

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 328**

51 Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05796311 .8**
- 96 Fecha de presentación: **12.09.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1791561**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54 Título: **Calicivirus felino hemorrágico, vacuna contra calicivirus y procedimiento para prevenir la infección o enfermedad por calicivirus**

30 Prioridad:
13.09.2004 US 609480 P
09.09.2005 US 223099

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.07.2012

73 Titular/es:
WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US

72 Inventor/es:
HUANG, Chengjn y
HESS, Jennifer

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 328 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

Calicivirus felino hemorrágico, vacuna contra calicivirus y procedimiento para prevenir la infección o enfermedad por calicivirus

Remisión a solicitudes de Estados Unidos relacionadas

- 5 La presente solicitud no provisional reivindica el beneficio en virtud de 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/609.480, presentada el 13 de septiembre de 2004.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere a una nueva cepa aislada y purificada de calicivirus felino hemorrágico virulento, vacunas producidas a partir de la misma y el uso de las vacunas para proteger a los gatos de la infección o enfermedad por calicivirus.

Descripción de la técnica relacionada

- 15 El calicivirus felino (FCV) a menudo causa una crisis aguda en entornos con muchos gatos, particularmente hospitales de animales y, a un menor grado, refugios de animales. Típicamente, la infección por FCV presenta signos que se parecen a la rinotraqueítis vírica (FVR) afectando al tracto respiratorio superior y, en ocasiones, produciendo dolor en las articulaciones y cojera. Adicionalmente, el gato infectado desarrollará úlceras en la lengua y en la región de la boca. Parecen ser frecuentes vesículas y erosiones de los conductos nasales, el paladar duro y la lengua. Otros síntomas de la enfermedad por FCV incluyen fiebre alta, pérdida de pelo, ulceraciones cutáneas y edema (hinchamiento) en las patas y alrededor de la cara. Dependiendo de la virulencia de la cepa infectante, la infección por FCV puede llegar a ser letal. El modo principal de transmisión de la infección es a través de la vía oral, pero los gatos también pueden infectarse por inhalación de un virus infeccioso encontrado en la saliva, las heces o la orina de gatos infectados.

- 25 La infección por FCV puede afectar tanto a gatos domésticos como a algunas especies felinas salvajes. Como el FVR y el FCV comprenden casi el 90% de todas las infecciones respiratorias en felinos, la disponibilidad de vacunas eficaces para evitar estas dos enfermedades es de gran trascendencia. El FCV es un virus ARN monocatenario capaz de mutar en nuevas cepas (J. N. Burroughs y col., "Physio-chemical evidence for the re-classification of the caliciviruses," *Journal Gen. Virol.* 22:281-286 (1974)). Existen más de sesenta y cinco calicivirus felinos en todo el mundo, lo que hace que la protección adecuada por vacunación usando una vacuna de un único componente sea en gran medida incompleta y difícil. Como el virus es capaz de mutar, las vacunas monovalentes basadas en una única cepa de FCV pueden no ser suficientemente protectoras contra otras cepas de FCV (véase en líneas generales, N. C. Pedersen y col., "Mechanisms for persistence of acute and chronic feline calicivirus infections in the face of vaccination," *Veterinary Microbiol.* 47(1-2):141-156 (noviembre 1995); A. Lauritzen y col., "Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom," *Veterinary Microbiol.* 56(1-2):55-63 (mayo 1997); T. Hohdatsu y col., "neutralizing feature of commercially available feline calicivirus (FCV) vaccine immune sera against FCV field isolates," *Journal of Veterinary Medicine Sci.*, 61(3):299-301 (marzo. 1999); A. D. Radford y col., "Comparison of serological and sequence-based methods for typing feline calicivirus isolates from vaccine failures," *Vet. Rec.* 146(5):117-123 (29 de enero de 2000)).

- 40 Otro problema con el FCV es que el virus es altamente contagioso, los gatos infectados seguirán propagando el virus durante largos periodos de tiempo después de la infección y los gatos recuperados pueden seguir siendo portadores del virus infeccioso durante toda la vida. Los gatos asintomáticos pueden incluso propagar la enfermedad letal a otros gatos sanos. Se ha informado de brotes recientes en el Norte de California y Nueva Inglaterra de dos cepas genéticamente diversas de calicivirus hemorrágico altamente virulento que eran particularmente letales para la población felina en refugios de animales, llamadas FCV-Ari y FCV-Diva, respectivamente (N. C. Pedersen y col., "An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus," *Veterinary Microbiol.* 73:281-300 (mayo 2000); E. M. Schorr-Evans y col., "An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England," *Journal of Feline Medicine and Surgery* 5:217-226 (2003)).

- 50 En el pasado, se han descrito vacunas virales monovalentes y se han fabricado varias para prevenir enfermedades felinas usando una diversidad de antígenos tales como la cepa F9 de calicivirus felino (patente de Estados Unidos N° 3.944.469 (J. L. Bittle y col.)), *Chlamydia psittaci* felina (patentes de Estados Unidos N° 5.972.350 y N° 5.242.686 (H.-J. Chu y col.)), el virus de la leucemia felina (patente de Estados Unidos N° 4.264.587 (N. C. Pedersen y col.)) y similares. También se ha aislado y descrito previamente otras cepas de calicivirus tales como la FCV-M8 y FCV-255 y el virus de la rinotraqueítis felina para su uso en vacunas (E. V. Davis y col., "Studies on the safety and efficacy of an intranasal feline rhinotracheitis-calici virus vaccine," *VM-SAC* 71:1405-1410 (1976); D. E. Kahn y col., "Induction of immunity to feline caliciviral disease," *Infect. Immun.* 11:1003-1009 (1975); D. E. Kahn, "Feline viruses: pathogenesis of picornavirus infection in the cat," *Am. J. Vet. Research* 32:521-531 (1971)). Además, la patente de Estados Unidos N° 4.522.810 (N. C. Pedersen) describe una vacuna contra calicivirus felino que contiene la cepa

FCV-2280. La patente de Estados Unidos N° 6.231.863 (D. Colau y col.) describe secuencias de nucleótidos a partir del genoma de la cepa FCV-2280 y vacunas que usan las secuencias de nucleótidos del gen de la cápsida para prevenir la enfermedad por calicivirus felino. La patente de Estados Unidos N° 5.106.619 (G. P. Wieseahn y col.) describe la preparación de vacunas virales inactivadas que incluyen calicivirus felino entre otros. La patente de Estados Unidos N° 6.051.239 (L. Simpson y col.) describe vacunas orales que usan una toxina botulínica modificada junto con antígenos tales como el calicivirus.

Más recientemente, se identificó una cepa de FCV-Kaos (K. F. Hurley y col., "An Outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease, J. Am. Vet. Med. Assoc. 224(2):241-249 (15 de enero de 2004)) y, posteriormente, se aislaron tanto la cepa FCV-Kaos como la FCV-Ari (solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040180064 A1, Hemorrhagic feline calicivirus, pub. 16 de septiembre de 2004). Las cepas de calicivirus sistémico virulento aisladas (VS-FCV), incluyendo FCV-Kaos, FCV-Ari y FCV-Bellingham, se han descrito comprendiendo una proteína de cápsida que incluye un resto aminoácido seleccionado entre el grupo compuesto por lisina (k) en la posición del aminoácido 448; ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 452; lisina (K) en la posición del aminoácido 581; y ácido aptico (D) en la posición del aminoácido 581 (solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040259225 A1, Virulent systemic feline calicivirus, pub. 23 de diciembre de 2004).

