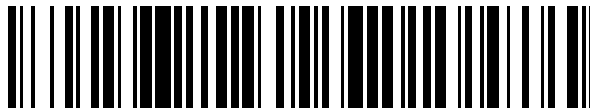


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 549**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/125** (2006.01)  
**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05705920 .6**
- 96 Fecha de presentación: **19.01.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1734992**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2006**

54 Título: **VACUNAS DE FCV INACTIVADAS MEJORADAS.**

30 Prioridad:  
**21.01.2004 US 537849 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.02.2012**

73 Titular/es:  
**MERIAL LIMITED**  
**3239 SATELLITE BLVD BLDG.500**  
**DULUTH GA 30096-4640, US**

72 Inventor/es:  
**POULET, Hervé y**  
**BARRAL, Denis**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

**ES 2 374 549 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

Vacunas de FCV inactivadas mejoradas

**SECTOR DE LA INVENCION**

5 **[0001]** La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas mejoradas inactivadas y estabilizadas contra el calicivirus felino (FCV). La invención también proporciona un procedimiento para la producción de FCV inactivados y estabilizados, y el uso de estos FCV inactivados y estabilizados en la producción de composiciones inmunogénicas FCV. La invención también proporciona las composiciones inmunogénicas según la invención para su uso en procedimientos para inducir respuestas inmunes en los animales de la familia de los félidos, preferentemente gatos.

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 **[0002]** El calicivirus felino (FCV) se describió por primera vez en 1957 (Fastier, L.B. (1957) Am. J. Vet. Res. 18: 382-389). El FCV afecta a un gran número de los animales de la familia de los félidos, siendo llevado el FCV por hasta 15 a 20% de los gatos domésticos clínicamente saludables (Coutts et al (1994) Vet. Rec. 135: 555-556; Ellis, T.M. (1981) Australian Vet. J. 57: 115-118; Harbour et al. (1991) Vet. Rec. 128: 77-80; Reubel et al, (1992) feline Dentistry 22: 1347-1360). El calicivirus se da a menudo con otra infección respiratoria superior, tal como el virus del herpes felino (FHV), el virus de la rinotraqueítis, o la clamidiosis en gatos domésticos y félidos salvajes. El FCV se transmite horizontalmente y no hay evidencia de transmisión vertical desde la madre a su gatito durante la gestación (Johnson, R.P. (1984) Res. Vet. Sci. 31: 114-119). La transmisión de FCV ocurre principalmente a través del contacto entre animales infectados y animales saludables o por aerosoles durante el estornudo (Wardley R C. (1976) arco. Virol 52: 243-249). El FCV es bastante resistente a varios agentes desinfectantes y por lo tanto también se puede extender en ausencia de contacto directo.

25 **[0003]** El FCV es en general conocido por causar enfermedades tales como conjuntivitis, rinitis, traqueítis, neumonía y por vesicularización/ ulceración del epitelio de la cavidad oral. Otros síntomas incluyen fiebre, anorexia, letargia, marcha rígida, y algunas veces secreción nasal y ocular. El FCV suele afectar a la garganta, y a veces a los pulmones; también puede infectar los intestinos y se ha aislado a partir de heces. Después de una fase inicial de hipertermia, estas enfermedades respiratorias suelen venir seguidas por ulceraciones bucales (paladar, lengua, labios, y nariz), rinitis, conjuntivitis, y posiblemente anorexia y astenia. El FCV también puede causar neumonía, enteritis, y dolor articular (síndrome de la cojera). La morbosidad puede ser elevada y a la recuperación le sigue un estado portador prolongado. El tipo de síntomas de la enfermedad causados por el FCV depende de la cepa de FCV; algunas cepas producirán poca enfermedad o ninguna, mientras que otras cepas más virulentas causan pirexia, anorexia, depresión o neumonía. Una cepa particular puede provocar úlceras en las patas así como en la boca.

35 **[0004]** El calicivirus felino de la Familia Caliciviridae es un virus sin envoltura, que comprende un genoma RNA de sentido positivo de hebra única que es poliadenilado y tiene un tamaño aproximado de 7.7 kilobases (Radford et al. (1997) Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV 93-99). El cápside de FCV comprende una proteína de cápside mayor única de 66 kDa (kilodalton), la proteína p66. La biología molecular de los calicivirus fue estudiada por Clarke y Lambden (1997) J. Gen. Virol. 8: 291-301. Como muchos virus RNA, hay una gran heterogeneidad en la población vírica de FCV. Las variaciones antigénicas, demostradas a partir de comienzos de los 1970 mediante experimentos de neutralización mediante suero cruzado, permiten clasificar los FCVs en varias cepas víricas o casi-especies (Radford et al. (1997) Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV 93-99). Se han identificado y aislado varias cepas de FCV, en particular la cepa F9 (depositada en la American Type Culture Collection o ATCC con el número de acceso VR-782), la cepa 2280 (ATCC VR-2057), la cepa KCD (ATCC VR-651), la cepa CFI (ATCC VR-654), la cepa FCV-LLK y la cepa FCV-M8.

45 **[0005]** Debido al prolongado estado portador después de la recuperación por una infección de FCV, así como a la resistencia del FCV a los agentes desinfectantes, el FCV es muy contagioso y se extiende fácilmente, en particular entre grupos de animales en proximidad cercana, por ejemplo, en refugios de animales o clínicas veterinarias. Por lo tanto, ha habido y sigue habiendo en la técnica una gran necesidad de vacunas eficaces contra el FCV.

50 **[0006]** La vacunación contra el FCV fue introducida al final de los 1970s, empleando cepas FCV atenuadas, principalmente la cepa F9 aislada en los USA en 1958 por Bittle (Bittle et al. (1960) Am. J. Vet. Res. 21: 547-550) o cepas derivadas de la F9 por paso in vitro o in vivo ("similares a la F9").

**[0007]** También hay disponibles vacunas que se basan en cepas FCV inactivadas. Estas vacunas emplean principalmente cepas 255 y 2280, que se aislaron en USA en 1970 en un gato con neumonía (Kahn y Gillepsie, (1970) Cornell Vet. 60: 669-683; Povey et al. (1980) J. Am. Vet. Med. Assoc. 177: 347-350) y en 1983 en un gato

aquejado de cojera, respectivamente (Pedersen et al. (1983) Fel. Prac. 13: 26-35; Pedersen N.C. y Hawkins K.F. (1995) Vet Microbiol. 47: 141-156).

- 5 **[0008]** Debido a la deriva antigénica a lo largo del tiempo, los antisueros producidos contra cepas de vacuna aisladas en los 1960 y 1970, tales como las cepas F9, 255 o 2280, neutralizan solamente algunas cepas aisladas de las cepas aisladas en los 1990. Por ejemplo, el anti- suero F9 neutraliza el 43% de las cepas aisladas en el período 1990-1996, en contraste con su capacidad para neutralizar el 56% de las cepas aisladas en el período 1980-89 y 86% de las cepas aisladas en el período 1958-79, y sólo 10% de las cepas inglesas aisladas en el período 1990-96 (Lauritzen et al. (1997) Vet. Microbiol. 56: 55-63). Por consiguiente, vacunas atenuadas e inactivadas de viejas cepas de FCV hasta ahora ya no ofrecen suficiente protección contra cepas de FCV recientemente aisladas.
- 10 **[0009]** La patente americana No. 6,534,066 describe el uso de nuevas cepas de FCV para la producción de vacunas FCV. Entre estas cepas, la cepa FCV 431 (depositada en la CNMC con el número de acceso I-2166) es un antisuero aislado que se mostró capaz de neutralizar un gran número de cepas aisladas de campo heterólogas. Esto contrasta con las cepas de vacuna históricas, tales como la F9 y la FCV-225, cuyos antisueros neutralizan muy pocas cepas de FCV de campo recientes.
- 15 **[0010]** La mayoría de las vacunas comerciales contra la FCV son vacunas atenuadas. Sólo se dispone de unas pocas vacunas inactivadas y todas contienen un adyuvante. Povey y sus colaboradores (Povey et al. (1978) Práctica Felina 8 (3):. 35-42) describen una preparación de formalina inactivada y con adyuvante FCV utilizada en los gatitos.
- 20 **[0011]** Cuando se inactiva una vacuna, la inactivación se realiza normalmente mediante un tratamiento químico con agentes como el formol o formaldehído,  $\beta$ -propiolactona, etilenimina, etilenimina binaria en presencia o ausencia de tratamiento térmico. En la Patente de EE.UU. No. 6.534.066, por ejemplo, se inactiva FCV mediante etilenimina y adyuvada con una emulsión de aceite en agua. La patente de EE.UU. No. 6.355.246 describe vacunas FCV atenuadas aisladas en la orina felina. La inactivación de FCV se puede lograr mediante un tratamiento con formaldehído o etilenimina binaria (BEI). Cabe destacar que la patente de EE.UU. N ° 6.355.246 no se refiere a ni proporciona a los expertos en la materia con procedimientos de inactivación de FCV.
- 25 **[0012]** Las vacunas inactivadas utilizados hasta ahora contra la FCV requieren o prefieren adyuvantes en la vacuna o una composición inmunogénica para mejorar la respuesta inmune e inducir a una mejor protección contra las cepas heterólogas FCV emergentes en la población de gatos. Sin embargo, las vacunas con adyuvante inducen una mayor tasa de reacciones adversas locales que las vacunas sin adyuvante (Gobar et al, (2002) JAVMA 220 (10):. 1,477-1.482) y por lo tanto aumentan el riesgo de fibrosarcomas asociados a la vacunación en el lugar de inyección
- 30 **[0013]** En la actualidad, las vacunas FCV sin adyuvante son vacunas vivas modificadas, que contienen habitualmente a la cepa F9. La virulencia residual de la FCV F9 ha sido demostrada por varios estudios sobre la calicivirosis post-vacunal (Dawson et al, (1993) Vet Rec 132:... 346-350). Aunque sólo existe un serotipo FCV, se ha observado una alta variación antigénica entre cepas de FCV y se identifican regularmente nuevos aislamientos de campo (Lauritzen, et al (1997) Vet Microbiol 56:... 55-63). Esta alta variación antigénica conduce a menudo a tasas de fracaso cada vez mayores de neutralización FCV por antisuero basado en una vacuna contra el F9. Además, algunas cepas vivas modificadas de FCV están implicadas en la aparición de nuevas variantes antigénicas en el campo (Radford et al, (1997) Vacuna contra 15 (12/13):. 1.451-1458). Por lo tanto, la seguridad de estas vacunas vivas modificadas es cuestionable.
- 40 **[0014]** En consecuencia, sigue habiendo una necesidad de eficacia en las vacunas FCV inactivadas sin adyuvante o en las composiciones inmunogénicas para una mayor seguridad y para que sean capaces de inducir una fuerte respuesta inmune contra cepas heterólogas FCV.

