacuna de subunidad puede prepararse a partir de polipéptidos inmunogénicos del patógeno o sus análogos, al menos parcialmente purificados o sustancialmente purificados. Los procedimientos para obtener un antígeno o antígenos en la vacuna de subunidad incluyen técnicas de purificación convencionales, producción de recombinantes, o síntesis química.

“TCID₅₀” se refiere a “dosis infecciosa de cultivo tisular” y se define como la dilución de un virus requerida para infectar el 50% de un lote dado de cultivos celulares inoculados. Se pueden usar diversos procedimientos para calcular TCID₅₀, incluyendo el procedimiento de Spearman-Kärber que se utiliza a lo largo de esta memoria descriptiva. Para una descripción del procedimiento de Spearman-Kärber, véase B.W. Mahy y H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 23-46 (1996).

“Cantidad terapéuticamente eficaz”, en el contexto de esta descripción, se refiere a una cantidad de un antígeno o vacuna que podría inducir una respuesta inmune en un sujeto (por ejemplo, un gato) que recibe el antígeno o la vacuna que es adecuado para evitar o mejorar signos o síntomas de enfermedad, incluyendo, efectos adversos para la salud o sus complicaciones, causados por infección con un patógeno, tal como un virus (por ejemplo FCV), bacteria, parásito u hongo. Puede inducirse inmunidad humoral o inmunidad mediada por células o inmunidad humoral y mediada por células. La respuesta inmunogénica de un animal a una vacuna puede evaluarse, por ejemplo indirectamente a través de la medición de los títulos de anticuerpo, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través del control de los signos y síntomas después de la exposición con la cepa de tipo silvestre. La inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción en los signos clínicos tales como la mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, y estado de salud general y actuación del sujeto. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del virus particular usado, del estado del sujeto, y puede determinarse por un veterinario.

“Tratar” se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o evitar un trastorno, o afección o enfermedad al que se aplica dicho término, o para evitar uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

“Tratamiento” se refiere al acto de “tratar” como se ha definido inmediatamente anteriormente.

“Vacuna” se refiere a una composición que incluye un antígeno y abarca las llamadas “vacunas de subunidad” como se definen a continuación. La administración de la vacuna a un sujeto da como resultado una respuesta inmune. La vacuna puede introducirse directamente en el sujeto por cualquier vía de administración conocida, incluyendo vía parenteral, vía peroral, y similares.

Parte I

Vacunas, cepas de virus, proteínas de la cápsida, y anticuerpos de la invención

5 La presente invención proporciona vacunas que se basan en cepas de FCV vivas o muertas de FCV-21. La solicitud describía adicionalmente vacunas de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV de las cepas de FCV de la invención y secuencias inmunogénicas específicas suyos. La invención proporciona adicionalmente proteínas de la cápsida aisladas obtenidas de las cepas de FCV de la invención o fragmentos inmunogénicos específicos suyos.

10 Para cepas de FCV, se induce una buena respuesta inmune mediante un determinante antigénico que surge de la proteína de la cápsida. En este documento se divulgan y reivindican varias cepas de FCV que incluyen proteínas de la cápsida estrechamente relacionadas y variantes suyas. Específicamente, se divulga la cepa FCV-21 y la secuencia de proteína (SEC ID 13) y secuencias que tienen 95% y 99% o más identidad. También se divulgan en el presente documento secuencias proteicas de FCV-21 que tienen un 91,2% de identidad con la SEC ID 13.

15 La vacuna de la presente invención generalmente pretende ser un tratamiento profiláctico que inmunice gatos contra enfermedad causada por cepas virulentas de calicivirus felino. Sin embargo, la vacuna también pretende el tratamiento terapéutico de gatos ya infectados con una cepa virulenta de calicivirus felino. Por ejemplo, una vacuna que comprende anticuerpos producidos inmunizando un huésped heterólogo con cápsida de FCV o componente inmunogénico suyo, se usa para el tratamiento terapéutico de un gato infectado con calicivirus felino.

20 Sin embargo, incluso las vacunas que proporcionan inmunidad activa, es decir, vacunas que comprenden cepas de FCV de FCV-21 o sus mutantes, o proteínas de la cápsida obtenidas de las cepas de FCV de la invención, o un fragmento inmunogénico específico de sus proteínas de la cápsida, puede esperarse que sean eficaces cuando se dan como un tratamiento terapéutico contra diversas enfermedades. Por tanto, la inmunidad que se proporciona por la presente invención puede ser inmunidad activa o inmunidad pasiva, y el uso pretendido de la vacuna puede ser profiláctico o terapéutico.

30 La vía de administración para una cualquiera de las realizaciones de la vacuna de la presente invención incluye, aunque sin limitación, oronasal, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraocular, y oral así como transdérmica o por inhalación o supositorio. Las vías preferidas de administración incluyen oronasal, intramuscular e inyección intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. La vacuna puede administrarse por cualquier medio que incluya, aunque sin limitación, jeringuillas, nebulizadores, pulverizadores, dispositivos de inyección sin aguja, o pistolas génicas de bombardeo de microproyectiles (bombardeo por biobalística).

35 La vacuna para una cualquiera de las realizaciones de la presente invención se formula en un vehículo farmacéuticamente aceptado de acuerdo con el modo de administración que se va a usar. Un especialista en la técnica puede fácilmente formular una vacuna que comprende un FCV-21 vivo o muerto, una proteína de la cápsida obtenida de cualquiera de las cepas de FCV de la invención, o un fragmento inmunogénico suyo, un vector de virus recombinante que codifica la proteína de la cápsida de FCV-21 o un fragmento inmunogénico específico suyo, o una molécula de ADN que codifica la proteína de la cápsida obtenida de FCV-21 o un fragmento inmunogénico específico suyo. En casos en que se prefiere la inyección intramuscular, se prefiere una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En casos particulares, se prefieren las soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Las formulaciones pueden proporcionar además estabilizantes tales como gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente vasoconstrictor a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se proporcionan estériles y libres de pirógenos. Sin embargo, los especialistas en la técnica saben bien que las formulaciones preferidas para el vehículo farmacéuticamente aceptado que comprenden las vacunas de la presente invención son aquellos vehículos farmacéuticos aprobados en las normativas promulgadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, o su agencia gubernamental equivalente en un país extranjero tal como Canadá o México o una cualquiera de las naciones Europeas, para vacunas de calicivirus felino vivo, vacunas de calicivirus felino muerto, vacunas de subunidad de polipéptidos (antígeno), vacunas de vector de virus recombinante, vacunas de anticuerpos, y vacunas de ADN. Por lo tanto, el vehículo farmacéuticamente aceptado para la producción comercial de la vacuna de la presente invención es un vehículo que ya está aprobado o que será aprobado por la agencia gubernamental apropiada en los Estados Unidos de América o País Extranjero. La vacuna puede mezclarse además con un adyuvante que es farmacéuticamente aceptable. En ciertas formulaciones de la vacuna de la presente invención, la vacuna se combina con otras vacunas felinas para producir un producto de vacuna polivalente que puede proteger a los gatos contra una amplia diversidad de enfermedades causadas por otros patógenos felinos. Actualmente, los fabricantes comerciales de vacunas felinas, así como los usuarios finales, prefieren productos de vacuna polivalente. Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención proporciona una vacuna polivalente que inmuniza gatos contra calicivirus felino y al menos otro patógeno felino, preferiblemente seleccionado entre el grupo que consiste en herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, Clamidia felina, y virus de la panleucopenia felina.

65 La inoculación de un gato es preferiblemente mediante una única vacunación que produce una completa, amplia respuesta inmunogénica. En otra realización de la presente invención, el gato se somete a una serie de vacunaciones

para producir una completa, amplia respuesta inmune. Cuando las vacunaciones se proporcionan en una serie, las vacunaciones pueden proporcionarse separadas entre aproximadamente un día hasta cuatro semanas o más. En realizaciones particulares, el gato se vacuna en diferentes sitios simultáneamente. Los detalles adicionales acerca de la vía y administración se encuentran a continuación en la sección titulada “Procedimientos para Inmunizar Gatos contra Calicivirus”.

Las composiciones de vacuna pueden incluir opcionalmente diluyentes líquidos, semi-sólidos o sólidos farmacéuticamente aceptables (es decir, estériles y no tóxicos) compatibles con vacunas que sirven como vehículos farmacéuticos, excipientes, o medios. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina entre otros. Cualquier adyuvante conocido en la técnica puede usarse en la composición de vacuna, incluyendo adyuvantes basados en aceite tales como el Adyuvante Completo de Freund y Adyuvante Incompleto de Freund, adyuvantes basados en micolato (por ejemplo, dimicolato de trehalosa), lipopolisacáridos bacterianos (LPS), peptidoglicanos (es decir, mureínas, mucopéptidos, o glicoproteínas tales como N-Opaca, muramil dipéptido [MDP], o análogos de MDP), proteoglicanos (por ejemplo, extraídos de *Klebsiella pneumoniae*), preparaciones de estreptococos (por ejemplo OK432), Biostim™ (por ejemplo 01K2), los “Iscoms” de la Patente Europea 109 942, Patente Europea 180 564 y Patente Europea 231 039, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrano, aceites neutros (tales como migliol), aceites vegetales (tales como aceite de cacahuete), liposomas, polioles de Pluronic®. Los adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), alumbre, hidróxido de aluminio en gel, colesterol, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, tales como por ejemplo, adyuvantes completo e incompleto de Freund, Copolímero en bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, adyuvante amina-lípido Avridina, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (recombinante o de otra manera), toxina del cólera, enterotoxina de *E. Coli* termolábil (recombinante o no), toxina colércia, o muramil dipéptido, entre muchos otros. Las composiciones inmunogénicas pueden además incluir uno o más de otros agentes inmunomoduladores tales como, por ejemplo, interleuquinas, interferones u otras citoquinas. Las composiciones inmunogénicas pueden incluir también gentamicina y Mertiolato. Aunque las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el especialista en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden desde aproximadamente 50 µg hasta aproximadamente 2000 µg de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 500 µg/2 ml de dosis de la composición de vacuna. En otra realización preferida, la presente invención contempla composiciones de vacuna que comprenden de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibiótico, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibiótico.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden fabricarse en diversas formas dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas pueden fabricarse en forma de soluciones acuosas estériles o dispersiones adecuadas para uso inyectable, o fabricarse en formas liofilizadas usando técnicas de secado por congelación. Las composiciones inmunogénicas liofilizadas se mantienen típicamente a aproximadamente 4°C, y pueden reconstituirse en una solución estabilizante, por ejemplo solución salina y/o HEPES, con o sin adyuvante.

Además, las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención pueden incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Como se usa en este documento “un vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción, y similares. Los vehículos deben ser “aceptables” en el sentido de que sean compatibles con los componentes de la invención y no perjudiciales para el sujeto que se va a inmunizar. Típicamente, los vehículos serán estériles y libres de pirógenos.

Vacunas vivas

La vacuna comprende una vacuna de FCV vivo, en la que el componente de FCV es FCV-21. Puesto que estas cepas se aislaron en forma no virulenta se prefieren particularmente para la preparación de una vacuna viva que estimula el sistema inmune del gato sin causar enfermedad.

Se conocen bien en la técnica procedimientos para atenuar adicionalmente los virus, e incluyen procedimientos tales como paso en serie en cultivo celular sobre una línea celular adecuada, o mutagénesis por ultravioleta o química.

Vacunas inactivadas

La vacuna comprende una vacuna de FCV inactivado o muerto que comprende una cepa de FCV que es FCV-21. La vacuna inactivada se fabrica mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez que el virus se propaga hasta títulos elevados, sería fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que la masa antigénica del virus pudiera obtenerse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la masa antigénica del virus puede obtenerse por dilución, concentración, o extracción. Todos estos procedimientos se han

empleado para obtener masa antigénica viral apropiada para producir vacunas. El calicivirus se inactiva mediante tratamiento con formalina, betapropiolactona (BPL), o etilenimina binaria (BEI), u otros procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica.

5 La inactivación por formalina se realiza mezclando la suspensión de calicivirus con formaldehído al 37% hasta una concentración final de formaldehído del 0,05%. La mezcla calicivirus-formaldehído se mezcla mediante agitado constante durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de calicivirus inactivado se ensaya después para virus vivos residuales ensayando para crecimiento sobre una línea celular felina adecuada tal como células CRFK.

10 La inactivación mediante BEI se realiza mezclando la suspensión de calicivirus de la presente invención con BEI 0,1 M (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N) hasta una concentración final de BEI de 1 mM. La mezcla calicivirus-BEI se mezcla mediante agitado constante durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, seguida de la adición de tiosulfato sódico 1,0 M hasta una concentración final de 0,1 mM. El mezclado se continúa durante dos horas adicionales. La mezcla de calicivirus inactivado se ensaya para calicivirus vivo residual ensayando para el crecimiento sobre una línea celular felina adecuada tal como células NLFK.

20 El calicivirus inactivado de la presente invención mencionado anteriormente se mezcla con uno cualquiera de los vehículos farmacéuticos para formular vacunas de virus inactivado hasta el nivel de dosificación apropiado. La vacuna inactivada puede además incluir, además del componente de FCV de FCV-21, al menos una cepa de calicivirus felino diferente, preferiblemente seleccionado entre el grupo que consiste en FCV-F9, FCV-M8, FCV-255, y FCV-2280. En una realización preferida, la vacuna incluye además una vacuna para inmunizar a un gato contra uno o más patógenos felinos diferentes, preferiblemente seleccionados entre el grupo que consiste en herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, Clamidia felina, y virus de la panleucopenia felina.

Vacunas recombinantes

30 La vacuna comprende un vector de virus recombinante que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápsida de FCV descrita en este documento o un fragmento inmunogénico específico suyo.

35 El vector de virus recombinante es un herpesvirus felino que inmuniza un gato contra el calicivirus felino y el herpesvirus felino. El vector de virus recombinante comprende uno o más antígenos seleccionados preferiblemente entre el grupo que consiste en herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, Clamidia felina, y virus de la panleucopenia felina, virus de la rabia y *Bordetella bronchiseptica*.

40 Para fabricar un vector de virus recombinante que exprese una proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, se inserta un ADNc que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo en el genoma de un vector de virus tal como herpesvirus, poxvirus o adenovirus. La Patente de Estados Unidos N° 5.716.822 de Wardley y col. divulga un procedimiento para insertar ADN que codifica la proteína de la cápsida de la cepa calicivirus felino CFI-68 FIV en el gen de timidina quinasa del herpesvirus felino. Otras vacunas de vector de virus recombinante abarcadas por la presente invención, incluyen aunque sin limitación, adenovirus, virus adeno-asociados, parvovirus, y diversos vectores de poxvirus, para expresar la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo. En particular, la presente invención incluye vacunas de vector de poxvirus recombinante que expresan la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, fabricados de acuerdo con los procedimientos mostrados en una cualquiera de las Patentes de Estados Unidos N° 5.338.683 y 5.494.807 de Paoletti y col., que muestran vacunas de virus recombinante constituidas por virus vaccinia o poxvirus de canario que expresan antígenos extraños; la Patente de Estados Unidos N° 5.266.313 de Esposito y col., que muestra vectores de poxvirus de mapaches recombinantes que expresan antígenos del virus de la rabia; y la Patente de Estados Unidos N° 6.010.703 de Maes y col. que muestra vectores de poxvirus de mapache recombinantes que expresan los antígenos gD o gB del herpesvirus felino.

55 Para cualquiera de los vectores de virus recombinante mencionados anteriormente, el ADNc que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, está unido de forma operativa a un promotor eucariota en el extremo 5' del ADNc que codifica el antígeno y una señal de terminación eucariota y una señal de poli (A) en el extremo 3' del ADNc que codifica el antígeno. Como se usa en este documento, la expresión "unido de forma operativa" significa que el polinucleótido (en forma de una molécula de ADNc) y un polinucleótido (ADN) que contiene una secuencia de control de expresión, por ejemplo, un promotor de la transcripción y secuencias de terminación, se sitúan en un vector o célula tal que la expresión del antígeno codificado por el ADNc se regula mediante la secuencia de control de expresión. Los procedimientos para clonar ADN tal como el ADNc que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, y para unirle de forma operativa el ADN que contiene las secuencias de control de expresión al se conocen bien en la técnica. Son ejemplos de promotores adecuados para expresar la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo en los vectores de virus recombinante, el promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV), el promotor de repeticiones terminales largas del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR), el promotor inmediato temprano del virus 40 de simios (SV40), y promotores inducibles tales como el promotor de la metalotioneína. Un ejemplo de un ADN que tiene una señal de terminación y una señal de poli (A) es la región tardía de poli (A) de SV 40. Otros ejemplo

de un sistema de expresión viral adecuado para producir el antígeno es el sistema de expresión de Sindbis disponible de Invitrogen. El uso de estos vectores y sistemas de expresión disponibles en el mercado se conoce bien en la técnica.

5

Vacuna de molécula de ADN o ácido nucleico

En el presente documento también se divulga una vacuna de molécula de ADN o ácido nucleico que provoca una respuesta inmune activa en el gato. La vacuna de molécula de ADN está constituida por ADN que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo de una proteína de la cápsida de FCV descrita en este documento.

La vacuna de molécula de ADN comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N^{os}: 12, 14 ó 16, o un fragmento suyo que codifica SEC ID N^{os}: 13, 15 ó 17, o un fragmento inmunogénico específico de SEC ID N^{os}: 13, 15 ó 17. El ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo se une de forma operativa a o cerca de un promotor transcripcional. Esto permite la transcripción de la proteína de la cápsida, o un fragmento inmunogénico específico suyo, a partir del ácido nucleico cuando el ácido nucleico se inocula en las células del gato. Preferiblemente la molécula de ADN es un plásmido. Los promotores que son útiles para vacunas de ADN se conocen bien en la técnica e incluyen aunque sin limitación, el promotor RSV LTR, el promotor inmediato temprano de CMV, y el promotor del antígeno T de SV40. Se prefiere además que el ácido nucleico esté unido de forma operativa, en o cerca del codón de terminación de la secuencia que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo, a un fragmento de ácido nucleico que comprende una señal de terminación de la transcripción y una señal de reconocimiento de poli (A). La vacuna de ADN se proporciona al gato en un vehículo farmacéuticamente aceptado, o en un vehículo de liposoma o de lípido similar a los descritos en la Patente de Estados Unidos N^o 5.703.055 de Felgner. La vacuna de ADN puede proporcionarse al gato mediante una diversidad de procedimientos tales como inyección intramuscular, inyección intrajet, o bombardeo por biobalística. La fabricación de vacunas de ADN y los procedimientos para su uso se proporcionan en las Patentes de Estados Unidos N^{os} 5.589.466 y 5.580.859 ambas de Felgner. Finalmente, un procedimiento para producir plásmidos de ADN de calidad farmacéutica se muestra en la Patente de Estados Unidos N^o 5.561.064 de Marquet y col.

