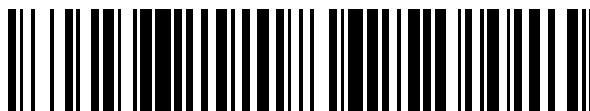


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 664**

51 Int. Cl.:

A61K 39/27 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2002 E 08150506 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1923071**

54 Título: **Vacuna contra el virus herpes equino**

30 Prioridad:

20.03.2001 US 812720

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.11.2013

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
(100.0%)
2621 NORTH BELT HIGHWAY
ST. JOSEPH MO 64506-2002, US**

72 Inventor/es:

MELLENBAMP, MARK W.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 428 664 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra el virus herpes equino

5 Antecedentes

10 Las enfermedades respiratorias son una causa importante de pérdidas económicas para la industria equina. El virus herpes equino (VHE), los virus influenza equinos (VIE) y la bacteria *Streptococcus equi* son patógenos que con mayor frecuencia se asocian a enfermedades respiratorias infecciosas en caballos. En todo el mundo, los virus herpes equinos son patógenos importantes asociados a morbilidad en caballos como resultado de la infección respiratoria. Tanto el virus herpes equino de tipo 1 (VHE-1) y de tipo 4 (VHE-4) pueden causar una enfermedad respiratoria. El VHE-1 también se asocia a abortos y a enfermedad neurológica. Debido al elevado grado de movilidad y a la naturaleza internacional de la industria equina, se necesitan vacunas eficaces para reducir la enfermedad y controlar la expansión de estos patógenos.

15 Se encuentran disponibles comercialmente varias vacunas del VHE. Sin embargo, ninguna es capaz generalmente de proporcionar una protección duradera y la mayoría requiere inmunizaciones de refuerzo frecuentes para alcanzar un nivel significativo de protección frente a la infección por VHE. La vía de administración más habitualmente recomendada es la inyección por vía intramuscular, a pesar de que el sistema respiratorio es un sitio primario de infección en muchos casos. Además, se ha informado de que algunas de las vacunas comerciales provoca efectos secundarios no deseables. Se ha informado de varios intentos para desarrollar una vacuna recombinante para el VHE. Sin embargo, este enfoque todavía no ha resultado en la introducción de una vacuna recombinante comercial que haya conseguido una aceptación generalizada.

25 Las publicaciones de la literatura han documentado consistentemente un grado elevado de variabilidad en la capacidad de las vacunas basadas en cepas de VHE-1 de proporcionar protección cruzada frente a la infección por cepas de VEH-4. Aunque las vacunas basadas en cepas de VHE-4 han demostrado una mayor tendencia a proporcionar cierta protección frente a ambas cepas, VHE-1 y VHE-4, la protección cruzada basada en las cepas de VHE-4 también se ha informado de que muestra variabilidad.

30 La patente EP nº 0978286 da a conocer una vacuna que resulta adecuada para proteger los caballos frente al reto con VHE-1 y VHE-4, que comprende la cepa de VHE-1 AB69 no atenuada e inactivada químicamente y un adyuvante. Se ha demostrado que VHE-1 KyA muerto por calor protege a los caballos inmunizados frente al reto con VHE-1 virulento (Zhang et al., *Virology* 268:482-492, 2000).

35 Por consiguiente, todavía existe una necesidad de desarrollar vacunas adicionales que sean capaces de proteger a los caballos frente a enfermedades asociadas a VHE-1 y/o VHE-4. También resultaría ventajoso desarrollar una vacuna que resultase efectiva frente a VHE-1 y/o VHE-4 que pudiese administrarse por vía intranasal además de mediante métodos por vía parenteral (por ejemplo por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa).

40 Descripción resumida

45 La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas según se definen en las reivindicaciones, que incluyen una forma inactivada de VHE-1. En particular, la solicitud proporciona una vacuna para proteger los caballos frente a enfermedades asociadas a VHE-1 y/o VHE-4. La vacuna incluye VHE-1 inactivado (por ejemplo virus VHE-1 KyA inactivado químicamente) y también incluye un adyuvante. La vacuna también puede incluir otros componentes, tales como uno o más conservantes, uno o más estabilizadores y antígenos contra otros patógenos equinos. Típicamente, los antígenos contra otros patógenos equinos también se encuentran presentes en una forma inactivada, tal como formas inactivadas de VHE-4 y cepas inactivadas de virus influenza equino ("VIE"). Por ejemplo, la vacuna puede ser una vacuna de combinación que incluya formas inactivadas de cepa A1 y/o A2 del virus influenza equino además de VHE-1 inactivado. Entre los ejemplos de antígenos adecuados contra VIE se incluyen el virus VIE A1 inactivado cepa A/EQ1/Newmarket/77, el virus VIE A2 inactivado cepa Newmarket/2/93 y el virus VIE A2 inactivado cepa Kentucky/95.

55 Las expresiones "vacuna" y "composición inmunogénica" se definen en la presente memoria en un sentido amplio para referirse a cualquier tipo de agente biológico en una forma administrable capaz de inducir una respuesta inmunológica en un animal en el que se ha inoculado la vacuna. Para los fines de la presente invención, la vacuna (composición inmunogénica) incluye el agente vírico en una forma inactivada. Las vacunas en general pueden estar basadas en el virus mismo o en un componente inmunogénico (antigénico) del virus. En la presente memoria, el término "protección" utilizado en referencia a una vacuna se refiere a la mejora (parcial o completa) de cualquiera de los síntomas asociados a la enfermedad o condición en cuestión. De esta manera, la protección de los caballos frente al VHE por las presentes vacunas generalmente resulta en una reducción de la propagación del virus y/o de

uno o más de los síntomas clínicos asociados a la infección por VHE-1 y/o VHE-4 (por ejemplo pirexia, descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea, depresión y necesidad de tratamiento antibiótico para una infección bacteriana secundaria).

5 Las presentes composiciones inmunogénicas tal como se dan a conocer incluyen una forma químicamente inactivada de VHE-1. Las vacunas que incluyen virus VHE-1 Kya químicamente inactivado resultan particularmente deseables. Puede utilizarse una diversidad de agentes químicos inactivadores que son conocidos por el experto en la materia para inactivar el virus. La etilenimina y derivados relacionados, tales como la etilenimina binaria ("EIB") y la acetiletilenimina, son ejemplos de agentes químicos inactivadores adecuados para la utilización para inactivar el virus VHE-1. También pueden utilizarse otros agentes químicos inactivadores, por ejemplo la β -propiolactona o los aldehídos (tales como el formaldehído y el glutaraldehído) para inactivar el virus.

15 Las presentes vacunas tal como se dan a conocer de manera general incluyen un adyuvante que deseablemente puede presentar propiedades bioadhesivas, particularmente en el caso de que se haya diseñado que el virus pueda administrarse por vía intranasal. Entre los ejemplos de adyuvantes adecuados se incluyen los polímeros reticulados olefinicamente insaturados de ácido carboxílico, tales como los polímeros de ácido acrílico reticulado. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "polímero de ácido acrílico reticulado" se refiere a polímero y copolímeros formados a partir de una mezcla de monómeros que incluye ácido acrílico como monómero predominante en la mezcla. Entre los ejemplos de polímeros de ácido acrílico reticulado adecuados se incluyen los disponibles comercialmente bajo los nombres comerciales Carbopol[®] 934P y Carbopol[®] 971 (disponibles de B.F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio). Un adyuvante particularmente adecuado para la utilización en las presentes vacunas es un polímero de ácido acrílico reticulado que presenta una viscosidad de Brookfield no superior a aproximadamente 20.000 cPs (medida a 20 rpm en forma de una solución acuosa al 1,0% en peso a pH 7,5). En el caso de que se desee un adyuvante bioadhesivo, puede resultar ventajoso utilizar un adyuvante que presente una propiedad bioadhesiva de por lo menos aproximadamente 50 dinas/cm², medida entre dos trozos de tejido estomacal de conejo recién extraídos (determinada mediante el procedimiento descrito en la patente US n^o 4.615.697).

30 Entre los métodos para proteger caballos frente a enfermedades asociadas a VHE-1 y/o VHE-4 tal como se da a conocer se incluyen la administración de una vacuna que contiene VHE-1 inactivado en los caballos. La vacuna puede administrarse utilizando una diversidad de métodos, incluyendo la administración intranasal y/o parenteral (por ejemplo intramuscular). La vacuna que contiene VHE-1 inactivado puede administrarse en primer lugar por vía intramuscular una o más veces (por ejemplo a intervalos de 2 a 4 semanas), seguido de la administración de la vacuna por lo menos una vez intranasalmente (por ejemplo 2 a 4 semanas después de la última administración parenteral de vacuna). Se recomienda que la vacuna se administre en caballos de 6 ó más meses de edad. Idealmente todos los caballos en la manada son vacunados cada año para protegerlos frente a la extensión de los síntomas respiratorios de la enfermedad.

40 Se describe además un método para producir una vacuna contra el virus herpes equino. El método típicamente incluye inocular células de simio con virus VHE-1, por ejemplo con virus VHE-1 KyA. Las células de simio inoculadas se incuban, generalmente por lo menos hasta observar CPE (habitualmente tras 24 a 120 horas a 36°C) y después se recolecta el virus VHE-1 a partir de las células incubadas (por ejemplo mediante decantación y filtración de los líquidos de cultivo). Los líquidos recolectados que contienen virus pueden tratarse con un agente químico inactivador, tal como etilenimina binaria, para formar virus VHE-1 inactivado. Típicamente, el virus inactivado se procesa adicionalmente, por ejemplo mediante concentración y mezcla con otros componentes, para producir una formulación comercial. Por ejemplo, los líquidos que contienen el virus inactivado pueden concentrarse y mezclarse con un adyuvante y/o uno o más antígenos contra otro u otros patógenos equinos.

50 La presente solicitud describe además un kit que incluye en combinación: (1) un dispensador capaz de administrar una vacuna en un caballo, y (2) una vacuna que contiene VHE-1 inactivado químicamente capaz de proteger frente a enfermedades asociadas a VHE-1 y/o VHE-4. El kit puede incluir un dispensador que es capaz de dispensar su contenido en forma de gotas, por ejemplo en forma de aerosol, spray atomizado y/o gotas de líquido, y una forma de la vacuna que es capaz de proteger frente a enfermedades asociadas a VHE-1 y/o VHE-4 al administrarlo por lo menos en parte por vía intranasal.

55 En toda la presente solicitud, el texto se refiere a diversas realizaciones de las presentes composiciones y/o a métodos relacionados. Las diversas realizaciones descritas pretenden proporcionar una diversidad de ejemplos ilustrativos y no deben interpretarse como descripciones de especies alternativas. Por el contrario, debe indicarse que las descripciones de las diversas realizaciones proporcionadas en la presente memoria pueden presentar un alcance superpuesto. Las realizaciones comentadas en la presente memoria son meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

60

Descripción detallada

Entre las presentes composiciones inmunogénicas tal como se dan a conocer se incluyen una forma inactivada de VHE-1. Las vacunas están diseñadas para proteger los caballos frente a enfermedades asociadas a VHE-1 y/o VHE-4. Entre las presentes composiciones inmunogénicas se incluye una vacuna para proteger un caballo frente a enfermedades asociadas a VHE-1, VHE-4 ó una combinación de los mismos que comprende un virus VHE-1 KyA inactivado químicamente y un adyuvante. Puede utilizarse una diversidad de agentes químicos inactivadores que son conocidos por el experto en la materia para inactivar el virus. La etilenimina y derivados relacionados, tales como la etilenimina binaria ("EIB") y la acetiletilenimina, son ejemplos de agentes químicos inactivadores adecuados para la utilización para inactivar el virus VHE-1. También pueden utilizarse otros agentes químicos inactivadores, por ejemplo la β -propiolactona o los aldehídos (tales como el formaldehído) y/o detergentes (por ejemplo el detergente Tween[®], Triton[®] X o las sales de alquiltrimetilamonio) para inactivar el virus. La inactivación puede llevarse a cabo utilizando métodos estándares conocidos por el experto en la materia. Pueden extraerse muestras a intervalos temporales periódicos y someterse a ensayo para virus vivo residual. El seguimiento del efecto citopático en una línea celular apropiada o la tinción fluorescente con un anticuerpo monoclonal específico apropiado puede utilizarse para detectar la presencia de virus vivo residual.

La inactivación con EIB puede llevarse a cabo combinando una solución madre de EIB (por ejemplo una solución formada mediante adición de hidrobromuro de 2-bromoetilamina 0,1-0,2 M a NaOH acuoso 0,1 a 0,2 N) con líquidos víricos hasta una concentración final de aproximadamente 1-2 mM de EIB. La inactivación habitualmente se lleva a cabo manteniendo la mezcla de EIB-virus a una temperatura de entre 35°C y 40°C (por ejemplo 37°C) bajo mezcla constante durante 36 a 72 horas. La inactivación del virus puede detenerse mediante la adición de solución de tiosulfato sódico hasta una concentración final en exceso de la concentración de EIB (por ejemplo tiosulfato sódico 2-3 mM con soluciones de BEI 1-2 mM) seguido de la mezcla durante varias horas.

Las presentes composiciones inmunogénicas incluyen un adyuvante y, si se desea, uno o más emulsionantes tales como detergente Tween[®] incorporado con el VHE-1 inactivado. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, por ejemplo, solubilizado de acetato de vitamina E, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio u óxido de aluminio, emulsiones de aceite (mineral), detergentes no iónicos, escualeno y saponinas. Entre otros adyuvantes que pueden utilizarse se incluyen adyuvantes basados en aceites, tales como adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF). Se ha encontrado que los polímeros de ácido carboxílico insaturados reticulados olefinicamente, tales como el polímero Carbopol[®] 971, son adyuvantes particularmente adecuados para la utilización en las presentes composiciones inmunogénicas de VHE-1 inactivado.

Un ejemplo de dicho adyuvante es un polímero de ácido carboxílico olefinicamente insaturado producido mediante la reacción de una mezcla de monómeros que incluye uno o más monómeros de ácido carboxílico olefinicamente insaturado (tal como ácido acrílico y/o ácido metacrílico) y un agente reticulante. Típicamente, por lo menos aproximadamente 90% en peso de la mezcla de monómeros es un monómero carboxílico olefinicamente insaturado. El producto polimérico resultante deseablemente contiene no más de aproximadamente 0,5% en peso y preferentemente no más de aproximadamente 0,2% en peso de monómero carboxílico olefinicamente insaturado no reaccionado. La reacción de polimerización puede llevarse a cabo mediante la reacción de la mezcla de monómeros en presencia de solvente, que incluye cetonas alifáticas, ésteres alquílicos o una mezcla de los mismos. Entre las cetonas alifáticas adecuadas se incluyen aquellas con 3 a 6 átomos de carbono, tales como acetona y ciclohexanona (tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cetona alifática" incluye las cetonas cicloalifáticas). Entre los ejemplos de los ésteres alquílicos adecuados se incluyen aquellos con 3 a 6 átomos de carbono, tales como acetato de etilo, formato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de n-propilo, acetato de butilo o una mezcla de los mismos.

