

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 958**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2006 PCT/US2006/002168**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2006 WO06078975**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2006 E 06719132 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 1846027**

54 Título: **Vacuna mejorada contra calicivirus felino**

30 Prioridad:

21.01.2005 US 40670

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

10.10.2017

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**POULET, HERVÉ y
DAVID, FREDERIC RAYMOND**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 636 958 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 mejorada contra calicivirus felino

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud es una continuación (CIP) de la solicitud de Estados Unidos de N° de Serie 10/368861 presentada el 18 de febrero de 2003, que es una divisional de la solicitud de Estados Unidos de N° de Serie 09/616781, presentada el 14 de julio de 2000, ahora patente de Estados Unidos No. 6.534.066, que reivindica prioridad de la solicitud francesa N° 99 09420, presentada el 16 de julio de 1999, solicitud francesa N° 00 01759, presentada el 11 de febrero de 2000, y la solicitud provisional de Estados Unidos de N° de serie 60/193197, presentada el 30 de marzo de 2000. Esta solicitud también es una CIP de la solicitud de N° de serie por asignar, presentada el 19 de enero de 2005 (expediente del agente número 574313-3258.1) que reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos de N° de Serie 60/573849, presentada el 21 de enero de 2004.

Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares, pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos, tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere al campo de inmunología, incluyendo diagnósticos, ensayos y vacunas. En particular, la descripción se refiere al uso de cepas particulares, incluyendo cepas hipervirulentas, de calicivirus felino para la producción de composiciones inmunogénicas y de vacunas, en particular vacunas inactivadas o subunitarias, contra calicivirus felino. El uso de estas cepas particulares, incluyendo cepas hipervirulentas, en composiciones inmunogénicas y vacunas proporciona una respuesta inmune superior que proporciona protección contra múltiples cepas de calicivirus felinos. Estas composiciones inmunogénicas y estas vacunas también se pueden combinar con composiciones inmunogénicas o vacunas preparadas sobre la base de otros patógenos felinos, para la producción de composiciones inmunogénicas y vacunas multivalentes. La presente descripción adicionalmente se refiere a pruebas de diagnóstico para determinar la infección con una cepa de calicivirus felino, así como ensayos para determinar la presencia o ausencia de proteínas y/o antígenos de calicivirus felino.

ANTECEDENTES

Los calicivirus felinos (FCV) fueron descritos por primera vez en 1957 (Fastier, 1957). Los calicivirus felinos y herpesvirus felinos son las dos fuentes principales de enfermedades virales del tracto respiratorio superior en gatos. Los virus FCV afectan a un gran número de animales, con FCV portando proporciones de infección del orden de 15 a 25%, y una seroprevalencia anti-FCV de 70 a 100% (Coutts, 1994; Ellis, 1981; Harbour, 1991; Reubel, 1992). Después de una fase inicial de hipertermia, estas enfermedades respiratorias están generalmente acompañadas por ulceraciones bucales sobre el paladar, lengua, labios y/o nariz, rinitis, estomatitis crónica, conjuntivitis y posiblemente anorexia y astenia. Los virus FCV también pueden causar neumonía, enteritis y dolor articular, también conocido como síndrome de cojera.

En general, el FCV se puede aislar del 15 al 25% de la población de gatos total (Harbour, 1991), del 45 al 60% de gatos con infección de tracto respiratorio superior (Harbour, 1991; Reubel, 1992) y del 50 al 92% de gatos con estomatitis crónica (Knowles, 1989; Harbour, 1991).

El virus FCV solo se transmite horizontalmente; hasta la fecha, no hay casos conocidos de transmisión vertical de la madre a sus gatitos durante la gestación (Johnson, 1984). En cambio, el FCV se transmite por contacto entre animales infectados y animales sanos o a través de la exposición a gotitas en el aire como puede ocurrir a través del estornudo (Wardley, 1975).

El calicivirus felino de la familia *Caliciviridae* es un virus sin envoltura, que comprende un genoma de RNA de sentido positivo de una sola hebra que está poliadenilado y tiene aproximadamente 7,7 kilobases de tamaño (Radford, 1997). La cápside del FCV está comprendida de una sola proteína capsidial mayor de 66 kDa (kilodalton), la proteína p66. Una revisión de la biología molecular de los calicivirus se puede encontrar en Clarke y Lambden.

Como muchos virus de RNA, existe una heterogeneidad grande dentro de la población viral de FCV. Las variaciones antigénicas, demostradas desde los inicios de los años de 1970 mediante los experimentos de neutralización de suero cruzado, hace posible clasificar los FCVs en varias cepas virales o cuasiespecies (Radford, 1997).

Se han identificado y aislado varias cepas de FCV, en particular la cepa F9 (depositada con la Colección Americana de

Cultivo Tipo o ATCC bajo el número de acceso VR-782), la cepa 2280 (ATCC VR-2057), la cepa KCD (ATCC VR-651) y la cepa CFI (ATCC VR-654).

La vacunación contra FCV se introdujo a fines de los años 1970 utilizando cepas de FCV atenuadas, principalmente la cepa F9 que se aisló en los Estados Unidos en 1958 (Bittle, 1960) o aquellas cepas derivadas de F9 mediante el pasaje *in vitro* o *in vivo* ("similar a F9"). Estas vacunas atenuadas comprenden la mayoría de las vacunas de FCV comerciales disponibles.

Las vacunas inactivadas también están comercialmente disponibles, y todas estas vacunas inactivadas contienen un adyuvante. Estas vacunas inactivadas principalmente utilizan las cepas 255 y 2280, que se aislaron en los Estados Unidos en 1970 en un gato con neumonía (Kahn y Gillepsie, 1970; Povey, 1980) y en 1983 en un gato que sufría de cojera (Pedersen, 1983; Pedersen y Hawkins, 1995), respectivamente.