### **RESUMEN DE LA INVENCION**

- 45 **[0015]** Las anteriores vacunas inactivadas o composiciones inmunogénicas contra el FCV contienen generalmente una mezcla de viriones FCV y fracciones de proteínas resultantes de la degradación de la cápside viral. Los presentes inventores han descubierto que, para una vacuna o para una composición inmunogénica sin adyuvante, es esencial limitar la degradación de la cápside vírica y mantener intactos los viriones tanto como sea posible.
- 50 **[0016]** Se ha descubierto que, sorprendentemente, someter un FCV a un tratamiento con un agente inactivado que inactiva el virus y a un tratamiento con formaldehído capaz de estabilizar el virión, es posible obtener una composición FCV inactivada dotada de una gran eficacia, incluso en ausencia de cualquier adyuvante. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría en particular, se cree que la presencia de formaldehído estabiliza la cápside viral. La estabilidad aumentada tiene como resultado una estabilidad mejorada de la vacuna o de la composición inmunogénica contra el FCV durante el almacenamiento a largo plazo y antes de la administración a los animales.

Se pueden utilizar otros compuestos químicos que actúan de manera similar para estabilizar la cápside vírica en lugar de formol.

5 **[0017]** Un primer aspecto de la presente invención proporciona una composición inmunogénica inactivada estabilizada, no-adyuvada contra el calicivirus felino (FCV), que comprende un FCV inactivado por uno o más agentes de inactivación y estabilizada por un compuesto aldehído, en la cual el compuesto aldehído comprende una cadena alquilo lineal en C1- C5, y en la que la composición inmunogénica es una mezcla con un vehículo o excipiente aceptable, y en la que los agentes de inactivación se seleccionan del grupo que consiste en etileneimina, acetiletileneimina, propileneimina, y  $\beta$ -propiolactona.

10 **[0018]** Preferentemente, el excipiente o vehículo es aceptable desde el punto de vista veterinario. Según otra forma de realización, la composición inmunogénica está liofilizada y es una mezcla con un excipiente o vehículo de liofilización.

**[0019]** Preferentemente, el agente de inactivación es etileneimina.

15 **[0020]** Cuando se utiliza como agente de inactivación, la etileneimina está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 20 mM, preferentemente desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM.

20 **[0021]** Cuando el compuesto aldehído comprende una cadena alquilo lineal en C1, el compuesto aldehído comprende un grupo aldehído. Cuando el compuesto aldehído comprende una cadena alquilo lineal en C2-C5, el compuesto aldehído comprende dos grupos aldehído. Según una realización alternativa, uno de los dos grupos aldehído puede ser reemplazado por una cetona o un grupo epoxi. El compuesto aldehído se puede seleccionar del grupo que consiste en formaldehído, glicidaldehído, glutaraldehído, glioxal, o metilglioxal. Cuando el compuesto aldehído es formaldehído, el formaldehído está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.05 g/l a aproximadamente 0.8 g/l. preferentemente, el formaldehído está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.1 g/l a aproximadamente 0.5 g/l.

25 **[0022]** Otra forma de realización comprende además un compuesto neutralizante que contiene grupos tiol (por ejemplo, tiosulfato y cisteína). La presente descripción comprende también al menos una cepa de FCV, donde por lo menos una o todas las cepas de FCV están inactivadas y estabilizadas. La cepa de FCV se puede seleccionar del grupo que consiste en FCV F9, FCV 255, FCV 2280, FCV 431, G1 FCV, LLK FCV, KCD FCV, CFI FCV, FCV M8, y FCV EE.UU. 100 869 (ATCC PTA 5930 No. FCV).

30 **[0023]** Según otra realización, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden al menos un inmunógeno no-FCV de un patógeno felino, que puede seleccionarse del grupo que consiste en el herpes felino (FHV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la panleucopenia felina (FPV), el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la rabia, y la clamidia. Preferentemente, el al menos un patógeno inmunógeno no-FCV felino comprende un microorganismo vivo atenuado, o un vector recombinante que expresa al menos un patógeno no-FCV inmunógeno felino.

35 **[0024]** Un segundo aspecto de la invención proporciona un proceso para la inactivación y la estabilización de FCV, que comprende las etapas de reaccionar FCV con un agente de inactivación y un compuesto aldehído, donde el compuesto aldehído comprende un alquilo lineal en C1-C5, y donde los agentes de inactivación se seleccionan del grupo que consiste de etileneimina, acetiletileneimina, propileneimina y  $\beta$ -propiolactona, y la recuperación del FCV inactivado y estabilizado. Una realización preferida recupera el FCV inactivado y estabilizado por cromatografía de  
40 exclusión, ultracentrifugación, y precipitación selectiva.

**[0025]** Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para producir una composición de vacuna inactivada, estabilizada, inmunogénica sin adyuvante, contra la FCV para el almacenamiento a largo plazo, que comprende mezclar el FCV inactivado y estabilizado de la invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune a la FCV con un excipiente liofilizado y su congelación.

45 **[0026]** Según otro aspecto adicional de la invención, esta proporciona un proceso para producir una composición inmunogénica de vacuna inactivada, estabilizada, sin adyuvante contra el FCV, que comprende mezclar el FCV inactivado y estabilizado descrito en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune a la FCV con un excipiente o vehículo aceptable desde el punto de vista veterinario.

50 **[0027]** La presente invención también proporciona composiciones inmunogénicas inactivadas, estabilizadas, sin adyuvante, para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un felino contra la FCV.

**[0028]** Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición inmunogénica inactivada, estabilizada, sin adyuvante, y por lo menos un inmunógeno no-FCV de otro patógeno felino, para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un felino contra la FCV y al menos un inmunógeno no FCV de un patógeno felino.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**[0029]** La siguiente descripción detallada, ofrecida a modo de ejemplo, y que en ningún caso pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 5 La figura 1 es un gráfico que muestra la media de la puntuación clínica total durante las dos semanas después de provocar la enfermedad por tipo de composición administrada (según el ejemplo 3).

La Figura 2 es un gráfico que muestra la media de la puntuación máxima para una observación clínica en un gato durante las dos semanas después de provocar la enfermedad por tipo de composición administrada (según el ejemplo 3).

- 10 La figura 3 es un gráfico que muestra el promedio de títulos de anticuerpos neutralizantes anti-FCV255 (expresado como  $\log_{10}$ ) por grupo y día (según el ejemplo 4).

La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados globales por grupo (según el ejemplo 4).

La figura 5 es un gráfico que muestra la media de la excreción de FCV después de la exposición por grupo y día, expresados como  $\log_{10}$  CCDE) 50/ml (según el ejemplo 4).

**15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

- [0030]** Cabe señalar que en esta descripción y en particular en las reivindicaciones, los términos tales como "comprende", "compuesto", "que comprende" y términos semejantes pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los EE.UU; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y significados similares; y los términos tales como " que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los EE.UU; por ejemplo, permiten elementos no explícitamente recitados, pero excluyen los elementos que se encuentran en el estado de la técnica o que afectan a una característica básica o nueva de la invención.
- 20

- [0031]** El término "composición inmunogénica" abarca cualquier composición capaz, una vez que se administra a las especies objetivo en las condiciones de la invención, de inducir una respuesta inmune dirigida contra la FCV. El término "vacuna" se entiende como una composición capaz de inducir una protección efectiva. Las especies objetivo son los félidos, preferentemente los gatos.
- 25

- [0032]** La presente invención se refiere a una composición o a una vacuna inmunogénica FCV inactivada, estabilizada, sin adyuvante que comprende un FCV que ha sido sometido a un agente de inactivación y a un compuesto de aldehído estabilizante. Un grupo preferido de compuestos estabilizadores son aldehídos que tienen una cadena lineal alquilo en C1-C5 que comprende un grupo aldehído cuando la cadena es C1 y dos grupos aldehído terminales cuando la cadena es en C2-C5, y, opcionalmente, un grupo aldehído puede ser sustituido por un grupo cetona o un grupo epoxi, cuando la cadena es la cadena en C2-C5, y cuando la composición o vacuna inmunogénica esta liofilizada y mezclada con un excipiente o vehículo de liofilización, o mezclada con un excipiente o vehículo aceptable para el uso veterinario.
- 30