Los adyuvantes adecuados de polímero de ácido carboxílico olefinicamente insaturado deseablemente presentan una viscosidad de Brookfield no superior a aproximadamente 40.000 cPs (a 20 rpm en forma de una solución acuosa al 0,5% en peso a pH 7,5). Entre los ejemplos particularmente adecuados se incluyen los polímeros de ácido carboxílico olefinicamente insaturados con una viscosidad no superior a aproximadamente 15.000 cPs y más deseablemente de entre aproximadamente 4.000 y 11.000 cPs (a 20 rpm en forma de una solución acuosa al 0,5% en peso a pH 7,5).

Un ejemplo de un adyuvante adecuado incluye un polímero de ácido acrílico reticulado formado a partir de una mezcla de monómeros que incluye ácido acrílico y un agente reticulante. El agente reticulante puede incluir un agente reticulante poliéter polialquénico, tal como divinilglicol. Entre los ejemplos de alcoholes divinílicos adecuados se incluyen alilsacarosa, alilpentaeritrol, polialquilenglicol dialil-éter con un peso molecular no superior a 1.000, trimetilolpropano dialil-éter y mezclas de los mismos. Son ejemplos de otros agentes reticulantes útiles, divinilbenceno, N,N-dialilacrilamida, 3,4-dihidroxi-1,5-hexadieno, 2,5-dimetil-1,5-hexadieno y similares.

En el caso de que la vacuna deba administrarse por vía intranasal, puede resultar ventajoso utilizar un adyuvante que sea bioadhesivo con respecto a las membranas mucosas. Los polímeros bioadhesivos generalmente presentan la propiedad de poder adherirse a una membrana mucosa en los ojos, nariz, boca, tracto gastrointestinal, cavidad vaginal y canal rectal. El término "bioadhesivo" puede definirse ampliamente como un material que se adhiere a una superficie viva o biológica recientemente muerta, tal como una membrana mucosa o tejido de la piel. El término bioadhesión tal como se utiliza en la presente memoria para definir un bioadhesivo útil, se somete a ensayo mediante un procedimiento que mide la fuerza necesaria para separar dos capas de tejido estomacal de conejo recién extirpado que se encuentran adheridas entre sí mediante un adhesivo. Utilizando este procedimiento, un adhesivo puede definirse como un material que requiere una fuerza de como mínimo aproximadamente 50 dinas/cm² para separar dos trozos recién extirpados y adheridos de tejido estomacal de conejo siguiendo el procedimiento descrito en la patente US nº 4.615.697. Los límites superiores para las fuerzas necesarias para separar el tejido de conejo recién extirpado no se conocen con precisión, pero se cree que son de como mínimo aproximadamente 2.000 dinas/cm².

Entre los ejemplos adecuados de adyuvantes se incluyen polímeros insaturados olefinicamente reticulados de ácido carboxílico con propiedades bioadhesivas (por ejemplo el polímero Carbopol® 971, un polímero reticulado de ácido acrílico de B.F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio). Los ácidos poliacrílicos de este tipo generalmente son polímeros carboxi-funcionales reticulados que contienen cantidades especificadas de funcionalidad carboxilo y agente reticulante. Dichos polímeros pueden ser un bioadhesivo de manera que los polímeros muestren una adhesión entre dos trozos de tejido estomacal de ratón recién extirpado de por lo menos 50 dinas/cm² (medida de la manera descrita en la patente US nº 4.615.697).

Generalmente resulta ventajoso formular las presentes composiciones en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria utilizada en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos que deben tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosificación unitaria de VHE-1 inactivado (así como VHE-4 inactivo y/o VIE inactivado) está dictada por y depende de, entre otros factores, (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que debe conseguirse, (b) las limitaciones inherentes a la técnica de formación de un compuesto de dicho material activo para el tratamiento de enfermedades, y (c) la manera de administración deseada de la forma de dosificación unitaria.

El ingrediente activo principal típicamente forma un compuesto para la administración conveniente y efectiva de cantidades eficaces con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado en forma de dosificación unitaria tal como se da a conocer en la presente memoria. Una forma de dosificación unitaria puede contener, por ejemplo, el antígeno VHE-1 en cantidades comprendidas entre 1 y aproximadamente 5 unidades de potencia relativa ("UPR"). Esta cantidad del antígeno generalmente se encuentra presente en aproximadamente 1 a aproximadamente 25 ml de portador. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios (por ejemplo VIE inactivado y/o VHE-4 inactivado), las dosis se determinan haciendo referencia a la dosis y modo de administración habituales de los ingredientes activos suplementarios.

Las presentes vacunas tal como se describen típicamente incluyen VHE-1 inactivado formulado con un portador farmacéuticamente aceptable. Entre las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable se incluyen habitualmente soluciones acuosas estériles (en caso de ser soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La formulación deseablemente debería ser estéril y líquida en la medida en que exista fácil jeringabilidad. La forma de dosificación debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y típicamente se conserva frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Un posible portador es una solución salina fisiológica. Puede mantenerse la fluidez correcta de la solución, por ejemplo mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenes, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal (etilmercurio-tiosalicilato sódico), deomicina, gentamicina y similares. En muchos casos puede resultar preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro sódico.

Puede conseguirse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la utilización en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del virus inactivado en la cantidad

deseada en un solvente apropiado con diversos de los demás ingredientes indicados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización mediante filtración. Generalmente pueden prepararse dispersiones mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los demás ingredientes requeridos de entre los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son las técnicas de secado al vacío o de liofilización, las cuales rinden unos polvos del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado procedente de un medio líquido previamente filtrado a esterilidad del mismo.

También puede resultar ventajoso añadir un estabilizador a las presentes composiciones con el fin de mejorar la estabilidad del virus inactivado. Entre los estabilizadores adecuados se incluyen, por ejemplo, glicerol/EDTA, carbohidratos (tales como sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa), proteínas (tales como albúmina o caseína) y productos de degradación de proteínas (por ejemplo gelatina parcialmente hidrolizada). Si se desea, la formulación puede tamponarse mediante métodos conocidos de la técnica utilizando reactivos tales como los fosfatos de metal alcalino, por ejemplo hidrogenofosfato sódico, dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato potásico y/o dihidrogenofosfato potásico. Pueden utilizarse otros solventes, tales como etanol o propilenglicol, para incrementar la solubilidad de los ingredientes en la formulación de vacuna y/o la estabilidad de la solución. Entre los aditivos adicionales que pueden utilizarse en la presente formulación se incluyen antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales, tales como ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA).

Las composiciones y métodos de la presente invención pueden ilustrarse mediante los ejemplos siguientes, los cuales se proporcionan únicamente a título ilustrativo de la presente invención y para ayudar a enseñar al experto ordinario a preparar y a utilizar los mismos. Estos ejemplos no pretenden en modo alguno restringir, o limitar de otro modo, el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1 - Producción de los líquidos que contienen cepa de VHE-1 inactivado

Para producir la vacuna de la rinoneumonitis equina, virus muerto, en primer lugar se produjo un cultivo inóculo madre de un VHE-1. A partir de este inóculo madre, se preparó un cultivo de VHE-1 y después se inactivó. El cultivo de virus inactivado seguidamente se mezcló con un adyuvante con el fin de producir la vacuna de la rinoneumonitis equina. Se utilizó el método siguiente para producir la vacuna de la rinoneumonitis equina.

Con el fin de producir el cultivo vírico inóculo madre de VHE-1 ("CIM de VHE-1"), se subcultivó cuatro veces el virus herpes equino de tipo 1 cepa KyA (VHE-1 KyA) en células Vero A139 y cuatro veces en células EVeró. Se utilizó el cuarto pase como virus inóculo madre, denominado VHE-1 KyA, CIM Lote 001-dil.

A partir del virus inóculo madre, se produjo un cultivo de VHE-1 mediante infección de células EVeró con CMI de VHE-1 en un medio esencial mínimo ("MEM") que presenta 0% a 5% de suero. Se añadió gentamicina al medio de cultivo en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. Las células EVeró resultaron típicamente infectadas con el CMI de VHE-1 con una multiplicidad de infección ("MOI") diana de 0,001. Dichos cultivos pueden cultivarse en botellas de vidrio de cultivo giratorias o sobre perlas microportadoras. El cultivo se incubó a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 120 horas hasta observar un efecto citopático ("CPE"). Durante la incubación, se realizó un seguimiento del cultivo para CPE inducido por VHE para garantizar que era una cepa de VHE pura. Si se observaba un CPE atípico o cualquier evidencia macroscópica o microscópica de contaminación, se descartaba el cultivo. El cultivo vírico puro se recolectó asépticamente en damajuanas de vidrio estériles, bombonas de plástico estériles o tanques de acero inoxidable estériles, y se clarificó mediante filtración a través de filtros de 8 micrómetros o más. Los líquidos totales recolectados de virus se sometieron a ensayo para determinar la ausencia de micoplasmas previamente a la inactivación. Los líquidos recolectados no inactivados inmediatamente se almacenaron a -40°C o temperatura inferior.

Tras la recolección, el cultivo de virus se inactivó con el fin de producir una vacuna muerta. Para inactivar el virus, se llevó la temperatura del cultivo a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A continuación, una solución 0,2 M de hidrobromuro de 2-bromoetilenamina se ciclizó en etilenimina binaria ("EIB") en NaOH 0,15 M y se añadió al cultivo, proporcionando una concentración final de 2 mM de EIB. La mezcla resultante se agitó continuamente durante 48 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tras el tratamiento con EIB, el cultivo se sometió a ensayo para su capacidad de inducir el CPE típico del VHE, para garantizar que el virus se había inactivado, utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3. Esta tarea se llevó a cabo pasando los líquidos víricos tratados con EIB por células EVeró y comprobando la presencia de cualquier infección vírica en las células EVeró. Los líquidos de cultivo tratados con EIB típicamente se almacenaron a una temperatura de entre 2°C y 7°C o temperatura inferior hasta completar el ensayo de inactivación. Tras realizar un ensayo de inactivación satisfactorio, que no mostrase infección vírica, se neutralizó el exceso de EIB mediante la adición de una cantidad suficiente de una solución fría ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) de tiosulfato sódico 1,0 M, proporcionando una

concentración final de 6 mM.

Tras la inactivación y ensayo del cultivo de VHE-1, se concentró el cultivo inactivado, en caso necesario, mediante ultrafiltración, hasta una concentración que permitiese la formulación en forma de vacuna con una potencia relativa ("PR") del VHE-1 de por lo menos 1,0, según se determina mediante el ensayo de liberación de potencia de VHE descrito en el Ejemplo 6 en la presente memoria.

El virus inactivado se formuló en forma de vacuna con adyuvante mezclando uniformemente el cultivo de VHE-1 inactivado con solución salina y una solución madre al 0,5% del adyuvante Carbopol® 971 para preparar una serie de dilución. Se preparó una serie de diluciones típica de 60 l mezclando 3,5 a 4,0 l de líquido de cultivo de VHE-1 inactivado, 12 l de solución madre de Carbopol® 971 y 44 a 44,5 l de solución salina. La serie de dilución de la solución madre se mantuvo a una temperatura de entre 2°C y 8°C hasta transferirla a viales que contenían una o diez dosis (con 2,2 ml en cada dosis). Cada dosis de la vacuna inactivado contenía por lo menos 1,0 PR de VHE-1 inactivado, 2 mg de Carbopol® 971 y una cantidad residual de gentamicina.

Ejemplo 2 - Producción de los líquidos que contienen virus influenza equino inactivado

Virus influenza equino -A/EQ I/Newmarket/77.subtipo A1

Se desarrolló el CMI de ER1K Rec subtipo A1 del virus influenza equino en Wellcome Foundation Ltd., Beckenham, Kent, UK. La cepa equina original se subcultivó diez veces, sola o en combinación con virus A/Puerto Rico/8/34 en huevos embrionados libres de patógenos específicos (LPE). Se subcultivó ER1K recombinante siete veces más en cultivo de tejido Vero con el fin de producir el CMI denominado A/E/Newmarket/77 (Equi) (H7N7) Rec ER1K. El virus fue recibido por Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. (BIVI) procedente de Coopers Animal Health, Inc., Est. Lic. nº 107. El virus se cultivó una vez en la línea celular EVer0 [línea celular Vero recibida de Coopers Animal Health se denominó EVer0 en BIVI] en BIVI para establecer el nuevo virus inóculo madre. El virus inóculo madre se denominó Lote 111795.

Virus influenza equino -Newmarket/2/93, subtipo A2

El virus Newmarket/2/93 subtipo A2 de influenza equina se obtuvo de Dr. T.A. Mummford del Animal Health Trust, P.O. Box 5, Newmarket, Suffolk CB8 8JH, Inglaterra. El virus se aisló a partir de un caballo con rinitis. El virus se subcultivó cinco veces en huevos de pollo embrionados libres de patógenos específicos (LPE) y después se subcultivó cinco veces en la línea celular renal canina Madin-Darby (MDCK). El quinto subcultivo en células MDCK se utilizó como el CIM. El CMI se denomina VIE NM/2/93, CMI lote 001-dil.

Virus influenza equino -Kentucky/95. subtipo A2

El virus de influenza equina Kentucky/95 subtipo A2 se obtuvo del Gluck Equine Research Center, Lexington, KY. El virus se aisló a partir de un caballo con rinitis. El virus se subcultivó dos veces en huevos de pollo embrionados libres de patógenos específicos (LPE). A continuación, el virus se subcultivó tres veces en la línea celular renal canina Madin-Darby (MDCK) y tres veces en células EVer0. El tercer subcultivo en células EVer0 se utilizó como el CIM. El CMI se denomina VIE K95, CMI lote 001-dil.

Se utilizaron los procedimientos siguientes para producir separadamente las tres cepas de componentes del virus influenza equino, aunque mediante métodos similares. Se identificó cada lote de producción de virus Newmarket/77 como virus influenza equino (VIE) observando los efectos citopáticos característicos inducidos (ECP) por VIE en células EVer0. Se identificó cada lote de producción de virus Newmarket/2/93 y virus Kentucky/95 como VIE mediante la observación de ECP inducido por VIE característico en células MDCK. Los virus Newmarket/77 y Kentucky/95 son citocidas de los cultivos celulares de riñón de mono y produjeron ECP de VIE típicos en cultivos de monocapa. El virus Newmarket/2/93 es citocida de los cultivos de células MDCK y produjo ECP de VIE típicos en cultivos de monocapa. No se evaluó la virulencia en caballos de ninguno de los virus. Los virus inóculo madre se sometieron a ensayo para pureza según 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28 y 113.55 El virus inóculo madre Newmarket/77 era de enfermedad vesicular porcina, enfermedad de Akabane, fiebre efímera bovina, fiebre catarral ovina y enfermedad viscerotrófica velogénica de Newcastle. Los líquidos totales de recolección de virus se sometieron a ensayo previamente a la inactivación según 9 C.F.R. 113.28. Los virus inóculo madre se sometieron a ensayo para inmunogenicidad mediante el procedimiento siguiente.