La inactivación de FCV para el uso en vacunas se puede realizar mediante una variedad de métodos, incluyendo el uso de formalina. Por ejemplo, Povey describe una preparación de FCV inactivada con formalina y con adyuvante utilizada en gatitos (Povey, 1978).

La patente de Estados Unidos No. 6.534.066 describe el uso de nuevas cepas de FCV para la producción de vacunas de FCV. Cuando la vacuna es una inactivada, la inactivación se produce a través de medios químicos (por ejemplo, formalina, o formaldehído, β -propiolactona, etilimina, etilenimina binaria) y/o el tratamiento con calor. Preferiblemente, el virus es inactivado mediante etilenimina. Las vacunas preferiblemente son preparadas con adyuvante, por ejemplo, con una emulsión de aceite en agua como se describe en el ejemplo 8 de la patente.

La patente de Estados Unidos No. 6.355.246 describe vacunas de FCV tanto atenuadas como inactivadas que preferiblemente comprenden un adyuvante. En esta patente, la inactivación se realiza a través del uso de formaldehído o etilenimina binaria (BEI).

Como se mencionó previamente, las vacunas inactivadas típicamente contienen un adyuvante para mejorar la respuesta inmune y para inducir una mejor protección contra las cepas de FCV heterólogas emergentes en la población de gatos. Sin embargo, las vacunas con adyuvante inducen una proporción más alta de reacciones adversas locales que las que no tienen adyuvante (Gobar, 2002) y de esta manera incrementan el riesgo de fibrosarcomas asociados con la vacuna en el sitio de la inyección (Baker, 1998).

Las vacunas de FCV sin adyuvante son típicamente vacunas vivas modificadas que contienen habitualmente la cepa F9 como se describe anteriormente. La virulencia residual de FCV F9 se ha incriminado por varios autores en caliciviriosis postvacunal (reversión a virulencia) (Dawson, 1993). Las cepas vivas modificadas de FCV están implicadas en la aparición de nuevas variantes antigénicas en el campo (Radford, 1997). Por lo tanto, la seguridad de vacunas vivas modificadas es cuestionable.

Aunque solamente existe un serotipo de FCV, se observa la variación antigénica entre los aislados de FCV y se identifican regularmente nuevos aislados en el campo (Lauritzen, 1997).

Por consiguiente, debido al desplazamiento antigénico a través del tiempo, los antisueros producidos contra cepas de vacunas aisladas en los años de 1960-70, incluyendo las cepas tales como F9, 255 o 2280, neutralizan solamente unos cuantos aislados de estas cepas de calicivirus prevalentes en los años 1990 y los años 2000. Por ejemplo, el suero anti-F9 neutraliza el 43% de los aislados americanos del periodo 1990-1996, comparado al 56% de los aislados para el periodo de 1980-89 y el 86% de los aislados para el periodo 1958-79, y solamente el 10% de los aislados ingleses del periodo 1990-96 (Lauritzen, 1997). Por lo tanto, las vacunas inactivadas y atenuadas de cepas FCV antiguas no ofrecen por más tiempo protección suficiente contra las cepas de FCV recientes.

A pesar del uso de la vacunación contra FCV desde finales de los años de 1970, las enfermedades asociadas a FCV continúan siendo un problema clínico significativo. Y, como se ha descrito previamente, han surgido recientemente nuevas cepas hipervirulentas. Varios mecanismos explican la persistencia de la infección de FCV y enfermedades relacionadas con FCV en el frente de la vacunación, incluyendo la carencia de protección cruzada ampliada por las cepas vacunales debido a la evolución de la población de FCV bajo la presión inmune inducida por la vacunación (Geissler, 1997); las cepas vacunales de vacunas atenuadas pueden contribuir a la infección por FCV aguda y crónica (Dawson, 1993; Pedersen, 1995; Radford, 1997); las vacunas tanto inactivadas como vivas protegen al gato contra la enfermedad clínica pero no contra la infección (Pedersen, 1995); y, FCV es capaz de evolucionar y escapar de la presión inmune al dar origen a mutantes que son más resistentes a la vacuna (Knowles, 1990; Johnson, 1992).

Como resultado, las vacunas de calicivirus actuales pueden ser reemplazadas por vacunas que están más adaptadas a la situación epidemiológica actual y que proporcionan una neutralización cruzada más grande contra los aislados actualmente identificados en las poblaciones felinas. Una vacuna prometedora sería aquella que es inactivada o recombinante y que está basada en una cepa más reciente de FCV. Recientemente, los brotes de una caliciviriosis muy severa se han observado en los Estados Unidos y otros países. Una de estas cepas hipervirulentas e inmunodominantes se ha seleccionado como candidato de vacuna y se ha descrito en el presente documento como

una alternativa a las vacunas de FCV tradicionales.

Además, en gatos un problema adicional que surge de la vacunación con FCV es la presencia de inflamación en el sitio de la inyección, frecuentemente como resultado de la presencia de un adyuvante en la vacuna, y que puede ser un factor en los fibrosarcomas post-vacunales. Por lo tanto, la tolerancia local de la vacuna es de importancia estratégica, y debe ser considerada cuando se desarrolla en nuevas vacunas tal que la vacuna ideal debe estar libre de adyuvante y debe tener una excelente tolerancia local.

Por consiguiente, la presente descripción se dirige a estos problemas evidentes en las vacunas tradicionales mediante la utilización de una cepa reciente representativa de la población de FCV en una vacuna inactivada o recombinante (en oposición a una vacuna viva modificada) (Pedersen, 1995) que tiene tolerancia local mejorada de la vacuna, y la cepa FCV utilizada en la vacuna debe ser ampliamente protectora de forma cruzada, alternativamente, se ha propuesto previamente la inclusión de varias cepas (Baulch-Brown, 1997; Dawson, 1993; Knowles, 1990).