Se han preparado o descrito vacunas multivalentes que contienen mezclas de muchos antígenos víricos tales como *Chlamydophila felis* (anteriormente conocida como *Chlamydia psittaci* felina) en combinación con uno o más patógenos que comprenden el virus de la leucemia felina, el virus de la panleucopenia felina, el calicivirus felino, el virus de la rinotraqueítis felina, el virus de la inmunodeficiencia felina adquirida, el virus de la rabia, el virus de la peritonitis infecciosa felina, *Borrelia burgdorferi* y similares (patente de Estados Unidos N° 6.004.563 (H.-J. Chu y col.)). Otra mezcla del virus de la leucemia felina del aislado Rickard, el virus de la rinotraqueítis felina, el calicivirus felino y el virus de la panleucemia felina se ha descrito de forma similar como una vacuna (patente de Estados Unidos N° 5.374.424 (W. H. Kelsey y col.)).

Desafortunadamente, ninguna de las vacunas anteriores que contienen cepas usadas previamente del calicivirus felino protege adecuadamente al felino contra la aparición de cepas hemorrágicas del calicivirus felino. En los recientes brotes de calicivirus felino hemorrágico, hubo una cantidad significativa de muertes a pesar del hecho de que los gatos habían recibido vacunaciones contra el calicivirus.

Como consecuencia, existe una necesidad definitiva reconocida en la técnica en el campo de la veterinaria de producir una vacuna eficaz y segura contra infecciones del calicivirus felino hemorrágico altamente virulento. Otra necesidad reconocida en la técnica es proporcionar una vacuna viral de amplio espectro que proteja a los gatos contra la infección y la enfermedad graves causadas por cepas de FCV hemorrágicas y comunes. La nueva cepa de FCV de la presente invención es capaz de satisfacer esas necesidades provocando de forma única y ventajosa una respuesta inmune específica contra la cepa hemorrágica virulenta de FCV para proteger a los gatos de la enfermedad vírica aguda y crónica. En combinación con cepas de calicivirus comunes, la nueva cepa de FCV de esta invención es capaz de conseguir excelentes títulos de anticuerpos neutralizantes del virus y de hacer posible la inmunización de amplio espectro.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa de FCV hemorrágica altamente infecciosa, denominada FCV-DD1 como se define en la reivindicación 1, que es útil como cepa de vacuna como se describe en las reivindicaciones 2-13. Una realización adicional de la invención lleva al uso de dicha vacuna definida en las reivindicaciones 14-15. También se describen procedimientos para diagnosticar o detectar el calicivirus felino hemorrágico en un huésped susceptible, un portador asintomático y similares detectando la presencia del calicivirus felino FCV-DD1 o anticuerpos creados o producidos contra el antígeno del calicivirus felino FCV-DD1.

Breve descripción de las distintas vistas de los dibujos

No aplicable

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una nueva cepa altamente infecciosa del calicivirus felino (FCV) y vacunas veterinarias para proteger a los gatos de la infección vírica causada por el calicivirus. Más específicamente, la invención describe un calicivirus felino hemorrágico aislado y purificado "FCV-DD1" como se describe en la reivindicación 1 e incluye los clones virales derivados del aislado FCV-DD1. (Siempre que se mencione el aislado FCV-DD1 en este documento, se entiende que los clones virales pueden sustituir al aislado parental en cada caso.) También se describen vacunas que contienen una cantidad inmunogénica del FCV-DD1 como se describe en las reivindicaciones 2-13 y el uso de dicha vacuna como se define en las reivindicaciones 14-15. La vacuna puede contener opcionalmente uno o más aislados adicionales de FCV tales como, por ejemplo, FCV-255, FCV-2280, FCV-Diva, FCV-Kaos, FCV-Bellingham, FCV-F9, FCV-F4, FCV-M8, etc. De forma deseable, la vacuna contendrá FCV-DD1 junto con FCV-255, FCV-2280 o ambos y, más preferiblemente, la mezcla de FCV-DD1 con FCV-255.

Además, la vacuna puede contener opcionalmente otros antígenos o patógenos tales como *Chlamydomphila felis* (*C. felis*), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la panleucopenia felina (FPV), el virus de la rinotraqueítis felina (FVR), el virus de la inmunodeficiencia felina, el virus de la rabia, el virus de la peritonitis infecciosa felina, la bacteria *Bartonella* (por ejemplo, la típica enfermedad por arañazo de gato), una combinación de los mismos y similares. Preferiblemente, la mezcla de antígenos comprende FCV-DD1 en combinación con *C. felis*, el virus de la leucemia felina, el virus de la panleucopenia felina y el virus de la rinotraqueítis felina o en combinación con *C. felis*, el virus de la panleucopenia felina y el virus de la rinotraqueítis felina. Una vacuna multivalente particularmente preferida comprende FCV-DD1, un calicivirus felino no hemorrágico tal como FCV-255, el virus de la rinotraqueítis felina y el virus de la panleucopenia felina, con la adición opcional del virus de la leucemia felina y/o *C. felis*, u otras cepas de FCV.

Previamente al descubrimiento de la nueva cepa FCV-DD de calicivirus felino hemorrágico, se obtuvo una muestra de cultivo tisular de FCV-Ari del Dr. Neils Pedersen en la School of Veterinary Medicine, UC Davis, California (N. C. Pedersen y col., "An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus," *Veterinary Microbiol.* 73:281-300 (mayo 2040)). La muestra de FCV-Ari se congeló, se descongeló y se usó para infectar un cultivo tisular en frasco rotatorio de células de Riñón Felino Crandrell confluyentes (CRFK). (R. A. Crandell y col., "Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK)," *In Vitro* 9:176-185 (1973)). Posteriormente, el frasco rotatorio se congeló, se descongeló y se hicieron alícuotas del fluido de cultivo como solución madre de trabajo.

La "solución madre de trabajo" de FCV-Ari inicial se usó para inocular gatos para confirmar que la "solución madre de trabajo" del material recibido del Dr. Neils Pedersen contenía calicivirus hemorrágico. Los gatos inoculados con la "solución madre de trabajo" de FCV-Ari generaron signos clínicos extremos tales como altas temperaturas, edema, deshidratación y muerte, confirmando que la "solución madre de trabajo" de FCV-Ari contenía calicivirus hemorrágico.

Después la "solución madre de trabajo" de FCV-Ari se diluyó a un título de 10^5 TCID₅₀ por ml, se congeló, se descongeló, y se filtró a 0,2 μ m. El FCV-Ari filtrado se usó para la posterior purificación y aislamiento de la cepa de calicivirus más virulenta. El FCV-Ari filtrado se aclaró, se diluyó en serie y se usó para infectar placas de cultivo tisular de 24 pocillos confluyentes con células CRFK. El pocillo de la dilución más elevada que contenía un efecto citopático (CPE) en las células CRFK se recolectó, se congeló, se descongeló rápidamente, se diluyó en serie, y se usó para infectar otra placa de cultivo tisular de 24 pocillos confluyentes con células CRFK. Este procedimiento se repitió dos veces para un total de tres rondas de purificación y aislamiento.