Las muestras globales o finales en recipientes de producto completado de cada serie de dilución se sometieron a ensayo para su potencia mediante un ensayo de potencia en cobayas. Cada cobaya de por lo menos diez, con pesos entre 300 y 500 gramos, recibió una inyección intramuscular. La dosis para cada cobaya era la mitad de la dosis recomendada como dosis unitaria de vacuna en la etiqueta para un caballo. Se inyectó una segunda dosis 14

5 a 21 días después de la primera dosis. Se mantuvieron como controles dos cobayas adicionales del mismo origen. Catorce a 21 días después de la segunda inyección se sometieron a ensayo muestras de suero de cada vacunado y de cada control para anticuerpos de Newmarket/77, Newmarket/2/93 y Kentucky/95 mediante inhibición de la hemaglutinación (IHA). La potencia de las fracciones de VIE en la vacuna se determinó utilizando el protocolo de ensayo del National Veterinary Services Laboratories, método suplementario de ensayo para la realización del ensayo de inhibición de la hemaglutinación para el anticuerpo de influenza equina (MVSAM0124.01, fechado 2 de octubre de 1988).

10 En el caso de que los controles no siguiesen siendo seronegativos a una dilución de 1:10 para la fracción de VIE sometida a ensayo, el ensayo se consideraba nulo y se repetía. En el caso de que ocho de los diez vacunados en un ensayo válido no desarrollasen un título de anticuerpo de IHA de 80 ó superior para la fracción Newmarket/77 y un título de 40 ó superior para las fracciones Newmarket/2/93 y Kentucky/95, la muestra se consideraba insatisfactoria. Las vacunas que contenían VIE inactivado deseablemente se formulan para que incluyan por lo menos aproximadamente 64 HAU/dosis unitaria de virus VIE inactivado de subtipo A1 y/o por lo menos aproximadamente 256 HAU/dosis unitaria de virus VIE inactivado de subtipo A2.

20 El primer a cuarto subcultivos del virus inóculo madre se utilizaron para los inóculos de trabajo y de producción. Se produjo vacuna a partir del primer a quinto subcultivos del virus inóculo madre. Se propagaron virus influenza equino, cepa Newmarket/77, subtipo A1 y virus influenza equino, cepa Kentucky/95, subtipo A2, en cultivos de líneas de células EVeró.

25 La línea de células MDCK utilizada para la propagación de Newmarket/2/93 se confinó a los pases 71 a 91. El pase 71 se congeló y se utilizó como cultivo celular madre. Los cultivos de células MDCK se propagaron en MEM que contenía 5% a 10% de suero fetal bovino. Los cultivos de inóculo y de producción de Newmarket/2/93 se propagaron en MEM suplementado con 10 unidades de tripsina/ml. Los cultivos celulares se cultivaron en perlas microportadoras en recipientes de cultivo celular de 1, 3, 10, 30, 50 ó 140 litros, botellas giratorias de vidrio de 9 litros o botellas giratorias de plástico. Los virus inóculo madre y de trabajo se almacenaron a -60°C o temperatura inferior.

30 Los cultivos de células MDCK se cultivaron en recipientes de vidrio o plástico estériles. Los cultivos se cultivaron en matraces de plástico de 75 cm² ó 150 cm² con 40 a 100 ml de medio. Se cultivaron cultivos de expansión en cultivos de botella giratoria en 100 a 1.000 ml de medio y después se subcultivaron también en cultivos en botella giratoria. Se seleccionó un área de adhesión de 75 cm² ó 150 cm², basándose en la adhesión y crecimiento de la línea celular inmediatamente después de salir del depósito de nitrógeno líquido. Debido al estrés del almacenamiento en nitrógeno líquido, en algunos casos resultó ventajoso iniciar el cultivo celular en un área más pequeña, y tras alcanzar el crecimiento, subcultivar las células adicionalmente en un matraz T de 150 cm². En el caso de que las células saliesen del almacenamiento en nitrógeno líquido y produjesen una monocapa de células sana para la expansión en un matraz T de 150 cm², se omitía la etapa de matraz T de 75 cm² y las células se plantaban directamente en el matraz T de 150 cm².

40 Previamente a la inoculación con virus, se decantó del recipiente de cultivo el medio de cultivo celular. Se añadió medio esencial mínimo (MEM) sin suero al recipiente de cultivo y se enjuagaron las células durante 30 a 45 minutos. El volumen de medio de enjuague dependía del recipiente de cultivo utilizado. Se realizó la inoculación del recipiente de cultivo mediante decantación del medio de enjuague y la adición de MEM sin suero que contenía 10 unidades de tripsina purificada/ml de MEM y al que se añadieron virus de inóculo. Se infectaron los cultivos celulares con una multiplicidad de infección (MOI) diana de 0,01 para las cepas Newmarket/77, Newmarket/2/93 y Kentucky/95.

50 Los cultivos celulares se mantuvieron a 36°C ± 2°C hasta la recolección del líquido. Se observaron las monocapas tras la inoculación para cambios característicos de la morfología celular inducidos por VIE. El ECP incluía células redondeadas y refráctiles que se desprendían de la superficie de la monocapa. El ECP habitualmente era aparente 24 a 96 horas después de la inoculación. Se examinó el cultivo durante todo el periodo de incubación para evidencia macroscópica y/o microscópica de contaminación o para cambios atípicos en la morfología celular. Cualquier cultivo que mostrase evidencia de contaminación microbiana o degeneración celular no específica era descartado.

55 Previamente a la recolección se examinó cada cultivo macroscópica y microscópicamente. Cualquier cultivo que mostrase evidencia de contaminación o ECP atípico era descartado. El líquido del recipiente o recipientes de cultivo se recolectó uno a cuatro días después de la inoculación. El líquido del cultivo vírico en el recipiente de cultivo se recolectó asépticamente en damajuanas de vidrio o bombonas de plástico estériles o en tanques de acero inoxidable estériles, y se clarificó mediante filtración a través de filtros de 8 micrómetros o más. Los líquidos agrupados se inactivaron inmediatamente o se almacenaron a -40°C o temperatura inferior para la inactivación en un tiempo posterior. Se recogieron muestras para esterilidad y ensayo de antígenos tras la inactivación.

60 Se determinó el volumen de los líquidos de cultivo y se llevó la temperatura de los líquidos a 36°C ± 2°C. Se añadió

una solución 0,2 M de hidrobromuro de 2-bromoetilenamina que había sido ciclizada para formar etilenimina binaria ("EIB") en NaOH 0,15 M, proporcionando una concentración final de EIB de 2 mM. El líquido de virus inactivado se almacenó congelado a $\leq -40^{\circ}\text{C}$ o a $4-8^{\circ}\text{C}$ hasta completar el ensayo de inactivación.

5 Se sometió a ensayo cada lote de Newmarket/77 y Kentucky/95 para la inactivación mediante subcultivo en células Vero A139. Se sometió a ensayo cada lote de Newmarket/2/93 para la inactivación mediante subcultivo en células MDCK. Se inoculó una monocapa de cultivo celular apropiada (150 ml) con 1,0 ml de líquidos de VIE inactivado y se mantuvo a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 14 días con por lo menos dos pases. Al final del periodo de mantenimiento, se examinaron las monocapas celulares para el ECP típico del VIE. Para los controles de virus positivo, se inoculó un
10 matraz de cultivo de células EVeró con virus de referencia Newmarket/77 y uno con virus Kentucky/95 de referencia, respectivamente, y un cultivo de células MDCK se inoculó con un virus Newmarket/2/93 de referencia (cada uno hasta una MOI diana de 0,01). Un matraz de células EVeró y un matraz de células MDCK se dejaron sin inocular a modo de controles negativos. Tras la incubación y subcultivo, la ausencia de células infectadas por virus en los
15 líquidos víricos tratados con EIB constituía un ensayo satisfactorio de inactivación. Las células de control inoculadas con el virus de referencia muestran un ECP típico del VIE y el matraz no inoculado no mostraba evidencia de ECP del VIE.

Tras un ensayo de inactivación satisfactorio, el EIB residual se neutralizó mediante la adición de una solución fría ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) de tiosulfato sódico 1,0 M, proporcionando una concentración final de 6 mM. Los líquidos inactivados se
20 almacenaron a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o temperatura inferior hasta la formación del producto final. En el caso de que el ensayo de inactivación fuese insatisfactorio, los líquidos pudieron tratarse nuevamente con EIB utilizando el procedimiento descrito anteriormente y se sometieron a ensayo nuevamente para la inactivación.

En caso necesario, cada lote de líquido de virus final inactivado se concentró 2X a 50X mediante ultrafiltración para
25 alcanzar la concentración deseada. Habitualmente se agruparon para la concentración uno o más lotes finales de líquidos de virus inactivado. El virus final concentrado se mantuvo a una temperatura de entre 4°C y 8°C hasta iniciar el proceso de carga.

El producto resultante tras la inactivación y la concentración contenía gentamicina en cantidades residuales
30 procedente del medio utilizado en la producción de los líquidos de recolección de virus. Estos niveles no excedieron el nivel permitido por cada dosis de producto. Se formuló la vacuna para que contuviese 2 mg de Carbopol[®] 971 por cada dosis de vacuna.

Los componentes para la carga se añadieron asepticamente a un recipiente de vidrio, plástico o acero inoxidable
35 mediante derivación sifónica o mediante presión positiva (nitrógeno filtrado a esterilidad). La serie de dilución se mezcló uniformemente y después se mantuvo a una temperatura de entre 2°C y 8°C hasta encontrarse lista para rellenar los recipientes finales. Lo siguiente proporciona una composición de vacuna de VIE inactivado ilustrativa:

Newmarket/77	3.000 ml
Newmarket/2/93	6.000 ml
Kentucky/95	6.000 ml
Carbopol [®] 971 (solución madre al 0,5%)	12.000 ml
Solución salina	33.000 ml

40 Si se desea, la solución salina o una parte de la misma puede sustituirse por una solución que contenga VHE-1 inactivado y, opcionalmente, VHE-4 inactivado, para producir una vacuna de combinación de VHE/VIE.

Tras agrupar, la serie de dilución se aspiró en recipientes estériles de plástico o acero inoxidable para transferirlas a
45 un área de rellenado estéril para rellenar los recipientes finales, o la serie total se muestreó y aspiró en bombonas de plástico estériles. En el caso de que la serie se aspirase en bombonas, se almacenaba a una temperatura de entre 4°C y 8°C . En el caso de que debiesen rellenarse de una sola vez dos o más bombonas de vacuna final, el producto se agrupaba en un recipiente estéril de acero inoxidable cuando se requería para el rellenado. Se formuló cada dosis de vacuna para que contuviese suficientes líquidos de recolección de virus inactivado para proporcionar por lo
50 menos 64 unidades de hemaglutinación (UHA) de Newmarket/77 y 128 UHA de Newmarket/2/93 y 128 UHA de Kentucky/95.

Ejemplo 3 - Método de seguimiento de la inactivación de los virus

55 Se sometió a ensayo cada lote de VHE-1, VHE-4, VIE Newmarket/77 y VIE Kentucky/95 para la inactivación mediante subcultivo en células EVeró. Se sometió a ensayo cada lote de VIE Newmarket/2/93 para la inactivación mediante subcultivo en células MDCK. Se inocularon ciento cincuenta (150) cm^2 de monocapa de cultivo de células EVeró con 1,0 ml de líquidos de VHE o VIE inactivado y se mantuvieron a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 14 días con por lo

menos dos pases. Al final del periodo de mantenimiento, se examinaron las monocapas celulares para el ECP típico de VHE o VIE. Para los controles de VHE, se inoculó un matraz de cultivo de células de EVeró con VHE-1 ó VHE-4 de referencia (control positivo), proporcionando una multiplicidad (MOI) diana de 0,001. Para los controles de VIE, se inoculó un matraz de cultivo de células EVeró con VIE Newmarket/77 ó VIE Kentucky/95 de referencia (control positivo), proporcionando una multiplicidad (MOI) diana de 0,01. Para los ensayos de VIE Newmarket/2/93, se inoculó un matraz de cultivo de células MDCK con VIE Newmarket/2/93 de referencia, proporcionando una MOI diana de 0,01. A modo de control negativo, se incubó un matraz no inoculado con células EVeró o células MDCK bajo las mismas condiciones que el cultivo o cultivos de ensayo. Tras la incubación y subcultivo, la ausencia de células infectadas por virus en los líquidos víricos tratados con EIB constituía un ensayo satisfactorio de inactivación. Las células de control inoculadas con el virus de referencia deberían mostrar un ECP típico de VHE o de VIE. El matraz no inoculado no debería mostrar evidencia de ECP de VHE o de VIE. Tras un ensayo de inactivación satisfactorio, el EIB residual se neutralizó mediante la adición de una solución fría de tiosulfato sódico y los líquidos inactivados se almacenaron a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o temperatura inferior previamente a la mezcla final del producto.

15 Ejemplo 4 - Ensayo de liberación de potencia de VHE

Recubrimiento de placas de 96 pocillos con mAb de VHE-1 ó mAb de VHE-4

Las placas de 96 pocillos utilizadas para el ensayo de la potencia de las fracciones se recubrieron con el anticuerpo monoclonal de VHE-1. Las placas de 96 pocillos utilizadas para el ensayo de la potencia de las muestras que contenían VHE-4 se recubrieron con el anticuerpo monoclonal de VHE-4. El anticuerpo monoclonal de VHE-1 ("mAb de VHE-1"), 16H9, fracción IgG, se diluyó 1:10.000 en tampón de recubrimiento. El anticuerpo monoclonal de VHE-4 ("mAb de VHE-4"), 20F3, fracción IgG, se diluyó 1:10.000 en tampón de recubrimiento. Se añadieron alícuotas (100 ml) de las soluciones de mAb a todos los pocillos de las placas NUNC MAXISORP excepto a los pocillos de la columna 1, y las placas se sellaron con tapas de sellado de placas. A continuación, las placas multipocillo se incubaron durante 1 hora a 37°C y durante la noche a 4°C .

Se cuantificaron los antígenos VHE-1 ó VHE-4 utilizando placas de microtitulación recubiertas con el mAb respectivo. Antes del ensayo en el ELISA, se congelaron a -40°C o temperatura inferior alícuotas de un ml de las muestras de ensayo (por ejemplo vacuna final con adyuvante o vacuna de recipiente final) en tubos cónicos de microcentrífuga, durante un mínimo de 18 horas. El día en que se llevó a cabo el ELISA, la muestra o muestras congeladas de vacuna de ensayo en tubos de microcentrífuga y el vial congelado de la vacuna de referencia se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37°C y se agitaron con vórtex para resuspender el material sedimentado. Se añadió una alícuota de 2,5 ml de Triton[®] X-100 al tubo de microcentrífuga de vacuna de referencia y a cada tubo de microcentrífuga de vacuna de ensayo. Los tubos de microcentrífuga se agitaron con vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Los tubos se agitaron con vórtex cada 15 minutos. Se añadió una alícuota de 100 ml del control de referencia externo de VHE-1 (o de control de referencia externo de VHE-4) a 900 ml de diluyente de antígeno. Se añadió una alícuota (2,5 ml) de Triton[®] X-100 a la referencia externa de VHE-1 diluida. Los líquidos de referencia externa se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se agitaron con vórtex cada 15 minutos.