OBJETIVO DE LA INVENCIÓN

La presente invención da a conocer una composición inmunogénica o de vacuna que comprende un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable y al menos un calicivirus felino (FCV) aislado, en la que dicho al menos un calicivirus felino es la cepa de FCV 100869 depositada en la ATCC bajo el número de acceso PTA 5930.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición de vacuna, según la presente invención, para utilizar en la inmunización de un animal de la familia Felidae contra un FCV.

En un aspecto adicional, la presente invención da a conocer la utilización de una composición, según la presente invención, para la fabricación de un medicamento para la inmunización de un animal de la familia Felidae contra un FCV.

Un objetivo de la presente descripción es la detección de nuevas cepas de FCV que inducen anticuerpos en felinos que tienen un espectro de neutralización cruzada amplio.

Otro objetivo de la descripción es la producción de composiciones inmunogénicas y/o vacunas contra calicivirosis felina a partir de estas cepas de FCV. Un objetivo adicional de la descripción incluye métodos para proporcionar una respuesta inmune que comprende la administración de las composiciones inmunogénicas y/o vacunas.

Todavía otro objetivo de la descripción es la producción de composiciones inmunogénicas multivalentes y/o vacunas multivalentes contra la calicivirosis felina y contra por lo menos un patógeno felino, así como métodos para proporcionar una respuesta inmune que comprende la administración de las composiciones inmunogénicas multivalentes y/o vacunas multivalentes.

Un objetivo adicional de la presente descripción es la producción de las composiciones y/o vacunas mencionadas anteriormente contra calicivirosis felina y/o composiciones inmunogénicas y/o vacunas multivalentes en donde la composición y/o vacuna no está comprendida con adyuvante. Por ejemplo, un objetivo de la presente solicitud implica someter el FCV a un tratamiento con formaldehído y/o un tratamiento con un agente de inactivación antes de la preparación de la composición y/o vacuna. Por consiguiente, un objetivo de la presente descripción es la producción de una composición inmunogénica o vacuna de FCV inactivada sin adyuvante que comprende FCV que se ha inactivado mediante un agente de inactivación y estabilizado por un compuesto de aldehído formado de una cadena de alquilo lineal C1-C5 que comprende un grupo aldehído cuando la cadena es C1 y dos grupos aldehído terminales cuando la cadena es C2-C5, y opcionalmente un grupo aldehído puede ser reemplazado por un grupo cetona o un grupo epoxi cuando la cadena es la cadena C2-C5, y la composición inmunogénica o vacuna está en forma liofilizada o en forma líquida en un excipiente o vehículo veterinariamente aceptable.

Todavía otro objetivo de la descripción es un método de inmunización de un animal de la familia felidae, preferiblemente un gato, que incluye recién nacidos, gatitos, machos, hembras, hembras preñadas, contra calicivirosis felina, que comprende la administración de una composición inmunogénica o vacuna de FCV inactivadas y estabilizadas sin adyuvante de acuerdo con la descripción; o contra por lo menos dos enfermedades felinas que incluyen FCV, que comprende la administración de una vacuna combinadas sin adyuvante que contiene FCV inactivado y estabilizado de acuerdo con la descripción, y por lo menos un inmunógeno de otro patógeno felino o vector recombinante que expresa por lo menos un inmunógeno de otro patógeno felino.

Estas y otras realizaciones se divulgan y son obvias a partir de y abarcadas por la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La siguiente Descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, y no propuesta para limitar la invención a realizaciones específicas descritas, se puede entender conjuntamente con las figuras acompañantes, en las cuales: Figura 1: muestra títulos de neutralización obtenidos durante neutralizaciones cruzadas como se describe en el

Ejemplo 4;

figura 2 muestra perfiles de IFA de aislados mediante la utilización de anticuerpos monoclonales ant-p66 (FCV431); anticuerpo monoclonal 44 es específico a FCV431.

figura 3 muestra los títulos de neutralización obtenidos durante las neutralizaciones cruzadas como se describe en el Ejemplo 10;

figura 4 muestra el porcentaje de aislados heterólogos seroneutralizados por cada cepa de FCV en forma de tabla y de gráfica;

figura 5 es una gráfica que representa los cambios en la temperatura de felinos después de la estimulación con FCV 100869;

figura 6 es una gráfica que representa los cambios en el peso de los felinos después de la estimulación con FCV 100869;

figura 7 es una gráfica que representa los títulos de infecciones de felinos después de la estimulación con FCV 100869;

figura 8 es una gráfica que representa los cambios en los anticuerpos de FCV en felinos antes y después de la estimulación con FCV 100869;

figura 9 es una gráfica que resume la prevalencia de síntomas después de la estimulación con FCV 100869;

figura 10 es una gráfica que representa la puntuación clínica total de animales vacunados y de control después de la estimulación con FCV 100869;

figura 11 es una gráfica que representa las puntuaciones clínicas de animales vacunados y de control después de la estimulación con FCV 100869.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En un aspecto, la presente descripción proporciona una composición antigénica, inmunológica o de vacuna o una composición terapéutica para inducir una respuesta antigénica o inmunológica en un animal huésped inoculado con la composición, en donde la respuesta antigénica o inmunológica es contra la infección por FCV. Por consiguiente, la presente descripción proporciona una composición antigénica, inmunológica o de vacuna mejorada o una composición terapéutica contra FCV. La presente invención difiere de las vacunas de FCV tradicionales por el tipo de cepa de FCV utilizada y por el hecho de que la presente invención es ventajosamente inactivada y no viva modificada.