30

Por lo tanto, usando los procedimientos mencionados anteriormente, las vacunas de ADN que expresan la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, se usan para inmunizar gatos contra calicivirus felino virulento. La ventaja de la vacuna de ADN es que la molécula de ADN se propaga convenientemente en forma de plásmido que es un medio sencillo y barato para producir una vacuna, y puesto que la vacuna no está viva, muchos de los problemas regulatorios asociados con las vacunas de vectores de virus recombinantes vivos no suponen un problema con las vacunas de ADN. Un especialista en la técnica podría apreciar que la vacuna de ADN puede comprender ácidos nucleicos producidos de forma sintética que se fabrican mediante procedimientos de síntesis química bien conocidos en la técnica.

40

Proteína de la cápsida de FCV aislada y purificada

En una realización de la presente invención, la vacuna está constituida por la proteína de la cápsida de FCV aislada y purificada o un fragmento inmunogénico específico suyo. En particular, una vacuna en la que la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N^o: 13. Preferiblemente, la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo se produce en una bacteria recombinante o un vector de expresión eucariota que produce el antígeno que puede aislarse y purificarse para fabricar la vacuna. Por ejemplo, la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo se produce en un microorganismo tal como bacterias, levaduras, u hongos, en una célula eucariota tal como una célula de mamífero o de insecto, o mediante un vector de virus recombinante tal como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus Semliki Forest, baculovirus, bacteriófago, virus Sindbis, o virus Sendai. Las bacterias adecuadas para producir la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Tipos de levadura adecuados para expresar la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida* o cualquier otra levadura capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Procedimientos para usar las bacterias, células eucariotas o vectores de virus recombinantes anteriormente mencionados para producir antígenos para vacunas se conocen bien en la técnica.

Para producir la vacuna constituida por la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo, el ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, se clona en un plásmido, y el ácido nucleico se une de forma operativa a un promotor que efectúa la expresión de la proteína de la cápsida o de un fragmento inmunogénico específico suyo en un microorganismo. Promotores adecuados incluyen, aunque sin limitación, el promotor del fago T7, el promotor del fago T3, el promotor de β -galactosidasa, y el promotor del fago Sp6. La expresión de la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo en un microorganismo permite que la proteína de la cápsida se produzca usando tecnologías de fermentación que se usan comercialmente para producir grandes cantidades de polipéptidos antígenicos recombinantes. Los procedimientos para aislar y purificar antígeno se conocen bien en la técnica e incluyen procedimientos tales como filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, o centrifugado.

65

ES 2 357 679 T3

Para facilitar el aislamiento de la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, se fabrica un polipéptido de fusión en el que la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo se une a otro polipéptido que permite el aislamiento por cromatografía de afinidad. Preferiblemente, un polipéptido de fusión se fabrica usando uno de los sistemas de expresión que se muestran a continuación. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico ADNc que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo se une en el extremo 5' o en el extremo 3' a un ácido nucleico que codifica un polipéptido. Los ácidos nucleicos se unen en el marco de lectura del codón apropiado para permitir la producción de un polipéptido de fusión en el que el extremo amino y/o carboxilo de la proteína de la cápsida o parte suya se fusiona con un polipéptido que permite la recuperación simplificada del antígeno en forma de polipéptido de fusión. El polipéptido de fusión puede también evitar la degradación del antígeno durante la purificación. Aunque una vacuna que comprende el polipéptido de fusión es eficaz, en algunos casos puede ser deseable retirar el segundo polipéptido después de la purificación. Por lo tanto, también se contempla que el polipéptido de fusión contenga un sitio de escisión en la unión entre el antígeno y el polipéptido. El sitio de escisión está que consiste en una secuencia de aminoácidos que se escinde con una enzima específica para la secuencia de aminoácidos en el sitio. Ejemplos de dichos sitios de escisión que se contemplan, incluyen el sitio de escisión por enteroquinasa que se escinde mediante enteroquinasa, el sitio de escisión por factor Xa que se escinde mediante el factor Xa, y el sitio de escisión por GENENASE que se escinde mediante GENENASE (GENENASE es una marca comercial de New England Biolabs, Beverly, Mass). Los siguientes son procedimientos para producir la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo en forma de polipéptido de fusión o en forma de un antígeno aislado libre del polipéptido.

Un ejemplo de un sistema de expresión procariota para producir la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo en forma de polipéptido de fusión para uso en vacunas, es el Sistema de Fusión de Genes de Glutathion S-transferasa (GST) disponible de Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J., que usa el plásmido del vector de expresión pGEX-4T-1. El ADNc que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo, se fusiona en el marco de lectura de codón apropiado con el ADN que codifica GST. La parte de GST del polipéptido de fusión permite la purificación rápida del polipéptido de fusión usando cromatografía de afinidad a glutathion Sefarosa 4B. Después de la purificación, la parte de GST del polipéptido de fusión puede retirarse mediante escisión con una proteasa específica de sitio tal como trombina o factor Xa para producir un antígeno libre del polipéptido GST. La proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo, libre del polipéptido GST, se produce mediante un segundo turno de cromatografía de afinidad a glutathion Sefarosa 4B.

Otro procedimiento para producir una vacuna que comprende la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, es un procedimiento que une en fase el ADNc que codifica el antígeno y codones de ADN que codifican polihistidina. La polihistidina preferiblemente comprende seis restos de histidina que permiten la purificación del polipéptido de fusión por cromatografía de afinidad a metal, preferiblemente cromatografía de afinidad a níquel. Para producir la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo libre de la polihistidina, se fusiona un sitio de escisión tal como un sitio de escisión por enteroquinasa en el marco de lectura apropiado entre los codones que codifican la polihistidina y los codones que codifican el antígeno. El antígeno se libera de la polihistidina mediante escisión con enteroquinasa, seguida de un segundo turno de cromatografía de afinidad a metal que une la polihistidina libre. Este procedimiento demostró ser útil para preparar el antígeno LcrV de *Y. pestis*, que se divulga en Motin y col. (Infect. Immun. 64: 4313-4318 (1996)). El Sistema Xpress disponible en Invitrogen, Carlsbad, California, es un ejemplo de un kit comercial que está disponible para fabricar y después aislar proteínas de fusión polipéptido-polihistidina.

Otro procedimiento más para producir una vacuna que comprende la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, usa un procedimiento descrito por Motin y col., Infect. Immun. 64: 3021-3029 (1995). Motin y col., describieron un ADN que codifica un polipéptido de fusión que consiste en el ADN que codifica un antígeno unido a un ADN que codifica una parte de proteína A en la que el ADN que codifica un sitio de escisión por enteroquinasa se interpone en el marco de lectura del codón apropiado entre el ADN que codifica la proteína A y el antígeno. La proteína A permite al polipéptido de fusión aislarse mediante cromatografía de afinidad a IgG, y la proteína de la cápsida, libre de la proteína A se produce mediante escisión con enteroquinasa. La proteína A se retira después mediante un segundo turno de cromatografía de afinidad a IgG.

Otro procedimiento para producir una vacuna que comprende la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo se basa en procedimientos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.725.863 de Daniels y col. El procedimiento de Daniels y col., puede usarse para fabricar la vacuna de proteína de la cápsida de FCV que está constituida por una molécula de enterotoxina en la que cada molécula tiene insertada más de 100 restos de aminoácidos de la proteína de la cápsida de FCV. Otros procedimientos para fabricar vacunas de polipéptido de fusión que pueden usarse para fabricar las vacunas de la presente invención se divulgan en Patente de Estados Unidos N° 5.585.100 de Mond y col., y Patente de Estados Unidos N° 5.589.384 de Liscombe. Finalmente, el Sistema de Fusión y Purificación pMAL disponible en New England Biolabs es otro ejemplo de un procedimiento para fabricar un polipéptido de fusión en el que una proteína de unión a maltosa se fusiona con la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo. La proteína de unión a maltosa facilita el aislamiento del polipéptido de fusión por cromatografía de afinidad a amilosa. La proteína de unión a maltosa puede unirse al antígeno mediante uno de los sitios de escisión mencionados anteriormente lo que permite que el antígeno se libere de la proteína de unión a maltosa.

Aunque los procedimientos bacterianos se usan para producir proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo para vacunas, puede ser deseable producir la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo en un sistema de expresión eucariota. Un sistema particularmente útil es el sistema de expresión de baculovirus que se divulga en Patente de Estados Unidos N° 5.229.293 de Matsuura y col. Vectores de expresión de baculovirus adecuados para producir la proteína de cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo son los vectores pPbac y pMbac de Stratagene; y el vector Bac-N-Blue, el vector pBlueBac4.5, pBlueBacHis2-A,B,C, y el pMelBac disponibles en Invitrogen, Carlsbad, Calif.

Otro sistema eucariota útil para expresar la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo para vacunas, es un sistema de expresión en levadura tal como el Sistema de Expresión y Purificación de Proteínas en levadura ESP disponible en Stratagene. Otro sistema de expresión en levadura es uno cualquiera de los sistemas de expresión basados en *Pichia* de Invitrogen. La presente invención también abarca sistemas de expresión en mamíferos. Ejemplos de sistemas de expresión en mamíferos son el sistema LacSwitch II, el fagémido pBK, el sistema del vector pXT1, y el sistema del vector pSG5 de Stratagene; el sistema del vector de expresión de mamíferos pTarget, el vector de expresión de mamíferos pSI, el vector de expresión de mamíferos pCI, y los vectores pAdVantage disponibles de Promega Corporation, Madison, Wis.; y el Sistema de Expresión en Mamíferos inducible por Ecdisona, pCDM8, pcDNA1.1 y pcDNA1.1/Amp disponibles en Invitrogen.

En la presente invención se divulgan también vacunas que comprenden la proteína de la cápsida de FCV o epítomos particulares de la proteína de la cápsida como componentes de un sistema de liberación de esporas termoestable fabricado de acuerdo con el procedimiento mostrado en la Patente de Estados Unidos N° 5.800.821 de Acheson y col. Por lo tanto, se divulga una célula bacteriana manipulada genéticamente que contiene un ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo. Cuando la vacuna de esporas bacterianas recombinantes se administra por vía oral al gato, las esporas germinan en el tracto gastrointestinal del gato y las bacterias expresan la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo, que se pone en contacto con el sistema inmune del gato y provoca una respuesta inmune. La vacuna tiene la ventaja de ser termoestable; por lo tanto puede almacenarse a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo indefinido.

Vacunas de inmunidad pasiva

Aunque las realizaciones anteriores de la presente invención proporcionan inmunidad activa contra calicivirus felino, la presente invención divulga también, vacunas que proporcionan inmunidad pasiva para calicivirus felino. Una vacuna que provoca inmunidad pasiva contra calicivirus felino está constituida por anticuerpos policlonales o monoclonales que son contra la proteína de la cápsida de FCV, un fragmento inmunogénico específico suyo o el virus FCV completo.

Para fabricar una vacuna de inmunidad pasiva que comprende anticuerpos policlonales, la proteína de la cápsida FCV incluida, o un fragmento inmunogénico específico suyo se inyecta en un huésped adecuado para preparar los anticuerpos, preferiblemente el huésped es un caballo, cerdo, conejo, oveja o cabra. Procedimientos para producir vacunas de anticuerpos policlonales a partir de estos huéspedes se conocen bien en la técnica. A modo de ejemplo, la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico suyo o la cápsida del calicivirus FCV completo se mezcla con un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund o el menos tóxico TiterMax disponible en CytRx Corp., Norcross, Ga., que después se administra al huésped mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. La producción de anticuerpos se controla, y cuando se ha producido suficiente anticuerpo, se retira el suero del huésped y se recupera preferiblemente el anticuerpo del suero.

La vacuna de inmunidad pasiva puede comprender uno o más anticuerpos monoclonales contra 1 o más epítomos de la proteína de la cápsida de FCV o el virus FCV completo. Procedimientos e hibridomas para producir anticuerpos monoclonales se conocen bien en la técnica. Aunque los anticuerpos monoclonales pueden fabricarse usando tecnologías de hibridoma bien conocidas en la técnica, los anticuerpos monoclonales contra el antígeno pueden también fabricarse de acuerdo con los procedimientos de exposición in fago tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.977.322 de Marks y col. Anticuerpos felinizados contra la proteína de la cápsida o una parte suya pueden fabricarse de acuerdo con procedimientos que se han usado para humanizar anticuerpos, tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.693.762 y 5.693.761 ambas de Queen y col., que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Un kit de exposición in fago que es útil para fabricar anticuerpos monoclonales es el Sistema de Anticuerpos en Fago Recombinante disponible de Amersham Pharmacia Biotech.

Anticuerpos, policlonales y monoclonales

En el presente documento también se divulgan varios anticuerpos monoclonales muy importantes. Estos anticuerpos se han desarrollado en este documento para identificar rápidamente y, en algunos casos definir, las cepas virales descritas en este documento. Ejemplos particulares de anticuerpos monoclonales y sus descripciones pueden encontrarse en los siguientes ejemplos. En particular, véase Ejemplo 1-2 y Tabla 1-2 y especialmente Ejemplo 1-8, Tabla 1-4.

Los siguientes ejemplos pretenden promover, pero no limitar una mayor comprensión de la presente invención.

Parte 1 Ejemplos

Ejemplo 1-1

5 *Aislamiento y cultivo de FCV-21*

Se recogió Calicivirus felino (FCV) de la cepa 21 (FCV-21) en junio de 1993 de una exposición de gatos en Ann Arbor, Michigan. Se diluyó en 96 microtubos o pocillos que contenían medio al 1% y se hicieron diluciones 1:10. Se añadieron 100 ul de la muestra diluida a 100 ul de células CRFK en una placa de 96 pocillos.

10 El virus FCV-21 se purificó tres veces mediante dilución limitada en placas de 96 pocillos. El sobrenadante viral de la purificación final se retiró y se usó para infectar células CRFK cultivadas hasta una confluencia del 75% en un matraz T25. Cuando se observó el 100% de CPE, la suspensión se congeló/descongeló tres veces y se trasladó en alícuotas a viales de congelación (1 ml/vial). El título de esta solución madre viral se determinó como 1,5 x 10⁸ TCID₅₀/ml.

FCV-21 se depositó con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, Estados Unidos.

20 Ejemplo 1-2

Inmunofluorescencia y elisa de FCV-21 usando diversos anticuerpos monoclonales comerciales o pre-existentes

25 Para el ensayo de inmunofluorescencia (IFA), se usó una solución madre viral de FCV-21 para infectar una placa de 24 pocillos sembrada con células NLFK cultivadas hasta una confluencia de aproximadamente el 90%. Aproximadamente 20 horas después de la infección, se lavó la placa 2 veces con PBS x 1 y se fijó con acetona al 80%. Se diluyeron diversos anticuerpos monoclonales hasta aproximadamente 2 ug/ul y se añadieron a pocillos individuales de la placa (0,2 ml/pocillo). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente (TA) con agitación, cada pocillo se lavó dos veces con PBS x 1, y se añadió un anticuerpo secundario (anti-ratón marcado con FITC, 10 ug/ul). Después de cubrir la placa con papel de aluminio e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación, cada pocillo se lavó dos veces con PHS 1 x y se secó al aire. Cada pocillo se observó después con un microscopio de fluorescencia para ver su intensidad de tinción con FITC.

35 Para el ensayo ELISA, se revistió una placa de ELISA de 96 pocillos con 200 ul de un anticuerpo policlonal anti-FCV de conejo (Pfizer #16), diluido a 1:1500 en tampón carbonato de sodio (1,59 g de Na₂CO₃ y 2,93 g de NaHCO₃ disueltos en 1 litro de agua). La placa se incubó a 4°C durante una noche. La placa se lavó tres veces con PBS x 1 (pH 7,4) que contenía un 0,05% de Tween-20 (PBST), después se bloqueó con 200 ul de caseína al 1% en PBST durante una hora a 37°C. Se diluyeron diversos anticuerpos monoclonales hasta aproximadamente 0,1 ug/ml y se añadieron a pocillos individuales (100 ul/pocillo). Cada muestra se hizo por triplicado. Después de la incubación a 37°C durante una hora, cada pocillo se lavó 3 veces con PBST, y se incubó con 100 ul de inmunoglobulina IgG (H+L) Anti-Ratón de Cabra AffiniPure conjugada con peroxidasa diluida al 1:200 (Jackson ImmunoResearch, cat. N° 715-035-150) durante 1 hora a 37°C. Cada pocillo se lavó después tres veces con PBST, seguido de la adición de 100 ul de sustrato de peroxidasa ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat. N° 50-66-18) a cada pocillo. Después de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, la placa se leyó a 405-490 nm (longitud de onda dual) con un lector de ELISA. La actividad específica se calculó en base a la proporción señal/ruido.

Los conjuntos de datos a partir de los ensayos de IFA y ELISA correlacionaban bien entre ellos (Tabla 1-2), e indicaban que el FCV-21 es inmunológicamente distinto del F9, una cepa de vacuna de FCV usada comúnmente. Dos anticuerpos monoclonales (FCV 1-43 y MAB791P) reaccionaron con F9, pero no con FCV-21 (Tabla 1-2).

50

TABLA 1-2

Sumario de afinidades de diversos anticuerpos monoclonales para cepas de FCV F9 y FCV-21

	Fuente	Catálogo/Nº de I.D.	IFA		ELISA		
			F9	FCV-21	F9	FCV-21	
60	1	Accurate Chemical	YVS7401	+++	++	17	16
	2	Accurate Chemical	YVS7402	-	-	1	1
	3	Accurate Chemical	EDCLA3 09	++++	++++	8	3
65	4	Chemicon	MAB8962	++	++	23	24

ES 2 357 679 T3

5	6	Cortex Biochem	CR1260M	+	+	11	12
	7	Custom Monocolonals, Int.	S1-9	+++	+++	27	24
5	8	Custom Monocolonals, Int	FCV 1-43	+++	-	5	1
10	9	Custom Monocolonals, Int	FCV8-1A	+++	+++	5	13
15	10	Maine Biotech	MAB790P	++++	++++	26	26
	11	Maine Biotech	MAB791P	+++	-	4	1
	12	Novocastra Lab	NCL-1G9	+++	+++	17	5
20	13	Fabricación propia (Pfizer)	1-4 Anticuerpo monoclonal	-	-	1	1
25	14	Fabricación propia (Pfizer)	1-12 Anticuerpo monoclonal	++++	+++	12	1
30	15	Fabricación propia (Pfizer)	3-3 Anticuerpo monoclonal	++++	++++	22	25
35	16	Fabricación propia (Pfizer)	3-5 Anticuerpo monoclonal	++++	++++	21	22
	17	Fabricación propia (Pfizer)	Suero de conejo	++++	++++		
40		Biocor/Pfizer	S1.9A1A	++++	++++	29	33

Ejemplo 1-3

45 *Análisis de la secuencia de la cápsida de FCV-21*

Se aisló ARN total del sobrenadante de un cultivo celular infectado con FCV-21 usando el reactivo TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA). Una preparación de ADNc de "primera cadena" se sintetizó usando cebadores aleatorios y transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó usando la polimerasa XL rTth (Applied Biosystems; Foster City, CA) y cebadores de oligonucleótidos DEL-653 (SEC ID N°: 1) y DEL-651 (SEC ID N°: 2). El producto de PCR resultante se secuenció usando química BigDye y un Analizador Genético ABI377. La secuencia de la cápsida completa se enumera como SEC ID N°: 12 para secuencia de nucleótidos y SEC ID N°: 13 para la secuencia de aminoácidos codificada.