Durante esta incubación de una hora, las placas recubiertas con mAb de VHE se lavaron tres veces con PBS-Tween[®]. Los sitios reactivos restantes en los pocillos se bloquearon mediante recubrimiento posterior de todos los pocillos con 200 ml/pocillo de tampón de bloqueo. Las placas se incubaron con tampón de bloqueo a 37°C durante un mínimo de 30 minutos. Tras el periodo de incubación de una hora, se prepararon diluciones en serie de dos veces de la vacuna de referencia y de la vacuna de ensayo mediante transferencia de 500 ml de vacuna de referencia y de muestra de ensayo a una probeta que contenía 500 ml de diluyente de antígeno.

Las placas recubiertas posteriormente se lavaron tres veces con solución de PBS-Tween[®]. Se añadieron alícuotas (50 ml) de las vacunas de referencia y de ensayo no diluidas hasta las diluidas 1:32 a pocillos por duplicado de placas recubiertas con mAb de VHE-1 y con mAb de VHE-4, tal como se muestra en la Tabla IV-1. Se añadieron alícuotas de 50 ml del control de referencia externo apropiado a los pocillos de cada placa, tal como se muestra en la Tabla IV-1. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Durante esta incubación de una hora, se diluyó 1:1.000 suero anti-VHE-1 de caballo (o suero anti-VHE-4 de caballo) en diluyente de anticuerpo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

Tras la incubación de una hora, las placas multipocillo se lavaron tres veces con solución de PBS-Tween[®]. Se añadieron alícuotas (50 ml) del suero anti-VHE-1 de caballo diluido (o de suero anti-VHE-4 de caballo diluido) a todos los pocillos de la placa apropiada, excepto a los pocillos de la columna 1. A continuación, las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Durante esta incubación de una hora, se diluyó 1:2.500 conjugado de anticuerpo de oveja anti-IgG de caballo-HRP en diluyente de anticuerpo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

Tras la incubación de una hora, las placas se lavaron nuevamente tres veces con solución de PBS-Tween®. Se añadieron alícuotas (50 ml) del conjugado de anticuerpo de oveja anti-IgG de caballo-HRP a todos los pocillos de la placa, excepto a los pocillos de la columna 1. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Tras la incubación de una hora, las placas se lavaron nuevamente tres veces con solución de PBS-Tween®.

Se preparó sustrato TMB siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron alícuotas (100 ml) de solución de sustrato TMB con una pipeta multicanal a todos los pocillos de la fila A y después en orden a las filas B a H de la placa. A continuación, las placas multipocillo se incubaron a temperatura ambiente. Se determinaron las densidad ópticas de los pocillos leyendo la placa en un lector de microplacas a una longitud de onda de 650 nm. Los pocillos de control en la columna 1 sirvieron de blancos. Las placas utilizadas para la cuantificación del antígeno VHE-1 se leyeron 35 ± 10 minutos tras la adición de sustrato TMB. Las densidades ópticas en los pocillos que contenían el VHE-1 de referencia externa deberían ser de entre 0,500 y 1,200. Las placas utilizadas para la cuantificación del antígeno VHE-4 se leyeron 45 ± 10 minutos tras la adición de sustrato TMB. Las densidades ópticas en los pocillos que contenían el VHE-4 de referencia externa deberían ser de entre 0,500 y 1,200. Se determinaron los valores de potencia relativa ("VPR") de las muestras de vacuna de ensayo a partir de las lecturas de densidad óptica mediante normalización de los valores respecto al control de referencia externa de VHE-1 (o respecto al control de referencia externa de VHE-4).

III. Criterios de validez de un ensayo

La densidad óptica en pocillos que contiene la referencia externa de VHE-1 (o la referencia externa de VHE-4) debería ser de entre 0,500 y 1,200 30± 5 minutos después de la adición del sustrato TMB. La densidad óptica en los pocillos de control negativo no debería ser superior a 0,250. En el caso de que cualquiera de estos criterios de validez no se satisfaga, el ensayo debe considerarse ENSAYO NULO y el ensayo puede repetirse sin sesgo. Los resultados de potencia relativa de un ensayo se consideraron satisfactorios en el caso de que el VPR (para VHE-1 inactivado y/o VHE-4 inactivado) de una dosis unitaria de la muestra de ensayo fuese superior o igual a 1,0.

IV. Reactivos

Anticuerpo monoclonal específico de VHE-1, fracción IgG. El hibridoma 16H9 se obtuvo del Dr. George Allen, Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington, KY. La fracción IgG del ascites de ratón se preparó comercialmente. El anticuerpo purificado se identificó como mAb 16H9-IgG de VHE-1, lote 001, 11-11-98, Exp. 11-11-03. La fracción de anticuerpo IgG se almacenó a una temperatura de entre 4°C y 8°C.

Anticuerpo monoclonal específico de VHE-4, fracción IgG. El hibridoma 20F3 se obtuvo del Dr. George Allen, Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington, KY. La fracción IgG del ascites de ratón se preparó comercialmente. El anticuerpo purificado se identificó como mAb 20F3-IgG de VHE-4, lote 001/11-11-98, Exp. 11-11-03. La fracción de anticuerpo IgG se almacenó a una temperatura de entre 4°C y 8°C.

Suero policlonal anti-VHE-1 de caballo. Se preparó un agrupado de suero a partir de sangre recogida de caballos de control no vacunados en el estudio de inmunogenicidad de VHE, 623-510-98E-015, 21 días después del reto con VHE-1 virulento. El anticuerpo se identificó como anti-VHE-1 de caballo, lote 001/030199, Exp. 030104. El suero se almacenó congelado a -40°C o temperatura inferior.

Suero policlonal anti-VHE-4 de caballo. Se preparó un agrupado de suero a partir de sangre recogida de caballos de control no vacunados en el estudio de inmunogenicidad de VHE, 623-510-98E-015, 21 días después del reto con VHE-4 virulento. El anticuerpo se identificó como anti-VHE-4 de caballo, lote 001/030399, Exp. 030304. El suero se almacenó congelado a -40°C o temperatura inferior.

Conjugado de anticuerpo de oveja anti-IgG de caballo-HRP, 1 mg/ml, Bethyl Laboratories, Inc., nº de catálogo A70-121P. El conjugado de anticuerpo se almacenó a una temperatura de entre 4°C y 8°C.

Líquidos de referencia externa de VHE-1. Los líquidos de VHE-1 se produjeron siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Los viales de líquidos de referencia externa de VHE-1 se identificaron como VHE-1 Liq. ref. ext., lote 001/040599. Exp. 040504. Los líquidos de virus se almacenaron a -40°C o temperatura inferior.

Líquidos de referencia externa de VHE-4. Los líquidos de VHE-4 se produjeron siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 6. Los viales de líquidos de referencia externa de VHE-4 se identificaron como VHE-4 Liq. ref. ext., lote 001/040699. Exp. 040604. Los líquidos de virus se almacenaron a -40°C o temperatura inferior.

Vacuna de referencia de VHE-1/VHE-4. La vacuna de referencia de VHE-IIVHE-4 es la misma vacuna utilizada en el estudio de inmunogenicidad en el Ejemplo 8 (623-0510-98E-015). La vacuna se identifica como 623-510-98E-015,

lote nº 001, 11-6-98. Exp. 110603. La vacuna de referencia se almacenó a -40°C o temperatura inferior.

Se utilizaron los reactivos disponibles comercialmente siguientes en el experimento:

Sistema de sustrato. TMB (dos componentes), Kirkegaard and Perry, nº de catálogo 50-76-00.

5 Triton® X-100. Sigma, nº de catálogo 1043.

Suero bovino. Hyclone Laboratories, Inc., nº de catálogo A-2151-L.

Se utilizaron las soluciones estándares siguientes para la utilización en el experimento:

Tampón de recubrimiento (preparado fresco para cada ensayo y pH ajustado a 9,6)

		g/litro de H ₂ O desionizada
a.	Na ₂ CO ₃ •anhidro	1,59
b.	NaHCO ₃	2,93
PBS (ajustado a pH 7,3)		

		g/litro de H ₂ O desionizada
a.	Na ₂ HPO ₄ •anhidro	1,18
b.	NaH ₂ PO ₄ •anhidro	0,23
c.	NaCl	8,50
Solución de PBS-Tween®		

		g/litro de H ₂ O desionizada
a.	Na ₂ HPO ₄ •anhidro	1,18
b.	NaH ₂ PO ₄ •anhidro	0,23
c.	NaCl	8,50
d.	Tween® 20	0,05 ml

Tampón de bloqueo (preparado fresco el día del ensayo)

a.	PBS	75 ml
b.	Suero bovino	25 ml

10

Diluyente de antígeno (igual que el tampón de bloqueo; preparado fresco el día del ensayo)

Diluyente de anticuerpo (preparado fresco el día del ensayo).

a.	PBS	50 ml
b.	Triton® X-100	0,05 ml

Ejemplo 5 - Inoculación de caballos con VHE-1 inactivado y posterior reto con VHE-4 virulento

15

El propósito del estudio era demostrar la inmunogenicidad de un virus VHE-1 KyA inactivado para la protección cruzada de caballos vacunados y retados con VHE-4 virulento. La vacuna utilizada en el estudio incluía virus VHE-1 KyA inactivado con adyuvante Carbopol® 971. Se vacunaron caballos con dos regímenes de vacunación diferentes. Un régimen de vacunación eran tres vacunaciones intramusculares y el otro régimen de vacunación eran dos vacunaciones intramusculares y una administración intranasal. Los caballos se vacunaron a intervalos de dos a cuatro semanas. Los caballos no vacunados sirvieron de controles. Tres semanas después de la última vacunación, se retaron caballos vacunados y de control no vacunados con VHE-4 virulento.

20

Se observó enfermedad respiratoria severa en los caballos de control no vacunados después del reto con VHE-4. Los caballos vacunados mediante régimen intramuscular o intramuscular/intranasal con la vacuna de VHE-1 KyA mostraron una reducción significativa de los signos clínicos de enfermedad respiratoria causada por VHE-4 en comparación con los caballos de control no vacunados y retados. Se produjo una reducción significativa en la propagación de virus entre caballos vacunados con cualquiera de los regímenes de vacunación frente a los caballos de control no vacunados. Los resultados del estudio demuestran la inmunogenicidad de la fracción de VHE-1 KyA inactivado de la vacuna contra la enfermedad respiratoria causada por el VHE-4 virulento. Además, el estudio demostró que la fracción de VHE-1 KyA inactivado era inmunogénica al administrarse tanto por la vía parenteral como por la vía parenteral/intranasal.

25

30

Se obtuvieron de fuentes seleccionadas caballos macho y hembra sanos de edades comprendidas entre cuatro y nueve meses. Los caballos se identificaron mediante etiquetas numeradas en el roncal y números de microchip. Todos los caballos presentaban buena salud al inicio del estudio. En el momento de la primera vacunación, los

caballos presentaban títulos de neutralización vírica (NV) de ≤ 2 para VHE-1 y VHE-4. Los caballos se dividieron aleatoriamente en grupos mediante la extracción de números de identificación de los caballos de una bolsa. Durante los periodos de vacunación y de reto, los caballos se mantuvieron juntos en corrales abiertos y se alimentaron con heno de alfalfa de calidad lechera de alimentación libre, suplemento dietético Sweet 14, Bio-mineral equino y agua *ad libitum*.

Los caballos se dividieron aleatoriamente en grupos mediante la extracción de una bolsa de números de identificación de los caballos. Los caballos fueron observados para su salud general y cualquier comportamiento anormal durante el periodo de vacunación. No se observó ningún comportamiento anormal o condiciones de salud adversas en ninguno de los caballos tras las vacunaciones y no se observaron reacciones adversas en el sitio de inyección en ningún caballo tras las vacunaciones. No se observaron signos clínicos de enfermedad respiratoria en ninguno de los caballos durante el periodo de vacunación.

Se produjeron líquidos de VHE-1 para la utilización en la vacuna siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Todos los líquidos víricos se encontraban en el quinto subcultivo a partir del virus inóculo madre y se produjeron en células en el vigésimo pase a partir del cultivo celular madre. Se formuló la vacuna para que contuviese VHE-1 y VIE Newmarket/77, subgrupo A1, VIE Kentucky 95, subgrupo A2 y Newmarket 2/93, subgrupo A2, por cada dosis de dos ml (producida siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2). La vacuna se etiquetó como VHE-1 Imm Vac, 623-510-99E-116, lote nº 001, 19 de diciembre de 1999.

Se administró la composición inmunogénica que contenía VHE-1 inactivado en caballos en dos regímenes de vacunación. Un régimen de vacunación eran tres vacunaciones intramusculares a intervalos de tres semanas. El otro régimen eran dos inoculaciones intramusculares a intervalos de dos a cuatro semanas seguido de una tercera inoculación por la vía intranasal dos a cuatro semanas después. Cada grupo de régimen de vacunación contenía 11 ó más caballos. Un grupo de 18 caballos sirvió como controles no vacunados. Tres semanas después de la última vacunación los caballos se retaron con VHE-4 virulento. Se realizó un seguimiento de los caballos para signos clínicos de enfermedad respiratoria causada por VHE-4 y se registró la severidad de la enfermedad mediante un sistema de puntuación descrito a continuación, en la Tabla V-1. Se extrajeron muestras de sangre y nasales para la evaluación serológica e hisopos nasales para el aislamiento de virus antes de la vacunación y en tiempos seleccionados después de la vacunación.

Tabla V-1
Sistema de puntuación de signos clínicos

Signo clínico	Puntuación asignada a cada día que mostraba el signo
Descarga nasal	
cantidad pequeña serosa	1
cantidad copiosa serosa	2
cantidad pequeña mucopurulenta	3
cantidad copiosa mucopurulenta	4
Pirexia	
102,5-103,9°F	1
104,0-76,06°C	2
$\geq 105,0^\circ\text{F}$	3
Otros síntomas	
Conjuntivitis	1
Tos	2
Disnea	3
Depresión	4
Tratamiento antibiótico requerido para infección bacteriana secundaria	5

Se llevaron a cabo en células Vero cinco réplicas de titulación de virus VHE-4 de reto, cepa 405. El título para las titulaciones fue de 4,63 TCID₅₀ Log₁₀/1 ml para cada una de las cinco titulaciones. Se administraron dos ml para el reto, proporcionando 4,9 TCID₅₀Log₁₀/dosis. La dosis de virus virulento resultó suficiente para provocar una enfermedad respiratoria clínica severa en caballos de control no vacunados.

La cepa VHE-4 405 se obtuvo de la American Type Culture Collection y se propagó en células Vero. Este virus se aisló a partir de un caballo con rinoneumonitis y fue caracterizado por el Dr. M. Studdert, un científico bien reconocido en el VHE y las enfermedades causadas por VHE. El virus se envió a la ATCC como ejemplo relevante y representativo de VHE-4 y previamente había sido recomendado por NVSL como cepa de reto de VHE-4.