Una parte del FCV-Ari purificado de este modo se inactivó en formalina y se usó para preparar una vacuna monovalente inactivada. Esta vacuna FCV-Ari inactivada se inyectó en gatos para medir la respuesta serológica a la vacunación. Inesperadamente, la vacuna no logró inducir títulos de anticuerpos neutralizantes del virus aunque se indujeron anticuerpos contra el virus, como se confirmó por ELISA. Además, el FCV-Ari purificado (vivo) se usó para inocular dos grupos de gatos. Estos dos grupos de gatos no mostraron signos clínicos característicos de una infección por calicivirus hemorrágico tales como altas temperaturas, edema, pioderma, alopecia, etc. Como la vacuna inactivada no indujo anticuerpos neutralizantes y la cepa viva purificada de la "solución madre de trabajo" de FCV-Ari no causó infección por calicivirus hemorrágico en un estudio de exposición controlada, se confirmó que el virus aislado de la primera purificación de la muestra de FCV-Ari no era el aislado hemorrágico; se cesó todo trabajo y desarrollo de vacunas adicional de esta cepa. Después se supuso que la muestra de virus original de FCV-Ari contenía dos cepas de FCV o posiblemente más, al menos una de las cuales no era virulenta, como se demostró por la cepa aislada que se obtuvo de la primera purificación.

En un intento de aislar la cepa virulenta que causaba la infección por calicivirus felino hemorrágico, la muestra de cultivo tisular original de FCV-Ari se usó para tres rondas de purificación y aislamiento. Para lograr la tarea, la muestra de FCV-Ari se incubó con los antisueros generados de la vacunación original con FCV-Ari (inactivado). El virus se diluyó en serie y se usó para infectar placas de cultivo tisular de 24 pocillos confluyentes con células CRFK, y se recolectaron los pocillos de la dilución más elevada que presentaron un efecto citopático (CPE) en las células CRFK. Los clones virales recolectados se evaluaron por ensayos convencionales de neutralización de virus en suero. Cada clon viral se incubó con los antisueros generados de la primera purificación de vacuna inactivada, o con los antisueros generados de la exposición con la "solución madre de trabajo" viva. Los resultados de este ensayo de neutralización en suero mostraron, sorprendentemente, que había más de una cepa de calicivirus en la muestra original y confirmaron adicionalmente que la cepa aislada de la primera ronda de purificación no era la cepa hemorrágica. Los clones virales que no se seleccionaron y se desecharon fueron aquellos que se neutralizaron por los antisueros específicos para el producto no deseado de la primera purificación. Los clones virales seleccionados para las posteriores rondas de purificación fueron aquellos que se neutralizaron por los antisueros contra el virus original del Dr. Pedersen pero no se neutralizaron por los antisueros específicos contra el producto no deseado de la primera purificación. La selección del clon viral por recolección de la dilución más elevada que causaba CPE se repitió para un total de tres rondas. El aislado de virus resultante, denominado FCV-DD1, se inoculó en gatos y los gatos mostraron signos clínicos típicos de calicivirus hemorrágico. Mediante este procedimiento, se determinó que la cepa FCV-DD1 purificada y aislada era una verdadera cepa de calicivirus felino hemorrágico, previamente desconocida en el campo veterinario.

Por consiguiente, la nueva cepa FCV-DD1 purificada y aislada, las vacunas de FCV-DD1 y los procedimientos para usar el calicivirus se describen en este documento. Los gatos inoculados están protegidos contra la infección vírica grave y la enfermedad causada por el calicivirus. El nuevo procedimiento protege a los gatos que necesitan protección contra la infección vírica administrando al gato una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna descrita en este documento, tal como, por ejemplo, la vacuna que contiene FCV-DD1 o su clon inactivado, vivo modificado o atenuado. Las vacunas pueden contener adicionalmente antígenos adicionales para promover la protección inmunológica de los gatos contra múltiples enfermedades felinas incluyendo, aunque sin limitación, cepas de calicivirus no hemorrágicas, por ejemplo, FCV-255, FCV-2280, etc., otras cepas de calicivirus hemorrágicas, por ejemplo, FCV-Diva, FCV-Kaos, FCV-F9, etc. y otros antígenos adecuados tales como el virus de la rinotraqueítis felina, el virus de la panleucopenia felina (moquillo felino), *Chlamydophilia felis* (*C. felis*), etc. Los antígenos adicionales pueden administrarse de forma concurrente al gato en un producto de combinación o por separado para proporcionar un amplio espectro de protección contra infecciones víricas. Más preferiblemente, la mezcla contiene FCV-DD1, FCV-255, *C. felis*, el virus de la leucemia felina, el virus de la panleucopenia felina y el virus de la rinotraqueítis felina o, como alternativa, FCV-DD1, FCV-255, el virus de la panleucopenia felina y el virus de la rinotraqueítis felina, virus inactivado y, opcionalmente, el virus de la leucemia felina y/o *C. felis* u otras cepas de FCV. Para ampliar el alcance de protección conferido por la vacuna que contiene FCV-DD1 contra infección o enfermedad de un modo complementario, es de ayuda que la vacuna multivalente contenga dos o más cepas de FCV, en la que la cepa adicional de FCV puede incluir, aunque sin limitación, FCV-255, FCV-2280, FCV-Diva, FCV-Kaos, FCV-Bellingham, FCV-F9, FCV-F4, FCV-M8, etc.; y es particularmente beneficioso incluir al menos una o más cepas no hemorrágicas tales como FCV-255, FCV-2280, etc. Cuando se emplean ciertos antígenos de FCV tales como FCV-F9, es deseable crear una vacuna viva modificada o atenuada para adecuar la virulencia del virus. Una combinación preferida de antígenos en una vacuna es una en la que el calicivirus felino adicional con FCV-DD1 comprende FCV-255, FCV-2280 o la combinación de FCV-255 y FCV-2280, junto con al menos el virus de la panleucopenia felina y el virus de la rinotraqueítis felina.

Las vacunas comprenden, por ejemplo, la cepa vírica infecciosa como un virus inactivado (muerto), un virus atenuado, un virus vivo modificado, etc. en combinación con un vehículo o diluyente no tóxico, fisiológicamente aceptable y otros excipientes inertes, adyuvantes o coformulantes convencionales tolerados por las especies felinas. La cepa FCV-DD1 aislada y purificada o su clon viral pueden usarse como vacuna monovalente en la que la protección depende de su capacidad de proporcionar protección contra la infección por otros serotipos a través de neutralización cruzada. La inoculación repetida con el mismo serotipo confiere típicamente protección contra una posterior infección grave.

Las nuevas vacunas descritas en este documento no están restringidas a ningún tipo o procedimiento particular de preparación. Las vacunas virales incluyen, aunque sin limitación, vacunas inactivadas (virus muerto), vacunas vivas modificadas, vacunas atenuadas, vacunas de subunidad, vacunas diseñadas por ingeniería genética, etc. Estas vacunas se preparan por procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Las vacunas más preferidas para el suministro de la nueva cepa FCV-DD1 para inocular a los gatos contra la infección y enfermedad por FCV virulento son las vacunas de virus inactivados (muertos) o vivos modificados.