Como se utiliza en el presente documento, un "antígeno" es una sustancia que es reconocida por el sistema inmune e induce una respuesta inmune. Un término similar utilizado en este contexto es "inmunógeno".

Como también se utiliza en el presente documento, el término "composición inmunogénica" cubre cualquier preparación capaz de, una vez administrada a los gatos, inducir una respuesta inmune dirigida contra el patógeno felino considerado. "Vacuna" se propone para dar a entender una preparación capaz de inducir protección efectiva.

En un aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición antigénica, inmunológica o de vacuna o una composición terapéutica que se prepara a partir de la cepa de calicivirus felino 431, o un equivalente a la misma, ventajosamente en forma inactivada o subunitaria, en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable. En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición antigénica, inmunológica o de vacuna o una composición terapéutica que se prepara a partir de la cepa de calicivirus felino 431 y G1, o equivalente a las mismas, ventajosamente en forma inactivada o subunitaria, en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable. En un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una composición antigénica, inmunológica o de vacuna o una composición terapéutica que se prepara a partir de una o más cepas de calicivirus felino 100869, 94580, 33585-1, 89391 o 88287, o un equivalente a las mismas, ventajosamente en forma inactivada o subunitaria, en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable. En un aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una composición antigénica, inmunológica o de vacuna o una composición terapéutica que se prepara a partir de por lo menos una cepa de calicivirus felino que induce neutralización cruzada, ventajosamente en forma inactivada o subunitaria, en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable.

Preferiblemente, la cepa o cepas de FCV se seleccionan entre aquellas recientemente aisladas del campo. Las cepas preferidas incluyen las cepas 431 (depositadas en la CNCM bajo el número de acceso 1-2166; o cualquier cepa que reacciona con el anticuerpo monoclonal 44 secretado por el hibridoma depositado en el CNCM bajo el número de acceso 1-2282; ver US-A-6.534.066), G1 (depositada en la CNCM bajo el número de acceso 1-2167) (CNCM= "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes", Pasteur Institute, Paris, Francia), cepas de Estados Unidos RML6 y RML9 (ambas disponibles de los solicitantes), US 100869 (depositada en el ATCC bajo el número de acceso PTA 5930 el 22 de Abril del 2004) (ATCC = "Colección Americana de Cultivo Tipo", Manassas, Virginia, USA) y más generalmente las nuevas cepas altamente virulentas descritas en las publicaciones (Pedersen y colaboradores, Vet. Microbiol. 2000. 73. 281-300; Schorr-Evans y colaboradores, JFMS. 2003. 5. 217-226; Hurley y colaboradores, Vet. Clin. Small Anim. 2003. 33. 759-772). En una realización preferida la composición inmunogénica o vacuna comprende FCV 431 inactivado y estabilizado (o cualquier cepa que reacciona con el anticuerpo monoclonal 44) y FCV G1 inactivada y estabilizada. En otra realización preferida, la composición inmunogénica o vacuna comprende FCV US 100869 inactivada y estabilizada.

Generalmente se considera que una cepa FCV seroneutraliza otra cepa FCV cuando el título de neutralización del suero heterólogo es mayor que o igual a 1,2 log₁₀ VN₅₀ (Povey C. y Ingersoll J., Infection and Immunity, 1975, 11,

877-885). Este valor se utiliza en el presente documento como el umbral de positividad. Sin embargo, los resultados de neutralización cruzada de suero obtenidos con un aislado de FCV que tiene un título de neutralización de suero homólogo de menos de o igual a $2 \log_{10} \text{VN}_{50}$ no puede ser interpretado.

Un segundo método para establecer la equivalencia de una cepa de FCV con respecto a la cepa FCV 431 es usar anticuerpos monoclonales específicos para la cepa FCV 431 y probar la cepa FCV candidata mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF). El solicitante así ha tenido éxito en producir varios anticuerpos monoclonales que se han demostrado como específicos para la cepa 431, una de las cuales es el anticuerpo monoclonal 44. Hay equivalencias si hay reactividad en la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos para 431, por ejemplo con el anticuerpo monoclonal 44. Este anticuerpo monoclonal y el hibridoma correspondiente están disponibles del solicitante bajo solicitud y también se divulgan en el artículo por Poulet y colaboradores, Arch. Virol. 2000. 145. 1-19. El hibridoma correspondiente también fue depositado el 11 de Agosto de 1999 bajo los términos del Tratado de Budapest en la CNCM bajo el número de acceso 1-2282. Esto quiere decir, sin embargo, que personas expertas en la técnica son perfectamente capaces de producir anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales y de selección, con relación al panel, de aquellos que son específicos para la cepa 431.

Aquellas cepas identificadas como equivalentes a 431 en el presente documento se identificaron durante las pruebas de neutralización cruzada de suero entre los 18 aislados de FCV del panel de referencia del Ejemplo 4, en donde se encontró, de manera sorprendente, que el antisuero para el aislado 431 neutraliza 14 de los 17 aislados heterólogos del panel de referencia (el título de neutralización de suero homólogo no se tiene en cuenta). Por comparación, los antisueros para las cepas de vacuna "histórica" 255 y F9 neutralizan solamente 2 de los 18 aislados del panel cada uno.

Inesperadamente, el solicitante por lo tanto ha encontrado con la cepa FCV 431 una cepa dominante que se puede utilizar para la protección de Felidae y en particular de gatos contra la mayoría de las cepas de FCV. En virtud del panel de cepas de FCV divulgadas en el presente documento, es posible para un experto en la materia seleccionar otras cepas de FCV dominantes. Por equivalencia, la descripción también cubre a través de la cepa FCV 431, las cepas FCV que son equivalentes a la misma, que tienen anticuerpos con amplio espectro de neutralización cruzada.