Se descongelaron soluciones madre de VHE-4 para la utilización en el reto y se diluyeron para que contuviesen una concentración diana de 5,0 TCID₅₀Log₁₀/ml y se congelaron a -70°C. Se descongeló una muestra de virus de reto y se determinó el título. En el momento del reto, se descongelaron los líquidos víricos y se extrajeron dos ml de VHE-4 con una jeringa de tres ml y una aguja de calibre 21. Se extrajo la aguja y el virus de reto se administró intranasalmente en grupos apropiados de caballos vacunados y no vacunados.

Después del reto, se realizó un seguimiento de los caballos para signos clínicos de enfermedad respiratoria causada por VHE-4, incluyendo pirexia, descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea, depresión y otros tales como tratamiento antibiótico requerido para una infección bacteriana secundaria. Se observaron los caballos diariamente para enfermedad clínica y se registró la severidad de la enfermedad.

Se extrajeron hisopos nasales para el aislamiento de VHE en días seleccionados tras el reto vírico y se almacenaron a -70°C. Las muestras congeladas se descongelaron y se extrajo el hisopo del medio de transporte. La muestra se procesó mediante centrifugación a 2.500xg durante 20 minutos a una temperatura de entre 19°C y 22°C. Se añadió una alícuota de 0,1 ml de la muestra procesada a un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 48 pocillos que contenía monocapas de 24 horas de células Vero. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂ durante siete días. Se observaron los pocillos de manera periódica para la presencia de efecto citopático (ECP) típico del VHE. Los pocillos que mostraban citotoxicidad se subcultivaron tras el periodo de incubación de siete días mediante transferencia de 0,2 ml de pocillo a pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 48 pocillos que contenía una monocapa de 24 horas de células Vero. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂ durante siete días y se observaron para ECP. El título de VHE en las muestras nasales procesadas que eran positivas para ECP se determinó mediante métodos estándares de titulación de las células en las placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos.

Se determinaron los títulos de anticuerpos de NV en los caballos antes y después de la vacunación y después del reto con virus virulentos. Al extraer muestras de sangre para el cribado de los caballos para la utilización en el estudio, todos los caballos presentaban títulos de anticuerpos de NV ≤2 para VHE-1 y VHE-4, excepto el caballo número 13, que presentaba un título de NV de 8 para VHE-1 y VHE-4. En el tiempo de la primera vacunación, el título de NV contra VHE-1 y VHE-4 había bajado a 2 y 4, respectivamente. Un caballo adicional en el grupo intramuscular presentaba un título de NV que se había incrementado de 2 a 8 y dos caballos en el grupo parenteral/intranasal presentaban títulos de NV que se habían incrementado de 2 a 16. Ninguno de los caballos manifestó ninguna evidencia de infección respiratoria. Tras la primera vacunación, el incremento del título de NV de VHE-1 y VHE-4 era variable, pero el título de NV en todos los caballos se incrementó respecto al título previo a la vacunación. Tras la segunda y tercera vacunaciones, el título de NV siguió esencialmente igual a después de la primera vacunación. El título de NV era mayor para VHE-1 que para VHE-4, aunque el título de NV para VHE-1 era más de dos veces, aunque menos de cuatro veces, mayor que el título de NV para VHE-4. Los títulos de NV para VHE-1 y VHE-4 eran mayores en el grupo de vacunación parenteral que en el grupo parenteral/intranasal, aunque por una diferencia inferior a dos veces. A los 21 días del reto con VHE-4 virulento, los títulos de anticuerpos de NV para tanto VHE-1 como VHE-4 se habían incrementado ligeramente o se mantuvieron iguales en los caballos vacunados. Sin embargo, en los caballos de control no vacunados, los títulos de anticuerpos de NV se incrementaron 32 a 128 veces para tanto VHE-1 como para VHE-4 en todos los caballos de control no vacunados excepto uno. Los títulos de anticuerpos de NV para VHE-1 eran similares a los títulos de anticuerpos de NV para VHE-4 en los caballos vacunados y de control tras el reto con VHE-4.

Los títulos de anticuerpos de NV en muestras nasales recogidas de caballos antes y después de la vacunación y tras el reto con virus virulentos se determinaron con el mismo ensayo de NV utilizado para determinar los títulos de anticuerpos en suero. De manera similar a la actividad de NV en el suero tras la vacunación, la actividad de NV en secreciones nasales se incrementó tras la vacunación aunque en menor grado. Tras el reto con VHE-4, el título de anticuerpos de NV se incrementó, aunque sólo ligeramente y sólo en unos cuantos caballos. Los datos de títulos de anticuerpos de NV no se presentan en el informe.

Los caballos se retaron intranasalmente con VHE-4 virulento. Tras el reto, se midió la temperatura de los caballos diariamente y se registraron signos clínicos de enfermedad respiratoria, tales como descarga nasal, incluyendo conjuntivitis, tos, disnea y depresión.

Se realizó un seguimiento de la pirexia en caballos tras el reto con VHE-4. La pirexia era esporádica y de corta duración tanto en los grupos vacunados como en el grupo de control. En la mayoría de los caballos que mostraba pirexia, se observó temperatura elevada durante únicamente uno o dos días. Un caballo vacunado en el grupo parenteral/intranasal mostró pirexia durante cuatro días consecutivos. No se observaron diferencias significativas en la distribución de las puntuaciones de pirexia entre grupos vacunados y de control los días 5 a 8, 10 ó 13 tras el reto. No se llevó a cabo análisis estadísticos los días 1 a 4, 9, 11, 12 y 14 a 21 debido a que menos de dos animales presentaban puntuaciones de pirexia no iguales a cero. Al analizar las temperaturas separadamente por día

utilizando análisis de la varianza se observó evidencia de una reducción significativa de la temperatura en grupos vacunados y de control, aunque sólo durante algunos días individuales.

También se realizaron observaciones de descarga nasal en caballos. Se evaluó la descarga nasal como normal, cantidad pequeña serosa, cantidad copiosa serosa, cantidad pequeña mucopurulenta y cantidad copiosa mucopurulenta y se puntuó como 0, 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Tres caballos en el grupo de vacunación parenteral mostraban descarga nasal mucopurulenta durante sólo un día. Todas las demás puntuaciones de descarga en los grupos vacunados fueron de cantidad pequeña de descarga serosa limitada principalmente a uno o dos días. En contraste, los caballos de control no vacunados mostraron una descarga mucopurulenta y serosa durante múltiples días consecutivos. Se observaron diferencias significativas entre grupos de vacunados y controles (5.0.0479) los días 3 a 9 y 11 a 15 tras el reto. Se observaron diferencias significativas en la distribución de las puntuaciones de descarga nasal entre el grupo de vacunación parenteral y el grupo de control ($p \leq 0,0398$) los días 4, 5, 6, 8, 9 y 11 tras el reto y entre los grupos de vacunación parenteral/intranasal y de control ($p \leq 0,0259$) los días 3 a 8 y 11 posteriores al reto.

Las observaciones posteriores al reto de signos clínicos de conjuntivitis, tos, disnea y depresión se proporcionan en la Tabla 4. La conjuntivitis era el signo primario observado en los vacunados y se registró durante dos a tres días. Un vacunado mostró disnea durante un día y un vacunado manifestó tos durante tres días consecutivos. Todas las demás observaciones de tos fueron durante un día únicamente. Un caballo en cada uno de los grupos de vacunación parenteral y parenteral/intranasal, 8% y 9%, mostró respectivamente dos signos de enfermedad clínica durante únicamente un día. No se observó depresión en ningún vacunado. Al contrario que los vacunados, el 80% de los caballos de control no vacunados mostró signos clínicos severos de enfermedad: tos y depresión durante tres o más días consecutivos tras el reto. Al analizar los signos clínicos como 0=ausente y 1=presente, se observó evidencia de una diferencia significativa en el número de animales que mostraban conjuntivitis en los grupos de vacunación parenteral ($p \leq 0,0315$) y parenteral/intranasal ($p \leq 0,0391$) y el grupo de control no vacunado los días 3 y 6 a 13 posteriores al reto. Se observó evidencia de una diferencia significativa en la reducción de los animales que mostraban depresión ($p \leq 0,0156$) el día 6 tras el reto para los grupos de vacunación parenteral y parenteral/intranasal en comparación con los controles no vacunados. No se observó evidencia de una diferencia significativa entre vacunados y controles para disnea.

Al realizar un recuento del número de signos clínicos mostrados cada día, se observó evidencia de una diferencia significativa en la distribución del número de signos clínicos entre los grupos de vacunación parenteral ($p \leq 0,0242$) y parenteral/intranasal ($p \leq 0,0259$) y los caballos de control no vacunados los días 6 a 9 y día 11 posteriores al reto. Las puntuaciones de signo clínico de conjuntivitis, tos, disnea y depresión se puntuaron como 1, 2, 3 y 4, respectivamente, tal como se indica en la Tabla V-1. Se calculó una puntuación clínica compuesta como la suma de las puntuaciones de descarga nasal y de signo clínico. Las temperaturas no fueron incluidas en el cálculo de la puntuación compuesta. La puntuación clínica compuesta se calculó para cada caballo en cada día posterior al reto. La puntuación clínica compuesta total es la suma de las puntuaciones clínicas para todos los días posteriores al reto. Se observaron diferencias significativas en la puntuación clínica compuesta entre el grupo de parenteral y de control no vacunado ($p < 0,0331$) los días 3 a 9 y 11 a 15 posteriores al reto y diferencias significativas para la puntuación compuesta total ($p \leq 0,0001$). Se observó evidencia de diferencias significativas en la puntuación clínica compuesta entre el grupo de vacunación parenteral/intranasal y el grupo de control no vacunado ($p \leq 0,0241$) los días 3 a 9 y 11 a 15 posteriores al reto y diferencias significativas para la puntuación compuesta total ($p \leq 0,0001$).

Se realizó un seguimiento de la propagación del virus en caballos tras el reto con VHE-4 virulento. Se recogieron muestras nasales de los caballos los días 1 a 7 y en días alternos hasta los 18 días después del reto. Se recuperó virus de reto VHE-4 de las muestras nasales de todos los caballos de control no vacunados excepto uno. Se detectó virus de la mayoría de los caballos de control no vacunados a la dilución de 10^{-2} . Los días 3 a 5 fueron los días principales en que se detectó propagación del virus. Se detectó virus en algunos caballos de control no vacunados el día 6 posterior al reto, aunque a niveles bajos. No se recuperó virus de reto de los caballos vacunados tras el reto.

La vacuna que contenía virus VHE-1 KyA inactivado generó una respuesta inmunológica humoral sistémica al administrarla por las vías tanto parenteral como parenteral/intranasal. La vacunación de los caballos con la vacuna que contenía VHE-1 generó niveles elevados de anticuerpo de NV para VHE-1 y para VHE-4. Los títulos de anticuerpos contra tanto VHE-1 como VHE-4 se detectaron en muestras nasales de los animales vacunados aunque a un título relativamente bajo. De esta manera, la vacuna que contiene VHE-1 KyA inactivado fue capaz de inmunizar los caballos frente a VHE-1 y fue capaz de inmunizar cruzadamente los caballos frente a VHE-4. No se observó una respuesta anormal a la vacunación o reacciones en el sitio de inyección en ninguno de los caballos tras la vacunación.

Se observó enfermedad respiratoria severa que consistía de episodios prolongados de descarga nasal mucopurulenta y serosa, conjuntivitis, tos y depresión en caballos de control no vacunados que habían sido retados

con VHE-4 virulento. En contraste, el número de signos clínicos de enfermedad respiratoria de VHE-4, la severidad de los signos clínicos y el número de vacunados que mostraba signos clínicos se habían reducido significativamente en los caballos vacunados. Los caballos vacunados por la vía parenteral o la vía parenteral/intranasal mostraron una reducción significativa de los signos clínicos de enfermedad respiratoria debido a la infección por VHE-4. La reducción de la enfermedad clínica resultó apoyada por los datos, que establecían que los caballos vacunados tanto por vía parenteral como parenteral/intranasal no propagaron virus tras el reto con VHE-4. Se recogieron muestras nasales de caballos de control no vacunados que contenían niveles elevados de virus en múltiples días posteriores al reto con VHE-4.

El antígeno de VHE-4 KyA inactivado contenido en la vacuna era inmunogénico para la protección cruzada de los caballos frente a la enfermedad respiratoria causada por VHE-4 al administrarlo por las vías parenteral y parenteral/intranasal. En resumen, los resultados del presente estudio demuestran que una vacuna que contiene virus VHE-1 KyA inactivado genera anticuerpos de NV no sólo contra VHE-1 sino anticuerpos de neutralización cruzada contra VHE-4. La vacuna que contenía VHE-1 KyA inactivado fue capaz de proporcionar protección cruzada a los caballos frente a la enfermedad respiratoria causada por VHE-4 virulento al administrarlo mediante un régimen parenteral o parenteral/intranasal.

Ejemplo 6 - Inoculación de caballos con VHE-1 inactivado y posterior reto con VHE-1 virulento

El objetivo del estudio descrito en el presente ejemplo era demostrar la inmunogenicidad de la fracción de VHE-1 al administrarla por las vías intramuscular o intramuscular/intranasal, para la protección cruzada de los caballos frente a la enfermedad causada por VHE-1 virulento. Un objetivo adicional era demostrar la no interferencia de las fracciones de VIE presentes con la inmunogenicidad de VHE-1.

El propósito del estudio era demostrar la inmunogenicidad de la fracción de VHE-1 de la vacuna de la rinoneumonitis, virus muerto, para la protección de caballos vacunados y retados con VHE-1 virulento. La vacuna utilizada en el estudio se formuló con VHE-1 inactivado con adyuvante Carbopol® 971. Se vacunaron caballos mediante dos regímenes de vacunación diferentes. Un régimen de vacunación eran tres vacunaciones intramusculares y el otro régimen de vacunación eran dos vacunaciones intramusculares y una administración intranasal. Los caballos se vacunaron a intervalos de dos a cuatro semanas. Los caballos no vacunados sirvieron de controles. Después de seis semanas de la última vacunación, los caballos vacunados y los caballos de control no vacunados se retaron con VHE-1 virulento. Se observaron los signos clínicos de enfermedad respiratoria clínica, incluyendo descarga nasal mucopurulenta, tos, disnea y depresión, en los caballos de control no vacunados tras el reto con VHE-1. Caballos.

Se obtuvieron de varias fuentes caballos macho y hembra sanos de diferencias razas, de tres a cuatro meses de edad. Los caballos se identificaron mediante etiquetas numeradas en el ronzal y números de microchip. Todos los caballos presentaban un buen estado de salud al iniciar el estudio, sin incidencia previa conocida de enfermedad respiratoria causada por VHE. Los caballos se dividieron aleatoriamente en grupos mediante la extracción de números de identificación de los caballos de una bolsa. Durante los periodos de vacunación y de reto, los caballos se mantuvieron juntos en corrales abiertos y se alimentaron con heno de alfalfa de calidad lechera de alimentación libre, suplemento dietético Sweet 14, Bio-mineral equino y agua *ad libitum*.