Para preparar vacunas de virus inactivados, por ejemplo, la propagación del virus se hace por procedimientos conocidos en la técnica o descritos en este documento. La inactivación del virus se consigue por protocolos generalmente conocidos para los especialistas en la técnica. Las vacunas de virus inactivado pueden prepararse tratando el virus con agentes inactivantes tales como formalina o disolventes hidrófobos, ácidos, beta propiolactona, etilnimina binaria, etc. La formalina es el agente inactivante más preferido. La inactivación se realiza de un modo comprendido en la técnica. Por ejemplo, para conseguir la inactivación química, se trata una muestra vírica o muestra sérica adecuada que contenga el virus durante un periodo de tiempo suficiente con una cantidad o concentración suficiente de agente inactivante a una temperatura o pH suficientemente alto o bajo, dependiendo del agente inactivante, para inactivar el virus. El virus se considera inactivado si es incapaz de infectar una célula susceptible a infección.

La preparación de vacunas de subunidad difiere típicamente de la preparación de una vacuna viva modificada o una vacuna inactivada. Antes de la preparación de una vacuna de subunidad, los componentes protectores o antigénicos de la vacuna deben identificarse. Dichos componentes protectores o antigénicos incluyen, por ejemplo, las proteínas inmunogénicas o proteínas de cápsida de la cepa vírica. Estos componentes inmunogénicos se identifican por procedimientos conocidos en la técnica. Una vez identificados, las partes protectoras o antigénicas del virus (es decir, la subunidad) se purifican posteriormente por procedimientos convencionales y/o se clonan por técnicas convencionales de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Maniatis y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, MA., 1989). La vacuna de subunidad proporciona una ventaja sobre otras vacunas basadas en virus vivo ya que la subunidad, tal como subunidades altamente purificadas del virus, es menos tóxica que el virus completo.

Para preparar vacunas atenuadas a partir de clones virales virulentos, primero se atenúa el FCV patógeno vivo, adaptado a cultivo tisular, por procedimientos conocidos en la técnica, lo que se hace típicamente por pases en serie a través de cultivos celulares. La atenuación de los clones patogénicos también puede hacerse introduciendo mutaciones puntuales, realizando deleciones génicas en el genoma viral.

Se administra una cantidad inmunológicamente eficaz o inmunogénica de la vacuna descrita en este documento a un felino que necesite protección contra infección vírica, de habitualmente 8 a 10 semanas de edad o más mayor. La cantidad inmunológicamente eficaz o inmunogénica que se inocula en el gato contra la infección y enfermedad por FCV pueden determinarla o titularla fácilmente por ensayo rutinario los especialistas en el campo veterinario. Una cantidad eficaz es una en la que se obtiene una respuesta inmunológica suficiente contra la vacuna para proteger al gato expuesto al virus felino virulento. Esta respuesta inmunológica para FCV generalmente se muestra a través de la capacidad de la vacuna de inducir títulos de anticuerpos neutralizantes del virus. Preferiblemente, el gato se protege a un grado en el que uno o todos los síntomas fisiológicos o efectos adversos de la patología vírica se reducen significativamente, mejoran o se previenen totalmente.

La vacuna se administra típicamente en una dosis única o dosificaciones repetidas en el tiempo. Las dosificaciones varían, por ejemplo, de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 3,5 ml, habitualmente de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 2,5 ml, preferiblemente de aproximadamente 0,8 ml a aproximadamente 1,2 ml, y mucho más preferiblemente, a aproximadamente 1,0 ml, dependiendo de la concentración del componente inmunogénico de la vacuna, pero no deben contener una cantidad de antígeno basado en el virus suficiente para provocar una reacción adversa o síntomas fisiológicos de infección vírica. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para determinar o titular dosificaciones adecuadas de agente antigénico activo para encontrar dosificaciones eficaces mínimas basadas en el peso del gato, la concentración del antígeno y otros factores típicos. Para una inmunización óptima, se vacuna a un gato sano con una dosis de aproximadamente 1 ml usando una técnica aséptica y luego se administra una segunda dosis de 1 ml en aproximadamente dos a cuatro semanas después. Para mantener una buena inmunidad contra la infección es útil la revacunación anual con un único refuerzo de la vacuna.

La vacuna puede administrarse convenientemente por vía intranasal, transdérmica (es decir, aplicada sobre o en la superficie cutánea para la absorción sistémica), parenteral, oral, etc., o una combinación tal como oronasal donde parte de la dosis se administra por vía oral y parte se administra en las fosas nasales. La vía parenteral de administración incluye, aunque sin limitación, intramuscular, subcutánea, intradérmica (es decir, inyectada o situada de otro modo bajo la piel), intravenosa y similares. Las vías intramuscular, subcutánea y oronasal de administración son las más preferidas.

Cuando se administra en forma de un líquido, la presente vacuna puede prepararse en una forma convencional de una solución acuosa, jarabe, elixir, tintura y similares. Dichas formulaciones son conocidas en la técnica y se preparan típicamente por disolución o dispersión del antígeno y otros aditivos en los sistemas de vehículo o disolvente apropiados para su administración a gatos. Los vehículos o disolventes no tóxicos, fisiológicamente aceptables adecuados incluyen, aunque sin limitación, agua, solución salina, etilenglicol, glicerol, etc. La vacuna también puede liofilizarse o secarse por congelación de otro modo y después reconstituirse asépticamente o rehidratarse usando un diluyente adecuado poco antes de su uso. Los diluyentes adecuados incluyen, aunque sin limitación, solución salina, medio esencial mínimo de Eagle y similares. Los aditivos típicos o coformulantes son, por ejemplo, colorantes certificados, aromas, edulcorantes y uno o más conservantes antimicrobianos tales como timerosal (etilmercuritosalicilato sódico), neomicina, polimixina B, anfotericina B y similares. Dichas soluciones pueden estabilizarse, por ejemplo, por la adición de gelatina parcialmente hidrolizada, sorbitol o medio de cultivo celular, y pueden tamponarse por procedimientos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como hidrogenofosfato sódico, dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato potásico, dihidrogenofosfato potásico, una mezcla de los mismos, y similares.

Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión o emulsión en combinación con otros coformulantes convencionales. Estos tipos de formulaciones líquidas pueden prepararse por procedimientos convencionales. Las suspensiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un molino coloidal. Las emulsiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un homogeneizador.

Las formulaciones parenterales, diseñadas para su inyección en sistemas de fluidos corporales, requieren una isotonicidad y tamponamiento del pH apropiados a los niveles correspondientes de los fluidos corporales de los felinos. La isotonicidad puede ajustarse apropiadamente con cloruro sódico y otras sales según sea necesario. En el momento de la vacunación, el virus se descongela (si está congelado) o se reconstituye (si está liofilizado) con un vehículo fisiológicamente aceptable tal como agua desionizada, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, o similares. Pueden usarse disolventes adecuados, tales como propilenglicol, para aumentar la solubilidad de los ingredientes en la formulación y la estabilidad de las preparaciones líquidas.