- [0033]** Un " agente de inactivación" es un agente capaz de bloquear la multiplicación de un virus mediante una reacción irreversible, principalmente, pero no limitado a ellas, las reacciones con ácidos nucleicos víricos, que no afectan sustancialmente a la propiedad inmunogénica del virus. Los agentes de inactivación de la invención son etilenimina, acetilileneimine, propilnimina y  $\beta$ -propiolactona. En una modalidad preferida, el agente de inactivación es etilenimina.
- 35

- [0034]** Según una modalidad preferida, el FCV está inactivado por la etilenimina. La concentración final de etilenimina puede ir desde aproximadamente 0,5 mM hasta 20 mM, y preferentemente desde 1 mM hasta 10 mM. La temperatura puede ser aproximadamente de 2 ° C a 40 ° C, y preferentemente de 5 ° C a 30 ° C.
- 40

- [0035]** La estabilización de los compuestos de aldehído puede reaccionar con grupos amino (por ejemplo, grupos amino de los aminoácidos lisina, arginina o histidina) y con los grupos hidroxilo de la(s) proteína(s) (por ejemplo, grupos hidroxilo en los aminoácidos tirosina) y puede formar enlaces entre las dos proteínas y/ o dentro de una proteína. El compuesto aldehído estabilizante se selecciona preferentemente del grupo que consiste en formaldehído (o metanal), glicidaldehído (o 2,3-epoxi-1-propanal), glutaraldehído (o 1,5 - dial-pentano), glioxal (o 1,2 -dial-etano), metilglioxal (o piruvaldehído). Según una modalidad preferida, el compuesto aldehído estabilizante es el formaldehído.
- 45

- [0036]** Cuando el formaldehído se utiliza como aldehído estabilizante, la concentración final puede ir desde aproximadamente 0,05 g / l a 0,8 g / l, preferentemente desde aproximadamente 0,075 g / l a 0,6 g / l, y más
- 50

preferentemente desde aproximadamente 0,1 g / l a 0,5 g / l. La temperatura puede ir desde aproximadamente 2 ° C a 37 ° C, preferentemente desde 2 ° C hasta 22 ° C, y más preferentemente desde aproximadamente 4 ° C a 7 ° C.

5 **[0037]** para ajustar las condiciones de estabilización (temperatura, concentración del compuesto aldehído estabilizante y duración), se puede realizar la cuantificación de los viriones FCV. Se puede utilizar cualquier técnica apropiada para cuantificar los viriones, por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para la proteína cápside FCV. Antes de la cuantificación de ELISA, se pueden separar los viriones del cultivo vírico tratado con técnicas conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo por cromatografía de exclusión de tamaño, por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, por ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio, y por precipitación selectiva, por ejemplo, una precipitación epolietilenglicol (PEG).

10 **[0038]** La suspensión FCV utilizada para la composición o vacuna inmunogénica contiene preferentemente de 108,5 a cerca de 1.011 DICC50 por dosis antes de la inactivación, más preferentemente desde aproximadamente 109 a aproximadamente 1.010 DICC50 por dosis antes de la inactivación. Tras la finalización de la inactivación y/ o de la estabilización, el agente de inactivación y/ o el compuesto aldehído de estabilización puede ser retirado de la suspensión, por procedimientos de neutralización conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, mediante la adición de compuestos neutralizantes que contienen grupos tiol (por ejemplo, tiosulfato, cisteína).

15 **[0039]** La eliminación del agente de inactivación y/ o el compuesto aldehído de estabilización o, alternativamente, la recuperación de la FCV inactivada y estabilizada a partir de la suspensión se puede lograr mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, por cromatografía de exclusión de tamaño, por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, por ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio, por precipitación selectiva, por ejemplo una precipitación de polietilenglicol (PEG).

20 **[0040]** La recuperación de los viriones de la suspensión, después de la inactivación y de la estabilización del virus, se puede lograr de forma concomitante en la etapa de tratamiento que elimina el agente de inactivación y/ o el aldehído de estabilización. En una realización alternativa, la recuperación de los viriones inactivados y estabilizados se puede lograr en un paso discreto que no es concomitante con el paso que elimina el agente de inactivación y/ o el compuesto aldehído. Este paso de recuperación del virión se puede lograr mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo por cromatografía de exclusión por tamaño, por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, por ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio, y por precipitación selectiva, por ejemplo una precipitación de polietileno glicol (PEG).

25 **[0041]** Las composiciones y las vacunas inmunogénicas según la descripción pueden incluir una combinación de al menos dos cepas de FCV que se inactivan y se estabilizan, o una combinación de al menos dos cepas de FCV donde al menos una de las cepas de FCV se ha inactivado y estabilizado.

30 **[0042]** Preferentemente, la(s) cepa(s) FCV se selecciona(n) de entre las que se han aislado recientemente. Las cepas preferidas incluyen las cepas 431 (depositadas en el CNCM bajo el número de registro I-2166; o cualquier otra cepa que reacciona con el anticuerpo monoclonal 44 secretado por el hibridoma depositado en la CNCM bajo el número de acceso 1-2282; ver la patente de EE.UU. N ° 6534066), FCV G1 (depositado en el CNCM bajo el número de registro I-2167) (CNM = "Colección Nacional de cultivos de Microorganismos", del Instituto Pasteur, París, Francia), FCV EE.UU. 100 869 (también conocido como PTA FCV 5930, depositado en la ATCC el 22 de abril de 2004) (ATCC = "American Type Culture Collection", Manassas, Virginia, EE.UU.) y en general cualquiera de las nuevas cepas altamente virulentas descritas en las publicaciones (Pedersen et al. (2000). Microbiol. Vet. 73: 281-300; Schorr-Evans et al (2003) JFMS 5: 217-226; Hurley et al (2003) Vet Clin. Anim. pequeños 33: 759 a 772)... En una realización preferida, la composición o vacuna inmunogénica comprende FCV 431 inactivado y estabilizado (o cualquier otra cepa que reaccione con el anticuerpo monoclonal 44) y FCV G1 inactivado y estabilizado. En otra realización preferida, la composición o vacuna inmunológica comprende FCV EE.UU. 100 869 inactivado y estabilizado (ATCC PTA 5930 No. FCV). Otras cepas de FCV se pueden utilizar en, o, añadidas a la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a, FCV F9, FCV 255, FCV 2280, FCV FCV LLK KCD, CFI FCV y FCV M8.

35 **[0043]** La composición o vacuna inmunológica FCV inactivada y estabilizada se puede combinar fácilmente con vacuna(s) viva(s) atenuada(s) o inactivada(s) o composiciones inmunogénicas utilizadas para enfermedad(es) de otro felino. Por lo tanto, otro objeto de la descripción es una composición o vacuna inmunológica de combinación no adyuvante que comprende al menos un FCV estabilizado e inactivado y al menos un componente inmunogénico no FCV para inducir en el huésped una respuesta inmune contra al menos otro patógeno felino, en el que el componente inmunogénico no FCV mencionado puede ser un inmunógeno que proviene de otro patógeno felino o un vector recombinante que expresa este inmunógeno, en el que la composición o vacuna inmunogénica combinada sin adyuvante está o en forma liofilizada mezclada con un excipiente o vehículo de liofilización o mezclada con un vehículo o excipiente aceptable desde el punto de vista veterinario. Se prefiere la forma liofilizada.

- [0044]** En una realización preferida, la composición o vacuna inmunogénica combinada sin adyuvante comprende el componente inmunogénico no FCV ya sea en forma de microorganismo vivo atenuado o en forma de vector recombinante que expresa al menos un inmunógeno que proviene del patógeno felino. El vector recombinante puede ser un plásmido o un vector vírico; el vector puede ser por ejemplo un virus de la viruela, un adenovirus, o un virus del herpes. Se prefiere la forma liofilizada.
- [0045]** Los otros patógenos felinos no FCV se seleccionan preferentemente del grupo que comprende al virus de la rinotraqueítis felina o el virus del herpes felino (FHV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la panleucopenia felina o parvovirus felino (FPV), el virus de la peritonitis felina infecciosa felina (FIPV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la rabia, y la clamidia (por ejemplo, Chlamydomphila felis).
- [0046]** La composición inmunogénica o vacuna combinada de la invención hasta ahora se refiere a al menos la composición FCV inmunogénica de la reivindicación 1, además de componentes inmunogénicos no FCV tales como:
- FHV, FPV, FeLV y clamidia
  - FHV, FPV y FeLV - FHV, FPV y la rabia
  - FHV, FPV y la clamidia
- [0047]** Según una realización preferida de estas combinaciones, los microorganismos vivos atenuados se utilizan para la FHV, la FPV y la clamidia, y un vector/ vectores recombinante(s) que expresan a los genes FeLV / que se utiliza(n) para FeLV. El vector recombinante puede ser un virus de la viruela del canario (por ejemplo vCP97 tal como se describe en la patente de EE.UU. N ° 5753103) que expresa genes env y gag / pol del FeLV. Para la rabia, se puede utilizar un vector recombinante, particularmente un virus de la viruela del canario (por ejemplo vCP65 tal como se describe en la patente de EE.UU. N ° 5.843.456) que expresa al gen de la rabia glicoproteína G.
- Otro objeto de la invención es un proceso de inactivación y de estabilización de FCV, que comprende hacer reaccionar FCV con un agente de inactivación y un compuesto aldehído de estabilización formado por una cadena lineal alquilo C1-C5 que comprende un grupo aldehído cuando la cadena es C1 y dos grupos aldehído terminales cuando la cadena es C2-C5, y, opcionalmente, se puede sustituir un grupo aldehído por un grupo cetona o por un grupo epoxi, cuando la cadena es la cadena C2-C5. Algunas realizaciones preferidas para el agente de inactivación y el compuesto aldehído estabilizante así como sus condiciones de uso son tal como se han descrito más arriba, en la medida que la invención se refiere a ello.
- El proceso de la invención comprende el cultivo de la FCV en células huésped adecuadas, el tratamiento con el agente de inactivación y con el compuesto aldehído estabilizante. La cultura y la propagación del virus de la FCV se realiza preferentemente a partir de células felinas, especialmente en el riñón felino Crandell-Reese o células CRFK (accesibles desde la American Type Culture Collection con el número CCL-94) con una multiplicidad de infecciones (MOI) de 2 a 0,01 dosis infecciosas de cultivo celular 50% (CCID50) por célula, preferentemente de 0,5 CCID50/cel.
- La adición del compuesto aldehído de estabilización se puede hacer antes, durante o después del paso de inactivación. La neutralización del agente de inactivación y/ o del compuesto aldehído de estabilización se puede realizar tal como se ha descrito anteriormente.
- Los viriones FCV inactivados estabilizados se pueden concentrar y/ o recuperar de la suspensión mediante técnicas de concentración convencionales, por ejemplo mediante ultrafiltración y luego opcionalmente se pueden purificar mediante una técnica convencional de purificación, por ejemplo por cromatografía de exclusión por tamaño, por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, por ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio, o por precipitación selectiva, por ejemplo en presencia de polietilenglicol (PEG).
- En una realización, la composición o vacuna inmunogénica de la invención comprende FCV liofilizado estabilizado e inactivado y un excipiente o vehículo de liofilización, que puede incluir aminoácidos, por ejemplo, ácidos glutámicos, o hidratos de carbono, por ejemplo lactosa, y sus mezclas, por ejemplo, SPGA (sacarosa / fosfato / glutamato / albúmina; véase también la solicitud de patente europea número 0.496.135). El FCV Inactivado y