55 Ejemplo 1-4

Aislamiento y cultivo de FCV-49 (ejemplo comparativo)

El calicivirus felino (FCV) cepa 49 (FCV-49, también llamado PHA-49) se recogió en 1993 de una exposición de gatos de Philadelphia, PA. La muestra se diluyó en 96 microtubos o pocillos que contenían medio al 1%, y se hicieron diluciones 1:10. Se añadieron 100 ul de la muestra diluida a 100 ul de células CRFK en una placa de 96 pocillos. El virus FCV-49 se purificó 3 veces mediante dilución limitada en placas de 96 pocillos. El sobrenadante viral de la purificación final se retiró y se usó para infectar células CRFK cultivadas hasta una confluencia del 75% en un matraz T25. Cuando se observó un 100% de CPE, la suspensión se congeló/descongeló 3 veces y se trasladó en forma de alícuotas a viales de congelación (1 ml/vial). El título de esta solución madre viral se determinó como $6,8 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

ES 2 357 679 T3

FCV-49 se depositó con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, Estados Unidos.

Ejemplo 1-5

5

Análisis de la secuencia de la cápsida de FCV-49 (ejemplo comparativo)

Se aisló ARN total del sobrenadante de un cultivo celular infectado con FCV-49 usando reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Una preparación de ADNc de "primera cadena" se sintetizó usando cebadores aleatorios y la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó usando la polimerasa XL rTth (Applied Biosystems; Foster City, CA) y cebadores de oligonucleótidos DEL-653 (SEC ID N°: 1) y DEL-651 (SEC ID N°: 2). El producto de PCR resultante se secuenció usando química BigDye y un Analizador Genético ABI377. La secuencia de la cápsida completa se muestra como SEC ID N°: 14 para la secuencia de nucleótidos y SEC ID N° 15 para la secuencia de aminoácidos codificada.

15

Ejemplo 1-6

Aislamiento y cultivo de FCV-26391-4 (ejemplo comparativo)

El calicivirus felino (FCV) cepa 26391-4 (FCV-26391-4) se recogió en 2003 de la Humane Society of Bay County (Panama City, Florida). Se purificó una vez mediante dilución limitada en una placa de 96 pocillos que contenía medio DMEM (Invitrogen) con suero fetal bovino al 2%. El virus purificado se usó después para infectar un matraz T150 que contenía células NLFK (Norden Lab Feline Kidney). Una vez que se alcanzó un 100% de CPE, la suspensión se congeló/descongeló una vez y se trasladó en forma de alícuotas a viales de congelación (0,85 ml/vial). El título de esta solución madre viral se determinó como $5,6 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

25

FCV-26391-4 se depositó con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, Estados Unidos.

Ejemplo 1-7

Análisis de la secuencia de la cápsida de FCV-26391-4 (ejemplo comparativo)

Se aisló ARN total del sobrenadante de un cultivo celular infectado con FCV26391-4 usando un kit QIAamp de aislamiento de ARN Viral. (Qiagen; Valencia, CA). Se usó aproximadamente 1 ug de ARN viral en RT-PCR (RT-PCR SuperScript de una etapa con Taq de Platino; de Invitrogen). Las condiciones de reacción fueron: 30 min a 50°C; 2 min a 94°C; seguido de 40 ciclos de 15 s a 94°C; 30 s a 55°C, y 2 min a 70°C; seguidos de una incubación final a 72°C durante 10 min, y almacenamiento a 4°C. Los cebadores usados fueron FCV-N2 (SEC ID N°: 3) y FCV-cebador 2 (SEC ID N°: 9). El producto de PCR se secuenció después usando diversos cebadores de oligonucleótidos (SEC ID N°s: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). La secuencia de la cápsida completa para FCV 26391-4 se muestra como SEC ID N°: 16 para la secuencia de nucleótidos y SEC ID N°: 17 para la secuencia de aminoácidos codificada.

40

Las secuencias de aminoácidos de los genes de la cápsida de FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4 se alinearon con todas las secuencias de las cápsidas de FCV de longitud completa disponibles en GenBank. El alineamiento se creó usando el algoritmo ClustalW (Thompson y col., 1994), la matriz de peso PAM250 (Dayhoff y col., 1978) y parámetros del programa por defecto (MegAlign; DNASTAR, Inc; Madison, WI). La identidad entre las secuencias de la proteína de la cápsida de FCV-21 y FCV-213-95, la más alta entre todas las entradas en el GenBank es del 90,7%. Las secuencias de la cápsida de FCV-49 y FCV-213-95 son idénticas en un 92,2%. Las secuencias de la cápsida de FCV-26391-4 y FCV CFI-68 son idénticas entre sí en un 91,3%.

50

Se presenta una única secuencia de la cápsida para FCV-21, FCV-49, y FCV-26391-4, y se basa en la secuenciación directa de los productos de PCR obtenidos. Sin embargo, cada una de estas secuencias representa la secuencia media, o secuencia consenso, entre una población de cuasiespecies virales, que se sabe que existen dentro de las poblaciones de ARN viral (para una revisión, véase Domingo y col., Virus Res. 82:39-44; 2002). Las cuasiespecies son un resultado directo de errores que se producen durante la replicación del genoma de ARN, generando progenie que tiene mutaciones dentro de su genoma. Por lo tanto, se espera que existan de forma natural variantes menores de las secuencias de la cápsida para estas y otras secuencias de genes de la cápsida de FCV. Sin embargo, la distribución de mutaciones dentro de cada uno es tal que tienen poco/ningún efecto en la identidad general entre cepas, incluyendo FCV-21, FCV-49, y FCV-26391-4.

60

Ejemplos 1-8

Generación de anticuerpos monoclonales específicos para FCV-21

65

A. *Purificación de FCV-21.* Se centrifugaron aproximadamente 200 ml de sobrenadante del cultivo celular de células NLFK infectadas con FCV-21 a 3.000 rpm durante 30 minutos a 10°C. 25 ml del sobrenadante se transfirieron a tubos de centrifuga Beckman Ultraclear, y 10 ml de una solución de sacarosa al 10% se colocaron en el fondo del tubo.

ES 2 357 679 T3

Los tubos se centrifugaron después a 27.000 rpm durante 2 horas a 15°C. Después del centrifugado, los sobrenadantes se retiraron y se descartaron, y los sedimentos se resuspendieron en 250 ul de agua estéril. La concentración de proteína se determinó como 7 mg/ml usando el Kit de Ensayo de Proteínas Micro BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

5

Inmunización de ratones y generación de clones de células de hibridoma

Se inyectaron aproximadamente 100 ug de proteína de virus FCV-21 purificada a cada ratón junto con adyuvante de Freund. Se vacunaron ocho ratones. Se realizaron dos inmunizaciones de refuerzo con 100 ug de FCV-21 purificado con adyuvante RIBI en un intervalo de 4 semanas. Se determinó que las respuestas inmunes para los ocho ratones tenían un título de 31.250 o superior en ELISA usando FCV-21 purificado. La fusión de células se realizó para crear clones de hibridoma. Sesenta y ocho de dichos clones celulares se cultivaron y el sobrenadante se ensayó para su reactividad con FCV-21.

15

Para este ELISA, una placa de ELISA de 96 pocillos se revistió con 100 ul de FCV purificado a una concentración de 5 ug/ml, diluido en PBS x 1. La placa se secó a 37°C durante una noche sin estar cubierta en una incubadora no humidificada. El virus en la placa se fijó aplicando 0,1 ml de metanol e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. La placa se lavó después 8 veces con agua destilada, después se bloqueó con 200 ul de suero de fabricación propia al 10% en PBS x 1 durante una noche a 4°C. La placa se lavó de nuevo 8 veces con agua destilada. Se añadieron diversas diluciones de muestras de suero de ratón a pocillos individuales (100 ul/pocillo). Cada muestra se hizo por triplicado. Después de la incubación a 37°C durante 1 h, cada pocillo se lavó 3 veces con PBST, y se incubó con 100 ul de IgG (H+L) anti-Ratón de Cabra AffiniPure conjugada con peroxidasa, diluida a 1:200 (Jackson ImmunoResearch, cat. N° 715-035-150) durante 1 hora a 37°C. Cada pocillo se lavó después 3 veces con PBST, seguido de la adición de 100 ul de sustrato de peroxidasa ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat N° 50-66-18) a cada pocillo. Después de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, la placa se leyó a 405-490 nm (longitud de onda dual) con un lector de ELISA. La actividad específica se calculó en base a la proporción señal/ruido.

30

Reactividad de anticuerpos monoclonales específicos de FCV-21

Los sobrenadantes de los clones de células de hibridoma anteriores se usaron para ensayar su reactividad para FCV-21 así como para F9 en ensayo de ELISA sandwich. En resumen, una placa de ELISA de 96 pocillos se revistió con 200 ul de un anticuerpo policlonal anti-FCV de conejo (Pfizer #16), diluido en tampón carbonato de sodio 1:1.500 (1,59 g de Na₂CO₃ y 2,93 g de NaHCO₃ disueltos en 1 litro de agua). La placa se incubó a 4°C durante una noche. La placa se lavó 3 veces con PBS x1 (pH 7,4) que contenía un 0,05% de Tween-20 (PBST), después se bloqueó con 200 ul de caseína al 1% en PBST durante una hora a 37°C. Los sobrenadantes de FCV-21 y F-9 se añadieron a cada pocillo a una dilución de 1:10. Después de la incubación a 37°C durante 1 hora, las placas se lavaron y se añadieron diversos sobrenadantes de hibridoma y sus diversas diluciones a pocillos individuales (100 ul/pocillo) por triplicado. Las placas se incubaron después a 37°C durante 1 hora, se lavaron 3 veces con PBST, y se incubaron con 100 ul de IgG (H+L) anti-Ratón de Cabra AffiniPure conjugado con peroxidasa, diluida a 1:200 (Jackson ImmunoResearch, Cat. N° 715-035-150) durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, se añadieron 100 ul de sustrato de peroxidasa ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, Cat N° 50-66-18) a cada pocillo. Después de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, la placa se leyó a 405-490 nm (longitud de onda dual) con un lector de ELISA. La actividad específica se calculó en base a la proporción señal/ruido.

50

TABLA 1-3

Exploración de elisa de diversos sobrenadantes de células de hibridoma para su reactividad específica para FCV-21 frente a F9

55

Anticuerpos monoclonales/Virus	Anticuerpos monoclonales sin diluir		Dilución 1:10 de Anticuerpos monoclonales		Dilución 1:50 de Anticuerpos monoclonales	
	PHA-21	F9	PHA-21	F9	PHA-21	F9
sob 1	30	1	3	1	2	1
sob 2A	2	1				
sob 2B	3	1				

65

ES 2 357 679 T3

	sob 3	29	3	21	1	16	1
5	sob 4	1	1				
	sob 5	1	1				
	sob 6	1	1				
10	sob 7	26	3	22	1	17	1
	sob 8	9	8	3	1		
	sob 9A	1	1				
15	sob 9B	1	1				
	sob 10	15	13	10	6		
	sob 11	1	1				
20	sob 13	27	22	19	14		
	sob 14A	2	2				
25	sob 14B	5	3				
	sob 15	1	1				
	sob 16	21	2	5	1	2	1
30	sob 17	20	1	14	1	12	1
	sob 18	27	22	25	11		
	sob 20	1	1				
35	sob 21	17	9	7	2	2	1
	sob 22	2	1				
40	sob 23	12	1	10	1	10	1
	sob 24	14	14	1	1		
	sob 26	1	1				
45	sob 27	15	7	8	3		
	sob 28	1	2				
	sob 29	24	8	23	1	29	1
50	sob 30	17	7	13	1	18	1
	sob 31	19	19	16	11		
55	sob 32	28	16	21	12	18	10
	sob 33	20	17	15	13		
	sob 34	20	18	15	13		
60	sob 35	14	12	9	6		
	sob 36	17	5	15	1	21	1
	sob 37	12	4	3	1	1	1
65	sob 38	6	5				

ES 2 357 679 T3

	sob 39	23	15	17	6		
5	sob 40	16	3	10	1	13	1
	sob 41	19	7	14	1		
	sob 42	13	1	15	1	17	1
10	sob 43	1	1				
	sob 44	9	4	4	1		
	sob 45	1	1				
15	sob 46	8	4	3	2		
	sob 47	4	3				
	sob 48	11	11	5	4		
20	sob 49	12	13	8	7		
	sob 50	1	1				
25	sob 51	2	2				
	sob 52	4	10				
	sob 53	12	2	10	1	3	1
30	sob 54	1	1				
	sob 55	19	18	25	15		
	sob 56	8	4	6	1		
35	sob 57	1	1				
	sob 58	2	8				
40	sob 59	18	1	20	1	16	1
	sob 60	31	1	35	1	21	1
	sob 61	18	4	33	1	29	1
45	sob 62	1	1				
	sob 63	1	1				
	sob 64	1	1				
50	sob 65	3	5				
	sob 66	4	5				
55	sob 67	21	12	22	3		
	sob 69	1	1				

B. *Anticuerpos monoclonales específicos para FCV-21 y no para otras cepas de FCV.* Se eligieron dieciocho clones de células de hibridoma (3, 7, 17, 23, 27, 29, 30, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 53, 56, 59, 60 y 61) para ensayar adicionalmente su especificidad para FCV-21. Se usaron once virus FCV en el ensayo (FCV-21, 49, 26391-4, F9, CFI-68, 33585, 89391, 255, J-1, 2280 y H). De nuevo se usó ELISA sandwich, como se ha descrito anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 1-4.

ES 2 357 679 T3

TABLA 1-4

Reactividad de sobrenadantes monoclonales contra diversas cepas de FCV

Año de aislamiento	1993	1993	2003	1960	desconocido	2000	2000	1970	1984	1983	1990
Anticuerpo monoclonal\ Virus	<u>21</u>	<u>49</u>	<u>26391-4</u>	<u>F9</u>	<u>CFI-68</u>	<u>33585</u>	<u>89391</u>	<u>255</u>	<u>J-1</u>	<u>2280</u>	<u>H</u>
sob 3	21	18	1	1	2	1	1	1	1	1	25
sob 7	22	21	1	1	5	1	1	1	2	1	24
sob 17	14	12	1	1	8	1	1	1	1	1	8
sob 23	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 27	8	9	3	3	10	4	4	23	4	2	2
sob 29	23	18	9	1	13	1	1	1	2	1	8
sob 30	13	13	7	1	5	1	1	1	3	2	6
sob 36	15	8	7	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 37	3	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1
sob 40	10	10	2	1	2	1	1	2	2	1	1
sob 41	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 42	15	21	1	1	1	1	1	1	1	1	2
sob 44	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 53	10	20	2	1	21	1	1	1	17	1	14
sob 56	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 59	20	4	1	1	1	1	1	1	1	1	2
sob 60	35	7	1	1	1	1	1	1	1	1	2
sob 61	33	21	12	1	25	1	1	1	3	1	8

Como se ha demostrado anteriormente, las líneas celulares de hibridoma 23, 41, 44, y 56 son específicas para FCV-21, y para ningún otro FCV ensayado. Por lo tanto, estos anticuerpos monoclonales pueden usarse como herramienta de diagnóstico para FCV-21. Es más, el hibridoma 36 parece reaccionar solamente con cepas FCV de vacuna (FCV-21, 49, 26391-4) y con ninguna otra cepa de FCV.

Todas las líneas celulares de hibridoma 23, 36, 41, 44 y 56 se depositaron con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, Estados Unidos, y se les asignó los números de acceso de la ATCC:

- PTA-7349 (23)
- PTA-7350 (36)
- PTA-7353 (41)
- PTA-7351 (44)
- PTA-7352 (56)

ES 2 357 679 T3

Ejemplo 1-9

Análisis de neutralización cruzada de suero de sueros de FCV-21 y FCV-49 contra virus de FCV aislados en 1993

5 A. *Titulación de antisuero homólogo.* Se provocó antisuero de fase convaleciente contra doce FCV aislados en gatos específicos libres de patógeno (SPF), y se recogieron después de una inoculación primaria y secundaria. El inóculo del virus variaba de acuerdo con los títulos de solución madre, en un intervalo de 10^4 a 10^8 TCID₅₀/gato. Los gatos se inocularon inicialmente, se les reforzó tres semanas después, y después se les extrajo sangre para el suero 2 semanas después del refuerzo. Los doce aislados incluían F9, CFI-68, LSO-12, JOK63, JOK92 y aislados de campo
10 18, 21, 49, 50, 54, 27, y 11. Los aislados de campo se seleccionaron en base a análisis filogenéticos de las secuencias de la región hipervariable de la secuencia de proteína de la cápsida de cada cepa. Se eligieron para el estudio los aislados más divergentes.

15 Los sueros se inactivaron por calor a 56°C durante 30 minutos, y se titularon contra sus virus homólogos usando una técnica convencional de virus constante-suero variable (Griest 1979, Mahy 1996). En resumen, se añadió medio (100-150 ul) a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Se añadió suero (100-150 ul) a cada pocillo de la fila superior (dilución inicial de suero 1:2 o 1:4; F9 y LSO12 a 1:4), y se transfirieron 100 ul hacia abajo en la placa después de mezclar (diluciones 1:2) con un pipeteador multicanal. Los últimos 100 ul se descartaron. Se añadieron 50 ul de virus homólogo titulado (diluido a 200 TCID₅₀/50 ul) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2 h a 37°C
20 en una incubadora de CO₂. Después de la incubación, se añadieron 50 ul de una dilución 1:10 de células CRFK en suspensión a cada pocillo. Se preparó una placa de título de virus usando el virus diluido para asegurar que se añadía un inóculo apropiado a cada pocillo. Se usaron 50 ul de virus en la fila superior que contenía 150 ul de medio; el resto de la placa contenía 180 ul/pocillo, y se realizaron diluciones de 10 veces hacia abajo en la placa con 20 ul. Las placas se incubaron durante 4 días, y se usó la fórmula de Kärber para calcular tanto los títulos del suero como los virales (en
25 el caso de los títulos del suero, la proporción de pocillos protegidos frente a los no protegidos se usó en la ecuación).

30 Cuando se titulaban los sueros, se definió el TCID₅₀ como la dilución punto final de neutralización al 50% (Griest 1979). Una unidad de anticuerpo (AU) se definió como la dilución más alta de ese antisuero capaz de neutralizar 32-320 TCID₅₀ del virus homólogo en el 50% de los cultivos de ensayo. Por lo tanto, el TCID₅₀ obtenido es igual a 1 AU. Las neutralizaciones cruzadas de virus se realizaron contra concentraciones de suero de 2,5, 5, 10 y 20 AU.