Los aditivos adicionales que pueden emplearse en la presente vacuna incluyen, aunque sin limitación, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales, tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). Otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables que pueden suplementar opcionalmente la formulación de vacuna incluyen, aunque sin limitación, tensioactivos, polianiones, policationes, péptidos, emulsión de aceite mineral, inmunomoduladores, una diversidad de combinaciones y similares. Ejemplos no limitantes adicionales de adyuvantes adecuados incluyen escualano y escualeno (u otros aceites de origen animal); copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno tales como Pluronic® (L121, por ejemplo, disponible en el mercado en BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Alemania); saponina; detergentes tales como Tween®-80 (polisorbato 80, disponible en el mercado en Sigma Chemical Co., San Luis, MO); Quil A (nombre comercial de una forma purificada

de Quillaja saponaria, disponible en Iscotec AB, Sweden and Superfos Biosector a/s, Vedbaek, Dinamarca); aceites minerales tales como Marcol[®] (una mezcla purificada de hidrocarburos saturados líquidos, disponible en el mercado en ExxonMobil, Fairfax, VA); aceites vegetales tales como aceite de cacahuete; adyuvantes derivados de corinebacterias tales como *Corynebacterium parvum*; adyuvantes derivados de propionibacterias tales como *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis* (bacilo de Calmette-Guerin, o BCG); interleuquinas tales como interleuquina-2 e interleuquina-12; interferones tales como interferón gamma; combinaciones tales como saponina-hidróxido de aluminio o Quil A-hidróxido de aluminio; liposomas; adyuvante iscom; extracto de pared celular micobacteriana; glucopéptidos sintéticos tales como muramil dipéptidos u otros derivados; N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina (avridina); Lípido A; sulfato de dextrano; DEAE-dextrano; carboxipolimetileno, tal como Carbopol[®] (polímero poliacrílico disponible en el mercado en B.F.Goodrich Company, Cleveland, Ohio); anhídrido etileno maleico o copolímeros de etileno/anhídrido maleico (EMA[®], un copolímero de etileno/anhídrido maleico lineal que tiene aproximadamente la misma cantidad de etileno y anhídrido maleico, con un peso molecular promedio estimado de aproximadamente 75.000 a 100.000, disponible en el mercado en Monsanto Co., San Louis, MO); emulsiones de copolímero acrílico tales como un copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y ácido metacrílico como NeoCryl[®] A640 (por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.047.238, un copolímero de ácido acrílico acuoso no combinado de ácido acrílico y ácido metacrílico mezclado con estireno, disponible en el mercado en Polyvinyl Chemicals, Inc, Wilmington, MA); proteínas de poxvirus animal; adyuvantes de partículas subvirales tales como orbivirus; toxina colérica; bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA, disponible en el mercado en Kodak, Rochester, NY); o mezclas de los mismos. Un adyuvante preferido comprende copolímero de etileno/anhídrido maleico, copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y ácido metacrílico, emulsión de aceite mineral o combinaciones de los mismos.

Para ilustrar ejemplos de cómo preparar el antígeno de FCV-DD1 y crear vacunas de FCV-DD1 inactivado, se usó el virus para infectar células CRFK confluyentes a una MOI de 0,01 (típicamente varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0) en frascos rotatorios de cultivo tisular. Los fluidos del virus se recogieron cuando se observó una CPE del 90-100%. Los fluidos recogidos se inactivaron con formalina al 0,04% a 36°C durante 4 días. La formalina residual se neutralizó por la adición de bisulfito sódico. Las vacunas de FCV-DD1 inactivado que contenían de aproximadamente el 0,5% p/v a aproximadamente el 10% p/v de FCV-DD1 se formularon después para que contuvieran FCV-DD1 inactivado por formalina solo; FCV-DD1 en combinación con FeLV inactivado (en la cantidad de aproximadamente el 5,0% p/v a aproximadamente el 50% p/v), FPV (en la cantidad de aproximadamente el 0,5% p/v a aproximadamente el 10% p/v), FCV-255 (en la cantidad de aproximadamente el 0,5% p/v a aproximadamente el 10% p/v), FVR (en la cantidad de aproximadamente el 1,0% p/v a aproximadamente el 20% p/v) y *C. felis* (en la cantidad de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 10% p/v); y FCV-DD1 en combinación con FPV (en la cantidad de aproximadamente el 0,5% p/v a aproximadamente el 10% p/v), FCV-255 (en la cantidad de aproximadamente el 0,5% p/v a aproximadamente el 10% p/v) y FVR (en la cantidad de aproximadamente el 1,0% p/v a aproximadamente el 20% p/v). Las vacunas se adyuvan adecuadamente; y se añadió medio esencial mínimo de Eagle como diluyente de mezcla. La cantidad de cada antígeno en las vacunas se determinó usando un ensayo de potencia ELISA específico de antígeno. Se descubrió que las vacunas inducían inmunidad protectora contra FCV hemorrágico en ensayos de exposición por vacunación convencional. La ausencia de interferencia de otras fracciones de la vacuna del FCV-DD1 se confirmó por ensayos de exposición o serológicos. También se preparó otra formulación de vacuna que contenía FCV-DD1, FPV, FCV-255, FVR y *C. felis*.

En este documento también se describe un nuevo procedimiento para proteger a un felino contra una infección o prevenir una enfermedad causada por calicivirus felino que comprende administrar al felino una cantidad inmunológicamente eficaz de las vacunas descritas en este documento que contienen el calicivirus felino hemorrágico aislado y purificado FCV-DD1. Procedimientos adicionales protegen al felino contra la infección o previenen la enfermedad causada por otros agentes patogénicos usando uno o más antígenos junto con FCV-DD1 tales como, por ejemplo, el virus de la leucemia felina, el virus de la panleucopenia felina, el virus de la rinotraqueítis felina, el virus de la inmunodeficiencia felina, el virus de la rabia, el virus de la peritonitis infecciosa felina, *Bartonella*, etc. y, más preferiblemente, una combinación de los antígenos que abarcan uno o más calicivirus felinos no hemorrágicos tales como FCV-255, el virus de la rinotraqueítis felina y el virus de la panleucopenia felina, con la adición opcional del virus de la leucemia felina y/o *C. felis*, u otras cepas de FCV hemorrágicas, que comprenden la administración al felino de una cantidad inmunológicamente eficaz de las vacunas multivalentes descritas en este documento.

Adicionalmente se describen los anticuerpos que se crean o producen contra el antígeno FCV-DD1. Los anticuerpos pueden crearse o producirse por procedimientos *in vitro* o *in vivo* que son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento *in vivo* típico para estimular la formación de anticuerpos contra FCV-DD1 comprende la administración directa al felino de una cantidad inmunológicamente eficaz de FCV-DD1 o una subunidad antigénica del mismo que será suficiente para inducir títulos detectables de anticuerpos neutralizantes del virus. Pueden usarse tanto los anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno FCV-DD1 como los anticuerpos policlonales útiles para reconocer diferentes epítopes de las cepas de calicivirus hemorrágico estrechamente relacionadas con el antígeno FCV-DD1. Procedimientos adicionales se basan en la interacción antígeno-anticuerpo y la capacidad del antígeno FCV-DD1 y los anticuerpos anti FCV-DD1 de formar un complejo inmune detectable; dichos procedimientos incluyen un procedimiento para detectar o diagnosticar una infección por calicivirus felino hemorrágico en un huésped susceptible que comprende analizar una muestra biológica del huésped

y detectar la presencia de FCV-DD1 o un anticuerpo creado o producido contra FCV-DD1 en la muestra biológica y un procedimiento para detectar el anticuerpo anti-FCV-DD1 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con un antígeno que comprende FCV-DD1 y detectar u observar la formación de un complejo inmune antígeno-anticuerpo. El antígeno usado en estos procedimientos es, por ejemplo, el virus completo FCV-DD1, una subunidad antigénica de FCV-DD1 tal como la proteína de cápsida inmunogénica y similares.