estabilizado se puede almacenar a largo plazo a alrededor de 5 ° C, o, alternativamente, se puede congelar o liofilizar (o liofilizar) según técnicas conocidas por los expertos en la materia.

5 **[0053]** Por lo tanto, para producir las composiciones inmunogénicas de la presente invención, la FCV se cultiva en un cultivo celular en una línea celular felina apropiada, es decir, las células CRFK, a los títulos suficientes para producir una suspensión vírica en cantidades suficientes para producir una composición inmunogénica. La FCV se cosecha según procedimientos bien conocidos en la técnica. Luego, el calcivirus se concentra, se congela y se almacena a -70 ° C o se liofiliza y se almacena a 4 ° C.

10 **[0054]** Otro objeto de la invención es un proceso de producción de una composición inmunogénica inactivada o que contiene una vacuna que proporciona la FCV inactivada y estabilizada de la invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune, y, o bien el FCV mencionado liofilizado, (y con la posibilidad de añadir un estabilizador de liofilización) o en forma líquida mediante la mezcla de FCV mencionado con un excipiente o vehículo aceptable en veterinaria. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, soluciones isotónicas, suero fisiológico, tales como, pero no limitados a, NaCl y tampón fosfato salino (PBS), dextrosa, manitol, sorbitol, lactosa, glicerol, etanol, o similares, y sus combinaciones. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de  
15 sustancias auxiliares, tales como, pero no limitadas a, agentes humectantes o emulsionantes, y agentes reguladores del pH.

20 **[0055]** Las composiciones y vacunas inmunogénicas de acuerdo con la descripción pueden comprender uno o más adyuvantes, pero preferentemente no los necesitan, las composiciones de la invención comprenden un FCV inactivado y estabilizado que es inmunogénico, incluso en ausencia de adyuvante. Sin embargo, si se desea, se puede incluir un adyuvante aceptable en las composiciones de la invención. El adyuvante aceptable es un adyuvante hidrosoluble. Tales adyuvantes aceptables pueden ser polímeros de ácido acrílico o metacrílico, polímeros de anhídrido maleico y de un derivado de alqueno, secuencias inmunoestimulantes (ISS), en particular, secuencias oligodesoxirribonucleótido que tienen uno o más motivos CpG no metilados (Klinman DM et al., (1996...) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 93: 2879-2883; WO-A1-98/16247), una emulsión de aceite en agua, en particular, la emulsión SPT  
25 descrita en la página 147 de "Diseño de la Vacuna, Enfoque de la Subunidad y del adyuvante", editado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press, de 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, los lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, las citoquinas, o combinaciones o mezclas de los mismos.

30 **[0056]** Otro objeto de la descripción es un procedimiento de inmunización de un animal de la familia Felidae, preferentemente gatos, incluidos los recién nacidos, los gatitos, machos, hembras, y hembras embarazadas, contra la enfermedad FCV, comprendiendo el procedimiento la administración de una composición o vacuna inmunogénica FCV inactivada y estabilizada sin adyuvante de acuerdo con la descripción.

35 **[0057]** Otro objeto de la descripción es un procedimiento de inmunización de un animal de la familia Felidae, preferentemente gatos, incluidos los recién nacidos, los gatitos, machos, hembras, y hembras embarazadas contra al menos dos enfermedades felinas incluyendo la enfermedad de FCV, comprendiendo el procedimiento la administración de una vacuna combinada sin adyuvante que comprende FCV inactivado y estabilizado según la descripción, y al menos un inmunógeno no-FCV que proviene de otro patógeno felino o un vector recombinante que expresa al menos un inmunógeno no-FCV que proviene de otro patógeno felino.

40 **[0058]** Son posibles vías diferentes para llevar a cabo la administración de las composiciones o vacunas inmunogénicas y vacunas de acuerdo con la descripción. Incluyen, pero no se limitan a, la vía parenteral, oronasal, intramuscular, intradérmica, subcutánea, y por las mucosas (por ejemplo, oral). Las vías preferidas de administración incluyen la vía subcutánea o intramuscular por inyección. Las vacunas o composiciones inmunogénicas pueden administrarse por cualquier medio incluyendo, pero no limitándose a, jeringas, dispositivos de inyección sin aguja. Los inyectores sin aguja se pueden utilizar para la administración transdérmica (administración intradérmica y subcutánea y posiblemente intramuscular). Si se utiliza un sistema de inyección sin aguja, los volúmenes de la dosis  
45 están determinados por el volumen necesario para administrar la composición inmunogénica FCV y se pueden situar entre 0,1 ml y 1 ml.

50 **[0059]** Con una jeringa, los volúmenes de dosis de las vacunas y composiciones inmunogénicas se sitúan generalmente entre 0,2 y 2,0 ml, preferentemente alrededor de 1,0 ml. Los gatos pueden ser vacunados a partir de las 6 semanas de edad. Se pueden realizar dos o más administraciones, por ejemplo con un intervalo de 3-5 semanas. Preferentemente una administración de recordatorio. Se puede realizar, por ejemplo, anualmente. Como alternativa, los gatos pueden ser preparados con una sola inyección.

**[0060]** Se describirá ahora la invención con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitativos.



EJEMPLOS

Ejemplo 1: La inactivación de FCV por formaldehído

**[0061]** Las células CRFK (Crandell-Reese células renales felinas, accesibles desde la American Type Culture Collection bajo CCL-94) fueron cultivadas a 37 ° C en frascos de rodillos de 2 litros (850 cm<sup>2</sup>) con medio de Eagle modificado (MEM, Gibco BRL) suplementado con 2,5% de hidrolizado de lactoalbúmina y 5% de suero fetal bovino. Se añadieron trescientos mililitros de una suspensión celular en medio MEM, que contenían alrededor de 100.000 células / ml, mediante un frasco de rodillos. 3 días después, las capas de células confluyeron. El medio de cultivo celular fue entonces sustituido por MEM sin suero y el virus FCV de la cepa 431 se añadió a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5 CCID<sub>50</sub> / celular. El cultivo vírico se mantuvo a 37 ° C durante 24 a 48 horas hasta obtener un efecto citopático en la totalidad de la capa celular. Se recogió la suspensión vírica y luego se aclaró en un filtro con una porosidad de 13:05 y se almacenó a 5 ° C. El título del virus FCV en el momento de la cosecha fue de 8,5 + / - 0,3 log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub>/ml.

**[0062]** La suspensión vírica se inactivó con etileneimina con una concentración de 8 mM a 22 ° C durante 18 horas. La etileneimina se preparó disolviendo 36 g de lentejas de hidróxido de sodio en 257,5 ml de agua destilada y añadiendo 87,5 g de bromoetilamina (BEA), lo que corresponde aproximadamente a una solución 1,2 M de etileneimina. Al final de la inactivación, se estabilizó parte de la suspensión vírica inactivada mediante la adición de formaldehído con una concentración final de 0,5 g / l, y en 5 ° C (+ / - 3 ° C) durante 24 horas. Parte de la suspensión vírica inactivada se mantuvo estabilizada como suspensión de control.

**[0063]** Una porción de la suspensión vírica inactivada y estabilizada y una porción de la suspensión de control fueron sometidas a la precipitación selectiva en presencia de polietilenglicol (PEG). Se añadió PEG 6000 a la suspensión con una concentración del 6%, y se agitó a 5 ° C (+ / - 3 ° C) durante 3 horas. Las suspensiones se centrifugaron a 1330 g durante 90 minutos. Los sobrenadantes, que contenían la proteína p66 soluble, y los precipitados, que contenían los viriones, se separaron y se recuperaron. Los precipitados se disolvieron en solución salina estéril de tampón fosfato (PBS) sin calcio y sin magnesio.