35 B. *Ensayo de neutralización cruzada de virus.* Cada aislado de campo viral, así como las cepas F9, LSO12, JOK63, JOK92, SA113 y CFI-68, se ensayó contra cada uno de los doce antisueros de FCV en un ensayo de neutralización cruzada. Cada virus requirió 5 placas de 96 pocillos. Cada suero se diluyó a 2,5, 5, 10 y 20 AU y se colocó en las placas en réplicas de ocho hacia abajo en las placas (tres sueros/placa para un total de cuatro placas) y una placa de título de virus (preparada de la misma manera que para las titulaciones de suero). Las diluciones antisueros se prepararon en DMEM diluyendo primero el suero a 20 AU, y después realizando diluciones de 2 veces hacia abajo hasta 2,5 AU. Se añadió después una alícuota de cada dilución (100 ul) a cada columna de pocillos en la placa. Los virus se descongelaron rápidamente a 37°C, se colocaron en hielo, y se diluyeron a 200 TCID₅₀/pocillo (se mantuvieron en hielo). Para mantener la regularidad, se usó un procedimiento de dilución de tres etapas para la mayoría de las soluciones madre virales, nunca llegando más arriba de 1:100 en cada etapa. La solución madre de virus diluida (50 ul) se añadió a todos los pocillos de las placas de suero y se titularon como se ha descrito previamente. Las placas se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 2 horas, después de lo que se añadieron 50 ul de una dilución 1:10 de suspensión de células CRFK previamente cultivada hasta confluencia, a cada pocillo. Se cambiaron las puntas de pipeta y las cubetas de reserva después de cada serie de 5 placas. Las placas se valoraron después de 4 días. En algunos casos se usó virus pre-titulado, y pre-diluido.

TABLA 1-5

Resultados de la neutralización cruzada de suero

50

Suero	JOK63	JOK92	CFI68	LSO12	F9	11
55 Virus	2,5/5/10/20*	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20
LSO12	-- n n	----	n N N N	n N N N	N N N	----
F9	----	----	--- n	----	n N N	----
60 JOK92	----	- n N N	----	--- n	N N N	----
CFI68	----	----	N N N N	n N N N	N N N	----
JOK63	n n n N	----	----	----	n N n	----
65 SA113	----	----	-- n N	----	N N N	----

ES 2 357 679 T3

	3	----	----	----	----	-	----
	4	----	----	----	----	- n N	----
5	6	----	----	----	----	-	----
	7	--- n	----	----	--- n	N	----
10	8	----	----	----	--- n	-	----
	9	----	----	--- n	-- n -	N	----
	10	----	----	----	----	-- N	----
15	11	----	----	----	----	---	- n n n
	12	----	----	----	--- n	-- n	----
	13	----	----	--- n n	----	n N N	----
20	14	----	----	----	----	-	----
	15	----	----	----	----	-- N	----
	16	----	----	----	----	-	----
25	17	-- n n	----	n n n N	-- n n	n	----
	18	----	----	----	----	-	----
30	19	----	----	----	----	- N n	----
	20	----	----	----	----	-- n	----
	21	----	----	----	----	- n n	----
35	22	----	----	----	----	- n n	----
	23	-- n N	----	--- n	----	N N N	----
	24	----	----	----	----	n n N	----
40	25	----	----	----	----	---	----
	27	----	----	----	----	---	--- n
	28	----	----	----	----	N N N	----
45	29	----	----	----	----	n n N	----
	30	----	----	----	-- n N	N	----
50	34	----	----	----	----	-- n	----
	36	----	----	----	----	- n n	----
	38	----	----	----	----	-	----
55	39	----	----	----	----	---	----
	41	----	----	----	----	-- n	----
	42	----	----	----	----	n n n	----
60	47	----	----	----	----	-- N	----
	48	----	----	----	----	N N N	----
	49	----	----	----	----	n N N	----
65	50	-- n N	----	-- n N	-- n N	N	----

ES 2 357 679 T3

51	----	----	----	----	-	----
52	----	----	----	----	-	----
53	----	----	----	----	N	----
54	----	----	----	----	N	----
55	----	----	----	----	-	----
56	----	----	n - n n	- - n n	N	----

*2,5, 5, 10, 20 unidades de anticuerpo usadas en la neutralización de suero

n = 4-7/8 pocillos protegidos

blanco = suero insuficiente/no hecho

N = 8/8 pocillos protegidos

- = 0-3/8 pocillos protegidos

TABLA 1-5 (continuación)

Suero	18	21	27	49	50	54
Virus	2,5/5/10/20*	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20
LSO12	--- n	N N N	----	N N N	----	- - n N
F9	----	N N N	----	n N N	--- n	----
JOK92	----	- - n	----	n n N	----	----
CFI68	----	N N N	----	N N N	----	----
JOK63	----	---	----	N N N	- - n n	----
SA113	N N N N	- n N	----	N N N	----	- n n n
3	----	---	----	N N N	----	- N N N
4	----	- - n	----	- N N	N N N N	--- n
6	----	---	----	- n n	----	----
7	----	- n n	----	N N N	----	- - n N
8	----	- n -	----	- - N	----	----
9	----	- - n	----	n N N	----	----
10	----	---	----	---	----	----
11	----	---	--- N	---	----	----
12	----	---	----	n N N	----	----
13	----	- n -	----	N N N	----	n n n n
14	----	---	- - n n	n N N	----	- n n N
15	----	N N N	----	n N N	----	- n n n
16	----	---	----	- - n	----	----
17	- - n n	n n n	- - n n	N N N	----	- n n N

ES 2 357 679 T3

18	n N N N	-- n	----	- N N	----	----
19	----	n - n	----	- n n	----	----
20	----	---	----	-- N	N N N N	----
21	----	N N N	----	- n N	----	----
22	----	---	----	- n n	----	----
23	----	N N N	--- n	N N N	-- n N	- n n N
24	----	n n N	----	---	----	--- n
25	----	---	----	-- n	--- n	----
27	----	---	N N N N	-- n	----	----
28	----	- n n		N N N	----	----
29	----	---	----	---	----	----
30	----	n n N	----	N N N	----	----
34	----	---	----	-- N	----	----
36	----	---	----	- n N	----	----
38	----	---	----	---	----	----
39	----	---	----	---	----	----
41	----	---	----	- n N	----	----
42	----	---	----	n n N	----	----
47	----	n n n	----	- n N	----	----
48	----	n n N		N N N	--- n	----
49	----	- n n	----	N N N	--- n	----
50	----	N N N	----	N N N	N N N N	-- n N
51	----	N N N	----	-- n	----	----
52	----	---	----	N N N	----	----
53	----	n N N	----	n n N	----	--- n
54	----	-- n	----	- n N	----	n N N N
55	----	N N N	----	- N N	----	----
56	-- n N	n n N	----	N N N	----	--- n

*2,5, 5, 10, 20 unidades de anticuerpo usadas en la neutralización de suero

55 N = 8/8 pocillos protegidos

n = 4-7/8 pocillos protegidos

- = 0-3/8 pocillos protegidos

60 blanco = suero insuficiente/no hecho

65 Los datos de neutralización cruzada se resumen en la Tabla 1-5. Cada punto de los datos representa ocho réplicas de pocillos ensayadas. "N", "n", o "-" representan la proporción de pocillos protegidos frente a no protegidos, que es una indicación del alcance de la neutralización cruzada. Los resultados de neutralización de suero correspondientes a cada suero monoespecífico ensayado contra su virus homólogo se destacan en la TABLA. Estos sueros deberían neutralizar completamente; en su mayor parte así lo hacen. Las pocas excepciones, más notablemente JOK63, JOK92 y 11, muestran neutralización completa a valores de AU más altos, pero no a 2,5 AU. Esto probablemente sea debido

ES 2 357 679 T3

a errores de dilución. El resultado más significativo de esta serie de datos es el alto grado de neutralización cruzada exhibido por los sueros de FCV-21 y FCV-49, particularmente éste último. Los patrones de neutralización cruzada de estos sueros parecen ser similares a los de F9 (nótese que la serie de datos para F9, y para FCV-21 y FCV-49 a 20 AU es incompleta debida a cantidades insuficientes de sueros). Aunque hay algunas diferencias en los patrones de neutralización entre estos tres sueros (FCV-21, FCV-49, y F9), los aislados 11, 38 y 39 no se neutralizaron consistentemente por ninguno de los tres.

Ejemplo 1-10

10 *Análisis de neutralización cruzada de antisueros de FCV-21 y FCV-49 contra virus FCV aislados en 2003*

Los antisueros de FCV en este estudio se generaron inoculando de 10^5 a 10^6 de TCID₅₀/ml de FCV por vía intranasal a gatos (4-5 gatos/grupo). Se realizó una inoculación de refuerzo 3 semanas después usando la misma cantidad de virus. Los sueros se recogieron dos semanas después del refuerzo y se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos.

Se usaron muestras de suero de cada uno de los gatos vacunados en el ensayo de neutralización de suero contra cada una de las 26 cepas de FCV (Tabla 1-6). Las muestras de suero se diluyeron a 1:8 y seguidas de diluciones seriadas de 2 veces hasta 1:16384 (12 diluciones en total) en un volumen de 600 ul. Se mezclaron FCV con un intervalo de título entre 50-500 TCID₅₀/ml en 600 ul, con muestras de suero diluido conjuntamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después se transfirieron 200 ul de muestra a cada pocillo de placas de 96 pocillos sembradas con células CRFK por cuadruplicado. Las placas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 6 días y se determinó el título de punto final de neutralización. Tanto el título de neutralización del suero (SN) como el retro-título de exposición al virus se calcularon por el procedimiento de Spearman-Kärber (Spearman C, 1908, Brit J Psychol 2:227-242; Karber G, 1931, Arch exp Path Pharmacol 162: 480-487).

Los datos de neutralización de suero se analizaron con títulos de punto de corte de >23 y >15 y >10. Los resultados se muestran en la Tabla 1-7. Los datos sugieren que FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4 tienen perfiles de neutralización cruzada más amplios, y son por lo tanto mejores candidatos a vacuna que la cepa de vacuna de FCV actual, F9.

TABLA 1-6

26 cepas de FCV usadas en los estudios de neutralización cruzada

Cepa	Año	Situación
12217-02	2002	NY
19306	2003	FL
26391-4	2003	FL
27086-2	2003	FL
32561-1	2003	IN
32561-14	2003	IN
32561-15	2003	IN
32561-7	2003	IN
36069-2	2003	MT
84883-02	2002	NY
F9	1960	Desconocido
J-1	1984	CT
H	1990	AZ
2280	1983	Desconocido
255NVSL	1970	Desconocido

ES 2 357 679 T3

94580	2000	NY
100869-1	2000	Ontario
33585	2000	MA
88287	2000	PA
89391	2000	PA
101920-1	2002	NY
17932-17	2003	RI
30101-2	2003	MT
41927-8	2003	CO
FCV-21	1993	MI
FCV-49	1993	PA

TABLA 1-7

Análisis de neutralización cruzada de FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4 en comparación con F9

A.			<u>Candidato sobre F9</u>
		<u>% (título de SN >23)</u>	<u>% Aumento (IN)</u>
FCV-21 IN		43,9	68,9
FCV-49 IN		33,9	30,4
FCV 26391-4 IN		28,9	11,2
F9 IN		26	

B.			<u>Candidato sobre F9</u>
		<u>% (título de SN >15)</u>	<u>% Aumento (IN)</u>
FCV-21 IN		51,5	62,5
FCV-49 IN		37,7	18,9
FCV 26391-4 IN		39,4	24,3
F9 IN		31,7	

C.			<u>Candidato sobre F9</u>
		<u>% (título de SN >10)</u>	<u>% Aumento (IN)</u>
FCV-21 IN		74,6	36,1
FCV-49 IN		63,1	15,2
FCV 26391-4 IN		63,5	15,9
F9 IN		54,8	

ES 2 357 679 T3

Ejemplo 1-11

Mortalidad y valores clínicos para gatos vacunados con componentes de FELOCELL 4 con y sin FCV-21

5 Se vacunaron gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, con componentes de FELOCELL® 4 que contienen virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-F9], virus de la panleucopenia [FP] y *Chlamydia psittaci*, con o sin otra cepa de FCV, FCV-21. Los regímenes de vacunación evaluados incluían: una vacunación subcutánea inicial seguida de refuerzos subcutáneos en los días 21 (SC/SC); una
10 vacunación subcutánea inicial seguida de una inmunización de refuerzo oral en el día 21 (SC/Oral); o una vacunación inicial oral seguida de una segunda vacunación oral en el día 21. Las vacunaciones orales se consiguieron mediante administración de la vacuna dentro de la boca. En el día 42, todos los gatos se expusieron con aproximadamente 1 ml de FCV-33585 sistémico virulento (3 log de TCID₅₀/ml). Todos los gatos se controlaron para los síntomas clínicos (temperatura, conjuntivitis con descarga de suero, conjuntivitis con descarga mucopurulenta, rinitis con descarga
15 anorexia, deshidratación, una úlcera oral < 4 mm, múltiples úlceras orales, úlceras orales > 4 mm, salivación, úlcera externa no sangrante, úlceras externas sangrantes) de enfermedad durante 14 días después de la exposición. Los gatos que exhibían síntomas clínicos graves después de la exposición que eran coherentes con patogénesis por calicivirus se sacrificaron.

20 Como se muestra en la Tabla 1-8, la adición de la nueva cepa FCV-21 aumenta significativamente la eficacia de FELOCELL 4, con o sin la presencia de FCV-F9. Tanto la vacunación SC/SC como la vacunación SC/Oral parecen ser eficaces para evitar la infección por FCV. Es más, se ha demostrado eficacia contra la infección por FCV incluso con vacunación oral/oral con adición de FCV-21 y ausencia de F9 en FELOCELL 4 y FELOCELL 3. (FELOCELL 3 es FELOCELL 4 sin *Chlamydia psittaci*).

25 Para la Tabla 1-9, los regímenes de vacunación evaluados incluían una vacunación subcutánea inicial seguida de dos inmunizaciones de refuerzo orales, en el día 21 y en el día 42 (SC/Oral/Oral). Se ha demostrado que la adición de FCV-21, con o sin FCV-F9 en FELOCELL 4, disminuye significativamente tanto la mortalidad como los valores clínicos.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

Tratamiento	Vacunación				Exposición				Valor clínico		
	Nº animales	Días	Dosis	Vía	Días	cepa FCV	Nº animales	Mortalidad	Mediano	Mínimo	Máximo
Control negativo	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	9	78%	24	2	35
FELOCELL 4	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	9	44%	12	3	18
FELOCELL 4A*	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	10	0%	2,5	0	11
FELOCELL 4+FCV-21	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	10	0%	1,5	0	13
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FELOCELL 4	10	0 21	1 ml 1 ml	SC Oral	42	33585	10	10%	5,5	0	30
FELOCELL 4+FCV-21	10	0 21	1 ml 1 ml	SC Oral	42	33585	10	0%	3,5	0	13
FELOCELL 4A*	10	0 21	1 ml 1 ml	SC Oral	42	33585	10	10%	5	1	22
FELOCELL 4A*	10	0 21	1 ml 1 ml	Oral Oral	42	33585	10	0%	3	0	10

TABLA 1-9

Grupo	Tratamiento	Vacunación					Exposición					Valor clínico		
		Nº animales	Días	Dosis	Vía	Días	cepa FCV	Nº animales	Mortalidad	Mediano	Mínimo	Máximo		
T01	Control neg.	10	0	1 ml	SC	63	33585	10	100%	25	21	31		
			21	1 ml	Oral	63								
			42	1 ml	Oral	63								
T02	Felocell 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	63	33585	10	0%	5,5	0	17		
			21	1 ml	Oral	63								
			42	1 ml	Oral	63								
T03	Felocell 4A*+FCV-21	10	0	1 ml	SC	63	33585	9	0%	4	0	10		
			21	1 ml	Oral	63								
			42	1 ml	Oral	63								
T04	Felocell 4	10	0	1 ml	SC	63	33585	10	30%	10,5	1	30		
			21	1 ml	Oral	63								
			42	1 ml	Oral	63								

*Felocell 4A: Felocell 4 sin FCV-F9

**Felocell 3A: Felocell 3 sin FCV-F9

ES 2 357 679 T3

Ejemplo 1-12

Análisis de neutralización cruzada de sueros de gatos vacunados con componentes de FELOCELL 4 con y sin FCV-21

5

Se recogieron muestras de suero de cada gato en el estudio descrito en el Ejemplo 1-11 después de la segunda vacunación, pero antes de la exposición 85. Las muestras se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos, y se evaluaron en el ensayo de neutralización de suero contra cada una de las 26 cepas de FCV como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1-10 (Tabla 1-6).

10

Los datos de neutralización de suero se analizaron con títulos de puntos de corte de >23 y >15, y se calculó una media de los dos títulos de puntos de corte (Med.). Los resultados se muestran en la TABLA 1-10. Los datos indican que todas las formulaciones de vacuna que contenían FCV-21 tenían perfiles de neutralización cruzada más amplios que las vacunas que contenían la cepa FCV-F9 tradicional (~ 60% frente al 40%). Esto dio como resultado un aumento aproximado del 50% en el número de las cepas de FCV neutralizadas.

15

TABLA 1-10									
Tratamiento	Vacunación				Recogida de Suero		Neutralización cruzada		
	Nº de animales	Días	Dosis	Vía	Días	Nº de animales	% (>23)	% (>15)	% (Med.)
control negativo	10	0	1 ml	SC	42	9	10,8	13,9	12,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SC	42	9	38,5	42,3	40,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SC	42	10	58,9	64,6	61,8
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	56,5	62,3	59,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SC	42	10	39,2	42,7	41,0
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	56,2	60	58,1
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SC	42	10	49,6	59,2	54,4
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral	42	10	51,2	54,6	52,9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	53,9	62,7	58,3
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	55,8	63,9	59,9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral	42	10	60,8	68,1	64,5
		21	1 ml	Oral					

65

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21

ES 2 357 679 T3

Como también se muestra en la Tabla 1-10, la adición de la nueva cepa de FCV-21 aumentó significativamente el perfil de neutralización cruzada de FELOCELL 4, con o sin la presencia de FCV-F9. Se observaron perfiles de neutralización cruzada más amplios tanto con vacunación SC/SC como con vacunación SC/Oral. Además, se han demostrado perfiles de neutralización cruzada potenciados con vacunación Oral/Oral con la presencia de FCV-21, pero no F9, en FELOCELL 4 y FELLOCEL 3.

En la Tabla 1-11, las regímenes de vacunación evaluados incluyeron una vacunación subcutánea inicial seguida de dos inmunizaciones de refuerzo orales el día 21 y el día 42 (SC/Oral/Oral). Los resultados indican que la adición de FCV-21, con o sin FCV-F9 en FELOCELL 4, dio como resultado perfiles de neutralización cruzada significativamente más anchos (un aumento de aproximadamente el 40%).

Tabla 1-11										
Tratamiento	Vacunación					Recogida de suero		Neutralización cruzada		
	Nº de Animales	Días	Fecha	Dosis	Vía	Días	Nº de Animales	% (>23)	% (>15)	% (Med.)
Control negativo	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	5,8	10,4	8,1
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	72,5	77,1	74,8
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	9	72,5	76,7	74,6
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	49,6	57,9	53,8
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					

* FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

Parte 2

Esta sección a continuación proporciona información detallada sobre los procedimientos para inmunizar animales contra virus y en particular gatos contra calicivirus.