Se describe un procedimiento adicional para detectar un portador del calicivirus felino hemorrágico, justificado porque el virus es altamente contagioso y virulento. El FCV infeccioso puede portarse o transmitirse mediante un gato asintomático a otros gatos, o los cuidadores en un entorno hospitalario pueden propagar fácilmente la infección de gatos enfermos esparciendo el virus a gatos sanos. Por lo tanto, se presenta un procedimiento para detectar al portador del calicivirus felino hemorrágico que implica las etapas de (a) obtener una muestra de ensayo de gatos asintomáticos (orina, suero, esputo, heces, etc.), cuidadores o propietarios de mascotas (pelos de gato de las prendas, las manos, el mobiliario, etc.), jaulas de los gatos y similares; (b) incubar la muestra de ensayo con un anticuerpo específico para FCV-DD1; (c) permitir la formación de un complejo anticuerpo-antígeno; y (d) detectar la presencia del complejo anticuerpo-antígeno.

El complejo inmune antígeno-anticuerpo puede detectarse por cualquier inmunoensayo convencional que incluye, aunque sin limitación, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia de Western, inmunohistoquímica, citometría de flujo y similares. Las técnicas de citometría de flujo bien conocidas, por ejemplo, pueden usar un dispositivo tal como un citómetro de flujo FACScan de Becton-Dickinson que detecta y mide la cantidad de colorante fluorescente sobre las partículas. Una célula o espécimen de muestra se marca con un anticuerpo marcado con fluorocromo, se elimina por lavado el exceso de anticuerpo no unido, y después la muestra se analiza por el citómetro de flujo. Se observa el grado de fluorescencia y los índices de dispersión láser y se registran para las células de muestra que pasan a través del citómetro. De este modo, los datos presentados en forma de histogramas en color que muestran la relación entre el fluorocromo y la dispersión de luz característica confirma la presencia de antígeno FCV-DD1 unido en la muestra.

Pueden usarse otros ensayos inmunológicos *in vitro* convencionales para la detección de anticuerpos específicos de virus en suero u otras muestras de ensayo a través de procedimientos inmunofluorescentes directos o indirectos de detección de anticuerpos y determinación del título. Los ensayos inmunofluorescentes indirectos pueden usarse para explorar e identificar FCV en un espécimen de muestra. Por ejemplo, se incuba una muestra de ensayo con antígeno FCV-DD1, un fragmento de la proteína de cápsida principal única para FCV-DD1 en la que el fragmento puede ser un péptido sintético o una cadena peptídica corta expresada usando técnicas de ADN recombinante, aislados de calicivirus hemorrágico relacionados y similares, después se depositan y estabilizan en un portaobjetos de vidrio. Si hay anticuerpos anti-FCV-DD1 presentes en la muestra, se forma un complejo inmune antígeno-anticuerpo estable. Después se hace reaccionar el anticuerpo unido con un reactivo conjugado con fluoresceína y se observa el complejo con un microscopio de fluorescencia. Una fluorescencia brillantemente coloreada en el sitio del antígeno confirma la reacción positiva del anticuerpo. Pueden emplearse otras técnicas de ELISA o inmunocromatografía convencionales para propósitos de diagnóstico en la detección de anticuerpos o antígenos acoplados a una enzima de fácil ensayo tal como, por ejemplo, la detección de la presencia de antígenos FCV-DD1 que se reconocen por un anticuerpo monoclonal o ensayos para anticuerpos que reconocen el antígeno FCV-DD1. Los ELISA, en particular, pueden proporcionar una medición útil de las concentraciones de antígeno o anticuerpo. Como alternativa, el antígeno FCV-DD1 puede unirse a un soporte sólido tal como una superficie de poliestireno de una tira de ensayo de micropocillos. La muestra de ensayo, tal como suero de gato, se lava para eliminar el suero residual y después se añade enzima conjugada a peroxidasa. También se añade un sustrato detectable tal como tetrametilbenzidina/peróxido de hidrógeno incolora y se hidroliza por la enzima. El cromógeno cambia a un color azul. Después de detener la reacción con la adición de ácido, la tetrametilbenzidina/peróxido de hidrógeno incolora cambia a amarillo. En el análisis final, la intensidad del color detecta la presencia del complejo anticuerpo-antígeno en la muestra.

La nueva cepa de FCV se ha depositado en las condiciones promulgadas en virtud de 37 C.F.R. § 1.808 y se ha mantenido con arreglo al Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos de América. Específicamente, la muestra de FCV-DD1 se ha depositado en la ATCC el 9 de septiembre de 2004 y se le ha asignado la denominación de depósito de patente ATCC PTA-6204.

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son solamente para ilustrar y no pretenden ser completamente definitivos en cuanto a las condiciones y alcance de esta invención. Debe apreciarse que todos los términos científicos y tecnológicos usados en este documento tienen el mismo significado que el habitualmente entendido por los especialistas en las técnicas veterinaria y farmacéutica. Para propósitos de esta invención, cualquier referencia en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones a la cepa FCV-DD1 incluye los clones virales derivados del aislado FCV-DD1. Estos clones virales pueden sustituir fácilmente a FCV-DD1 en todos los aspectos de las vacunas, procedimientos, etc. descritos en este documento. Además debe apreciarse que cuando se han dado condiciones típicas de reacción (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.), también pueden usarse las condiciones tanto por encima como por debajo de los intervalos especificados, aunque generalmente de forma menos conveniente. Los ejemplos se realizan a temperatura ambiente (de aproximadamente 23°C a aproximadamente 28°C) y a presión atmosférica. Todas las

partes y porcentajes mencionados en este documento son en una base ponderal y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados salvo que se especifique lo contrario.

Puede obtenerse una comprensión adicional de la invención a partir de los ejemplos no limitantes que siguen a continuación.

5 **Ejemplo 1**

INTENTO FALLIDO PARA AISLAR EL CALICIVIRUS FELINO HEMORRÁGICO

10 Se obtuvieron dos matraces de cultivo tisular de 25-cm² de FCV-Ari (marcados 1:100 y 1:1000) del Dr. Neils Pedersen, School of Veterinary Medicine, UC Davis (N. C. Pedersen y col., "An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus," Veterinary Microbiol. 73:281-300 (mayo 2000)). El matraz de FCV-Ari marcado 1:1000 se congeló y se descongeló. Después se usó 1 ml del fluido de cultivo para infectar un frasco rotatorio de cultivo tisular de 850-cm² de células de Riñón Felino Crandell confluyentes (CRFK) (R. A. Crandell y col., "Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK)," In Vitro 9:176-185 (1973)). Dieciséis horas después, el frasco rotatorio se congeló, se descongeló, y se hizo en alícuotas en forma de solución madre de trabajo.

15 La "solución madre de trabajo" de FCV-Ari inicial se usó para inocular gatos para confirmar que el material contenía calicivirus hemorrágico. Los gatos inoculados con la "solución madre de trabajo" de FCV-Ari produjeron signos clínicos extremos tales como pirexia elevada, edema, deshidratación, y muerte. Por tanto, se confirmó que la "solución madre de trabajo" de FCV-Ari contenía el calicivirus hemorrágico.

20 La "solución madre de trabajo" de FCV-Ari se diluyó a un título de aproximadamente 10⁵ TCID₅₀ por ml y se filtró a 0,2 µm. El FCV-Ari filtrado se usó para la purificación/aislamiento de la cepa de calicivirus más virulenta. El FCV-Ari filtrado se diluyó en serie y se usó para infectar placas de cultivo tisular de 24 pocillos confluyentes con células CRFK. El pocillo de la mayor dilución que presentó un efecto citopático (CPE) en la células CRFK se recolectó, se congeló, se descongeló rápidamente, se diluyó en serie, y se usó para infectar otra placa de cultivo tisular de 24 pocillos confluyente con células CRFK. Este procedimiento se repitió dos veces para un total de tres rondas de purificación y aislamiento.