**[0064]** Dos o tres días después del final de la etapa de inactivación, proteínas p66 FCV fueron cuantificadas por titulación ELISA en la suspensión vírica inactivada y estabilizada, en la suspensión de control, en los sobrenadantes y en los precipitados en la solución. La titulación ELISA se realizó por revestimiento de anticuerpos anti-FCV policlonales en una placa de titulación, la adición de diferentes diluciones de la suspensión vírica inactivada y estabilizada, la suspensión de control, los sobrenadantes y la solución de precipitado. La placa de titulación se mantuvo a 37 ° C durante 3 horas, luego se lavó la placa de titulación con un tampón de lavado y, posteriormente, se añadió un anticuerpo monoclonal específico para la proteína de la cápside p66 FCV, junto a una peroxidasa. Después, la placa de titulación se mantuvo a 37 ° C durante 1 hora, tras lo cual se lavó la placa con el tampón de lavado. A la placa de lavado, se añadieron 100 µl. de la solución de TMB (5,5'-tetrametilbenzidina) por pocillo a 20 ° C, y se mantuvo en la oscuridad a 20 ° C durante 30 minutos. El desarrollo del color se bloqueó mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 2M por pocillo. Se midieron ópticamente los títulos de ELISA y se expresaron como log<sub>10</sub> OD<sub>50</sub> (densidad óptica del 50%), lo que corresponde al logaritmo decimal de la dilución, con 50% de la densidad óptica máxima. La desviación estándar de la titulación de ELISA es de 0,07.

Tabla 1: Degradación de viriones FCV tras la inactivación

	Inactivación sin estabilización	Inactivación con estabilización
Total de proteínas p66 en la suspensión vírica no sujeta a precipitación PEG	2.81	2.36
Proteína P66 en el sobrenadante (p66 soluble)	2.55	2.18
Proteína P66 en el precipitado (p66 en el virión)	1.95	2.62

**[0065]** Estos resultados demuestran la degradación de los viriones de FCV después de la inactivación en ausencia de estabilización y la efecto de estabilización del formaldehído.

Ejemplo 2: Efecto de estabilización del formaldehído sobre FCV en varias condiciones

**[0066]** La cepa 431 FCV se cultivó esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1.

**[0067]** Se probaron tres procedimientos de inactivación:

- 1) etileneimina a una concentración de aproximadamente 4 mM a 20°C durante 24 horas,
- 2) etileneimina a una concentración de aproximadamente 8 mM a 20°C durante 24 horas,
- 3) etileneimina a una concentración de aproximadamente 8 mM a 5°C durante 24 horas.

5 **[0068]** La suspensión vírica se estabilizó mediante formaldehído a varias concentraciones finales de 0.1 g/l- 0.5 g/l y a 5°C (+/- 3°C) durante 5 días. Una suspensión de control no contenía formaldehído.

**[0069]** Las proteínas de FCV p66 se cuantificaron tal como se describe en el ejemplo 1 antes y después por precipitación selectiva PEG, por titulación ELISA. Los títulos ELISA se expresaron como log<sub>10</sub> OD50.

Tabla 2: Títulos de ELISA de proteínas FCV p66

Formaldehído 5 días, 5 ° C	Etileneimina								
	4 mm, 20 ° C, 24 horas			8 mm, 20 ° C, 24 horas			8 mm, 5 ° C, total 24 horas		
	Total de proteínas	p66 soluble	p66 en virión	Total de proteínas	p66 soluble	p66 en virión	Total de proteínas	p66 soluble	p66 en virión
0,5 g / l	2,15	1,53	1,56	1,96	1,37	1,09	2,11	1,42	1,38
0,1 g / l	2,38	1,88	1,56	2,24	1,87	0,98	2,27	1,72	1,35
0 g / l	2,41	1,86	1,34	2,14	1,85	0,82	2,3	1,76	1,14

10

**[0070]** Estos resultados demuestran el efecto estabilizador de 0,1 g / l y 0,5 g / l de la solución de formaldehído en relación con diversas condiciones de inactivación.

Ejemplo 3: Inmunogenicidad de viriones FCV inactivados

15 **[0071]** Se cultivaron, inactivaron y estabilizaron FCV 431 tal como se describe en el ejemplo 1. Esta suspensión vírica se separó mediante cromatografía de exclusión en dos fracciones que contenían, respectivamente, el virión (también llamado fracción vírica p66) y la proteína soluble p66 (también llamada fracción soluble p66). Después de la separación, las dos fracciones se almacenaron a 5 ° C.

20 **[0072]** Se prepararon un total de 12 vacunas, que contenían 1 ml de la fracción p66 vírica diluida o sin diluir (1 / 1, 1 / 4 y 1 / 16) y formuladas con 1 ml de PBS (tampón fosfato salino, sin calcio y sin magnesio); 1 ml de la fracción vírica p66 diluida o sin diluir (1 / 1, 1 / 4 y 1 / 16) y formulada con 1 ml de una emulsión de aceite en agua (aceite de parafina, éteres de alcoholes grasos y polioles, ácidos grasos de polioxietileno), 1 ml de la fracción soluble p66 diluido o sin diluir (1 / 1, 1 / 4 y 1 / 16) y formulada con la PBS, 1 ml de la fracción soluble p66 diluida o sin diluir (1 / 1, 1 / 4 y 1 / 16) y formulada con la emulsión aceite-agua.

25 **[0073]** Las vacunas no diluidas contienen aproximadamente la cantidad de proteína que corresponde a 10 ml de cultivo vírico crudo. Se diluyeron las fracciones virales p66 y las fracciones solubles p66 por adición de PBS sin calcio y sin magnesio.

30 **[0074]** Veinticuatro gatitos libres de patógenos específicos (SPF), de aproximadamente 8-9 semanas de edad, fueron asignados (repartidos) al azar en 12 grupos y se les administró por vía subcutánea dos veces, 28 días, 2 ml de estas vacunas. No se observó ningún efecto en relación con la cantidad de proteína p66 inyectada. Los siguientes resultados son el reflejo de todos los gatos que fueron inoculados por vía oronasal con la cepa virulenta FCV 431 en el día 46 (0.25 ml en cada fosa nasal y 0,5 ml por vía oral, 105,5 CCID50/ml).

**[0075]** Los signos clínicos se observaron durante las dos semanas después de provocar la enfermedad. La puntuación utilizada para el cálculo de la puntuación clínica es la siguiente:

Tabla 3: Puntuaciones clínicas de felinos vacunados

Parámetros	Observación	Puntuación
Temperatura rectal	$T^{\circ} < 39,5^{\circ} \text{C}$	0
	$0 \ 39,5^{\circ} \text{C} \leq T^{\circ} < 40^{\circ} \text{C}$	1
	$T^{\circ} \geq 40^{\circ} \text{C}$	2
Estado general del cuerpo	Normal	0
	Depresión	1
Ulceración oronasal	Ausencia	0
	Diámetro < 5 mm	1
	Diámetro de 5 a 10 mm	2
	Diámetro > 10 mm	3
Rinitis	Secreción nasal de suero	1
	Secreción nasal mucopurulenta	2
Conjuntivitis	Secreción de suero	1
	Secreción nasal mucopurulenta	2
Gingivitis	Presente	1
Cojeo	Presente	1

**[0076]** La puntuación clínica total es la suma de todos los signos clínicos observados en un gato durante las dos semanas tras la inoculación. Los promedios de la puntuación clínica total por tipo de vacunas se indican en la siguiente tabla y en la figura 1.

Tabla 4: Media de la puntuación clínica máxima por tipo de vacuna

	Fracción de p66 vírica	Fracción de p66 soluble
PBS	17.17	29.33
Emulsión	16.17	20.83

**[0077]** La puntuación clínica máxima es la más alta puntuación clínica obtenida en la observación de un gato durante las dos semanas después del desafío. Las medias de la puntuación clínica máxima por tipo de vacunas se indican en la siguiente tabla y en la figura 2.

Tabla 5: La media de la puntuación clínica máxima por tipo de vacuna

	Fracción de p66 vírica	Fracción de p66 soluble
PBS	2.33	4.67
Emulsión	2.83	2.83

[0078] Hubo una diferencia significativa entre las medias de la puntuación máxima clínica obtenidas de la fracción vírica p66 / PBS y la fracción soluble p66 / PBS grupos (p-valor,  $p = 0,0495$ ).

5 [0079] Estos resultados demuestran que los viriones inactivados mantienen la inmunogenicidad en ausencia de un adyuvante. Al contrario, las proteínas solubles p66 inducen una buena respuesta inmunogénica sólo en presencia de un adyuvante.

Ejemplo 4: Vacunación de los gatos con FCV inactivada

[0080] 431 FCV se cultivó, se inactivó con etileneimina y se estabilizó por la acción del formaldehído esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1. Se aplicó el mismo procedimiento a la cepa FCV G1.

10 [0081] Una vacuna combinada (vacuna A) comprendía  $5,60 \log_{10}$  DICC50 por dosis del virus de la rinotraqueítis felina atenuado (FHV-1),  $4,17 \log_{10}$  DICC50 por dosis del virus de la panleucopenia felina atenuado (FPV),  $8,29 \log_{10}$  DICC50 por dosis de viruela del canario vCP97 vector recombinante de expresión de env y gag / pol genes FeLV (ver US-A-5.753.103),  $4,8 \log_{10}$  ELD50 por dosis atenuada de clamidia atenuada,  $8,7 \log_{10}$  DICC50 por dosis de FVC 431 inactivado y estabilizado (título equivalente de FVC antes de la inactivación),  $8,7 \log_{10}$  DICC50 por dosis de FVC G1 inactivado y estabilizado (título equivalente de FVC antes de la inactivación F), y de agua fisiológica.