A no ser que se indique otra cosa, las descripciones a continuación usan las definiciones proporcionadas anteriormente y a continuación.

Se divulgan en este documento procedimientos y materiales para tratar e inmunizar animales con vacuna y en particular gatos contra calicivirus felino (FCV). Los procedimientos incluyen administrar al gato cantidades terapéuticamente eficaces de primeras y segundas vacunas que son capaces de inducir una respuesta inmune, y en particular en el gato contra FCV. La primera vacuna se administra típicamente por vía parenteral, pero en algunas situaciones puede administrarse por vía oral, mientras que la segunda vacuna se administra por vía oral u oronasal *N* días después de la administración de la primera vacuna. Estas vacunas se administran típicamente por vía parenteral primero porque típicamente causan lesiones orales si se administran inicialmente por vía oral. Curiosamente, en este documento se divulgan cepas FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4, que son tan seguras y eficaces que pueden administrarse en forma de una primera administración oral seguida de una segunda administración oral. En este documento, *N* es un número entero de 3 a 120, ambos inclusive, pero es típicamente un número entero de 7 a 42, ambos inclusive, o de 14 a 28, ambos inclusive, se prefieren aproximadamente 3 semanas y también aproximadamente 2-4 semanas. Como alternativa, la segunda vacuna puede administrarse después de que el gato ha desarrollado un título de neutralización de suero de FCV de aproximadamente 1:6, 1:9, 1:12, 1:15, 1:18 o mayor.

ES 2 357 679 T3

El procedimiento puede también incluir una o más administraciones parenterales, orales u oronasales adicionales de una vacuna de FCV *M* días después de la administración de la primera vacuna o de la segunda vacuna, donde *M* es un número entero de 1 a 120, ambos inclusive. Por tanto, los regímenes de vacunación representativos incluyen (1) administración subcutánea de una primera vacuna de FCV, seguida de administración oral de una segunda vacuna de FCV; (2) administraciones subcutáneas sucesivas de primera y tercera vacunas de FCV, seguidas por la administración oral de una segunda vacuna de FCV; y (3) administración subcutánea de una primera vacuna de FCV, seguida de administraciones orales sucesivas de una segunda y tercera vacunas de FCV.

Como se ha descrito anteriormente, la primera vacuna se administra por vía parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea), la segunda vacuna se administra por vía oral u oronasal, y una tercera vacuna opcional puede administrarse por vía parenteral, oral u oronasal. Cualquier dispositivo puede usarse para administrar las vacunas, incluyendo jeringuillas, dispensadores de gotas, dispositivos de inyección sin aguja, y similares. Para la administración oronasal, puede usarse una jeringa dotada con una cánula para colocar gotas de la vacuna en la nariz y boca del gato.

El procedimiento puede emplear cualquier vacuna que sea capaz de inducir una respuesta inmune en el gato contra FCV, siempre que la primera vacuna esté adaptada para administrarse por vía parenteral y la segunda vacuna esté adaptada para administrarse por vía oral u oronasal. Como se ha indicado anteriormente, la tercera vacuna opcional está adaptada para administrarse por vía parenteral, por vía peroral o por vía oronasal. Las vacunas primera, segunda, y tercera opcional, pueden ser las mismas o diferentes y cada una comprende, por separado, un antígeno o antígenos obtenidos de una o más cepas de FCV. Las vacunas útiles por tanto incluyen vacunas de virus vivo, vacunas de virus vivo modificado y vacunas de virus inactivado. Vacunas de virus de FCV vivo modificado y vivo contienen cepas de FCV que no causan la enfermedad en gatos y que se han aislado en forma no virulenta o se han atenuado usando procedimientos bien conocidos, incluyendo pasos seriados en una línea celular adecuada o exposición a luz ultravioleta o a un mutágeno químico. Vacunas de FCV muerto o inactivado contienen cepas de FCV que han sido inactivadas mediante procedimientos conocidos, incluyendo tratamientos con formalina, betapropiolactona, etilenimina binaria y similares. Vacunas ejemplares incluyen las que contienen cepas no virulentas seleccionadas de FCV-F9, FCV-M8, FCV-255, FCV-2280, FCV-21, FCV-49, FCV 26391-4, etc., solas o en combinación.

Otras vacunas útiles obtenidas de una o más cepas de FCV incluyen vacunas recombinantes y vacunas de ADN (es decir, vacunas de subunidad). Las vacunas recombinantes incluyen vectores de virus recombinante, cada una conteniendo un ácido nucleico que codifica un antígeno obtenido de una cepa de FCV. Dichos vectores pueden prepararse insertando un ADNc que codifica un antígeno obtenido de una cepa de FCV (por ejemplo, una proteína de la cápsida) en el genoma de un virus no virulento, incluyendo cepas de herpesvirus, poxvirus, adenovirus y similares. Para vectores de virus, el ADNc está unido de forma operativa a un promotor de transcripción eucariota en el extremo 5' de la secuencia que codifica el antígeno y está unido de forma operativa a una señal de terminación eucariota y una señal poli(A) en el extremo 3' de la secuencia que codifica al antígeno, de modo que el promotor de la transcripción y las secuencias de terminación regulan la expresión del antígeno. Los promotores de transcripción útiles incluyen el promotor de repeticiones terminales largas del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR), el promotor inmediato temprano principal de Citomegalovirus (CMV), el promotor del antígeno T de virus vacuolizante de simio 40 (SV40) y promotores inducibles, tales como el promotor de metalotioneína. Para una descripción de vacunas de FCV recombinantes, véase Patente de Estados Unidos N° 5.716.822 de Wardley y col.

Las vacunas de ADN incluyen moléculas de ADN (por ejemplo plásmidos) que tienen una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de FCV, tal como una proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico suyo, que provoca una respuesta inmune en el gato contra FCV. La secuencia que codifica el ácido nucleico se une de forma operativa a un promotor transcripcional que permite la expresión del ADN cuando está inoculado en las células del gato. Promotores útiles incluyen el promotor RSV-LTR, el promotor inmediato temprano principal de CMV, y el promotor de antígeno T de SV40. Adicionalmente, el ácido nucleico puede unirse de forma operativa, en o cerca del codón de terminación de la secuencia que codifica el antígeno de FCV, a un fragmento de ácido nucleico que comprende una señal de terminación de la transcripción y una señal de reconocimiento de poli(A). Para una descripción de vacunas de ADN véase Patente de Estados Unidos N° 5.580.859, Patente de Estados Unidos N° 5.589.466, y Patente de Estados Unidos N° 5.703.055 de Felgner y col.

Otras vacunas útiles incluyen las que contienen uno o más antígenos de subunidad, tales como una proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico de la proteína de la cápsida, que se ha aislado y purificado. El antígeno de subunidad puede producirse en un vector de expresión recombinante que produce el antígeno *in vitro* usando procedimientos descritos anteriormente. El antígeno resultante se aísla y purifica posteriormente. Los vectores de expresión útiles incluyen diversos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos, así como eucariotas, tales como células de mamíferos y de insectos. Otros vectores de expresión útiles incluyen virus, tales como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus Semliki Forest, baculovirus, bacteriófagos, virus Sindbis, virus Sendai, y similares. La expresión del antígeno de subunidad de FCV en un microorganismo permite la producción de la proteína antigénica usando tecnologías de fermentación a escala comercial. Diversos procedimientos pueden usarse para aislar y purificar los antígenos, incluyendo filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, centrifugado, y similares.

Una o más de las vacunas pueden también contener antígenos para inmunizar gatos contra uno o más patógenos además de FCV, incluyendo herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la panleucopenia felina, y Chlamydia felina.

Otros componentes de vacunas pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo vehículos, disolventes, diluyentes, agentes isotónicos, agentes tamponantes, estabilizantes, conservantes, agentes inmunomoduladores (por ejemplo, interleuquinas, interferones y otras citoquinas), agentes vasoconstrictores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, y similares. Vehículos, disolventes y diluyentes típicos incluyen agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y similares. Agentes isotónicos representativos incluyen cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, lactosa y similares. Estabilizantes útiles incluyen gelatina, albúmina y similares.

Las vacunas pueden también incluir uno o más adyuvantes que aumentan la respuesta inmune al antígeno. Adyuvantes representativos incluyen adyuvantes basados en aceite, tales como el Adyuvante Completo de Freund, y el Adyuvante Incompleto de Freund, adyuvantes basados en micolato (por ejemplo, dimicolato de trehalosa), lipopolisacáridos bacterianos, peptidoglicanos (es decir, mureinas, mucopéptidos, o glicoproteínas tales como N-Opaca, muramil dipéptido o análogos suyos), proteoglicanos (por ejemplo, extractos de *Klebsiella pneumoniae*), preparaciones de estreptococos (por ejemplo, OK432), BIOSTIM® (por ejemplo, 01K2), Iscoms (por ejemplo, véase solicitudes de Patente Europea N° Patente Europea 109942, Patente Europea 180564 y Patente Europea 231039), hidróxido de aluminio, saponina, dietilaminoetil dextrano, aceites neutros (por ejemplo, migliol), aceites vegetales (por ejemplo, aceite de cacahuetes), liposomas, polioles PLURONIC®. Otros adyuvantes incluyen el sistema de adyuvante RIBI, alumbre, gel de hidróxido de aluminio, colesterol, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, copolímeros de bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, adyuvante amina-lípido Avridina, enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (recombinante o de otra manera), toxina del cólera, o muramil dipéptido, entre otros.

Los tamaños de dosis de las vacunas de FCV típicamente varían desde aproximadamente 1 ml a aproximadamente 2 ml, ambos inclusive. Cada dosis contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno de FCV o antígenos que pueden variar dependiendo de la edad y estado general del gato, la vía de administración, la naturaleza del antígeno de FCV, y otros factores. Para las vacunas que contienen virus vivos modificados o virus atenuados, una dosis terapéuticamente eficaz generalmente varía de aproximadamente 10^6 TCID₅₀ a aproximadamente 10^8 TCID₅₀, ambas inclusive. Para vacunas que contienen antígenos de subunidad, tales como proteínas de la cápsida de FCV, una dosis terapéuticamente eficaz generalmente varía de aproximadamente 10 ug a aproximadamente 100 ug, ambos inclusive. Los otros componentes de las vacunas pueden ajustarse para modificar las propiedades físicas y químicas de las vacunas. Por ejemplo, los adyuvantes comprenden típicamente de aproximadamente 25 ug a aproximadamente 1000 ug, ambos inclusive, de una dosis de 1 ml. De forma similar, los antibióticos comprenden típicamente de aproximadamente 1 ug a aproximadamente 60 ug, ambos inclusive, de una dosis de 1 ml.

Las vacunas de FCV se proporcionan en diversas formas dependiendo de la vía de administración, requisitos de almacenamiento, y similares. Por ejemplo, las vacunas se pueden preparar en forma de soluciones acuosas, o dispersiones adecuadas para su uso en jeringas, dispensadores de gotas, etc. o pueden prepararse en forma de polvos liofilizados, que se reconstituyen en solución salina, tampón HEPES, y similares, antes de usar.

Parte 2 Ejemplos y Tablas

Los siguientes ejemplos pretenden ser ilustrativos y no limitantes, y representan varias realizaciones específicas de la presente invención.

Ejemplo 2-1

Régimen de vacunación subcutáneo/oral con FELOCELL® 4 y FEL-O-VAX®

Se vacunaron gatos domésticos de pelo corto, de 4-5 meses de edad, con FELOCELL® 4 (Pfizer Inc.; virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV], virus de la panleucopenia [FP] y *Chlamydia psittaci*), con FEL-O-VAX® (Fort Dodge; FHV, FCV, FP, y *C. psittaci* muertos), o con diluyente estéril (grupo de control). Los regímenes de vacunación evaluados incluían: una vacunación subcutánea inicial seguida de refuerzos subcutáneos en los días 21 y 42 (SC/SC/SC); una vacunación subcutánea inicial seguida por dos inmunizaciones de refuerzo orales en los días 21 y 42 (SC/Oral/Oral); o una vacunación subcutánea inicial seguida por una segunda vacunación subcutánea en el día 21, y un refuerzo oral en el día 42. Todas las dosis fueron de 1 ml. La vacunación oral se consiguió por administración de la vacuna dentro de la boca. En el día 99, todos los gatos se expusieron con aproximadamente 3,5 ml de FCV-33585 sistémico virulento ($4,8 \log$ de TCID₅₀/ml). La exposición se realizó administrando aproximadamente 3 ml de la dosis en comida enlatada para gatos, y 0,05 ml mediante instilación nasal. Todos los gatos se controlaron para los síntomas clínicos de enfermedad durante 14 días después de la exposición. Los gatos que exhibían síntomas clínicos graves después de la exposición que eran consecuentes con patogénesis por calicivirus se sacrificaron.

Como se muestra en la Tabla 2-1, el grupo vacunado mediante el régimen SC/Oral/Oral tenía una tasa de mortalidad de solamente el 10%, mientras que el grupo de control tenía una tasa de mortalidad del 90%. El grupo vacunado mediante el régimen SC/SC/SC tenía una tasa de mortalidad del 50%, mientras que el grupo vacunado mediante el régimen SC/SC/Oral tenía una tasa de mortalidad del 20%. Estos resultados sugieren que la vacunación SC seguida por un refuerzo oral potencia significativamente la eficacia de la vacunación con FELOCELL® 4 contra exposición a FCV virulento. No sólo disminuyeron las tasas de mortalidad del 50% (SC/SC/SC) al 10% (SC/Oral/Oral) o 20%

ES 2 357 679 T3

(SC/SC/Oral) cuando la vacunación oral formaba parte del régimen, sino que, como se muestra en la Tabla 2-2, la gravedad de los síntomas clínicos tales como lesiones cutáneas (SL), inapetencia (IA), depresión (DP), úlceras orales (OU), cojera (LN), estornudos (SZ), descarga nasal (ND) y ojos acuosos (WE), también disminuyó.

5

TABLA 2-1

Mortalidad de gatos expuestos con FCV-33585 virulento después de la vacunación (ejemplo 2-1)

10

TABLA 2-1

Grupo	Vacunación			Exposición	
	Tratamiento	Nº Animales	Vía	Nº Animales	Mortalidad %
T1	Control	10	SC/SC/SC	10	90
T2	FELOCELL® 4	5	SC/SC/SC	4	50
T3	FELOCELL® 4	10	SC/SC/Oral	10	20
T4	FELOCELL® 4	10	SC/Oral/Oral	10	10
T5	FEL-O-VAX®	5	SC/SC/SC	5	60

30

TABLA 2-2

Síntomas clínicos (% de animales) después de la vacunación y la posterior exposición a FCV-33585 (ejemplo 2-1)

35

TABLA 2-2

Grupo	Vía	SL	IA	EP	OU	LN	SZ	ND	WE
T1	SC/SC/SC	50	100	100	70	100	30	90	70
T2	SC/SC/SC	100	100	100	100	100	25	100	25
T3	SC/SC/Oral	70	70	50	60	70	20	30	10
T4	SC/Oral/Oral	10	40	20	40	50	10	30	0
T5	SC/SC/SC	40	80	60	60	60	40	60	20

50

Ejemplo 2-2

Títulos medios de neutralización de suero de FCV después de vacunación sc/oral

55

Las muestras de sangre tomadas de los gatos del Ejemplo 2-1 se recogieron en los días de estudio 0, 21, 42, 63, 98 y 113, y se evaluaron en un ensayo de neutralización de suero (SN) para su capacidad para neutralizar FCV. Las muestras de suero se diluyeron a 1:8, seguido de diluciones seriadas de 2 veces hasta 1:16384 (12 diluciones en total) en volúmenes de 600 ul. Los calicivirus felinos con un título de 50-500 TCID₅₀/ml en 600 ul se mezclaron con las muestras de suero diluidas y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min. Después, 200 ul de cada muestra diluida se transfirieron a pocillos diferentes de placas de 96 pocillos sembradas con células Renales Felinas Crandel (CrFK) por cuadruplicado. Las placas se incubaron a 37°C, en CO₂ al 5% durante 6 días, momento en que se determinaron los títulos de neutralización de punto final. Tanto el título de neutralización de suero (SN) como el retro-título de exposición al virus se calcularon usando el procedimiento de Spearman-Kärber Véase, C. Spearman, *Brit. J. Psychol.* 2:227-242 (1908) y G. Karber, *Arch. Exp.Path. Pharmacol.* 162:480-487 (1931). Como se muestra en la Tabla 2-3, FELOCELL® 4 administrado mediante los regímenes de vacunación SC/Oral/Oral o SC/SC/Oral tuvo títulos de SN de FCV significativamente más altos. Estos datos están en relación con la reducción significativa de las tasas de mortalidad descritas en el Ejemplo 2-1.

65

ES 2 357 679 T3

TABLA 2-3

Títulos medios de sn (neutralización de suero) de FCV en diversos días de estudio (ejemplo 2-2)

5

TABLA 2-3

Grupo	Vía de Vacunación	Títulos medios de SN de FCV*						Nº Animales día 113
		0	21	42	63	98	113	
T1	SC/SC/SC	3	2	4	3	4	7340	1
T2	SC/SC/SC	3	18	17	24	29	5986	2
T3	SC/SC/Oral	3	27	36	310	1032	5783	8
T4	SC/Oral/Oral	3	18	431	877	1980	5787	9
T5	SC/SC/SC	4	3	6	8	15	3563	2

20

* Medidos en el día 0, día 21, día 42, día 63, día 98 y día 133 después de la vacunación.

Ejemplo 2-3

25

Eficacia de la administración sc/oral de FELOCELL® 4 y FEL-O-VAX® contra virus de la panleucopenia felina

30

Las muestras de suero de los gatos del Ejemplo 2-1 se ensayaron también para sus títulos de FP medios. Como se muestra en la Tabla 2-4, todos los gatos eran seronegativos al comienzo del estudio. Posteriormente, los títulos medios del grupo de control permanecieron en 1 a lo largo de la duración de los intervalos de muestreo (días 21 y 42). Sin embargo, los títulos medios de los otros cuatro grupos de vacunación aumentaron de forma significativa.

TABLA 2-4

Títulos medios de anticuerpos de suero para el virus de la panleucopenia felina (ejemplo 2-3)

35

TABLA 2-4

Grupo	Vía de Vacunación	Título medio de suero de FP*		
		0	21	42
T1	SC/SC/SC	1	1	1
T2	SC/SC/SC	1	5782	5782
T3	SC/SC/Oral	1	5595	5793
T4	SC/Oral/Oral	1	5499	5693
T5	SC/SC/SC	1	2360	4887

55

* Medidos en el día 0, día 21, y día 42 después de la vacunación.