Los caballos se dividieron aleatoriamente en grupos mediante la extracción de una bolsa de números de identificación de los caballos. Los caballos fueron observados para su salud general y cualquier comportamiento anormal durante el periodo de vacunación. Todos los caballos presentaban buena salud al inicio del estudio. No se observó ningún comportamiento anormal o condiciones de salud adversas en ninguno de los caballos tras las vacunaciones y no se observaron reacciones adversas en el sitio de inyección en ningún caballo tras las vacunaciones. No se observaron signos clínicos de enfermedad respiratoria causada por VHE en ninguno de los caballos durante el periodo de vacunación.

Aproximadamente tres semanas antes de la fecha prevista de reto de los caballos con VHE-1 virulento, se produjo un brote de parotiditis en los caballos. Las muestras obtenidas de los nódulos linfáticos hinchados se enviaron al laboratorio diagnóstico de Montana State University y se aisló *Streptococcus equi* de las muestras. Se administró penicilina en los caballos y estos fueron vacunados con una vacuna viva atenuada de *S. equi*, Pinnacle. Se dejó que los caballos se recuperasen de la parotiditis durante tres semanas antes del reto con VHE-1 virulento. Un caballo, de control no vacunado, fue retirado del estudio el día del reto con VHE-1. Se había observado una ligera depresión y disnea y se habían oído roncus agudos durante la inspiración. Otro caballo, en el grupo de vacunados por vía intramuscular, murió el 21 de septiembre de 2000, cinco semanas antes del reto con VHE-1. La causa de muerte fue neumonía. Un tercer caballo, en el grupo de vacunación por vía intramuscular, murió el 28 de octubre de 2000, un día después del reto. La causa de muerte fue la ruptura de un absceso mesentérico y posterior toxemia. Se aisló *S. equi* del absceso. Todos los caballos retados con VHE-1 se encontraban sanos y no mostraban evidencia de

infección por *S. equi*. Todos los datos de los caballos retirados del estudio fueron excluidos del informe.

Vacuna.

5 Se produjeron líquidos de VHE-1 para la utilización en la vacuna siguiendo el procedimiento descrito en los Ejemplos 1 y 2. Todos los líquidos víricos se encontraban en el quinto subcultivo a partir del virus inóculo madre y se produjeron en células en el vigésimo pase a partir del cultivo celular madre. Se formuló la vacuna para que contuviese VHE-1 y VIE Newmarket/77, subgrupo A1, VIE Kentucky 95, subgrupo A2 y Newmarket 2/93, subgrupo A2, por cada dosis de dos ml. La vacuna se denominó VHE-11mm Vac, lote nº 001, 6129-0510-00E-045, 3-agosto-10 2000.

Diseño del estudio.

15 La vacuna se administró en los caballos mediante dos regímenes de vacunación. Un régimen de vacunación eran tres vacunaciones intramusculares a intervalos de dos a cuatro semanas. El otro régimen eran dos vacunaciones intramusculares a intervalos de dos a cuatro semanas y una tercera vacunación por vía intranasal dos a cuatro semanas después. Cada grupo de régimen de vacunación contenía 19 ó 20 caballos. Un grupo de 20 caballos sirvió como grupo de control no vacunado. Seis semanas después de la última vacunación los caballos fueron retados con VHE-1 virulento. Se realizó un seguimiento de los caballos para signos clínicos de enfermedad respiratoria causada por VHE-1 y se registró la severidad de la enfermedad. Se extrajeron muestras de sangre y nasales para la evaluación serológica e hisopos nasales para el aislamiento del virus antes y en tiempos seleccionados posteriores a la vacunación. La recolección de las muestras de sangre, nasales y de los hisopos nasales se describe en el protocolo de estudio de los animales.

25 Títulos de anticuerpos de NV séricos contra VHE-1 y VHE-4.

Se determinaron los títulos de anticuerpos de VN en los caballos antes y después de la vacunación y después del reto con VHE-1 virulentos. Todos los caballos en los grupos de vacunación intramuscular e intramuscular/intranasal presentaban títulos de anticuerpos de NV ≤ 2 ó 4 contra VHE-1 en el tiempo de la primera vacunación. Un caballo en el grupo de vacunación intramuscular y cinco caballos en el grupo de vacunación intranasal presentaban títulos de anticuerpos de NV contra VHE-4 de 8 ó 16 en el tiempo de la primera vacunación. Los títulos de anticuerpos de NV en los caballos de control no vacunados eran ≤ 2 a 16, con la mayoría ≤ 2 ó 4 en el tiempo de la primera vacunación. Ninguno de los caballos mostró ninguna evidencia de infección respiratoria y no se produjo exposición previa conocida al VHE. Tras una vacunación, se produjo un incremento reducido a nulo del título de NV contra VHE-1 y VHE-4. Los títulos de anticuerpos en los caballos de control no vacunados no cambiaron y, de hecho, los títulos de anticuerpos en algunos controles se redujeron ligeramente respecto a los títulos previos a la vacunación. Tras la segunda vacunación, los títulos de anticuerpos de NV contra VHE-1 se incrementaron en los grupos de vacunados por vía intramuscular y por vía intramuscular/intranasal. Los títulos de anticuerpos contra VHE-4 no se incrementaron en ninguno de los grupos vacunados. Los títulos de anticuerpos en los controles no vacunados permanecieron sin cambios o continuaron bajando en el grupo de control no vacunado. Tras la tercera vacunación, los títulos de NV contra VHE-1 continuaron incrementándose. Los títulos de anticuerpos contra VHE-1 también se incrementaron tras la tercera vacunación. La media geométrica de los títulos de anticuerpos de NV contra VHE-1 y VHE-4 en el grupo de vacunación intramuscular era de 86 y 19, respectivamente, y de 69 y 20 para VHE-1 y VHE-4, respectivamente, en el grupo intramuscular/intranasal. Con la excepción de los tres caballos de control no vacunados, los títulos de anticuerpos contra VHE-1 y VHE-4 permanecieron sin cambios o habían bajado al final del tercer periodo de vacunación. A los 21 días del reto con VHE-1 virulento, los títulos de anticuerpos de NV para tanto VHE-1 como VHE-4 se habían incrementado ligeramente en algunos vacunados y se incrementaron sólo ligeramente o se mantuvieron iguales en otros vacunados. Sin embargo, en los caballos de control no vacunados, los títulos de anticuerpos de NV se incrementaron en más de 100 veces contra tanto VHE-1 como VHE-4 en todos los caballos de control no vacunados excepto cuatro. En general, los títulos de anticuerpos de NV eran mayores contra VHE-1 que contra VHE-4.

Titulación de virus de reto VHE-1.

55 Se llevaron a cabo cinco réplicas de titulación de virus de reto VHE-1, cepa KyD en células Vero. Los resultados de la cinco réplicas de titulación fueron 4,4, 4,4, 4,4, 4,4 y 4,5 TCID₅₀ Log₁₀/ml. El título medio fue de 4,4 TCID₅₀ Log₁₀/ml. Se administraron dos ml en cada caballo para el reto, proporcionando 4,7 TCID₅₀Log₁₀/dosis de 2 ml. La dosis diana de virus que debía administrarse en los caballos para el reto fue de 4,0 TCID₅₀ Log₁₀/dosis de 2 ml.

60 Reto de caballos con VHE-1 virulento.

La cepa VHE-1 KyD se obtuvo de la American Type Culture Collection y se propagó en células Vero. Las soluciones

madre de VHE-1 a utilizar para el reto debían contener una concentración diana. Las soluciones madre se congelaron a -70°C . Se descongeló una muestra de virus de reto y se determinó el título. En el momento del reto, se descongelaron los líquidos víricos y se extrajeron dos ml de VHE-1 con una jeringa de tres ml y una aguja de calibre 21. Se extrajo la aguja y el virus de reto se administró intranasalmente en grupos apropiados de caballos vacunados y no vacunados. Los caballos vacunados y de control no vacunados se alojaron juntos en corrales abiertos durante el periodo de 21 días posterior al reto.

Después del reto se realizó un seguimiento de los caballos para pirexia y signos clínicos de enfermedad respiratoria causada por VHE-1, incluyendo descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea, depresión y otros tales como el tratamiento antibiótico requerido para una infección bacteriana secundaria. Se observaron los caballos diariamente para enfermedad clínica y se registró la severidad de la enfermedad.

Se realizó un seguimiento de la pirexia en caballos tras el reto con VHE-1. La pirexia era esporádica y se extendía durante toda la duración del periodo de reto. Algunos caballos en el grupo de control no vacunado, así como en ambos grupos de vacunación, presentaron temperaturas elevadas durante dos y tres días consecutivos, pero aparentemente no existía correlación entre la pirexia y los signos clínicos de enfermedad respiratoria. No se observaron diferencias significativas en la distribución de las puntuaciones de pirexia en cada uno de los grupos de vacunación y el grupo de control no vacunado.

También se realizaron observaciones de la descarga nasal en los caballos. Se evaluó la descarga nasal como normal, cantidad pequeña serosa, cantidad copiosa serosa, cantidad pequeña mucopurulenta y cantidad copiosa mucopurulenta y se puntuó como 0, 1, 2, 3 y 4, respectivamente, según el protocolo de animales. Se observó descarga nasal serosa tras el reto en todos los caballos en el grupo de vacunación intramuscular, con aproximadamente un número igual de caballos con cantidades ligeras y copiosas de descarga serosa. Los caballos 405 y 423 presentaron dos días consecutivos de descarga mucopurulenta y los caballos 420 y 469 presentaron un día de descarga mucopurulenta. Los caballos de control no vacunados mostraron una descarga principalmente mucopurulenta durante múltiples días consecutivos. Al analizar las puntuaciones de descarga nasal según el sistema de puntuación en el protocolo de animales, se puso de manifiesto una diferencia significativa en la distribución de las puntuaciones de descarga nasal entre el grupo intramuscular y el grupo de control no vacunado los días 5 a 7 y 10 posteriores al reto ($p \leq 0,0018$). Se observaron resultados similares de descarga nasal serosa en el grupo intramuscular/intranasal posteriormente al reto, registrando descarga mucopurulenta en dos vacunados durante uno o dos días. Se observó una diferencia significativa en la distribución de las puntuaciones de descarga nasal entre el grupo intramuscular/intranasal y el grupo de control no vacunado los días 4 a 7, 10 y 19 posteriores al reto ($p \leq 0,0463$).

Al analizar las puntuaciones de descarga nasal según un sistema de normal=0, seroso=1 y mucopurulento=2, se observó una diferencia significativa entre el grupo intramuscular y el grupo de control no vacunado los días 5 a 7, 10 y 17 posteriores al reto ($p \leq 0,0463$). Se observó además una diferencia significativa en la distribución de las puntuaciones de descarga nasal entre el grupo intramuscular/intranasal y el grupo de control no vacunado los días 4 a 7 y 10 posteriores al reto ($p \leq 0,0092$).

También se realizaron observaciones de signos clínicos de conjuntivitis, tos, disnea y depresión posteriores al reto. Los días 3 a 11 posteriores al reto fueron días en que se observaron los signos más severos de enfermedad en los caballos. Los signos clínicos de enfermedad se produjeron más frecuentemente los días 3 a 11 posteriores al reto. Aparentemente se produjo también una etapa secundaria de signos clínicos que se observaron en los vacunados y en los controles. Sin embargo, ésta se observó en los vacunados únicamente días individuales, y en los controles durante múltiples días. La tos y la conjuntivitis fueron los signos principales de enfermedad clínica observados en los vacunados en el grupo de régimen intramuscular. La conjuntivitis y la tos fueron observadas en los vacunados durante no más de tres días consecutivos. Se observó una reducción significativa de la proporción de animales que mostraba conjuntivitis en el grupo intramuscular en comparación con los controles no vacunados los días 6 y 7 posteriores al reto ($p \leq 0,0197$) y una reducción significativa de la proporción de animales con tos en el grupo intramuscular en comparación con los controles no vacunados los días 4 a 8 posteriores al reto ($p \leq 0,0463$). La tos y la conjuntivitis fueron los signos clínicos más habituales de enfermedad observados en el grupo de vacunación intramuscular/intranasal. Se observó una reducción significativa de la proporción de animales que mostraba conjuntivitis en el grupo intramuscular/intranasal en comparación con los controles no vacunados los días 6 y 7 posteriores al reto ($p \leq 0,0197$) y una reducción significativa de la proporción de animales con tos en el grupo intramuscular en comparación con los controles no vacunados los días 5 y 6 posteriores al reto ($p \leq 0,0044$). No se observó depresión en ningún caballo vacunado intramuscularmente tras el reto y se observó en sólo dos vacunados por vía intramuscular/intranasal tras el reto. Se observó depresión en múltiples caballos de control no vacunados durante múltiples días. En contraste con los vacunados, los caballos de control no vacunados mostró múltiples signos de enfermedad que en general persistieron durante cuatro días consecutivos y durante hasta siete u ocho días. No se observó disnea en ningún caballo vacunado aunque se observó en dos caballos de control durante

múltiples días. Los mismos dos caballos de control no vacunados requirieron tratamiento antibiótico para infección bacteriana secundaria. Las puntuaciones de enfermedad clínica, calculadas según el protocolo de animales se proporcionan en las Tablas 7 y 8 para los vacunados intramuscularmente frente a los controles y para los vacunados por vía intramuscular/intranasal frente a los controles, respectivamente.

Se realizó un recuento del número de signos clínicos para cada día y se informa como 0, 1, 2 ó 3. Al realizar el recuento del número de signos clínicos mostrado cada día, se observó una diferencia significativa en la distribución del número de signos clínicos entre el grupo intramuscular y el grupo de control no vacunado durante los días 4 a 8 ($p \leq 0,0206$). Se observó una diferencia significativa en la distribución del número de signos clínicos entre el grupo intramuscular/intranasal y el grupo de control no vacunado los días 5 a 7 ($p \leq 0,0159$).

Se calculó una puntuación clínica compuesta como la suma de las puntuaciones de descarga nasal y de signo clínico. La prueba de Kruskal-Wallis, una extensión multigrupo de la prueba de Wilcoxon de dos grupos, se utilizó para someter a ensayo la hipótesis de igualdad de las puntuaciones entre grupos. La prueba de Wilcoxon se utilizó para someter a ensayo la hipótesis de la reducción de las puntuaciones para cada grupo vacunado en comparación con el grupo de control (una prueba de una cola) y para someter a ensayo la hipótesis de igualdad de las puntuaciones entre grupos vacunados (una prueba de dos colas). Se observó una reducción significativa de las puntuaciones clínicas compuestas en grupo intramuscular y grupo de control no vacunado los días 4 a 7 y 11 posteriores al reto ($p \leq 0,0372$) y para la puntuación clínica compuesta total ($p \leq 0,0001$). Se observó una reducción significativa de las puntuaciones clínicas compuestas en el grupo intramuscular/intranasal y en el grupo de control no vacunado los días 4 a 7 y 11 posteriores al reto ($p \leq 0,0408$) y para la puntuación clínica compuesta total ($p \leq 0,0002$).