15 [0082] Dieciocho gatitos de entre 8 y 9 semanas, exentos de patógenos específicos, fueron repartidos al azar en 3 grupos (6 crías por grupo). Los gatitos del grupo A fueron vacunados con una dosis de la vacuna A. Los gatitos del grupo B fueron vacunados con una mezcla de una vacuna comercial que contiene, en forma liofilizada, una cepa viva FCV F9 modificada, un FHV -1 vivo modificado y un FPV vivo modificado, y una vacuna comercial que contenía un FeLV inactivado y adyuvante, actuando esta vacuna como diluyente de la vacuna comercial liofilizada. Los gatitos del grupo C quedaron sin vacunar como grupo de control. La vacuna se administró dos veces, 28 días, además, por vía subcutánea. Cuatro semanas después de la última vacunación, todos los gatos fueron inoculados por vía oronasal con la cepa virulenta heteróloga 255 FVC (Scott FW. Soy. J. Vet. Res. 1977. 38 (2). 229-34) (0,25 ml en cada fosa nasal y 0,5 ml por vía oral,  $108,2 \text{ CCID}_{50}/\text{ml}$ ).

20 [0083] Se observaron los anticuerpos neutralizantes Anti-FCV255, el peso de los animales, la temperatura rectal, las condiciones generales, los síntomas generales y locales y las excreciones virales durante las dos semanas después del desafío. Los títulos de anticuerpos calicivirus (expresados como  $\log_{10}$ ) se presentan en la tabla siguiente y en la Figura 3.

Tabla 6: Títulos de anticuerpos según el grupo

	D0	D28	D56	D70
Grupo A	0.20	0.20	1.13	2.23
Grupo B	0.20	0.62	1.28	2.43
Grupo C	0.20	0.20	0.20	2.83

30 [0084] En el día 0, los títulos de anticuerpos fueron negativos en todos los grupos.

[0085] Después de una inyección de la vacuna, ninguno de los gatos vacunados seroconvirtieron excepto en el grupo B. Después de la segunda inyección, todos los gatos tenían títulos de anticuerpos neutralizantes. La media de los títulos de anticuerpos en el momento de la inoculación (D56) no fueron diferentes entre los grupos vacunados (test de Tukey), pero fueron significativamente más altos que en el grupo control (ANOVA,  $p = 0,0002$ ).

35 [0086] La puntuación utilizada para el cálculo de la puntuación global es la siguiente:

Tabla 7: Puntuación Clínica Global de los gatos vacunados

Parámetros	Observación	Puntuación
Temperatura rectal	$T^{\circ} \geq 39,5^{\circ} \text{ C}$	1
	$T^{\circ} \leq 37^{\circ} \text{ C}$	2
Estado general del	Depresión	2

cuerpo*	Muerte	10
Ulceración oronasal*	Pequeños y poco numerosos	1
	Grandes y numerosos	3
Secreción nasal*	Ligera	1
	Copiosa	2
Secreción ocular*	Presente	1
Peso	Pérdida de peso	2
* La suma de las puntuaciones de la condición general del cuerpo, ulceración oronasal, secreción nasal y secreción ocular representa la puntuación de los síntomas clínicos, tal como se muestra en la figura 4.		

**[0087]** Los resultados de la puntuación clínica se presentan en la siguiente tabla y en la Figura 4.

Tabla 8: Resultados clínicos del Grupo de los gatos Vacunados

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Temperatura rectal	2	1	3
Pérdida de peso	18	20	22
Síntomas clínicos	4	43	116

5 **[0088]** Todos los gatos control, excepto uno, mostraron síntomas clínicos típicos de la infección por FCV. Una comparación por pares con la prueba de Tukey mostró que el grupo A fue el único grupo vacunado significativamente diferente del grupo control.

**[0089]** Se recogieron y analizaron unas torundas faríngeas para su excreción viral. Los resultados de la excreción de FCV (expresada como  $\log_{10}$  CCID50/ml) se presentan en la siguiente tabla y en la figura 5.

10 Tabla 9: Niveles de excreción de FCV en gatos vacunados

	D56	D58	D60	D62	D64	D67	D70
Grupo A	1,20	2,20	2,28	1,62	1,70	1,45	1,70
Grupo B	1,20	1,95	1,37	1,45	1,53	1,28	1,37
Grupo C	1,28	3,12	3,20	3,45	2,87	2,20	1,62

**[0090]** Después de la exposición, se observó excreción vírica en todos los grupos, pero era reducida en los grupos vacunados en comparación con el grupo de control (ANOVA,  $p < 0,00001$ ). No hubo diferencias entre los grupos vacunados (prueba de Tukey).

15 **[0091]** Ambas vacunas protegieron a los gatos contra la infección de la FCV 255 heteróloga reduciendo fuertemente los síntomas clínicos y la excreción viral. El nivel de protección de las vacunas de la descripción fue al menos tan bueno como el de la vacuna comercial F9 viva modificada F9. Esto demuestra que se puede alcanzar una vacuna eficaz contra la FCV con una vacuna FCV inactivada y estabilizada en ausencia de adyuvante, y que el nivel de protección es al menos tan bueno como el que se obtiene con las vacunas vivas comerciales.

20 **[0092]** También se ha demostrado la compatibilidad in vivo entre la FCV431/G1 inactivada y estabilizada y los otros componentes de la vacuna (virus de la rinotraqueítis felina, virus de la panleucopenia felina infecciosa, virus de la leucemia felina y clamidia).