Ejemplo 2-4

60

Síntomas clínicos para gatos vacunados con FELOCELL® 4 mediante diversas vías de administración

65

La administración oronasal (ON) de FELOCELL® 4 se consiguió mediante instilación de gotas en los orificios nasales del animal. Como se indica en la Tabla 2-5, grupos de 10 gatos (T1, T2, T3), de 6-7 meses de edad, se vacunaron y se reforzaron en el día 21 de acuerdo con los regímenes mostrados en la Tabla 2-5: Vacunación y refuerzo subcutáneos (SC/SC); vacunación subcutánea y refuerzo oronasal (SC/ON); o vacunación y refuerzo oronasal (ON/ON). La vacuna se administró por vía subcutánea en la parte derecha del cuello (1 ml); la administración oronasal fue mediante el suministro de 0,5 ml de vacuna en cada orificio nasal. Comenzando el día 1, todos los gatos se observaron diariamente para el estado de salud general.

ES 2 357 679 T3

TABLA 2-5

Síntomas clínicos para gatos vacunados con FELOCELL® 4 mediante diferentes vías de administración (Ejemplo 2-4)

5

TABLA 2-5							
Grupo	Vía de vacunación	Síntomas clínicos, %					
		NU	OU	SZ	ND	WE	IA
T1	SC/SC	0	0	0	0	0	50
T2	SC/ON	0	0	20	0	0	20
T3	ON/ON	10	30	90	50	60	20

10

15

20

25

Como se muestra en la Tabla 2-5, los gatos que recibían ambas vacunaciones por vía oronasal tenían niveles altos de síntomas clínicos, incluyendo úlceras nasales (NU), úlceras orales (OU), estornudos persistentes (SZ), descarga nasal (ND), ojos acuosos (WE), e inapetencia transitoria (IA). Los gatos vacunados mediante el régimen SC/ON, sin embargo, mostraron menos síntomas clínicos que los gatos vacunados con ON/ON, sin indicios de úlceras nasales, úlceras orales, descarga nasal u ojos acuosos. Además, los sujetos en el grupo SC/ON, exhibieron menos estornudos que los gatos en el grupo ON/ON. El perfil de seguridad del grupo SC/ON era similar al del grupo SC/SC.

Ejemplo 2-5

El efecto de diferentes vías de vacunación sobre respuestas serológicas a antígenos de FELOCELL® 4

30

35

Muestras de suero de gatos inscritos en el estudio descrito en el Ejemplo 2-4 se ensayaron para reactividad serológica a diversos antígenos virales presentes en la vacuna FELOCELL® 4. Los títulos medios de anticuerpos de neutralización de suero para FCV, FHV y FP se determinaron para los días de estudio 0, 21 y 42. Como se muestra en la Tabla 2-6, los tres regímenes de vacunación dieron como resultado una fuerte respuesta inmune a FP. La respuesta inmune a FHV, era apenas detectable debido a dificultades con el ensayo. Sin embargo, los títulos de neutralización de suero contra FCV fueron significativamente más altos en los grupos ON/ON y SC/ON, en comparación con el grupo SC/SC. Estos resultados sugieren que los gatos en los grupos ON/ON y SC/ON estarían protegidos contra la exposición a un FCV virulento, pero que el grupo SC/SC puede no estarlo.

40

TABLA 2-6

Respuestas serológicas de gatos vacunados con FELOCELL® 4 mediante diferentes vías (ejemplo 2-5)

45

TABLA 2-6										
Grupo	Vía de vacunación	Título de FCV*			Título de FHV*		Título de FP*			
		0	21	42	0	21	42	0	21	42
T1	SC/SC	3	4	7	3	3	3	3	10884	10441
T2	SC/ON	3	14	151	3	3	5	3	11113	11585
T3	ON/ON	3	75	491	3	4	16	3	5333	10960

50

55

*Medido en el día 0, día 21 y día 42 después de la vacunación.

60

Ejemplo 2-6

65

Títulos de neutralización de suero contra FCV-F9 administrado mediante una vía SC u ON

Se vacunaron seis gatos por grupo con el antígeno de FCV-F9 presente en la vacuna FELOCELL® 4, por vía subcutánea u oronasal. Tres semanas después de la vacunación inicial, se reforzaron todos los gatos con el mismo

ES 2 357 679 T3

antígeno mediante la misma vía que previamente. Todas las dosis fueron de 1 ml. Las muestras de suero se recogieron tres semanas después de la inmunización de refuerzo. Como se muestra en la Tabla 2-7, los títulos de neutralización de suero se determinaron para estas muestras contra un panel de 26 cepas de FCV. Las cepas de FCV elegidas para el panel se seleccionaron en base a su diversidad genética (como se determina por la secuencia de la región hipervariable de su cápsida), así como por su distribución geográfica. Además, el fenotipo de virulencia de cada cepa se consideró también. Las muestras de suero de gatos vacunados por vía oronasal con F9 neutralizaron más cepas de FCV en el panel de 26 miembros, en comparación con las muestras de gatos vacunados por vía subcutánea. Usando 23 como el valor de corte para los títulos de neutralización, la vacunación por vía oronasal dio como resultado títulos en o por encima del valor de corte en el 26% de los miembros del panel, mientras que la vacunación por vía subcutánea dio como resultado solamente un 16% que satisfacía los criterios. Para un valor de corte de título de 15, la vacunación oronasal proporcionó un 32% de miembros del panel en o por encima del valor de corte; la subcutánea produjo solamente el 17%.

TABLA 2-7

Títulos de neutralización cruzada de suero para suero generado por vía subcutánea frente a vía oronasal para FCV-F9 frente a un panel viral de 26 FCV (ejemplo 2-6)

TABLA 2-7		
FCV-F9	% Pos. (>23*)	% Pos. (>15*)
Inoculación SC	16	17
Inoculación ON	26	32
ON sobre SC (%)	163	188
SC sobre ON (%)	62	53

*Título de neutralización ≥ 23 como valor de corte; o título de neutralización ≥ 15 como valor de corte.

Ejemplo 2-7

Mortalidad y valores clínicos para gatos vacunados con dos dosis de componentes FELOCELL® 4 o FELOCELL® 3 y un FCV-21 vivo modificado

A gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, se les administraron vacunas que contenían virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado (FHV), virus de la panleucopenia (FP), *Chlamydia psittaci*, y (1) FCV-F9 (FELOCELL® 4 o FELOCELL® 3), (2) FCV-F9 y FCV-21 (FELOCELL® 4 más FCV-21 o FELOCELL® 3 más FCV-21) o (3) FCV-21 (FELOCELL® 4A o FELOCELL® 3A). Los regímenes de vacunación incluían: una vacunación subcutánea inicial seguida de refuerzos subcutáneos en el día 21 (SC/SC); una vacunación subcutánea inicial seguida de una inmunización de refuerzo oral en el día 21 (SC/Oral); o una vacunación oral inicial seguida de una segunda vacunación oral en el día 21 (Oral/Oral). Cada gato en los diferentes regímenes de dosificación (grupos T1 a T10, 10 gatos por grupo) recibió 1 ml de vacuna. La vacunación oral se consiguió mediante la administración de la vacuna dentro de la boca. En el día 42, todos los gatos se expusieron con aproximadamente 1 ml de FCV-33585 sistémico virulento (3 log de TCID₅₀/ml). Durante 14 días después de la exposición, todos los gatos se controlaron para los síntomas clínicos de enfermedad, incluyendo temperatura elevada, conjuntivitis con descarga serosa, conjuntivitis con descarga mucopurulenta, rinitis con descarga serosa, rinitis con descarga mucopurulenta, estornudos, respiración sibilante, toses, respiración por la boca abierta, anorexia, deshidratación, una úlcera oral < 4 mm, múltiples úlceras orales, úlceras orales > 4 mm, salivación, úlcera externa no sangrante y úlceras externas sangrantes. Los gatos que mostraban síntomas clínicos graves después de la exposición que eran coherentes con la patogénesis por calicivirus se sacrificaron.

Como se muestra en la Tabla 2-8, cuando se compara con la vacunación SC/SC, un régimen de vacunación SC/Oral disminuyó la mortalidad del 44% al 10%, y mejoró el valor clínico mediano de 12 a 5,5 para gatos vacunados con FELOCELL® 4. Además, añadir la cepa FCV-21 a FELOCELL® 3 y a FELOCELL® 4 dio como resultado la ausencia de mortalidad después de la exposición. Reemplazar la cepa FCV-F9 de FELOCELL® 3 y FELOCELL® 4 con cepa FCV-21 dio como resultado una eficacia similar a las vacunas que contienen tanto FCV-F9 como FCV-21, incluso para un régimen de vacunación Oral/Oral.

ES 2 357 679 T3

TABLA 2-8

Mortalidad de gatos expuestos a FCV-33585 virulento después de vacunación de dos dosis con FELOCELL® 3 o 4 y con o sin FCV-F9 y/o FCV-F21 (ejemplo 2-7)

5

TABLA 2-8

Grupo	Vacunación		Exposición		Valor clínico		
	Tratamiento	Vía	Nº Animales	Mortalidad %	Mediano	Min.	Máx.
T1	Control	SC/SC	9	78	24	2	35
T2	FELOCELL 4	SC/SC	9	44	12	3	38
T3	FELOCELL 4	SC/Oral	10	10	5,5	0	30
T4	FELOCELL 4 + FCV-21	SC/SC	10	0	1,5	0	13
T5	FELOCELL 4 + FCV-21	SC/Oral	10	0	3,5	0	13
T6	FELOCELL 4A	SC/SC	10	0	2,5	0	11
T7	FELOCELL 4A	SC/Oral	10	10	5	1	22
T8	FELOCELL 4A	Oral/Oral	10	0	3	0	10
T9	FELOCELL 3 + FCV-21	SC/SC	10	0	2	0	8
T10	FELOCELL 3 + FCV-21	SC/Oral	10	0	4	0	10
T11	FELOCELL 3A	Oral/Oral	10	0	5	1	18

10

15

20

25

30

35

FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

40

FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21

Ejemplo 2-8

45

Mortalidad y valores clínicos para gatos vacunados con tres dosis de componentes de FELOCELL® 4 y FCV-21 vivo modificado

50

A gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, se les administraron vacunas que contenían virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado (FHV), virus de la panleucopenia (FP), *Chlamydia psittaci* y (1) FCV-F9 (FELOCELL® 4), (2) FCV-F9 y FCV-21 (FELOCELL® 4A) o (3) FCV-21 (FELOCELL® 4B). En cada caso, a los gatos se les administró una vacunación subcutánea inicial seguida de administraciones orales sucesivas en los días 21 y 42 (SC/Oral/Oral). Cada gato en los diferentes regímenes de dosificación (grupos T1 a T4, 10 gatos por grupo) recibió 1 ml de vacuna. La vacunación oral se consiguió mediante la administración de la vacuna dentro de la boca. En el día 63, todos los gatos se expusieron con aproximadamente 1 ml de FCV-33585 sistémico virulento (3 log de TCID₅₀/ml). Durante 14 días después de la exposición, todos los gatos se controlaron para síntomas clínicos de enfermedad como en el Ejemplo 2-7. Los gatos que mostraron síntomas clínicos graves después de la exposición que eran coherentes con patogénesis por calicivirus se sacrificaron. Como se muestra en la Tabla 2-9, la eficacia del régimen de dosis triple, según lo medido mediante mortalidad y valores clínicos después de la exposición, es comparable a la eficacia del régimen de dosis doble descrito en el Ejemplo 2-7.

60

65

ES 2 357 679 T3

TABLA 2-9

Mortalidad de gatos expuestos con FCV-33585 virulento después de vacunación de tres dosis con FCV-F9 y/o FCV-f21 (ejemplo 2-8)

TABLA 2-9

Grupo	Vacunación		Exposición		Valor clínico		
	Tratamiento	Vía	Nº Animales	Mortalidad	Mediano	Min.	Máx.
T1	Control	SC/Oral/Oral	10	100%	25	21	31
T2	Felocell 4 + FCV-21	SC/Oral/Oral	10	0%	5,5	0	17
T3	Felocell 4A	SC/Oral/Oral	9	0%	4	0	10
T4	Felocell 4	SC/Oral/Oral	10	30%	10,5	1	30

FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

Ejemplo 2-9

Análisis de neutralización cruzada de sueros de gatos vacunados con componentes de FELOCELL 4 con y sin FCV-21

Se recogieron muestras de suero de cada gato en el estudio descrito en el Ejemplo 2-7 después de la segunda vacunación, pero antes de la exposición. Las muestras se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos, y se evaluaron en el ensayo de neutralización de suero contra cada una de las 26 cepas de FCV como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1-10 (Tabla 1-6).

Los datos de neutralización de suero se analizaron con títulos de puntos de corte de >23 y >15, y se calculó una media de los dos títulos de puntos de corte (Med.). Los resultados se muestran en la Tabla 2-10. Los datos indican que el perfil de neutralización cruzada de FELOCELL 4 (que contiene FCV-F9) permanece constante independientemente de si la vía de administración es SC/SC o SC/Oral. Sin embargo, con la adición de FCV-21, el perfil de neutralización cruzada se potencia mucho cuando la vacuna se administra por SC/SC o SC/Oral. Además, para FELOCELL 4A (que contiene FCV-21, pero no FCV-F9), el perfil de neutralización cruzada se potencia para las vías de vacunación SC/SC, SC/Oral e incluso Oral/Oral.

TABLA 2-10

Tratamiento	Vacunación				Recogida de Suero		Neutralización cruzada		
	Nº de animales	Días	Dosis	Vía	Días	Nº de animales	% (>23)	% (>15)	% (Med.)
Control negativo	10	0	1 ml	SC	42	9	10,8	13,9	12,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SC	42	9	38,5	42,3	40,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SC	42	10	39,2	42,7	41,0
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	56,5	62,3	59,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	56,2	60	58,1
		21	1 ml	Oral					

ES 2 357 679 T3

		0	1 ml	SC						
5	FELOCELL 4A*	10	21	1 ml	SC	42	10	58,9	64,6	61,8
			0	1 ml	SC					
	FELOCELL 4A*	10	21	1 ml	Oral	42	10	49,6	59,2	54,4
10			0	1 ml	Oral					
	FELOCELL 4A*	10	21	1 ml	Oral	42	10	51,2	54,6	52,9
15			0	1 ml	SC					
	FELOCELL 3+FCV-21	10	21	1 ml	SC	42	10	53,9	62,7	58,3
			0	1 ml	SC					
	FELOCELL 3+FCV-21	10	21	1 ml	Oral	42	10	55,8	63,9	59,9
20			0	1 ml	Oral					
	FELOCELL 3A**	10	21	1 ml	Oral	42	10	60,8	68,1	64,5

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

25

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21

30 En la Tabla 2-11, los regímenes de vacunación evaluados incluyeron una vacunación inicial subcutánea seguida de dos inmunizaciones de refuerzo orales en el día 21 y en el día 42 (SC/Oral/Oral). Los resultados indican que la adición de FCV-21, con o sin FCV-F9 en FELOCELL 4, dieron como resultado perfiles de neutralización cruzada significativamente más amplios (un aumento de aproximadamente el 40%).

35

TABLA 2-11

40	Tratamiento	Vacunación					Recogida de suero		Neutralización cruzada		
		Nº de Animales	Días	Fecha	Dosis	Vía	Días	Nº de Animales	% (>23)	% (>15)	% (Med.)
45	Control negativo	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	5,8	10,4	8,1
21			8/3/2005	1 ml	Oral						
42			29/3/2005	1 ml	Oral						
50	FELOCELL 4+FCV-21	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	72,5	77,1	74,8
21			8/3/2005	1 ml	Oral						
42			29/3/2005	1 ml	Oral						
55	FELOCELL 4A*	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	9	72,5	76,7	74,6
21			8/3/2005	1 ml	Oral						
42			29/3/2005	1 ml	Oral						
60	FELOCELL 4	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	49,6	57,9	53,8
21			8/3/2005	1 ml	Oral						
42			29/3/2005	1 ml	Oral						

65

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

ES 2 357 679 T3

También se divulga el descubrimiento de que con las vacunas descritas en este documento como péptidos, proteínas y ADN relacionadas con cepas de FCV FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4, la administración oral u oronasal (ON) puede realizarse en el primer momento seguido de una segunda administración oral u oronasal sin los efectos secundarios previamente descritos mencionados anteriormente en el Ejemplo 2-4 y en la Tabla 2-5.

Se debe observar que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, los artículos singulares tales como “un”, “uno”, y “el”, pueden referirse a un objeto o a una pluralidad de objetos a menos que el contexto indique claramente otra cosa. De esta forma, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene “un compuesto” puede incluir un único compuesto o dos o más compuestos.

En las Tablas 2-1 hasta la 2-9, Felocell[®] 4, Felocell 4, o FELOCELL 4, o estas palabras seguidas por el número “3” son vacunas donde cualquier variación del nombre Felocell es propiedad de Pfizer. La referencia a Felocell 4 A es Felocell 4 sin FCV-F9, la referencia a Felocell 3 A es Felocell 3 sin FCV-F9. Nota, los verdaderos antígenos usados en este estudio no procedieron del producto comercial sino que los antígenos se prepararon en pequeños lotes sólo para fines de investigación, pero de la misma manera que el producto comercial.

Todas las composiciones y/o procedimientos descritos y reivindicados en este documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y procedimientos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, será evidente para los especialistas en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones. Más específicamente, será evidente que los agentes descritos en este documento pueden sustituirse por ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados mientras se consigan los mismos o similares resultados.

Parte 3

Esta parte proporciona procedimientos y composiciones para inmunizar animales contra parvovirus felino (FPV) y herpesvirus felino (FHV).

En este documento se divulgan procedimientos y materiales para tratar e inmunizar animales con vacuna, y en particular gatos contra enfermedades respiratorias felinas causadas por calicivirus felino (FCV), panleucopenia felina causada por Parvovirus Felino (FPV), rinotraqueítis viral felina causada por herpesvirus felino (FHV), que también se ha denominado virus de la rinotraqueítis felina. A continuación se divulgan nuevas combinaciones de vacunas, que cuando se presentan a un felino de la manera descrita permiten suministros eficaces orales únicos y orales/orales y subcutáneos/orales de vacunas tanto contra FPV como contra FHV.

Oral único significa un único suministro oral que confiere protección eficaz a un animal vacunado. Por oral/oral se entiende un suministro oral dado dos veces, similar a la descripción anterior en la Parte 2, es decir, oral seguido por algún periodo de tiempo y después se da otra dosis mediante la vía oral, y subc/oral es una primera dosis dada por vía subcutánea seguida por un periodo de tiempo y después se da otra dosis mediante la vía oral.

Lo que se divulga en este documento es el suministro de la combinación de FPV vivo modificado y/o FHV vivo modificado en combinación con una vacuna de Chlamydia viva modificada, o cualquier componente de la vacuna de Chlamydia viva modificada, por ejemplo, medio de cultivo, lisado de células o células enteras, o cualquier componente de la propia Chlamydia. Chlamydia también se denomina como Chlamydia Felina, o *Chlamydia psittaci* Felina o FCp.