También se calculó una puntuación clínica compuesta modificada: la suma de la puntuación de observación clínica y la puntuación de descarga nasal pero sin pirexia. Se observó una reducción significativa de las puntuaciones clínicas compuestas modificadas en el grupo intramuscular y el grupo de control no vacunado los días 3 a 8 y 10, 11 y 19 posteriores al reto ($p \leq 0,0383$) y para la puntuación clínica compuesta total ($p \leq 0,0001$). También se observó una reducción significativa de las puntuaciones clínicas compuestas en el grupo intramuscular/intranasal y en el grupo de control no vacunado los días 3 a 7 y 10, 11 y 19 posteriores al reto ($p \leq 0,0487$) y para la puntuación clínica compuesta total ($p \leq 0,0001$).

Propagación del virus a partir de los caballos después del reto.

Se recuperó el virus de reto VHE-1 a partir de muestras nasales de todos los caballos de control no vacunados que propagaron virus VHE-1 tras el reto y se almacenaron a -70°C . Las muestras congeladas se descongelaron y se extrajo el hisopo del medio de transporte. La muestra se procesó mediante centrifugación a $2.500 \times g$ durante 20 minutos a una temperatura de entre 19°C y 22°C . Se añadió una alícuota de 0,1 ml de la muestra procesada a un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 48 pocillos que contenía monocapas de 24-48 horas de células Vero. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en un incubador de CO_2 durante siete días. Se observaron los pocillos periódicamente para la presencia de efecto citopático (ECP) típico del VHE. Los pocillos que mostraban citotoxicidad se subcultivaron tras el periodo de incubación de siete días mediante transferencia de 0,2 ml de pocillo a pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 48 pocillos que contenía una monocapa de 24 horas de células Vero. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en un incubador de CO_2 durante siete días y se observaron para ECP. El título de VHE en las muestras nasales procesadas que eran positivas para ECP se determinó mediante métodos estándares de titulación de las células en las placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos.

Se recuperó virus de reto VHE-1 a partir de las muestras nasales de todos los caballos de control no vacunados que propagaron virus VHE-1 tras el reto. El virus detectado en los hisopos nasales se identificó como VHE-1 mediante el ensayo de inmunofluorescencia utilizando anticuerpo monoclonal específico de VHE-1. Se detectó virus de la mayoría de los caballos de control no vacunados a las diluciones de 10^{-2} a 10^{-3} . Los días dos a cinco fueron los días principales en que se detectó propagación del virus. Se recuperó virus de reto tras el reto a partir de cinco caballos en el grupo de vacunación intramuscular y de tres caballos en el grupo de vacunación intramuscular/intranasal. Se observó una reducción significativa de la proporción de animales que mostraba la presencia de virus en el grupo intramuscular en comparación con los controles no vacunados los días 2 a 5 ($p \leq 0,0001$) y una reducción significativa de la proporción de animales que mostraba la presencia de virus en el grupo intramuscular/intranasal en comparación con los controles no vacunados los días 2 a 5 ($p \leq 0,0003$).

Criterios de estudio satisfactorio.

Deben satisfacerse los criterios siguientes para un estudio de inmunogenicidad de VHE satisfactorio: los caballos de control no vacunados deben seguir siendo seronegativos para VHE-1 y VHE-4 durante el periodo de vacunación y/o no mostrar ningún signo clínico de enfermedad como indicador de la exposición de los caballos de ensayo a virus de campo virulento. Tras el reto con VHE-1 virulento debe producirse una reducción estadísticamente significativa de

los signos clínicos de enfermedad en los animales vacunados en comparación con los signos clínicos de enfermedad en los animales de control no vacunados.

Conclusiones.

5

En el presente estudio, se vacunaron grupos de potros macho y hembra de tres a cuatro meses de edad con tres dosis de vacuna administradas por las vías intramuscular o intramuscular/intranasal. Tras la administración de tres dosis de vacuna, todos los animales vacunados desarrollaron anticuerpos de NV. El desarrollo de la respuesta humoral sistémica fue similar en los animales vacunados mediante el régimen de vacunación intramuscular y el intramuscular/intranasal. La vacunación de los caballos con la vacuna que contiene VHE-1 generó niveles elevados de anticuerpos de NV contra VHE-1 y contra VHE-4. De esta manera, la vacuna que contiene VHE-1 fue capaz de inmunizar los caballos frente a VHE-1 y fue capaz de inmunizar cruzadamente los caballos frente a VHE-4. No se observaron respuestas anormales a la vacunación o reacciones en el sitio de inyección en ninguno de los caballos tras la vacunación.

10

15

Con el fin de evaluar la capacidad de la vacuna que contenía VHE-1 de proteger los caballos frente a la enfermedad respiratoria causada por VHE-1, se compararon los signos clínicos de la enfermedad respiratoria en los caballos vacunados con la enfermedad clínica en los caballos de control no vacunados tras el reto con una cepa virulenta de VHE-1, cepa KyD. Aproximadamente seis semanas después de la tercera vacunación con la vacuna que contenía VHE-1, los caballos vacunados y los de control no vacunados se retaron intranasalmente con VHE-1 virulento. Se observó enfermedad respiratoria severa que consistía de episodios prolongados de descarga nasal serosa y mucopurulenta, conjuntivitis, tos, depresión y disnea en los caballos de control no vacunados y retados con VHE-1 virulento. En contraste con los animales de control, el número de signos clínicos de enfermedad respiratoria de VHE-1, la severidad de los signos clínicos y el número de vacunados que mostraba signos clínicos se redujeron significativamente en los caballos vacunados. La vía intramuscular y la intramuscular/intranasal fueron equivalentes en la reducción de los signos clínicos de enfermedad respiratoria debida a la infección por VHE-1. La reducción de la enfermedad clínica en los vacunados está apoyada por el dato de que menos caballos vacunados por vía intramuscular e intramuscular/intranasal propagó virus tras el reto con VHE-1 y propagó virus durante periodos más cortos de tiempo.

20

25

30

Los resultados del estudio demuestran que la vacuna que contenía VHE-1 inactivado generó anticuerpos de NV que eran inmunogénicos para la protección de los caballos frente a la enfermedad respiratoria causada por VHE-1 al administrarla por la vía intramuscular o la vía intramuscular/intranasal.

35

Ejemplo 7 - Producción de composiciones inmunogénicas que contienen cepas inactivadas de VHE-1 y VHE-4

Para producir la vacuna combinada, en primer lugar se produjeron los cultivos madre de inóculo de VHE-1 y VHE-4. A partir de estos inóculos madre se prepararon cultivos separados de VHE-1 y VHE-4 y después se inactivaron. Los cultivos virus inactivados seguidamente se mezclaron con adyuvante, produciendo la vacuna combinada. El método utilizado para producir la vacuna de VHE-1/VHE-4 inactivada combinada se describe posteriormente.

40

Se produjeron líquidos que contenían VHE-1 KyA inactivado procedente del líquido de cultivo vírico madre de inóculo denominado VHE-1 KyA, CIM Lote 001-dil, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

45

Para crear el virus inóculo madre de virus herpes equino de tipo 4 (VHE-4), el personal de Boehringer Ingelheim Vetmedia, Inc., aisló el virus a partir de un caballo infectado con rinitis. El virus aislado se subcultivó cinco veces en células Vero A139 y tres veces en células EVeró. Se utilizó el tercer pase como virus inóculo madre y se denominó VHE-4 CIM Lote 001-dil.

50

Se produjeron cultivos de VHE-4 mediante infección de células EVeró con virus inóculo contenido en un medio esencial mínimo ("MEM") que presenta 0% a 5% de suero. A continuación, los cultivos se incubaron a 36°C ± 2°C durante 24 a 120 horas en botellas giratorias de vidrio o sobre perlas microportadoras. Durante la incubación, se realizó un seguimiento de los cultivos para los efectos citopáticos (CPE) inducidos por VHE para garantizar la pureza de la cepa de VHE. Si se observaban CPE atípicos o cualquier evidencia macroscópica o microscópica de contaminación, se descartaba el cultivo. Los cultivos víricos puros se recolectaron asépticamente en damajuanas de vidrio estériles, bombonas de plástico estériles o tanques de acero inoxidable estériles, y se clarificó mediante filtración a través de filtros de 8 micrómetros o más. Tras la recolección, el cultivo de virus se inactivó con el fin de producir una vacuna muerta mediante el procedimiento descrito para VHE-1 en el Ejemplo 1.

55

60

Tras la inactivación, los cultivos se sometieron a ensayo para el ECP típico del VHE para garantizar la inactivación del virus, mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. Esta tarea se llevó a cabo pasando los líquidos víricos tratados con EIB por células EVeró y comprobando la presencia de cualquier infección vírica en las células EVeró.

Tras realizar un ensayo de inactivación satisfactorio, que no mostrase infección vírica, se neutralizó el exceso de EIB mediante la adición de una cantidad suficiente de una solución fría ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) de tiosulfato sódico 1,0 M, proporcionando una concentración final de 6 mM.

5 Tras la inactivación y el ensayo de los cultivos de VHE-1 y VHE-4, los cultivos se mezclaron con un adyuvante, formando el producto final, la vacuna inactivada combinada VHE-1/VHE-4. Este producto final contenía líquidos de VHE-1, líquidos de VHE-4, solución madre de adyuvante (Carbopol[®] 971 al 0,5%) y solución salina en una proporción de 3,75:3,00:12,00:41,19. Típicamente, un lote contenía 3.750 ml de VHE-1, 3.000 ml de VHE-4, 12.000 ml de solución de adyuvante y 41.190 ml de solución salina, rindiendo un volumen total de 60 l de serie total.

10 Ejemplo 8 - Inoculación de caballos con la vacuna combinada de VHE-1 y VHE-4 y posterior reto con VHE-4 virulento

15 Se llevó a cabo un experimento para demostrar la inmunogenicidad de la vacuna de combinación inactivada VHE-1/VHE-4. En el experimento se utilizaron seis grupos de caballos macho y hembra de edades comprendidas entre cuatro y siete meses y neutros para los virus VHE-1 y VHE-4. Tal como se ilustra en la Tabla VIII-1, posteriormente, se retaron tres grupos con VHE-1 virulento, mientras que se retaron tres grupos con VHE-4 virulento. De entre los caballos retados con VHE-1, un grupo se vacunó con tres inyecciones intramusculares ("IM"), un grupo se vacunó con dos inyecciones intramusculares seguido de una administración intranasal ("IN") y un grupo no fue vacunado. De manera similar, de los caballos retados con VHE-4, un grupo se vacunó enteramente con inyecciones intramusculares, un grupo se vacunó con dos inyecciones intramusculares seguido de una administración intranasal y un grupo no fue vacunado.

25 Los caballos se vacunaron a intervalos de tres semanas con dosis de 2 ml de la vacuna combinada que presentaba una VPR de 1,0 por dosis de VHE-1 inactivado y de 1,0 por dosis de VHE-4 inactivado. Durante la prueba, se realizó un seguimiento de los caballos para signos de enfermedad respiratoria. No se observaron signos clínicos de enfermedad respiratoria en ninguno de los caballos durante el periodo de vacunación.

Tabla VIII-1

Resumen del ensayo de la vacuna combinada VHE-1/VHE-4				
Grupo	Nº de animales	Método de vacunación	de	Reto
Grupo IV-1	10	IM, IM, IM		VHE-1
Grupo IV-2	10	IM, IM, IN		VHE-1
Grupo IV-3	10	No (grupo de control)		VHE-1
Grupo IV-4	10	IM,IM,IM		VHE-4
Grupo IV-5	10	IM, IM, IN		VHE-4
Grupo IV-6	10	No (grupo de control)		VHE-4

30 Los animales se retaron 3 semanas después de la vacunación con VHE-1 virulento o VHE-4 virulento a una dosis diana de 5,0 TCID₅₀ Log₁₀/2 ml. Concretamente, se utilizó la cepa Kentucky D de VHE-1 (dosis aproximada de 4,5 TCID₅₀ Log₁₀/2 ml) y la cepa 405 de VHE-4 (dosis aproximada de 4,0 TCID₅₀ Log₁₀/2 ml) como virus de reto y se administraron intranasalmente en dosis de 2 ml (administradas como una dosis de 1 ml en cada fosa nasal). Se midió la protección de la vacuna mediante seguimiento de los caballos para signos clínicos de enfermedad respiratoria, tales como pirexia, descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea y depresión, y medición de la severidad de la enfermedad. Además, se extrajeron muestras de sangre y nasales para medir la cantidad de virus propagado.

40 Tras el reto vírico, todos los grupos de caballos vacunados y retados con VHE-1 ó VHE-4 mostraron una reducción significativa de los signos de enfermedad respiratoria, mostrando pocas diferencias entre los grupos de vacunación parenteral y los grupos de vacunación parenteral/intranasal. Concretamente, los animales vacunados experimentaron una reducción significativa de descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea y depresión. Estos resultados demuestran que los antígenos VHE-1 y VHE-4 contenidos en la vacuna inactivada combinada VHE-1/VHE-4 son inmunogénicos al administrarlos por vía parenteral o parenteral/intranasal.

45 Además de que los caballos vacunados mostraron una reducción de enfermedad respiratoria, los caballos vacunados también mostraron una reducción de la propagación del virus. En los caballos vacunados y retados con VHE-1, se observó una propagación vírica de 1 a 2,5 log₁₀ TCID₅₀/ml durante uno a tres días en únicamente 30% del grupo de vacunación parenteral y en 40% del grupo parenteral/intranasal. En contraste, el 90% del grupo de control

no vacunado propagó el virus a razón de 2,5 a 3,75 log₁₀ TCID₅₀/ml durante dos a siete días. De manera similar, en los caballos vacunados y retados con cepa virulenta de VHE-4, se observó una propagación vírica de 1 a 2,5 log₁₀ TCID₅₀/ml durante uno a tres días en únicamente 40% del grupo de vacunación parenteral y en 50% del grupo parenteral/intranasal. Nuevamente, los caballos no vacunados mostraron una propagación vírica mucho mayor, mostrando el 100% del grupo de control no vacunado una propagación vírica de 1 a 5,25 log₁₀ TCID₅₀/ml durante dos a siete días. Estos resultados estadísticos constituyen evidencia de una reducción significativa de la cantidad y número de días en que los caballos vacunados propagaron el virus en comparación con los caballos no vacunados. Esta evidencia demuestra que los antígenos VHE-1 y VHE-4 contenidos en la vacuna inactivada combinada VHE-1/VHE-4 son inmunogénicos al administrarlos por vía parenteral o parenteral/intranasal.