Por lo tanto existe equivalencia cuando el antisuero para una cepa FCV seroneutraliza por lo menos 13 de los 18 aislados heterólogos del panel de referencia (es decir que incluye FCV 431), preferiblemente cuando seroneutraliza por lo menos 14 de los 18 aislados heterólogos del panel de referencia, todavía más preferiblemente cuando seroneutraliza por lo menos 15 de los 18 aislados heterólogos del panel de referencia.

Adicionalmente, los solicitantes también han encontrado que FCV 100869 y otras cepas hipervirulentas son cepas dominantes que se pueden utilizar para la protección de Felidae y en particular de gatos contra la mayoría de las cepas de FCV.

Como se utiliza en el presente documento, el término "hipervirulento" se entiende que tiene la definición atribuida a éste en la técnica, específicamente, una cepa hipervirulenta muestra un incremento marcado en la virulencia sobre las cepas tradicionales. Por consiguiente, como se utiliza en el presente documento, por ejemplo, la cepa 100869 tiene una virulencia incrementada sobre las cepas más viejas tales como 431 y 255 y F9.

De manera similar, los equivalentes de cepas de FCV, tales como 100869, se pueden determinar al identificar a aquellas cepas que también seroneutralizan por lo menos 41 de los 44 aislados heterólogos del panel de referencia del Ejemplo 10, preferiblemente por lo menos 42 de los 44 aislados heterólogos, o por lo menos 43 de los 44 aislados heterólogos o 44 de los 44 aislados heterólogos del panel de referencia. Además, un experto en la materia puede identificar equivalentes de cualquiera de las cepas 100869, 94580, 33585-1, 89391 u 88287 identificadas en el presente documento a través de otras técnicas descritas en el presente documento o conocidas para los expertos en la materia sin demasiada experimentación.

Otra realización de la presente descripción es por lo tanto composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden, además de los antígenos de la cepa FCV 431 o uno de sus equivalentes de acuerdo con la descripción, antígenos de por lo menos otra cepa de FCV, especialmente una cepa complementaria, en particular seleccionada del grupo que comprende G1, RML6, RML9, que incluye sus equivalentes, en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante. Preferiblemente, los antígenos obtenidos de la otra u otras cepas de FCV comprenden el virus o subunidades inactivadas.

Las cepas FCV G1, RM16 y RM19 se seleccionaron por su complementariedad a la cepa FCV 431, específicamente que la combinación del antisuero para 431 y para uno de estos tres FCV seroneutralizan el 100% de los aislados del panel de referencia, es decir, que estas tres cepas FCV tienen un título de neutralización de suero homólogo mayor que o igual a $2 \log_{10} \text{VN}_{50}$ y títulos de neutralización de suero heterólogo mayor que o igual a $1,2 \log_{10} \text{VN}_{50}$ con respecto a los aislados de FCV del panel de referencia contra los cuales el antisuero 431 no seroneutraliza o seroneutraliza levemente (valor menor que $1,2 \log_{10} \text{VN}_{50}$). La descripción también cubre las cepas de FCV equivalentes que tienen la misma complementariedad con respecto a la cepa FCV 431. También es posible producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos para estas cepas, en particular para G1, que hace posible

determinar equivalentes sobre esta otra base.

Otro aspecto de la descripción es en particular la combinación de las dos cepas FCV 431 y G1 para la producción de composiciones inmunogénicas o de vacunas inactivadas o subunitarias.

De manera sorprendente, la combinación de las dos cepas FCV G1 y 431 causa ventajosamente un efecto sinérgico. Durante estudios sobre la complementariedad de las cepas FCV G1 y 431, se compararon las respuestas inmunes inducidas por G1 solamente, 431 solamente o la combinación de ambos (G1+431). El grupo de animales que se inmunizaron con la combinación de las dos cepas FCV G1 y 431 tuvo el beneficio de una mejor protección clínica. En realidad, una realización de la presente descripción es el uso de FCV 431 en combinación con FCV G1 en la preparación de una composición para inducir una respuesta inmune contra cepas hipervirulentas de FCV, que incluyen aquellas cepas identificadas en el presente documento, y en particular la cepa 100869. De manera similar, otra realización de la presente descripción es composiciones inmunogénicas y de vacuna que comprenden FCV 431 en combinación con FCV G1 o equivalentes a las mismas que se pueden utilizar para la protección de Felidae y en particular de gatos contra la mayoría de las cepas de FCV, que incluyen cepas hipervirulentas de FCV, incluyendo aquellas identificadas en el presente documento, y en particular la cepa 100869.

Otra realización de la presente descripción es una vacuna multivalente que comprende por lo menos una valencia de calicivirus felino inactivado, que comprende por lo menos la cepa de FCV 431, que incluye sus equivalentes, y opcionalmente por lo menos otra cepa de FCV, en particular una cepa que es complementaria dentro del significado de la descripción, en particular seleccionada de G1, RM16 y RM19, y por lo menos una valencia de otro patógeno felino, en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable y preferiblemente con un adyuvante, en particular uno de los descritos anteriormente. Del mismo modo es posible producir vacunas multivalentes basadas en subunidad.

Los patógenos felinos son en particular seleccionados del grupo que consiste del virus de rinotraquitis felino o el herpesvirus felino (FHV), el virus de leucemia felino (FeLV), virus de panleucopenia felino o parvovirus felino (FPV), el virus de peritonitis infecciosa felina (FIPV), el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de rabia, Chlamydia (por ejemplo, *Chlamydomydia felix*).