Cuando se da FPV vivo modificado solo o en combinación con FCV vivo modificado, o vacunas de FHV vivo modificado, el FPV no es eficaz cuando se suministra de manera oral/oral, y muestra un título de neutralización de suero disminuido con la vía de administración SC/oral. De forma similar, cuando FHV vivo modificado se da solo o en combinación con FCV vivo modificado, o con vacuna de FPV vivo modificado, el FHV no es eficaz cuando se suministra de manera oral/oral, y muestra una eficacia disminuida con la vía de administración SC/oral. Sólo cuando FPV y/o FHV se dan en combinación con una vacuna de Clamidia viva modificada, se proporciona una protección adecuada contra FPV y/o FHV, cuando el suministro de las vacunas de combinación es a través de una vía subc/oral u oral/oral.

De acuerdo con lo anterior, se proporcionan los siguientes Ejemplos. Los siguientes ejemplos pretender ser ilustrativos y no limitantes, y representan algunas realizaciones específicas de la presente invención.

Ejemplo 3-1 (teórico)

Régimen de vacunación subc/oral con FPV y Clamidia

FPV y Clamidia (o cualquier componente de vacuna de Clamidia viva modificada) se proporciona en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía subcutánea/oral.

ES 2 357 679 T3

Ejemplo 3-2 (teórico)

Régimen de vacunación oral/oral con FPV y Clamidia

5 FPV y Clamidia (o cualquier componente de vacuna de Clamidia viva modificada) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral.

Ejemplo 3-3 (teórico)

10 *Régimen de vacunación subc/oral con FPV, FHV y Clamidia*

15 FPV, FHV y Clamidia (o cualquier componente de vacuna de Clamidia viva modificada) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía subcutánea/oral.

Ejemplo 3-4 (teórico)

Régimen de vacunación oral/oral con FPV, FHV y Clamidia

20 FPV, FHV y Clamidia (o cualquier componente de vacuna de Clamidia viva modificada) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral.

Ejemplo 3-5 (real)

25 *Régimen de vacunación subc/oral con FPV, FHV, FCV y Clamidia*

30 FPV, FHV, FCV y Clamidia (o cualquier componente de vacuna de Clamidia viva modificada) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral (Tabla 3-1).

Ejemplo 3-6 (real)

35 *Régimen de vacunación oral/oral con FPV, FHV, FCV y Clamidia*

40 FPV, FHV, FCV y Clamidia (o cualquier componente de vacuna de Clamidia viva modificada) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral. Véase la Tabla 3-1.

45 Se vacunaron gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, con componentes de FE-LOCELL 4A y 3A que contienen virus de rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-21], virus de panleucopenia [FPV] y *Chlamydia psittaci* [FCp]. Los regímenes de vacunación evaluados incluían: una vacunación inicial subcutánea seguida de refuerzos subcutáneos en los días 21, (SC/SC); una vacunación inicial subcutánea seguida de una inmunización de refuerzo oral en el día 21 (SC/Oral); o una vacunación inicial oral seguida de una segunda vacunación oral en el día 21. La vacunación oral se consiguió mediante la administración de la vacuna en la boca. Las muestras de suero de cada gato se recogieron después de la segunda vacunación, y se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos. Las muestras se evaluaron en el ensayo de neutralización de suero contra FPV.

50

TABLA 3-1		
Vacuna	Vía	Título de neutralización de suero de FPV
FELOCELL 4A	SC/SC	4096
FELOCELL 4A	SC/Oral	7276
FELOCELL 4A	Oral/Oral	5793
FELOCELL 3A	Oral/Oral	7
FELOCELL 4A: FPV/FHV/FCV-21/FCp		
FELOCELL 3A: FPV/FHV/FCV-21		

65

Los resultados de la Tabla 3-1 sugieren que los gatos respondieron mínimamente al antígeno FPV, como se había indicado previamente en la bibliografía. (Absence of an immune response after oral administration of attenuated feline

ES 2 357 679 T3

panleukopenia virus. Schults RD, Scott FW, Infect Immun. 1973, 7 de abril (4): 547-9). Con la presencia de Clamidia, sin embargo, o cualquier componente asociado con una vacuna de Clamidia, los títulos de neutralización de suero de FPV fueron mucho más altos, sugiriendo eficacia *in vivo* contra la exposición a FPV. Además, se ha observado inmunogenicidad contra FPV potenciada no solamente con SC/SC, SC/Oral, sino también con un grupo Oral/Oral.

5 Ejemplo 3-7 (real)

Régimen de vacunación oral/oral con FPV, FHV, FCV

10 FPV, FHV, y FCV se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral. Véase la Tabla 3-2.

15 Se vacunaron gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, con FELOCELL 3A que contiene virus de rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-21], y virus de panleucopenia [FPV]. Los regímenes de vacunación evaluados incluían: una vacunación inicial subcutánea seguida de refuerzos subcutáneos en los días 21, (SC/SC); una vacunación inicial subcutánea seguida de una inmunización de refuerzo oral en el día 21 (SC/Oral); o una vacunación inicial oral seguida de una segunda vacunación oral en el día 21. La vacunación oral se consiguió mediante la administración de la vacuna en la boca. Se recogieron muestras de suero de cada gato después de la primera y segunda vacunación, y se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos. Las muestras se analizaron en
20 el ensayo de neutralización de suero contra FPV.

25

TABLA 3-2				
Grupo	Tratamiento	Vía	Título de neutralización de suero de FPV-FPN	
			Después de la primera vacunación	Después de la segunda vacunación
T01	Sin vacunar	N/A	1	1
30 T02	FELOCELL 3A	SC/SC	16618	54319
T03	FELOCELL 3A	SC/Oral	20346	28771
35 T04	FELOCELL 3A	Oral/Oral	1	4

40 Los resultados de la Tabla 3-2 sugieren que el antígeno FPV presente en la vacuna FELOCELL 3A indujo una respuesta inmune mínima cuando se dio por vía Ora/Oral (coherente con los resultados de la Tabla 3-1). Sin embargo, cuando las vacunas se dieron por vía SC/SC o SC/Oral, se observaron títulos de neutralización de suero de FPV altos, un indicio de eficacia *in vivo*.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende la secuencia proteica SEC ID N°: 13 o secuencias proteicas que tienen al menos un 95% de identidad con ella.

10 2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proteína de la cápsida comprende secuencias proteicas con al menos un 99% de identidad con la SEC ID N°: 13.

15 3. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicha proteína de la cápsida se proporciona en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 4. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un adyuvante y/o un componente de FCV que está vivo, atenuado o inactivado y que puede incluir al menos una cepa de FCV distinta.

25 5. La vacuna de la reivindicación 4, en la que dicha al menos una cepa distinta de FCV se selecciona del grupo que consiste en FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255 y FCV-2280.

30 6. La vacuna de la reivindicación 5, en la que la vacuna además incluye una vacuna para inmunizar gatos contra uno o más patógenos felinos distintos.

35 7. La vacuna de la reivindicación 6, en la que dichos uno o más patógenos felinos distintos se seleccionan del grupo que consiste en herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, Clamidia felina y virus de la panleucopenia felina.

40

45

50

55

60

65

ES 2 357 679 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Pfizer Inc	
5	<120> Cepas de FCV no virulentas y sus usos	
	<130> PC32702	
	<160> 17	
	<170> Patente en versión 3.3	
10	<210> 1	
	<211> 29	
	<212> ADN	
15	<213> Calicivirus felino	
	<400> 400	
20	ggctaggatc catgtgctca acctgcgct	29
	<210> 2	
	<211> 32	
25	<212> ADN	
	<213> calicivirus felino	
	<400> 2	
30	gccattctag atttttttt ttcctggg gr	32
	<210> 3	
35	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> calicivirus felino	
40	<400> 3	
	gtggaggcgc ggtctgacca gate	24
45	<210> 4	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> calicivirus felino	
50	<400> 4	
	atcacagcac ccgagcaagg aac	23
55	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> ADN	
60	<213> calicivirus felino	
	<400> 5	
65	tgtttgatgc tcgtcagtg gaacc	25
	<210> 6	

ES 2 357 679 T3

	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> calicivirus felino	
5	<400> 6	
	gtaccacctt atgtctgaca ctga	24
10	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> ADN	
15	<213> calicivirus felino	
	<400> 7	
20	attcggccgt ttgtcttcca agc	24
	<210> 8	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> calicivirus felino	
	<400> 8	
30	ctttctgcct cctacatggg aat	23
	<210> 9	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> calicivirus felino	
40	<400> 9	
	gtgtatgagt aagggtcaac cc	22
45	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> calicivirus felino	
	<400> 10	
55	gcttggaaga caaacggccg aat	23
	<210> 11	
	<211> 29	
60	<212> ADN	
	<213> calicivirus felino	
	<400> 11	
65	Tgtacccttt gctcaagaat tttgttaa	29
	<210> 12	

ES 2 357 679 T3

<211> 2007

<212> ADN

<213> calicivirus felino

5

<400> 12

atgtgctcaa cctgcgctaa cgtgcttaaa tactatgatt gggatcctca cttagattg 60
 10 attatcaacc ccaacaagtt tctctctgtt ggcttctgtg ataatccact tatgtgttgc 120
 taccctgaac tacttctga atttggaaact gtgtgggact gtgaccagtc accacttcaa 180
 15 atctacttag agtctattct cggggatgat gagtgggctt gcactcatga agcagtagac 240
 ccagtgggtgc cgccaatgca ttgggatagt gctggcaaga tcttcagcc acatcctggc 300
 20 gtattgatgc accatctgat tggatgaagt gccaaaggcct gggatccaaa cttgccactc 360
 tttcgtctgg aagcagatga tggatccatt acaacgcctg aacaaggaac actagttggc 420
 25 ggggttattg ctgaaccag tgctcaaagt tcatcagctg ctgacatggc cacagggaaa 480
 acagttgatt ctgagtggga ggctttcttc tcctttcaca ctagtgtcaa ctggagtaca 540
 tctgaaactc aaggggaagat tcttttcaag cagactttgg gaccctact taacccttac 600
 30 ctaaccate tcgctaagct ttatgttget tggctctggct ctggtgaagt taggttttct 660
 atttctgggt cggcgtatt tggaggggaag ctggcggcaa ttggtgtacc ccaggggtt 720
 35 gaccccatte agagtacctc aatgctacag taccctcatg ttctgttoga cgtcgcgcaa 780
 gtggagcctg taatcttttc tatccctgat ttgagaagta cactgtatca ccttatgtct 840
 gacaccgata ctacatctct tgtaatcatg gtgtacaatg atctcattaa tcctatgcc 900
 40 aatgattcaa attcttctgg gtgtattgtt accgttgaaa ctaaaccagg acctgacttc 960
 aagtttcatt tactgaaacc ccttggatct atgttaactc acggatcagt cccttctgat 1020
 45 ctaatcccta agtcttctc cctttggatt ggtaatcggg attggtctga tataacggat 1080
 tttgtgatte ggcctttcgt atttcaggca aacaggcact ttgacttcaa tcaggagact 1140
 50 gcaggatgga gcacccaag gtttcgacct atcacagtca cactcagtggt gaaggatgcc 1200
 gcaaagttgg gcactgcaat cgctactgac tacattgtcc caggcatacc agatggctgg 1260
 55 cctgacacaa caattgctga gcagctcaca cctgctggtg attacgctat caccaatgat 1320
 tctggtaatg atattacaac tgctgccgga tatgactctg ctactgtgat caaaaatgac 1380
 acaaacttta ggggcatgta catttgtggt tctctccaaa gggcctgggg tgataagaaa 1440
 60 atttogaata ctgctttcat caccactgca acggttgatg gcaacaggct gaaacctatgc 1500
 aataccatcg accagagcaa aattgctata ttccaagaca cccatgccaa tgaaggagtc 1560
 65 caaacctctg atgatacact ggccttgctt ggctatactg gaattggtga agaagcaatt 1620

ES 2 357 679 T3

5 ggctccgadc gggacagggg ggtacgaatt agcgtgctcc cagaagctgg tgcccagaggt 1680
 ggtaatcacc cgatcttcta caaaaattca atcaaacttg gatatgtaat taggtccatt 1740
 gatgtgttca attoccaaatt tctacataca tcaagacagt tgtccctcaa ccattacctg 1800
 ttatcaccag actcttttgc tgtttacagg attacagatt ctaatgggtc ttggtttgac 1860
 10 ataggcattg atagtgaagg tttttctttt gttggtgttt caagcattgg gaaactggag 1920
 tttctctca ccgctccta catgggaatt caactggcga agattcgact cgcctcaaatt 1980
 15 attaggagtg tgaagaccag aatatga 2007

<210> 13

20 <211> 668

<212> PRT

<213> calicivirus felino

25 <400> 13

30 Met Cys Ser Thr Cys Ala Asn Val Leu Lys Tyr Tyr Asp Trp Asp Pro
 1 5 10 15

35 His Phe Arg Leu Ile Ile Asn Pro Asn Lys Phe Leu Ser Val Gly Phe
 20 25 30

40 Cys Asp Asn Pro Leu Met Cys Cys Tyr Pro Glu Leu Leu Pro Glu Phe
 35 40 45

45 Gly Thr Val Trp Asp Cys Asp Gln Ser Pro Leu Gln Ile Tyr Leu Glu
 50 55 60

50 Ser Ile Leu Gly Asp Asp Glu Trp Ala Cys Thr His Glu Ala Val Asp
 65 70 75 80

55 Pro Val Val Pro Pro Met His Trp Asp Ser Ala Gly Lys Ile Phe Gln
 85 90 95

60 Pro His Pro Gly Val Leu Met His His Leu Ile Gly Glu Val Ala Lys
 100 105 110

65 Ala Trp Asp Pro Asn Leu Pro Leu Phe Arg Leu Glu Ala Asp Asp Gly
 115 120 125

70 Ser Ile Thr Thr Pro Glu Gln Gly Thr Leu Val Gly Gly Val Ile Ala
 130 135 140

ES 2 357 679 T3

Glu Pro Ser Ala Gln Met Ser Ser Ala Ala Asp Met Ala Thr Gly Lys
 145 150 155 160

5

Thr Val Asp Ser Glu Trp Glu Ala Phe Phe Ser Phe His Thr Ser Val
 165 170 175

10

Asn Trp Ser Thr Ser Glu Thr Gln Gly Lys Ile Leu Phe Lys Gln Thr
 180 185 190

15

Leu Gly Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Leu Thr His Leu Ala Lys Leu Tyr
 195 200 205

20

Val Ala Trp Ser Gly Ser Val Glu Val Arg Phe Ser Ile Ser Gly Ser
 210 215 220

25

Gly Val Phe Gly Gly Lys Leu Ala Ala Ile Val Val Pro Pro Gly Val
 225 230 235 240

30

Asp Pro Ile Gln Ser Thr Ser Met Leu Gln Tyr Pro His Val Leu Phe
 245 250 255

35

Asp Ala Arg Gln Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Ile Pro Asp Leu Arg
 260 265 270

40

Ser Thr Leu Tyr His Leu Met Ser Asp Thr Asp Thr Thr Ser Leu Val
 275 280 285

45

Ile Met Val Tyr Asn Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Ala Asn Asp Ser Asn
 290 295 300

50

Ser Ser Gly Cys Ile Val Thr Val Glu Thr Lys Pro Gly Pro Asp Phe
 305 310 315 320

55

Lys Phe His Leu Leu Lys Pro Pro Gly Ser Met Leu Thr His Gly Ser
 325 330 335

60

Val Pro Ser Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ser Ser Leu Trp Ile Gly Asn
 340 345 350

65

Arg Tyr Trp Ser Asp Ile Thr Asp Phe Val Ile Arg Pro Phe Val Phe
 355 360 365

ES 2 357 679 T3

5 Gln Ala Asn Arg His Phe Asp Phe Asn Gln Glu Thr Ala Gly Trp Ser
 370 375 380
 Thr Pro Arg Phe Arg Pro Ile Thr Val Thr Leu Ser Val Lys Asp Ala
 385 390 395 400
 10 Ala Lys Leu Gly Thr Ala Ile Ala Thr Asp Tyr Ile Val Pro Gly Ile
 405 410 415
 15 Pro Asp Gly Trp Pro Asp Thr Thr Ile Ala Glu Gln Leu Thr Pro Ala
 420 425 430
 20 Gly Asp Tyr Ala Ile Thr Asn Asp Ser Gly Asn Asp Ile Thr Thr Ala
 435 440 445
 25 Ala Gly Tyr Asp Ser Ala Thr Val Ile Lys Asn Asp Thr Asn Phe Arg
 450 455 460
 30 Gly Met Tyr Ile Cys Gly Ser Leu Gln Arg Ala Trp Gly Asp Lys Lys
 465 470 475 480
 35 Ile Ser Asn Thr Ala Phe Ile Thr Thr Ala Thr Val Asp Gly Asn Arg
 485 490 495
 40 Leu Lys Pro Cys Asn Thr Ile Asp Gln Ser Lys Ile Ala Ile Phe Gln
 500 505 510
 45 Asp Thr His Ala Asn Glu Gly Val Gln Thr Ser Asp Asp Thr Leu Ala
 515 520 525
 50 Leu Leu Gly Tyr Thr Gly Ile Gly Glu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Arg
 530 535 540
 55 Asp Arg Val Val Arg Ile Ser Val Leu Pro Glu Ala Gly Ala Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Asn His Pro Ile Phe Tyr Lys Asn Ser Ile Lys Leu Gly Tyr Val
 565 570 575
 60 Ile Arg Ser Ile Asp Val Phe Asn Ser Gln Ile Leu His Thr Ser Arg
 580 585 590
 65 Gln Leu Ser Leu Asn His Tyr Leu Leu Ser Pro Asp Ser Phe Ala Val

ES 2 357 679 T3

	595		600		605	
5	Tyr Arg Ile Thr Asp	Ser Asn Gly Ser Trp Phe Asp Ile Gly Ile Asp				
	610		615		620	
10	Ser Glu Gly Phe Ser	Phe Val Gly Val Ser Ser Ile Gly Lys Leu Glu				
	625		630		635	640
15	Phe Pro Leu Thr Ala	Ser Tyr Met Gly Ile Gln Leu Ala Lys Ile Arg				
		645		650		655
20	Leu Ala Ser Asn Ile Arg Ser Val Lys Thr Arg Ile					
		660		665		