Ejemplo 9 - Inoculación de caballos con la vacuna combinada de VHE-1/VHE-4/influenza equina y posterior reto con virus influenza equina virulento

Se llevó a cabo un experimento con el fin de evaluar la inmunogenicidad de las fracciones de vacuna VIE mediante la evaluación de la respuesta serológica a los subgrupos A1 y A2 de VIE en el animal huésped. El estudio también se diseñó para demostrar la no interferencia de los componentes VIE y VHE en una vacuna de combinación para rinoneumonitis-influenza, virus muertos, mediante la evaluación serológica en el animal huésped. El tercer objetivo era demostrar que los subgrupos A1 y A2 de VIE en la vacuna para influenza y en la vacuna de combinación para rinoneumonitis-influenza era inmunogénicos al administrarlos por las vías parenteral y parenteral/intranasal.

Diseño del estudio.

La vacuna A se administró en los caballos mediante dos regímenes de vacunación. Un régimen de vacunación eran tres vacunaciones intramusculares a intervalos de tres semanas. El otro régimen eran dos vacunaciones intramusculares a intervalos de tres semanas y una tercera vacunación por vía intranasal tres semanas después. Cada grupo de régimen de vacunación contenía 20 caballos. Un grupo de cinco caballos sirvió como controles no vacunados. Se extrajeron muestras de sangre y lavados nasales antes de la vacunación y en tiempos seleccionados posteriores a la misma, para la evaluación de la respuesta serológica a cada una de las tres cepas de vacuna de VIE.

Caballos.

Se obtuvieron de fuentes seleccionadas caballos macho y hembra sanos de edades comprendidas entre siete y nueve meses. Los caballos se identificaron mediante números de microchip y dividieron aleatoriamente en grupos mediante la extracción de números de identificación de los caballos de una bolsa. Durante el periodo experimental, los caballos se mantuvieron en corrales abiertos y se alimentaron con heno de alfalfa de calidad lechera de alimentación libre, suplemento dietético Sweet 14, Bio-mineral equino y agua *ad libitum*. Los caballos fueron observados para su salud general y cualquier comportamiento anormal durante el periodo experimental. No se observó ningún comportamiento anormal o condiciones de salud adversas en ninguno de los caballos tras las vacunaciones y no se observaron reacciones adversas en el sitio de inyección en ningún caballo tras las vacunaciones. En el momento de la primera vacunación, los caballos vacunados con vacuna A presentaban títulos de anticuerpo de inhibición de la hemaglutinación (IHA) ≤10 contra VIE subgrupos A1 y A2.

Vacuna.

La vacuna incluía virus VIE muerto que contenía VIE subgrupo A1 y cepas antigénicamente relevantes de VIE subgrupo A2. Debido a que los subgrupos A2 en Norteamérica difieren de los subgrupos A2 europeos, la vacuna contenía las cepas denominadas Kentucky/95 y Newmarket/2/93, las cuales son representativas de los subgrupos A2 en Norteamérica y en Europa, respectivamente. Se produjeron líquidos de VIE y VHE para la utilización en la vacuna siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 7. Todos los líquidos víricos se encontraban en el quinto pase a partir del virus inóculo madre y se produjeron en células en el vigésimo pase a partir del cultivo celular madre. La vacuna A se formuló para que contuviese 64 unidades de HA de VIE subgrupo A1, 128 unidades de HA de cada uno de los subgrupos de VIE A2 y ≥ 3,0 unidades de potencia relativa (PR) de VHE-1 y ≥3,0 unidades de potencia relativa (PR) de VHE-4 por cada dosis de 2 ml. La vacuna se etiquetó como VIE/VHE Imm/Intfr, 623-0856-98E-107, vacuna A, Lote 001, 12-15-98.

Determinación de la potencia de las fracciones de VIE y VHE de la vacuna A.

La potencia de las fracciones de VIE en la vacuna se determinó utilizando el protocolo de ensayo del National Veterinary Services Laboratories, método suplementario de ensayo para la realización del ensayo de inhibición de la hemaglutinación para el anticuerpo de influenza equina (MVSAM0124.01, fechado 2 de octubre de 1988). Los valores de potencia relativa de las fracciones VHE-1 y VHE-4 en la vacuna A se determinaron mediante el ensayo

ELISA de liberación de potencia de VHE descrito en el Ejemplo 4. La potencia de la vacuna A resultó satisfactoria para las fracciones de VIE. Diez de diez cobayas presentó títulos de anticuerpo de IHA de 80 ó superiores para el subgrupo A1 y 10 de 10 cobayas presentó títulos de anticuerpos de IHA de 40 ó superiores para cada subgrupo A2 en la vacuna. El valor de potencia relativa era de 4,73 y 3,31 para las fracciones VHE-1 y VHE-4, respectivamente.

5

Títulos séricos de anticuerpo de IHA contra VIE subgrupos A1 y A2 tras la vacunación.

Se determinaron los títulos de anticuerpos de IHA en caballos tras la vacunación con vacuna A. Todos los vacunados eran seronegativos para las tres cepas de VIE en el momento de la primera vacunación. En el periodo de prevacunación, dos de los caballos de control no vacunados presentaban títulos de anticuerpos de IHA de 20 contra VIE A1 y los otros tres caballos de control eran seronegativos para VIE A1. Los cinco caballos de control no vacunados eran seronegativos para los dos VIE A2. Durante el periodo experimental, los caballos de control no vacunados siguieron siendo seronegativos para los dos VIE subgrupo A2 y no mostraron una variación de más de dos veces del título de anticuerpos IHA contra VIE subgrupo A1. No se observó ninguna indicación de exposición a VIE de campo durante el periodo experimental. Tras tres semanas de la primera vacunación, la mayoría de los caballos mostró una respuesta serológica a VIE subgrupo A1 y a VIE subgrupo A2 NM. Tras una vacunación, sólo cuatro caballos mostraron una respuesta serológica a VIE subgrupo A2 K. El número de caballos con una respuesta serológica a VIE subgrupo A2 K se incrementó tras la segunda vacunación. Tras la tercera vacunación, 19 de 20 caballos (95%) que habían recibido tres vacunaciones intramusculares presentaba títulos de anticuerpo de IHA de 40 ó superiores contra VIE subgrupo A1. Tras tres inyecciones intramusculares, 18 de 20 (90%) y 20 de 20 (100%) de los caballos presentaba títulos de anticuerpos de IHA de 20 ó superiores contra VIE subgrupos A2 K y A2 NM, respectivamente. De manera similar, 17 de 20 caballos (85%) que habían recibido dos vacunaciones intramusculares y una vacunación intranasal presentaba títulos de anticuerpo de IHA de 40 ó superiores contra VIE subgrupo A1. Dieciocho de 20 (90%) y 20 de 20 (100%) de los caballos presentaba títulos de anticuerpos de IHA de 20 ó superiores contra VIE subgrupos A2 K y A2 NM, respectivamente, tras dos vacunaciones intramusculares y una intranasal. Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos tras la tercera vacunación eran de 45, 35 y 61 para los subgrupos de VIE A1, A2 K y A2 NM, respectivamente, en caballos que habían recibido tres inyecciones intramusculares. Las medias geométricas de los títulos de anticuerpos en caballos que habían recibido dos vacunaciones intramusculares y una intranasal eran de 39, 24 y 51 para los subgrupos de VIE A1, A2 K y A2 NM, respectivamente.

30

Se determinaron los títulos de anticuerpos de IHA en muestras nasales de caballos tras la vacunación con vacuna A. En el momento de la primera vacunación, no se detectaron anticuerpos de IHA contra los dos subgrupos de VIE A2 en ninguna muestra nasal de los caballos. Se detectaron títulos de inhibición de la hemaglutinación contra VIE subgrupo A1 en algunos de los caballos vacunados y de control no vacunados en la primera vacunación. Tras la primera y segunda vacunaciones, los niveles de anticuerpos de IHA en las secreciones nasales eran variables. Tras la vacunación intramuscular o intranasal final, los niveles de anticuerpos de IHA eran más altos contra VIE subgrupo A1 que contra los dos subgrupos A2. Se observaron niveles bajos o nulos de anticuerpos de IHA contra VIE subgrupo A2 K en las muestras nasales de caballos tras la tercera vacunación por la vía intramuscular o intranasal. Resulta interesante que los niveles de anticuerpos de IHA contra VIE subgrupos A1 y A2 NM eran más bajos en los caballos que habían recibido la tercera vacunación por la vía intranasal.

35

40

Comentario

Un objetivo del presente estudio era demostrar la inmunogenicidad de las fracciones VIE A1 y A2 en la vacuna al administrarla mediante cualquiera de los regímenes de vacunación. Se evaluó la inmunogenicidad mediante la determinación de la respuesta sérica de anticuerpos de IHA a las tres cepas de VIE tras la vacunación final. Los resultados demuestran que más de 80% de los caballos en ambos grupos de régimen de vacunación presentaba títulos séricos de anticuerpos de IHA de 40 ó superiores contra VIE subgrupo A1 tras la vacunación final y más de 80% de los caballos en ambos grupos de régimen de vacunación presentaba títulos séricos de anticuerpos de IHA de 20 ó superiores contra ambos grupos de VIE A2 tras la vacunación final. Los niveles de anticuerpos de IHA contra los subgrupos A1 y A2 de VIE también se determinaron en muestras nasales en tiempos seleccionados posteriores a la vacunación. Los títulos mucosales de anticuerpos de IHA eran más bajos que los títulos séricos de anticuerpos de IHA en muestras nasales de caballos en ambos regímenes de vacunación y, en contraste con los títulos séricos de IHA, los títulos mucosales de IHA se incrementaron muy poco tras cada vacunación. Resulta posible que el ensayo de inhibición de la hemaglutinación no detecte el isotipo de anticuerpo que es más prevalente en las muestras nasales. Los experimentos demuestran que VIE subgrupo A1 y subgrupos A2 en la vacuna para influenza, virus muertos, y la vacuna para rinoneumonitis-influenza, virus muertos, era inmunogénicos al administrarlos tanto por vía parenteral como parenteral/intranasal. En particular, el estudio demuestra que VIE subgrupo NM/77 A1 y el subgrupo K95 A2 y los subgrupos NM/2/93 A2 eran inmunogénicos.

50

55

60

Otro objetivo del estudio era demostrar la no interferencia mutua de las fracciones VIE y VHE de la vacuna. La

5 vacuna A utilizada en el estudio se formuló con la dosis de liberación mínima de 64 y 128 unidades de HA de VIE fracciones A1 y A2, respectivamente, y se formuló con un valor de potencia relativa de tres veces o más la de las fracciones VHE-1 y VHE-4. Los resultados del estudio demuestran que una vacuna que contenga la dosis antigénica mínima de las fracciones de VIE y más de la dosis mínima de antígeno VHE es capaz de generar una respuesta serológica satisfactoria contra VIE subgrupos A1 y A2 en el animal huésped. De esta manera, las fracciones VHE-1 y VHE-4 no interfirieron con la inmunogenicidad de las fracciones VIE de la vacuna. De manera similar, las fracciones VHE no resultaron en un ensayo de potencia insatisfactorio en el modelo de cobaya.

10 La invención se ha descrito haciendo referencia a diversas realizaciones y técnicas específicas e ilustrativas. Sin embargo, debe entenderse que pueden realizarse muchas variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Aunque se comentan diversas realizaciones en cierto detalle en la presente memoria, debe apreciarse que la presente invención proporciona conceptos inventivos que pueden realizarse en una amplia diversidad de contextos específicos. Las realizaciones específicas comentadas en la presente memoria son meramente ilustrativas de maneras específicas para preparar y utilizar las presentes composiciones inmunogénicas y no pretenden limitar el
15 alcance de la invención. Diversas modificaciones y combinaciones de las realizaciones ilustrativas, así como otras realizaciones de la invención, resultarán evidentes para el experto en la materia haciendo referencia a la exposición contenida en la presente memoria

Tabla IV-1
PLANTILLA DE PLACA PARA ELISA DE VHE

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Vacuna de ref. No dil.	Vacuna de ref. No dil.	Vacuna de ensayo 1 No dil.	Vacuna de ensayo 1 No dil.	Vacuna de ensayo 2 No dil.	Vacuna de ensayo 2 No dil.	Vacuna de ensayo 3 No dil.	Vacuna de ensayo 3 No dil.	Vacuna de ensayo 4 No dil.	Vacuna de ensayo 4 Undiluc	Referencia externa
B	Bianco	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	Referencia externa
C	Bianco	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	Referencia externa
D	Bianco	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	Control negativo
E	Bianco	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	Control negativo
F		1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	Control negativo
G											
H											

REIVINDICACIONES

1. Vacuna para la protección de un caballo frente a enfermedades asociadas a VHE-1, VHE-4 ó una combinación de los mismos, que comprende:
- 5 virus VHE-1 KyA químicamente inactivado, y un adyuvante.
2. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el virus VHE-1 KyA se ha inactivado químicamente mediante tratamiento con un agente inactivador químico que incluye un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste de etilenimina o derivados de etilenimina tales como etilenimina binaria o acetietilenimina.
- 10 3. Vacuna según la reivindicación 2, en la que el virus VHE-1 KyA ha sido inactivado químicamente mediante tratamiento con etilenimina binaria.
- 15 4. Vacuna según la reivindicación 1, que comprende además VHE-4 inactivado.
5. Vacuna según la reivindicación 1, que comprende además virus influenza equino inactivado.
- 20 6. Vacuna según la reivindicación 5, en la que el virus influenza equino inactivado incluye virus VIE subtipo A1 inactivado.
7. Vacuna según la reivindicación 6, en la que el virus VIE inactivado subtipo A1 incluye virus VIE A1 inactivado cepa A/EQ1/Newmarket/77.
- 25 8. Vacuna según la reivindicación 5, en la que el virus influenza equino inactivado incluye virus VIE subtipo A2 inactivado.
9. Vacuna según la reivindicación 8, en la que el virus VIE subtipo A2 inactivado incluye el virus VIE A2 de la cepa Newmarket/2/93, el virus VIE A2 inactivado de cepa Kentucky/95 ó una mezcla de los mismos.
- 30 10. Vacuna según la reivindicación 5, que comprende el virus VIE subtipo A1 inactivado y el virus VIE subtipo A2 inactivo equino inactivado.
- 35 11. Vacuna según la reivindicación 10, que comprende virus VIE A1 inactivado de cepa A/EQ1/Newmarket/77, virus VIE A2 inactivado de la cepa Newmarket/2/93 y virus VIE A2 inactivado de la cepa Kentucky/95.
- 40 12. Vacuna según la reivindicación 1, en la que dicha vacuna es capaz de proteger los caballos frente a VHE-1 y VHE-4.
13. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la utilización en la inmunización de caballos frente al virus herpes equino.
- 45 14. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 para la utilización en la inmunización de caballos frente al virus herpes equino y el virus influenza equino.
15. Método para producir una vacuna de virus herpes equino según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:
- 50 (a) inocular células de simio con un VHE-1 KyA,
(b) incubar las células de simio inoculadas,
(c) recolectar el VHE-1 KyA de las células incubadas, y
(d) tratar el VHE-1 KyA recolectado con un agente inactivador químico que incluye etilenimina, formando VHE-1 KyA inactivado, y
- 55 (e) añadir un adyuvante.
16. Método según la reivindicación 15, en el que las células de simio son células Vero A139 ó células EVeró.