Preferiblemente, dichas vacunas combinan componentes vacunales para:

- FCV, FHV, FPV, FeLV y Chlamydia
- FCV, FHV, FPV y FeLV
- FCV, FHV, FPV y Rabies
- FCV, FHV, FPV y Chlamydia
- FCV, FHV, FPV, Chlamydia y Rabies
- FCV, FHV y FPV
- FCV, FHV y Chlamydia
- FCV y FHV.

En una realización preferida de estas diversas combinaciones, para FeLV se utilizan microorganismos vivos atenuados para FHV, FPV y Chlamydia y un vector o vectores recombinantes que expresan genes de FeLV. El vector recombinante puede ser un virus de viruela de canario (por ejemplo vCP97 como se describe en US-A-5.753.103) que expresa los genes de FeLV *env* y *gag/pol*.

Otro objetivo de la descripción es de este modo una composición inmunogénica o vacuna combinada sin adyuvante que comprende un FCV estabilizado e inactivado y por lo menos un componente vacunal para inducir en el huésped una respuesta inmune contra por lo menos otro patógeno felino, en donde el componente puede ser un inmunógeno de otro patógeno felino o un vector recombinante que expresa este inmunógeno, en donde la composición inmunogénica o vacuna combinada sin adyuvante está en forma liofilizada o en una forma líquida en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable. Se prefiere la forma liofilizada.

En una realización preferida, la composición inmunogénica o vacuna combinada sin adyuvante comprende el componente vacunal en forma de un microorganismo vivo atenuado o un vector recombinante que expresa por lo menos un inmunógeno del patógeno felino. El vector recombinante puede ser un plásmido o un vector viral; por ejemplo el vector es un poxvirus, un adenovirus o un virus del herpes. Nuevamente se prefiere la forma liofilizada.

De acuerdo con una característica de la descripción, es posible producir composiciones inmunogénicas o vacunas subunitarias, mediante la extracción de la cápside del virus, con opcionalmente inactivación antes o después de la extracción. Estas preparaciones y vacunas por lo tanto comprenden, como único ingrediente activo o de otra manera, dicho producto de extracción que contiene proteína predominantemente de cápside y opcionalmente subfragmentos, opcionalmente inactivados, producidos de las cepas de acuerdo con la descripción, en particular la cepa 431, que incluye sus equivalentes, opcionalmente también de otra cepa de FCV, en particular G1 o equivalente. Estas vacunas subunitarias y preparaciones se suplementan ventajosamente con adyuvante, por ejemplo, como se describe anteriormente. También es posible mezclar la vacuna o preparación inactivada completa y vacuna o preparación subunitaria.

La materia de la descripción también es una composición inmunogénica o una vacuna basada en la cepa G1, en particular que está inactivada o es una subunidad de extracción.

5 El cultivo y la propagación de los virus FCV preferiblemente se lleva a cabo sobre células felinas, más particularmente sobre células de Riñón Felino Crandell-Reese o CRFK (accesible de la Colección Americana de Cultivos Tipo bajo el número CCL-94) con una multiplicidad de infección (moi) de 2 a 0,01 de dosis infecciosas de cultivo de células al 50% (CCID₅₀) por célula, preferiblemente 0,5 CCID₅₀/célula.

10 Después de la recogida y clarificación, los virus FCV propuestos para producir una composición inmunogénica inactivada o una vacuna inactivada se inactivan mediante un tratamiento químico (por ejemplo, formalina o formaldehído, β-propiolactona, etilimina, etilenimina binaria (BEI)) y/o un tratamiento con calor. Preferiblemente, los virus de acuerdo con la descripción son activados mediante la acción de etilenimina formada inmediatamente antes del uso de bromoetilamina (BEA). Las partículas virales se pueden concentrar mediante técnicas de concentración convencionales, en particular mediante ultrafiltración y a continuación opcionalmente purificar por medios de purificación convencionales, en particular técnicas de filtración en gel o técnicas de precipitación selectivas en particular en presencia de polietilenglicol (PEG). También se puede realizar una purificación sin concentración previa.

20 Para la producción de una composición inmunogénica o de una vacuna inactivada o subunitaria, las partículas virales se recogen en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable, y opcionalmente se suplementan con un adyuvante. La cantidad de antígeno es en particular igual a un título de preinactivación de aproximadamente 10⁵ a aproximadamente 10¹⁰ CCID₅₀ por dosis, preferiblemente de aproximadamente 10⁸ a aproximadamente 10⁹ CCID₅₀ por dosis. Tal administración permite una respuesta inmune sistémica, o respuestas de mediación humoral o celular.

25 Las composiciones de FCV se pueden preparar de acuerdo con técnicas estándares bien conocidas para aquellos expertos en la técnica farmacéutica o veterinaria. Tales composiciones se pueden administrar en dosificaciones y mediante técnicas bien conocidas por expertos en las técnicas médicas o veterinarias tomando en consideración factores, tales como la edad, sexo, peso, especie y condición del paciente particular, y la ruta de administración. Las composiciones se pueden administrar solas, o se pueden coadministrar o secuencialmente administrar con composiciones, por ejemplo, con "otra" composición inmunológica, o composiciones de vacuna o terapéuticas recombinantes, inactivadas o atenuadas para de esta manera proporcionar composiciones multivalentes o "de cóctel" o de combinación de la descripción y métodos que las emplean. La composición puede contener ciertas combinaciones del componente FCV y una o más vacunas de patógeno de felino no relacionadas (por ejemplo, epítipo o epítipos de interés, antígeno o antígenos y/o vector o virus tal como un virus recombinante. Nuevamente, los ingredientes y la manera (secuencial o coadministración) de administración, así como las dosificaciones se pueden determinar tomando en consideración factores, tales como la edad, sexo, peso, especie y/o la ruta de administración.