<210> 14

<211> 2007

25 <212> DNA

<213> calicivirus felino

30 <400> 14

	atgtgctcaa	cctgcgctaa	cggtgcttaa	tattatgatt	gggacccccca	cttcaagttg	60
	attatcaacc	ccaacaaatt	tctctctggt	ggcttttgtg	ataatccoct	tatgtgttgt	120
35	taccctgagt	tgcttcacaga	atttgggaact	gtgtgggatt	gtgaccagtc	accactgcaa	180
	atttacttgg	agtctatcct	tggagatgat	gaatggagct	ccacttatga	agcaatagac	240
40	ccagtagcgc	caccaatgca	ttgggatagt	gctggcaaga	tctttcagcc	acatcccggg	300
	gtgttgatgc	actacttgat	tggtagggtt	gctagggcct	gggatccaag	tttgccaacc	360
45	tttcgtctgg	aagcagatga	tggatctatc	acaacgcctg	agcaaggaac	actagtcggg	420
	ggggctcattg	ctgaaccocag	tgcccaaatg	tcaactgctg	ctgatatggc	cacagggaaa	480
50	accgttgact	ctgagtgggg	ggctttcttt	tccttccaca	ccagcgtcaa	ctggagcaca	540
	tctgaaactc	aaggggaagat	tcttttcaaa	caatcattgg	gacctctact	aatccctac	600
55	ttaaccatec	ttgcaaagct	ctacgttgct	tggctctggt	ctgttgaggt	taggttttct	660
	atttctggat	ctgggtgatt	cgggggcaag	cttgacgcaa	ttgttggtcc	accagggggt	720
60	gatcctgttc	agagcacttc	aatgctacag	tacccccatg	ttctgtttga	tgcccgcaa	780
	gtagagcctg	tcattttcac	tattcctgac	ttgagaagca	ccctgtatca	tcttatgtct	840
65	gatactgaca	ctacctctct	tgtaatcatg	gtgtataacg	atcttatcaa	cccttatgct	900
	aatgattcaa	attcatctgg	ctgtattgtc	actgttgaaa	caaaaccggg	ccctgatttc	960

ES 2 357 679 T3

5 aaatttcac tgetgaagcc cccaggatct atgctaacac atggttcagt gccatcagat 1020
 ctgatcccaa aatcttcttc gctttggatt ggtaatcggg attgggtctga tataactgac 1080
 ttcggtatcc gcccttcgt gtttcaagca aatagacact ttgatttcaa tcaggaaact 1140
 gccggttgga gcacccccacg gtttcggccc attacagtta cacttagtgt gaaggaatcc 1200
 10 gcaaaattgg gtactgcaat tgccaccgat tacatcgtcc caggcatacc agatggctgg 1260
 cctgacacga cagttgctga ggagctcaca cccgctgggtg attacgccat cactaatgag 1320
 15 actggcaacg acattacaac cgctgctagt tatgattctg ccagtgcaat caagaatata 1380
 accaacttta gaggcattga tatttgggtg tcccttcaa gagcctgggg tgacaagaag 1440
 20 atttcaaaca ctgcttttat caccactgga acggttagcg acaacaaatt aaaaccatcc 1500
 aacatcattg accaaagtaa gatagctgta tttcaggaca cgcattgcaa taaggaagtt 1560
 caaacatctg atgatacatt agccttactt ggctatactg gaattggcga agaagcaatt 1620
 25 ggggctgac gggacagagt agtgcgatc agtgtgctcc cagaagctgg tgcccgtggg 1680
 ggtaaccacc caattttcta caagaattcc attaaacttg gatagcgaat tagatctatt 1740
 30 gatgtattca attccagat tttgcacaca tcaagacaac tttcccttaa tcattatttg 1800
 ttatcaccag actcttttgc tgtttacaga atcacagact ccaatggatc atggtttgac 1860
 35 ataggtattg atagtgaagg tttttctttt gttgggtgtt caaatattgg aaaattagag 1920
 tttccctta ctgctccta catgggaatt cagctggcga aaattcggct cgcctcaaat 1980
 40 attaggagta gtatgaccaa aatatga 2007

<210> 15

<211> 668

<212> PRT

<213> calicivirus felino

<400> 15

50 Met Cys Ser Thr Cys Ala Asn Val Leu Lys Tyr Tyr Asp Trp Asp Pro
 1 5 10 15
 55 His Phe Lys Leu Ile Ile Asn Pro Asn Lys Phe Leu Ser Val Gly Phe
 20 25 30
 60 Cys Asp Asn Pro Leu Met Cys Cys Tyr Pro Glu Leu Leu Pro Glu Phe
 35 40 45
 65 Gly Thr Val Trp Asp Cys Asp Gln Ser Pro Leu Gln Ile Tyr Leu Glu

ES 2 357 679 T3

	50		55		60														
5	Ser	Ile	Leu	Gly	Asp	Asp	Glu	Trp	Ser	Ser	Thr	Tyr	Glu	Ala	Ile	Asp			
	65				70						75					80			
10	Pro	Val	Ala	Pro	Pro	Met	His	Trp	Asp	Ser	Ala	Gly	Lys	Ile	Phe	Gln			
					85					90					95				
15	Pro	His	Pro	Gly	Val	Leu	Met	His	Tyr	Leu	Ile	Gly	Glu	Val	Ala	Arg			
			100						105					110					
20	Ala	Trp	Asp	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Phe	Arg	Leu	Glu	Ala	Asp	Asp	Gly			
			115					120					125						
25	Ser	Ile	Thr	Thr	Pro	Glu	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Ile	Ala			
	130						135					140							
30	Glu	Pro	Ser	Ala	Gln	Met	Ser	Thr	Ala	Ala	Asp	Met	Ala	Thr	Gly	Lys			
	145					150					155					160			
35	Thr	Val	Asp	Ser	Glu	Trp	Glu	Ala	Phe	Phe	Ser	Phe	His	Thr	Ser	Val			
					165					170					175				
40	Asn	Trp	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Gln	Gly	Lys	Ile	Leu	Phe	Lys	Gln	Ser			
					180				185					190					
45	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Asn	Pro	Tyr	Leu	Thr	His	Leu	Ala	Lys	Leu	Tyr			
			195					200					205						
50	Val	Ala	Trp	Ser	Gly	Ser	Val	Glu	Val	Arg	Phe	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser			
	210						215					220							
55	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Lys	Leu	Ala	Ala	Ile	Val	Val	Pro	Pro	Gly	Val			
	225					230					235					240			
60	Asp	Pro	Val	Gln	Ser	Thr	Ser	Met	Leu	Gln	Tyr	Pro	His	Val	Leu	Phe			
				245						250					255				
65	Asp	Ala	Arg	Gln	Val	Glu	Pro	Val	Ile	Phe	Thr	Ile	Pro	Asp	Leu	Arg			
			260						265					270					
70	Ser	Thr	Leu	Tyr	His	Leu	Met	Ser	Asp	Thr	Asp	Thr	Thr	Ser	Leu	Val			
			275					280					285						

ES 2 357 679 T3

Ile Met Val Tyr Asn Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Ala Asn Asp Ser Asn
 290 295 300

5

Ser Ser Gly Cys Ile Val Thr Val Glu Thr Lys Pro Gly Pro Asp Phe
 305 310 315 320

10

Lys Phe His Leu Leu Lys Pro Pro Gly Ser Met Leu Thr His Gly Ser
 325 330 335

15

Val Pro Ser Asp Leu Ile Pro Lys Ser Ser Ser Leu Trp Ile Gly Asn
 340 345 350

20

Arg Tyr Trp Ser Asp Ile Thr Asp Phe Val Ile Arg Pro Phe Val Phe
 355 360 365

25

Gln Ala Asn Arg His Phe Asp Phe Asn Gln Glu Thr Ala Gly Trp Ser
 370 375 380

30

Thr Pro Arg Phe Arg Pro Ile Thr Val Thr Leu Ser Val Lys Glu Ser
 385 390 395 400

35

Ala Lys Leu Gly Thr Ala Ile Ala Thr Asp Tyr Ile Val Pro Gly Ile
 405 410 415

40

Pro Asp Gly Trp Pro Asp Thr Thr Val Ala Glu Glu Leu Thr Pro Ala
 420 425 430

45

Gly Asp Tyr Ala Ile Thr Asn Glu Thr Gly Asn Asp Ile Thr Thr Ala
 435 440 445

50

Ala Ser Tyr Asp Ser Ala Ser Ala Ile Lys Asn Thr Thr Asn Phe Arg
 450 455 460

55

Gly Met Tyr Ile Cys Gly Ser Leu Gln Arg Ala Trp Gly Asp Lys Lys
 465 470 475 480

60

Ile Ser Asn Thr Ala Phe Ile Thr Thr Gly Thr Val Ser Asp Asn Lys
 485 490 495

65

Leu Lys Pro Ser Asn Ile Ile Asp Gln Ser Lys Ile Ala Val Phe Gln
 500 505 510

ES 2 357 679 T3

Asp Thr His Ala Asn Lys Glu Val Gln Thr Ser Asp Asp Thr Leu Ala
 515 520 525

5 Leu Leu Gly Tyr Thr Gly Ile Gly Glu Glu Ala Ile Gly Ala Asp Arg
 530 535 540

10 Asp Arg Val Val Arg Ile Ser Val Leu Pro Glu Ala Gly Ala Arg Gly
 545 550 555 560

15 Gly Asn His Pro Ile Phe Tyr Lys Asn Ser Ile Lys Leu Gly Tyr Val
 565 570 575

20 Ile Arg Ser Ile Asp Val Phe Asn Ser Gln Ile Leu His Thr Ser Arg
 580 585 590

25 Gln Leu Ser Leu Asn His Tyr Leu Leu Ser Pro Asp Ser Phe Ala Val
 595 600 605

30 Tyr Arg Ile Thr Asp Ser Asn Gly Ser Trp Phe Asp Ile Gly Ile Asp
 610 615 620

35 Ser Glu Gly Phe Ser Phe Val Gly Val Ser Asn Ile Gly Lys Leu Glu
 625 630 635 640

40 Phe Pro Leu Thr Ala Ser Tyr Met Gly Ile Gln Leu Ala Lys Ile Arg
 645 650 655

45 Leu Ala Ser Asn Ile Arg Ser Ser Met Thr Lys Ile
 660 665

50 <210> 16
 <211> 2007
 <212> DNA
 <213> calicivirus felino

55 <400> 16
 60 atgtgctcaa cctgcgctaa cgtgcttaa tactatgatt gggatcccca ctttagattg 60
 gttatcaacc ccaacaaatt tctgtctgtt ggcttttgcg ataaccctct tatgtgttgt 120
 taccctgaat tacttctga atttggact gtgtgggact gtgatcagtc tccactgcaa 180
 65 atttacttag agtctatcct tggatgatgat gagtgggctt gcacctatga agcagttgat 240
 ccgtgcgtac caccgatgca ctgggatgag gctgggaaga tttttcagcc acaccctggt 300

ES 2 357 679 T3

5 gttcttatgc accatcttat tggtaagtt gccaaaggcgt gggatccaga tctaccactt 360
 ttccgcacatgg aagcagatga tggatccatt acagcgcccg agcaaggtaac agtagttggc 420
 ggtgtcattg ctgagcctag tgctcaaagt tccgcggctg ctgacatggc cactgggaag 480
 10 agcgtggact cggagtggga agctttcttt tccctccaca ccagtgtaaa ttggagtaca 540
 tcagaaacce aaggaaagat tctcttcaaa caaaccttag gtcccccttct caaccctat 600
 ctctcgcac c ttgcaaagct ttatgtcgc tgggtccgggt ctggtgatgt taggttttct 660
 atttctgggt ctggggtctt tgggggaaaa ctggctgcc a ttggtgtacc accaggaatt 720
 gatcctgtcc aaagcacgtc aatgttacag taccocccacg ttctttttga cgctcgccaa 780
 20 gtggaacctg ttatcttctc aattcctgat ttaagaagca cactctacca tcttatgtca 840
 gacacagaca ctacatcact tgtgattatg gtgtacaatg atctcatcaa cccatattgct 900
 25 aatgacacca actcatctgg gtgtattgtc actgtggaaa caaagcctgg tctgatttc 960
 aagttccatc ttttgaagcc cctgggttc atgctgacc acgggtctgt tcttcagat 1020
 ttgataccia aaacttcac actatggatt ggcaatcgggt attggtctga cataactgac 1080
 30 tttgttattc gaccctttgt gttccaagcc aacaggcact ttgatttcaa tcaagaaact 1140
 gctgggtgga gcaactcaag gtttcgacca attaccatca acataagtgt taaaaacgca 1200
 35 gcaaaacttg gcaactggaat tgctactgat ttcattgttc caggcatccc cgatggttgg 1260
 cctgacacaa ccatccctgg aagactgaca cctgctgggtg attatgcaat aactaatgag 1320
 40 aaaaataatg atatcacaac tgccagtggg tatgactcag cactttccat caccaacaat 1380
 accaacttca aggggatgta catctgtggt tcgctgcaaa gggcttgggg agataaaaag 1440
 45 atctccaaca ctgcattcat cacaactgga acggttaatg gcaacatgct ggagcccagc 1500
 aatgtcattg atccaacaaa gattgcagta tccaggaca cccatgctaa ccaagatgtc 1560
 caaacatctg atgacactct ggctttgctt ggatatacag ggattggcga ggaagctatt 1620
 50 ggagctgac gtgacagagt agtgcgcat agtggtgtac ctgaaaccgg ggctcgtggt 1680
 ggaaatcatc caatcttta caaaaactca attaagctag gatattgtgat caggctctatt 1740
 55 gatgtgttca actctcaaat ccttcacacc tctaggcaac tctctctcaa tcaactatcta 1800
 ctatcacctg actcttttgc tgtttatagg ataatagact ctaatggctt atggtttgat 1860
 60 attggcattg atagtgatgg cttctctttt gtcgggtgtct ctaatattgg taaattggaa 1920
 tttcctttaa cagcctcta catgggaatt caattggcaa agattcgtct tgctctaac 1980
 65 attaggagca ccatgattaa attatga 2007

ES 2 357 679 T3

<211> 668

<212> PRT

<213> calicivirus felino

5

<400> 17

Met Cys Ser Thr Cys Ala Asn Val Leu Lys Tyr Tyr Asp Trp Asp Pro
 1 5 10 15
 His Phe Arg Leu Val Ile Asn Pro Asn Lys Phe Leu Ser Val Gly Phe
 20 25 30
 Cys Asp Asn Pro Leu Met Cys Cys Tyr Pro Glu Leu Leu Pro Glu Phe
 35 40 45
 Gly Thr Val Trp Asp Cys Asp Gln Ser Pro Leu Gln Ile Tyr Leu Glu
 50 55 60
 Ser Ile Leu Gly Asp Asp Glu Trp Ala Cys Thr Tyr Glu Ala Val Asp
 65 70 75 80
 Pro Cys Val Pro Pro Met His Trp Asp Glu Ala Gly Lys Ile Phe Gln
 85 90 95
 Pro His Pro Gly Val Leu Met His His Leu Ile Gly Gln Val Ala Lys
 100 105 110
 Ala Trp Asp Pro Asp Leu Pro Leu Phe Arg Met Glu Ala Asp Asp Gly
 115 120 125
 Ser Ile Thr Ala Pro Glu Gln Gly Thr Val Val Gly Gly Val Ile Ala
 130 135 140
 Glu Pro Ser Ala Gln Met Ser Ala Ala Ala Asp Met Ala Thr Gly Lys
 145 150 155 160
 Ser Val Asp Ser Glu Trp Glu Ala Phe Phe Ser Phe His Thr Ser Val
 165 170 175
 Asn Trp Ser Thr Ser Glu Thr Gln Gly Lys Ile Leu Phe Lys Gln Thr
 180 185 190

65

ES 2 357 679 T3

5 Leu Gly Pro Leu Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Lys Leu Tyr
 195 200 205
 Val Ala Trp Ser Gly Ser Val Asp Val Arg Phe Ser Ile Ser Gly Ser
 210 215 220
 10 Gly Val Phe Gly Gly Lys Leu Ala Ala Ile Val Val Pro Pro Gly Ile
 225 230 235 240
 15 Asp Pro Val Gln Ser Thr Ser Met Leu Gln Tyr Pro His Val Leu Phe
 245 250 255
 20 Asp Ala Arg Gln Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Ile Pro Asp Leu Arg
 260 265 270
 25 Ser Thr Leu Tyr His Leu Met Ser Asp Thr Asp Thr Thr Ser Leu Val
 275 280 285
 30 Ile Met Val Tyr Asn Asp Leu Ile Asn Pro Tyr Ala Asn Asp Thr Asn
 290 295 300
 35 Ser Ser Gly Cys Ile Val Thr Val Glu Thr Lys Pro Gly Pro Asp Phe
 305 310 315 320
 40 Lys Phe His Leu Leu Lys Pro Pro Gly Ser Met Leu Thr His Gly Ser
 325 330 335
 45 Val Pro Ser Asp Leu Ile Pro Lys Thr Ser Ser Leu Trp Ile Gly Asn
 340 345 350
 50 Arg Tyr Trp Ser Asp Ile Thr Asp Phe Val Ile Arg Pro Phe Val Phe
 355 360 365
 55 Gln Ala Asn Arg His Phe Asp Phe Asn Gln Glu Thr Ala Gly Trp Ser
 370 375 380
 60 Thr Pro Arg Phe Arg Pro Ile Thr Ile Asn Ile Ser Val Lys Asn Ala
 385 390 395 400
 65 Ala Lys Leu Gly Thr Gly Ile Ala Thr Asp Phe Ile Val Pro Gly Ile
 405 410 415
 Pro Asp Gly Trp Pro Asp Thr Thr Ile Pro Gly Arg Leu Thr Pro Ala

ES 2 357 679 T3

	420	425	430	
5	Gly Asp Tyr Ala Ile Thr Asn Glu Lys Asn Asn Asp Ile Thr Thr Ala			
	435	440	445	
10	Ser Gly Tyr Asp Ser Ala Leu Ser Ile Thr Asn Asn Thr Asn Phe Lys			
	450	455	460	
15	Gly Met Tyr Ile Cys Gly Ser Leu Gln Arg Ala Trp Gly Asp Lys Lys			
	465	470	475	480
20	Ile Ser Asn Thr Ala Phe Ile Thr Thr Gly Thr Val Asn Gly Asn Met			
	485	490	495	
25	Leu Glu Pro Ser Asn Val Ile Asp Pro Thr Lys Ile Ala Val Phe Gln			
	500	505	510	
30	Asp Thr His Ala Asn Gln Asp Val Gln Thr Ser Asp Asp Thr Leu Ala			
	515	520	525	
35	Leu Leu Gly Tyr Thr Gly Ile Gly Glu Glu Ala Ile Gly Ala Asp Arg			
	530	535	540	
40	Asp Arg Val Val Arg Ile Ser Val Leu Pro Glu Thr Gly Ala Arg Gly			
	545	550	555	560
45	Gly Asn His Pro Ile Phe Tyr Lys Asn Ser Ile Lys Leu Gly Tyr Val			
	565	570	575	
50	Ile Arg Ser Ile Asp Val Phe Asn Ser Gln Ile Leu His Thr Ser Arg			
	580	585	590	
55	Gln Leu Ser Leu Asn His Tyr Leu Leu Ser Pro Asp Ser Phe Ala Val			
	595	600	605	
60	Tyr Arg Ile Ile Asp Ser Asn Gly Ser Trp Phe Asp Ile Gly Ile Asp			
	610	615	620	
65	Ser Asp Gly Phe Ser Phe Val Gly Val Ser Asn Ile Gly Lys Leu Glu			
	625	630	635	640
70	Phe Pro Leu Thr Ala Ser Tyr Met Gly Ile Gln Leu Ala Lys Ile Arg			
	645	650	655	
75	Leu Ala Ser Asn Ile Arg Ser Thr Met Ile Lys Leu			
	660	665		