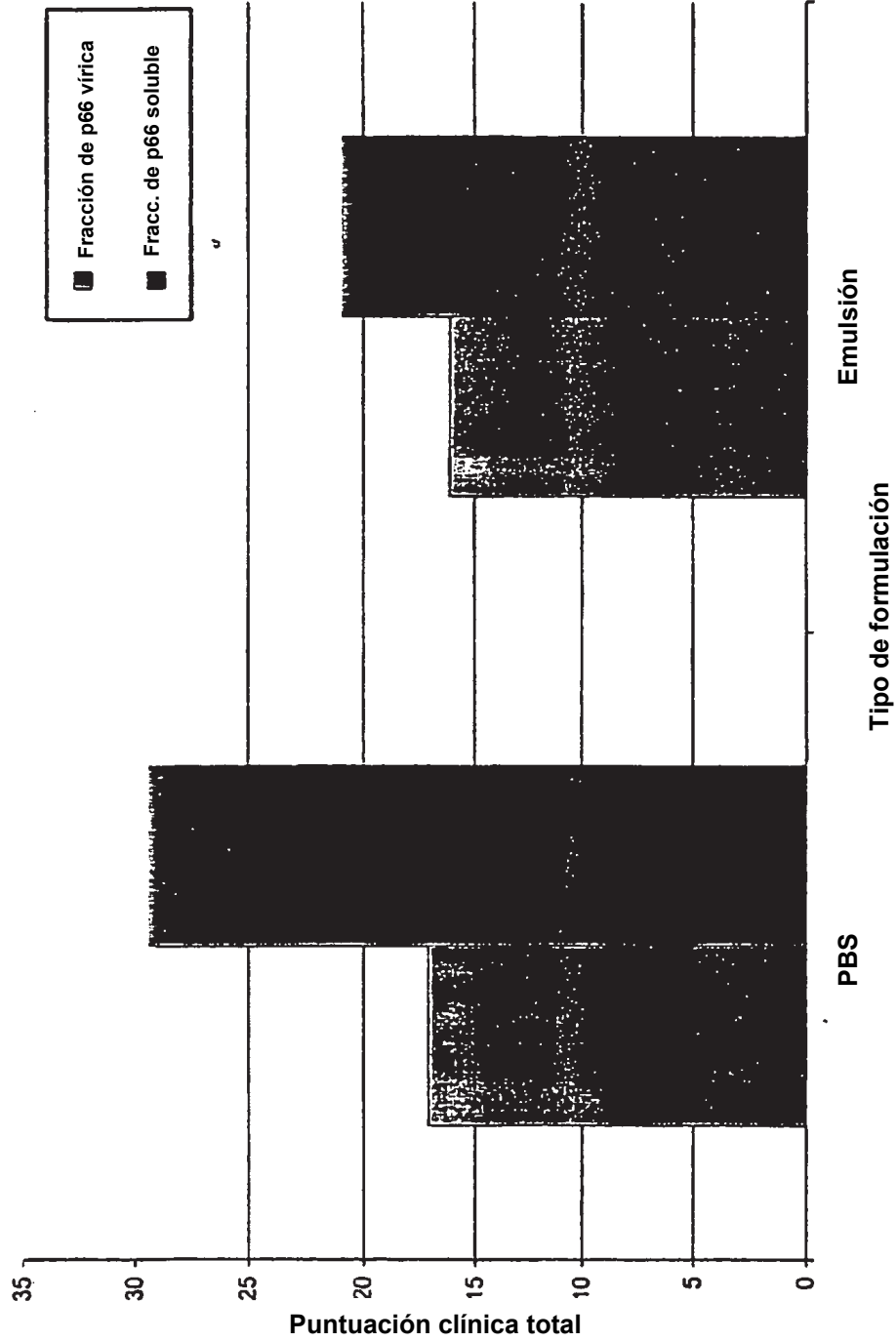
## REIVINDICACIONES

1. Composición inmunógena inactivada, estabilizada, sin adyuvante contra el calicivirus felino (FCV), que comprende un FCV inactivado por uno o más agentes de inactivación y estabilizada por un compuesto aldehído, en la cual el compuesto aldehído comprende una cadena alquilo lineal en C1- C5, y en la que la composición inmunogénica es una mezcla con un excipiente o vehículo aceptable y en la que los agentes de inactivación se seleccionan del grupo que consiste en etileneimina, acetiletileneimina, propileneimina, y  $\beta$ -propiolactona.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el excipiente o vehículo es aceptable desde el punto de vista veterinario.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición está liofilizada y es una mezcla con un excipiente o vehículo de liofilización.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente de inactivación es  $\beta$ -propiolactona.
5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente de inactivación es etileneimina y en la que la etileneimina está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 20 mM.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente de inactivación es etileneimina y en la que la etileneimina está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM.
7. La composición de la reivindicación 1, en la cual el compuesto aldehído comprende una cadena alquilo lineal en C1 y en la cual el compuesto aldehído comprende un grupo aldehído.
8. La composición de la reivindicación 1, en la cual el compuesto aldehído comprende una cadena alquilo lineal en C2-C5 y en la cual el compuesto aldehído comprende dos grupos aldehído.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que uno de los dos grupos aldehído está reemplazado por una cetona o un grupo epoxi.
10. La composición de la reivindicación 1, en la cual el compuesto aldehído se selecciona del grupo que consiste en formaldehído, glicidaldehído, glutaraldehído, glioxal, o metilglioxal.
11. La composición de la reivindicación 10, en la cual el compuesto aldehído es formaldehído y en la que el formaldehído está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.05 g/l a aproximadamente 0.8 g/l.
12. La composición de la reivindicación 10, en la cual el compuesto aldehído es formaldehído y en la que el formaldehído está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.1 g/l a aproximadamente 0.5 g/l.
13. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un compuesto de neutralización, en la que el compuesto de neutralización comprende tiosulfato y cisteína.
14. La composición de la reivindicación 1, que comprende además al menos una cepa adicional FCV, en la que al menos una o ambas de las cepas FCV está inactivada y estabilizada.
15. La composición de la reivindicación 14, en la que la al menos una cepa adicional FCV se selecciona del grupo que consiste en FCV US 100869 (FCV PTA 5930), FCV F9, FCV 255, FCV 2280, FCV 431, FCV G1, FCV LLK, FCV KCD, FCV CFI, y FCV M8.
16. La composición de la reivindicación 1, que comprende además al menos un inmunógeno no-FCV de un patógeno felino.
17. La composición de la reivindicación 16, en la que el patógeno felino se selecciona del grupo que consiste en herpesvirus felino (FHV), virus de la leucemia felina (FeLV), virus de la panleucopenia felina (FPV), virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la rabia, y clamidia felina.
18. La composición de la reivindicación 16, en la que el al menos un inmunógeno no-FCV de un patógeno felino comprende un microorganismo vivo atenuado o un vector recombinante que expresa al menos un inmunógeno de un patógeno felino.
19. Procedimiento de inactivación y estabilización de FCV, que comprende las etapas de reacción del FCV con un agente de inactivación y un compuesto aldehído, en el cual el compuesto aldehído comprende a cadena alquilo

lineal en C1- C5, y en la que el agente de inactivación se selecciona del grupo que consiste en etileneimina, acetiletileneimina, propileneimina, y  $\beta$ -propiolactona, y de recuperación del FCV inactivados y estabilizados.

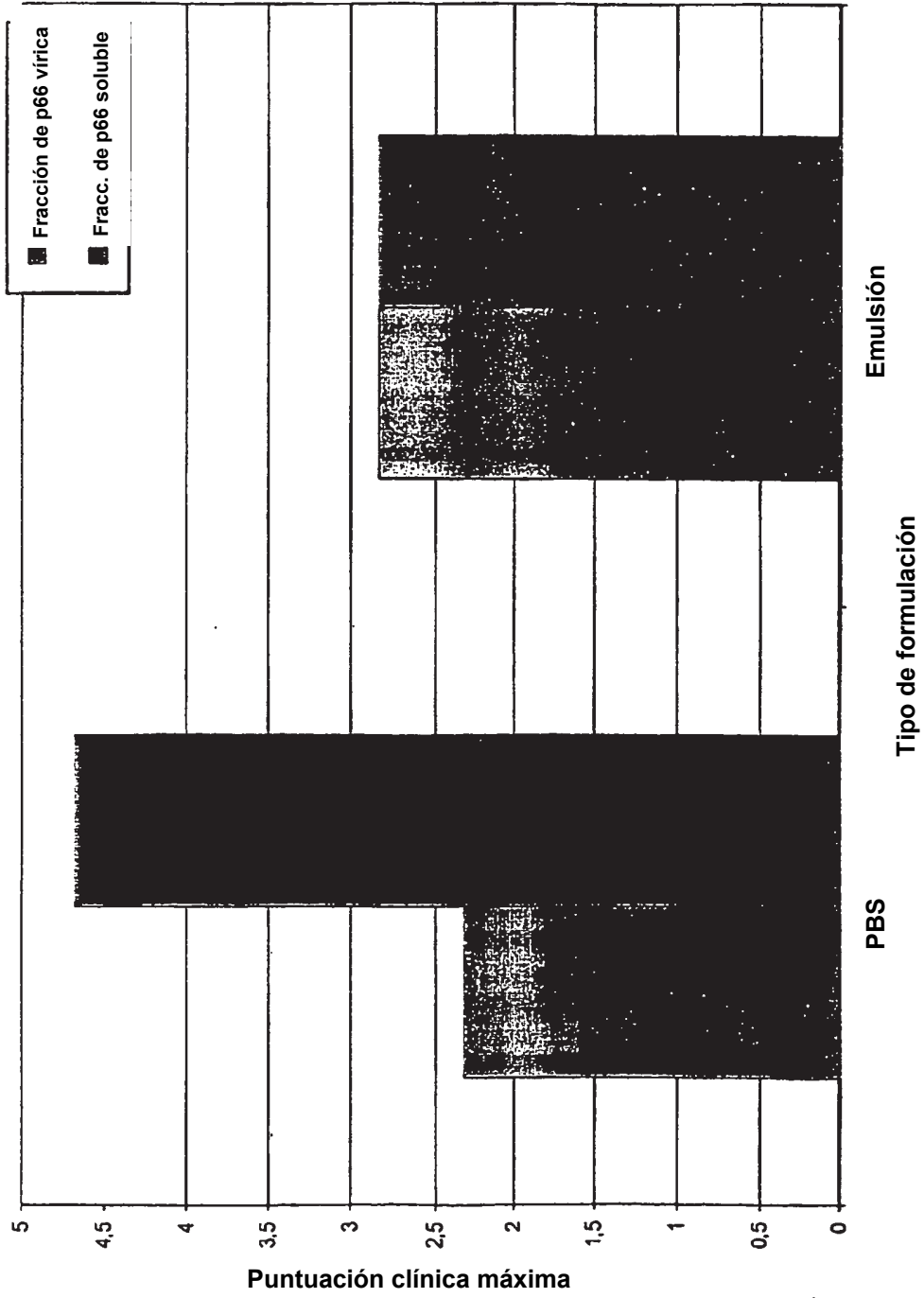
20. El procedimiento según la reivindicación 19, en la que el agente de inactivación es  $\beta$ -propiolactona.
- 5 21. El procedimiento según la reivindicación 19, en la que el agente de inactivación es etileneimina y en la que la etileneimina está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 20 mM.
22. El procedimiento según la reivindicación 19, en la que el agente de inactivación es etileneimina y en la que la etileneimina está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM.
23. El procedimiento según la reivindicación 19, en la cual el compuesto aldehído comprende una cadena alquilo lineal en C1 y en la cual el compuesto aldehído comprende un grupo aldehído.
- 10 24. El procedimiento según la reivindicación 19, en la cual el compuesto aldehído comprende una cadena alquilo lineal en C2-C5 y en la cual el compuesto aldehído comprende dos grupos aldehído.
25. El procedimiento según la reivindicación 24, en la que uno de los dos grupos aldehído está reemplazado por una cetona o un grupo epoxi.
- 15 26. El procedimiento según la reivindicación 19, en la cual el compuesto aldehído se selecciona del grupo que consiste en formaldehído, glicidaldehído, glutaraldehído, glioxal, o metilglioxal.
27. El procedimiento según la reivindicación 26, en la cual el compuesto aldehído es formaldehído y en la que el formaldehído está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.05 g/l a aproximadamente 0.8 g/l.
28. El procedimiento según la reivindicación 26, en la cual el compuesto aldehído es formaldehído y en la que el formaldehído está presente en una cantidad que va desde aproximadamente 0.1 g/l a aproximadamente 0.5 g/l.
- 20 29. El procedimiento según la reivindicación 19, que comprende además la etapa de reacción del FCV inactivados y estabilizados con un compuesto de neutralización, en la que el compuesto de neutralización comprende tiosulfato y cisteína.
30. El procedimiento según la reivindicación 19, en la que el FCV inactivados y estabilizados es recuperado por cromatografía de exclusión estérica, ultracentrifugación, y precipitación selectiva.
- 25 31. El procedimiento según la reivindicación 19, que comprende además la etapa de liofilización del FCV inactivados y estabilizados en un excipiente de liofilización.
32. Un procedimiento para la producción de composición inmunogénica inactivada, sin adyuvante, que comprende la mezcla del FCV inactivados y estabilizados de la reivindicación 1 en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune contra el FCV con un excipiente o vehículo aceptable desde el punto de vista veterinario.
- 30 33. Un procedimiento para la producción de una composición inmunogénica inactivada, sin adyuvante para un almacenamiento de larga duración, que comprende la mezcla del FCV inactivados y estabilizados de la reivindicación 1 en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune contra el FCV con un excipiente de liofilización y congelar la composición.
- 35 34. La composición inmunógena inactivada, estabilizada, sin adyuvante de la reivindicación 1 para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un félido contra el FCV.
- 35 35. La composición inmunógena inactivada, estabilizada, sin adyuvante de la reivindicación 17 para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un félido contra el FCV.
36. Combinación que comprende la composición inmunogénica inactivada, estabilizada sin adyuvante de la reivindicación 1 y al menos un inmunógeno no-FCV de otro patógeno felino para su uso en la inducción de una
- 40 37. La combinación según la reivindicación 36, en la que el al menos un patógeno felino adicional se selecciona del grupo que consiste en el herpesvirus felino (FHV), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la panleucopenia felina (FPV), el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la rabia, y la clamidia felina
- 45 38. La combinación según la reivindicación 36, en la que el al menos un inmunógeno no-FCV de un patógeno felino comprende un microorganismo vivo atenuado o un vector recombinante que expresa al menos un inmunógeno de un patógeno felino.