40 Ejemplos de composiciones de la descripción incluyen preparaciones líquidas para la administración por la mucosa, por ejemplo administración oral, nasal, ocular, etc., tales como suspensiones y, preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular (por ejemplo, administración inyectable), tales como suspensiones o emulsiones estériles. En tales composiciones el FCV puede estar en mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, o similares. Las composiciones también pueden ser liofilizadas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH, adyuvantes, conservantes y similares, dependiendo de la ruta de administración y la preparación deseada.

50 Para suplementar las composiciones inmunogénicas y vacunas de acuerdo con la descripción con adyuvantes, es posible utilizar un adyuvante (1) hidróxido de aluminio, (2) un polímero de ácido acrílico o metacrílico, un polímero de anhídrido maleico y de derivado de alqueno, o (3) formular la composición inmunogénica o vacuna en forma de emulsión de aceite en agua, en particular la emulsión SPT descrita en la pág. 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editada por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en pág. 183 en el mismo libro.

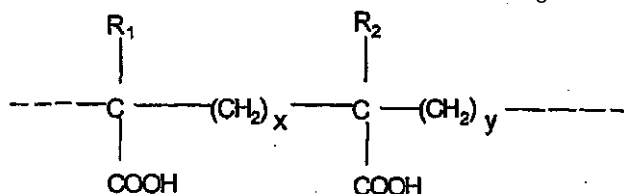
55 La emulsión de aceite en agua puede basarse en particular en aceite de parafina líquida ligera (tipo de farmacopea europea); aceite isoprenoide, tal como escualano, escualeno; aceite que resulta de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o de deceno; ésteres de ácidos o alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol di(caprilato/caprato), tri(caprilato/caprato) de glicerilo, dioleato de propilenglicol; ésteres de alcoholes o ácidos grasos ramificados, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes preferiblemente son surfactantes no iónicos, en particular los ésteres de sorbitán, manitol, glicerol, poliglicerol, propilenglicol y de ácido oleico, isosteárico, rinoleico o hidroxiesteárico que están opcionalmente etoxilados, los copolímeros de bloque de polioxipropileno-polioxi-etileno, en particular los copolímeros Pluronic®, especialmente L121.

65 Los compuestos adyuvantes preferidos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que son reticulados, especialmente con éteres polialquenílicos de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, Junio de 1996). Los expertos en la materia también pueden referirse a

la patente de Estados Unidos No. 2,909,462 que describe tales polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene por lo menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, estando los átomos de hidrógeno de por lo menos tres hidroxilos sustituidos por radicales alifáticos insaturados que tienen por lo menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden por sí mismos contener otros ingredientes, tal como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, USA) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alil sacarosa o con alil pentaeritrol. Entre todos estos, se pueden mencionar Carbopol® 974P, 934P y 971P.

Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivados de alqueno, los copolímeros EMA® (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno, lineales o reticulados, por ejemplo reticulados con divencil éter, son preferidos. Se puede hacer referencia a J. Fields y colaboradores.

Desde el punto de vista de su estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros EMA® preferiblemente se forman de unidades básicas de la siguiente fórmula:



en la cual:

- R₁ y R₂, que son idénticos o diferentes, representan H o CH₃
- x= 0 o 1, preferiblemente x = 1
- y= 1 o 2, con x + y = 2

Para los copolímeros EMA®, x=0 y y=2. Para los carbómeros, x=y=1.

La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que sería neutralizada, preferiblemente a pH fisiológico, con el fin de proporcionar la solución de adyuvante en la cual la propia vacuna será incorporada. Los grupos carboxílicos del polímero están entonces parcialmente en forma COO⁻.

Preferiblemente, una solución de adyuvante de acuerdo con la descripción, especialmente de carbómero, se prepara en agua destilada, preferiblemente en presencia de cloruro de sodio, estando la solución obtenida a pH ácido. Esta solución madre se diluye al adicionar a la cantidad deseada (para obtener la concentración final deseada), o una parte sustancial de la misma, agua cargada con NaCl, preferiblemente solución salina fisiológica (NaCl 9 g/l) todo a la vez en varias porciones con neutralización concomitante o posterior (pH 7,3 a 7,4), preferiblemente con NaOH. Esta solución a pH fisiológico será utilizada tal cual para la mezcla con la vacuna, que puede ser especialmente almacenarse en forma liofilizada, líquida o congelada.

La concentración de polímero en la composición de vacuna final será del 0,01% al 2% p/v, más particularmente del 0,06 al 1% p/v, preferiblemente del 0,1 al 0,6% p/v.

Se pueden consultar textos estándares, tal como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17^a edición, 1985, para preparar preparaciones adecuadas, sin gran experimentación.

Las composiciones en formas para varias rutas de administración son contempladas por la descripción. Y nuevamente, la dosificación y ruta efectiva de administración se determina por factores conocidos, tales como la edad, sexo, peso, condición y naturaleza del felino, así como la LD₅₀ y otros procedimientos de cribado que son conocidos y no requieren gran experimentación. Las dosificaciones de cada agente activo pueden estar, como en los documentos citados en el presente documento (o documentos referenciados o citados en los documentos citados en el presente documento) y/o pueden variar de poco o unos cuantos cientos o miles de microgramos, por ejemplo, 1 µg a 1 mg, para una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna subunitaria; y 10⁴ a 10¹⁰ TCID₅₀ ventajosamente 10⁶ a 10⁸ TCID₅₀ para una composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna inactivada.

Por supuesto es posible también combinar virus inactivado y subunidades de la misma cepa de FCV de acuerdo con la descripción y/o de diferentes cepas de FCV de acuerdo con la descripción.