25 El FCV-Ari purificado se inactivó con formalina y se usó para preparar una vacuna monovalente, inactivada. Esta vacuna FCV-Ari (inactivada) se aplicó a gatos para medir la respuesta serológica a la vacunación. La vacuna no indujo títulos de anticuerpos neutralizantes del virus aunque se indujeron anticuerpos contra el virus, confirmado por ELISA.

30 Específicamente, el estudio con la vacuna FCV-Ari inactivada, purificada usó 20 gatos, cinco gatos por grupo en dosis del 0,5% v/v, 2% v/v y 8% v/v con cinco controles (sin inyecciones). Cada uno de los quince gatos recibió 2 dosis de 1 ml por vía subcutánea en la nuca, separadas por tres semanas. Una y dos semanas después de la vacunación final, no hubo títulos medibles de neutralización en suero (SN) contra FCV en el momento en que los títulos SN contra FCV están típicamente en su pico.

35 Para volver a ensayar y confirmar los hallazgos iniciales, cuatro gatos más recibieron 2 dosis de 1 ml separadas por tres semanas con la vacuna FCV-Ari inactivada, purificada. Una semana después de la vacunación final, no hubo títulos medibles de anticuerpos neutralizantes en suero (todos < 2) en el momento en que los títulos de neutralización en suero para FCV son típicamente los más altos.

40 El FCV-Ari purificado (vivo) también se usó para inocular dos grupos de gatos. Los dos grupos de gatos no mostraron signos clínicos característicos de una infección por calicivirus hemorrágico tales como temperaturas elevadas, edema, pioderma, alopecia, etc. Por lo tanto, se confirmó que la cepa purificada de la "solución madre de trabajo" no era una cepa de calicivirus hemorrágico. Como la vacuna tampoco indujo anticuerpos neutralizantes, se cesó todo trabajo y desarrollo adicional de esta cepa.

Ejemplo 2

45 AISLAMIENTO DE FCV-DD1 MEDIANTE CLONACIÓN POR DILUCIÓN LIMITANTE

50 El FCV-Ari original recibido del Dr. Pedersen, marcado 1:100, se usó para tres rondas de clonación por dilución limitante para purificar y aislar FCV-DD1. La muestra FCV-Ari 1:100 se incubó con los antisueros generados de la vacunación FCV-Ari (inactivado) original para neutralizar la cepa FCV aislada de la primera purificación/aislamiento de FCV-Ari. El virus se diluyó en serie y se usó para infectar placas de cultivo tisular de 24 pocillos confluyentes con células CRFK y el pocillo de la mayor dilución que mostró un efecto citopático (CPE) en las células CRFK se recolectó, se congeló, y se descongeló rápidamente. Los clones recolectados se evaluaron por ensayos de neutralización en suero. (Para una descripción general del procedimiento de clonación por dilución limitante y los ensayos de neutralización en suero usados para distinguir y aislar cepas de FCV, véase H. Poulet y col., "Comparison between acute oral/respiratory and chronic stomatitis/gingivitis isolates of feline calicivirus: pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralisation studies," Arch. Virol. 145:43-261 (2000).) Cada clon viral de

FCV-Ari se incubó con los antisueros generados de la vacuna inactivada de la primera purificación, o con los antisueros generados a partir de la exposición con la "solución madre de trabajo" viva. Los resultados de este ensayo de neutralización en suero mostraron que había más de una cepa de calicivirus en la muestra original. Los clones virales que no se seleccionaron y se desecharon fueron aquellos que se neutralizaron por los antisueros específicos contra el producto no deseado de la primera purificación. Los clones virales seleccionados para las posteriores rondas de purificación fueron aquellos que se neutralizaron por los antisueros contra la muestra de virus original del Dr. Pedersen pero que no se neutralizaron por los antisueros específicos contra el producto no deseado de la primera purificación. Este patrón de selección de clones virales, recogiendo la mayor dilución que contenía CPE, se repitió para un total de tres rondas. El clon resultante, denominado FCV-DD1, se eligió para estudios biológicos.

Específicamente, la muestra FCV-Ari se neutralizó y se volvió a purificar a través de clonación por dilución limitante. Para neutralizar el virus FCV-Ari, el cultivo tisular original de la muestra FCV-Ari se diluyó a 1:200 en MEM 1x (medio de Eagle modificado). Los antisueros generados de la vacunación FCV-Ari (inactivado) original (suero de Vacunación α -Ari) se diluyeron 1:50 en MEM 1x. A 2 ml de suero anti-Ari diluido se añadieron 2 ml de virus diluido. La mezcla virus/antisuero se incubó durante aproximadamente 1 hora a 37°C.

A partir de una purificación piloto de FCV-Ari usando virus neutralizado, se descubrió que el CPE en placas de 24 pocillos era positivo hasta una dilución 10^{-2} (los pocillos 10^{-2} tenían un 50% de CPE y los 10^{-3} tenían un 0% de CPE). En base a esta información, el virus se diluyó para conseguir un CPE en aproximadamente el 50% de los pocillos de células CRFK. Se hicieron tres diluciones, por encima del objetivo en un factor cuatro, en el objetivo y por debajo del objetivo en un factor cuatro.

Se usó una placa de 24 pocillos para cada dilución. Se usaron los 24 pocillos como réplicas de la misma dilución. Estas placas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 4 días. Se recolectaron los pocillos que fueron positivos para el CPE en la dilución que daba menos de o aproximadamente igual al 50% de CPE en las 24 réplicas (es decir, ≤ 12 pocillos positivos).

Para la ronda nº 1 del procedimiento de clonación por dilución limitante, se realizó análisis de neutralización cruzada sobre los clones recolectados. Cada recolección se diluyó 1:200 y 1:1000 en MEM 1 x y se mezcló con diluciones de Exposición α -Ari (antisuero generado a partir de la exposición con la "solución madre de trabajo" viva) o Vacunación α -Ari (antisuero de la vacuna inactivada de la primera purificación), en réplicas de dos. La mezcla virus-suero se incubó a 37°C durante 1 hora y después se sembró sobre células CRFK en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante 3 días y se leyeron para el CPE. Los resultados de la primera ronda de clonación por dilución limitante e identificación por neutralización cruzada se muestran en la siguiente Tabla 1.

Se neutralizaron cinco clones recolectados (AB2, BC1, BC4, CB4 y DD1) por los antisueros contra la muestra de virus original del Dr. Pedersen pero no se neutralizaron por los antisueros específicos contra el producto no deseado de la primera purificación. Se seleccionaron para la ronda nº 2 de purificación.

Para la ronda nº 2 del procedimiento de clonación por dilución limitante, se descubrió que el CPE en placas de 24 pocillos era positivo hasta 10^{-5} a 10^{-6} . Se hicieron tres diluciones, por encima del objetivo en un factor cuatro, en el objetivo y por debajo del objetivo en un factor cuatro. Se usó una placa de 24 pocillos para cada dilución. Se usaron los 24 pocillos como réplicas de la misma dilución. Estas placas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 4 días. Se recogieron los pocillos que fueron positivos para el CPE en la dilución que dio $\leq 50\%$ de CPE en las 24 réplicas.