Promedios de las puntuaciones clínicas totales por tipo de de vacunas

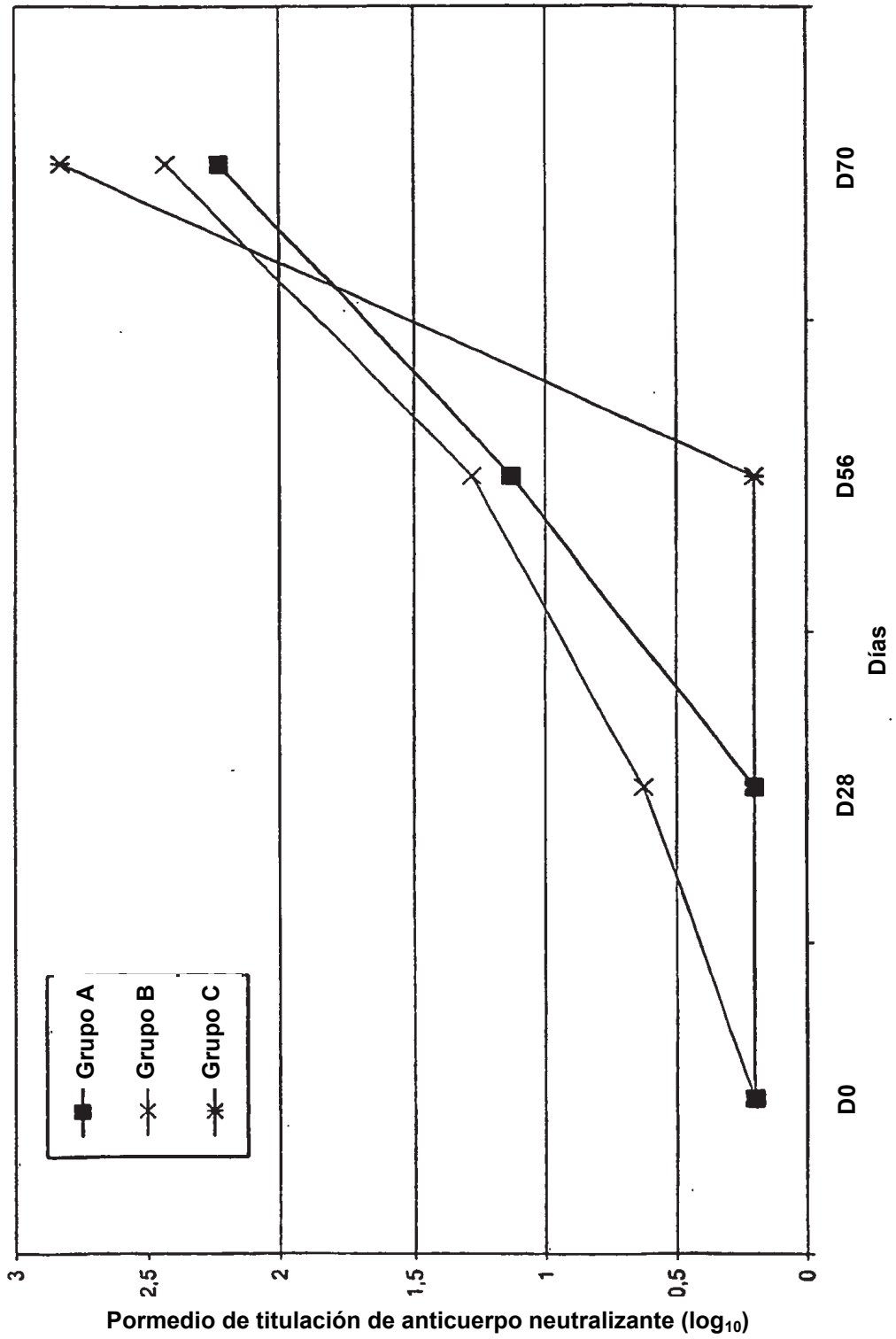


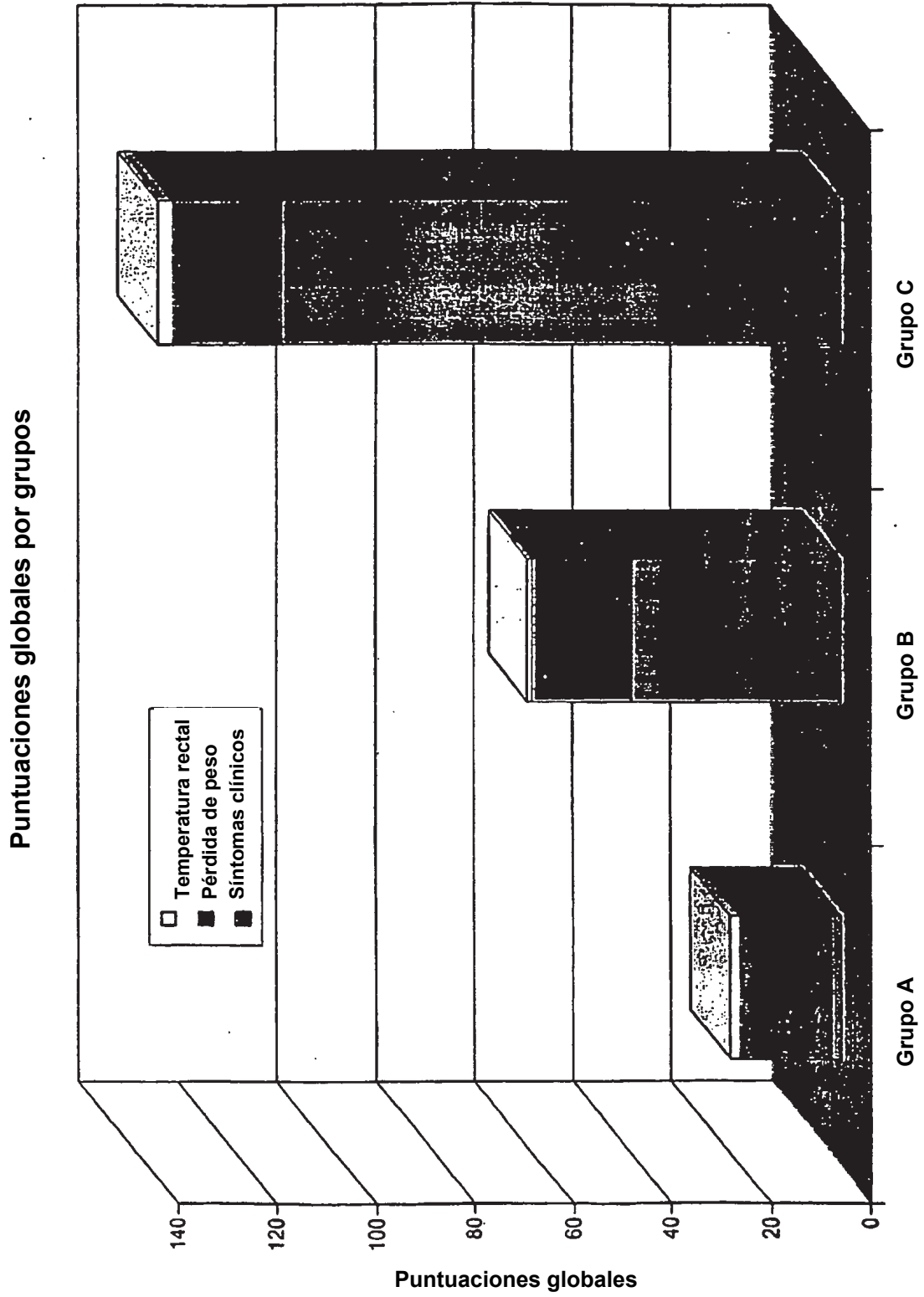


Promedios de las puntuaciones clínicas máximas por tipo de vacunas



Promedios de los títulos de anticuerpos neutralizantes anti-FCV255 por grupo y día





Promedio de excreción FVC ( $\log_{10}$  CCID50/ml) tras la provocación por grupo y día