Las etapas anteriores se repitieron para la tercera ronda de clonación por dilución limitante.

Tabla 1. Identificación por Neutralización Cruzada de la Dilución Limitante de FCV-Ari

ID de recolección	Dilución del virus	Exposición α -Ari	Vacunación α -Ari
AB2	1:200	>256	<2
AB2	1:1000	>256	<2
BC1	1:200	>256	<2
BC1	1:1000	>256	<2
BC4	1:200	>256	<2
BC4	1:1000	>256	<2
CA4	1:200	>256	<2

(continuación)

ID de recolección	Dilución del virus	Exposición α -Ari	Vacunación α -Ari
CA4	1:1000	>256	<2
CB2	1:200	>256	<2
CB2	1:1000	>256	<2
CB3	1:200	>256	<2
CB3	1:1000	>256	<2
CB4	1:200	>256	<2
CB4	1:1000	>256	<2
CC5	1:200	>256	<2
CC5	1:1000	>256	<2
CD1	1:200	>256	37
CD1	1:1000	>256	<2
DA5	1:200	>256	<2
DA5	1:1000	>256	<2
DB1	1:200	>256	<2
DB1	1:1000	>256	<2
DB5	1:200	>256	<2
DB5	1:1000	>256	<2
DC2	1:200	>256	<2
DC2	1:1000	>256	<2
DD1	1:200	>256	<2
DD1	1:1000	>256	<2
DD2	1:200	>256	<2
DD2	1:1000	>256	<2
DD4	1:200	>256	<2
DD4	1:1000	>256	<2

Ejemplo 3

AISLAMIENTO DE LA CEPA FCV-DD1

- 5 El clon recolectado, DD1, se seleccionó de la ronda nº 3 y se usó para infectar un frasco rotatorio de cultivo tisular de 850 cm² de células CRFK confluyentes a una MOI (Multiplicidad de Infección) de aproximadamente 0,003. El fluido del virus se recogió del frasco rotatorio cuando se observó un CPE del 100%, se congeló a -50°C durante 4 horas y después se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37°C. El fluido del virus se centrifugó en una centrifuga Beckman GS-6R (disponible en el mercado en Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA) a 3000 rpm durante 20 minutos, y se hicieron alícuotas del sobrenadante sin células en 81 viales de muestra de 1 ml y se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 4

ESTUDIOS DE EXPOSICIÓN FISIOLÓGICA

5 La cepa FCV-DD1 aislada y purificada preparada en el Ejemplo 3 se inoculó en gatos. Se usó un grupo de
exposición de tres gatos en el que cada gato recibió 6,3 unidades log de FCV-DD1 virulento por administración de
0,25 ml por fosa nasal y 0,5 ml por vía oral para un total de 1 ml. Los gatos mostraron signos clínicos típicos de
10 calicivirus hemorrágico. Aparecieron temperaturas extremadamente elevadas en los 3 gatos después de 1 día. El
edema (hinchamiento) comenzó en el quinto día de observación. Las ulceraciones, tanto externas como orales,
aparecieron en el sexto día de observación. Dos tercios de los gatos se sacrificaron por eutanasia (exanguinados)
en el sexto día de observación ya que estaban moribundos. El tercer gato estaba moribundo con una bajada de las
temperaturas en el séptimo día de observación y se finalizó el estudio. Los resultados de este estudio de exposición
demuestran que la cepa de calicivirus purificada y aislada de la muestra FCV-Ari original, denominada FCV-DD1, era
una verdadera cepa de calicivirus felino hemorrágico.

En lo expuesto anteriormente, se ha proporcionado una descripción detallada de realizaciones particulares de la
presente invención con propósitos de ilustración y no de limitación.

15

REIVINDICACIONES

1. Un calicivirus felino hemorrágico aislado y purificado FCV-DD1 que tiene una denominación de depósito de patente ATCC PTA-6204 o un clon viral derivado del mismo.
- 5 2. Una vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz del calicivirus felino de acuerdo con la reivindicación 1, y un vehículo o diluyente no tóxico, fisiológicamente aceptable, y que opcionalmente comprende además uno o más calicivirus felinos adicionales.
3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el calicivirus felino adicional se selecciona entre el grupo que consiste en FCV-255, FCV-2280, FCV-Diva, FCV-Kaos, FCV-Bellingham, FCV-F9, FCV-F4, FCV-M8 y una combinación de los mismos.
- 10 4. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el calicivirus felino adicional comprende FCV-255, FCV-2280 o la combinación de FCV-255 y FCV-2280.
5. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el calicivirus felino adicional comprende FCV-255.
6. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Chlamydomphila felis, el virus de la leucemia felina, el virus de la panleucopenia felina, el virus de la rinotraqueítis felina, el virus de la inmunodeficiencia felina, el virus de la rabia, el virus de la peritonitis infecciosa felina, Bartonella y una combinación de los mismos.
- 15 7. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el antígeno comprende la combinación de Chlamydomphila felis, el virus de la leucemia felina, el virus de la panleucopenia felina y el virus de la rinotraqueítis felina.
8. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el antígeno comprende la combinación de Chlamydomphila felis, el virus de la panleucopenia felina y el virus de la rinotraqueítis felina.
- 20 9. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el antígeno comprende la combinación del virus de la panleucopenia felina y el virus de la rinotraqueítis felina.
10. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, que comprende además un adyuvante seleccionado entre el grupo que consiste en fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, un tensioactivo, un polianión, un policatión, un detergente, un péptido, un aceite animal o vegetal metabolizable, un aceite mineral, una emulsión de aceite mineral, un inmunomodulador, un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxiopropileno, un copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y ácido metacrílico, un adyuvante derivado de corinebacterias, un adyuvante derivado de propionibacterias, Mycobacterium bovis (bacilo de Calmette-Guerin), una interleuquina, un interferón, un liposoma, un adyuvante iscom, un extracto de pared celular micobacteriana, un glucopéptido sintético, avridina, Lípido A, sulfato de dextrano, DEAE-dextrano, carboxipolimetileno, copolímero de etileno/anhídrido maleico, una emulsión de copolímero acrílico, una proteína de poxvirus animal, un adyuvante de partícula subviral, toxina colérica, bromuro de dimetildioctadecilamonio y una combinación de los mismos.
- 25 30 11. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el adyuvante es un copolímero de etileno/anhídrido maleico, un copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y ácido metacrílico, una emulsión de aceite mineral o la combinación de los mismos.
- 35 12. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en la que el vehículo o diluyente no tóxico, fisiológicamente aceptable comprende solución salina o medio esencial mínimo de Eagle.
13. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-12, que comprende además un conservante seleccionado entre el grupo que consiste en timerosal, neomicina, polimixina B, anfotericina B y una combinación de los mismos.
- 40 14. Uso de una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-13 en la fabricación de un medicamento para proteger a un felino contra una infección o para prevenir una enfermedad causada por calicivirus felino, Chlamydomphila felis, el virus de la leucemia felina, el virus de la panleucopenia felina, el virus de la rinotraqueítis felina, el virus de la inmunodeficiencia felina, el virus de la rabia, el virus de la peritonitis infecciosa felina, Bartonella o una combinación de los mismos.
- 45 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la vacuna se administra por vía parenteral, oral, intranasal, oronasal o transdérmica al felino.