Las vacunas de FCV de acuerdo con la descripción se pueden mezclar inmediatamente antes del uso con la otra valencia felina (valencias) que pueden estar en forma de vacunas vivas atenuadas, inactivadas, subunitarias, recombinantes o de polinucleótido.

Sin embargo, la dosificación de la composición o composiciones, concentración de los componentes de las mismas y la sincronización de administración de la composición o composiciones, que induce una respuesta inmunológica adecuada, se puede determinar por métodos tales como las titulaciones de anticuerpo de sueros, por ejemplo, mediante ELISA y/o el análisis de ensayo de seroneutralización. Tales determinaciones no requieren gran experimentación del experto en la materia, esta descripción y los documentos citados en el presente documento. Y, el tiempo para las administraciones secuenciales pueden ser del mismo modo averiguado por métodos averiguables a partir de esta descripción, y el conocimiento de la técnica, sin gran experimentación.

En una realización, el método de inmunización comprende la administración de una vacuna de FCV multivalente, combinada, subunitaria o inactivada de acuerdo con la descripción, a gatos. La administración de la vacuna se puede llevar a cabo en particular mediante la ruta parenteral, preferiblemente mediante la ruta subcutánea o intramuscular.

Por ejemplo, la utilización de una vacuna que comprende componentes liofilizados que se han reconstituido con diluyente, a gatos sanos de 6 semanas de edad y más viejos se puede inmunizar para la prevención de la enfermedad debido a FCV. Una dosis de 1 ml se puede inyectar intramuscularmente o subcutáneamente. Para la vacunación primaria, se pueden administrar adicionalmente refuerzos, por ejemplo, a las 3 a 4 semanas después de la administración inicial. Un experto en la técnica puede determinar programas de dosificación apropiados sin gran experimentación. Por ejemplo, los gatos más jóvenes que 12 semanas de edad pueden ser revacunados cada 3 a 4 semanas, la dosis posterior administrada a las 12 semanas o más de edad. Después de la vacunación primaria, se pueden administrar refuerzos anualmente.

Por consiguiente, otra realización de la presente descripción es un método de inmunización de felinos contra FCV que comprende por lo menos la administración de una composición inmunogénica o de vacuna. En otra realización, se pueden administrar por lo menos 2 o 3 o 4 o más administraciones de una composición inmunogénica o de vacuna.

Las personas expertas en la técnica tienen la competencia necesaria para definir con precisión el número de inyecciones y la dosis de cada vacuna a ser utilizadas para cada protocolo de vacunación. Por ejemplo, en una realización, los volúmenes de dosis pueden estar en particular entre 0,2 y 2 ml, preferiblemente en el orden de 1 ml.

Alternativamente, se puede utilizar un inyector libre de agujas para la administración transdérmica (intradérmica y subcutánea y posiblemente administración intramuscular). Los volúmenes de dosis pueden estar entre 0,1 ml y 1 ml.

Las dosificaciones adecuadas también se pueden basar en los ejemplos siguientes.

En una realización de la invención, las composiciones inmunogénicas o de vacuna comprenden FCV inactivado. De este modo, la invención se refiere a una composición inmunogénica o de vacuna de FCV inactivada sin adyuvante que comprende FCV que se ha sometido a un agente de inactivación de un compuesto de aldehído estabilizante formado de una cadena de alquilo lineal C1-C5 que comprende un grupo aldehído cuando la cadena es C1 y dos grupos aldehído terminales cuando la cadena es C2-C5 y opcionalmente un grupo aldehído puede ser reemplazado por un grupo cetona o un grupo de epoxi cuando la cadena es C2-C5, y la composición inmunogénica o vacuna está en forma liofilizada o en forma líquida en un excipiente o vehículo veterinariamente aceptable.

Por definición, el agente de inactivación es un agente capaz de bloquear la multiplicación de un virus mediante una reacción irreversible principalmente con ácidos nucleicos virales y sin afectar sustancialmente la propiedad inmunogénica del virus. Ejemplos preferidos de agentes de inactivación son etilenimina y los derivados de amina (por ejemplo acetil-etilenimina), propileimina, β -propiolactona. En una realización preferida, el agente de inactivación es etilenimina.

En una realización preferida, el FCV es inactivado mediante la acción de etilenimina. La concentración final de etilenimina puede ser de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 20 mM y preferiblemente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM. La temperatura puede ser de aproximadamente 2°C a aproximadamente 40°C y preferiblemente de aproximadamente 5°C a aproximadamente 30°C.

Los compuestos de aldehído estabilizantes reaccionan sobre los grupos amino (por ejemplo, grupos amino sobre los aminoácidos de lisina, arginina o histidina) y grupos hidroxilo de proteína o proteínas (por ejemplo, grupos hidroxilo sobre los aminoácidos tirosina) y pueden formar enlaces entre dos proteínas y/o dentro de una proteína. El compuesto de aldehído estabilizante preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en formaldehído (o metanol), glicidaldehído (o 2,3-epoxi-1-propanol), glutaraldehído (o 1,5-dial-pentano), glioxal (o 1,2-dial-etano), metilglioxal (o piruvaldehído). En una realización preferida, el compuesto de aldehído estabilizante es el formaldehído.

Después de la terminación de la inactivación y/o estabilización es posible neutralizar el agente de inactivación y/o el compuesto de aldehído estabilizante con técnicas conocidas por la persona experta en la técnica, por ejemplo, al adicionar compuestos neutralizantes que comprenden grupos tiol (por ejemplo, tiosulfato, cisteína).

Es posible con técnicas conocidas por la persona experta en la técnica, por ejemplo la cromatografía de exclusión de tamaño, ultracentrifugación sobre un gradiente de sacarosa, ultracentrifugación sobre un gradiente de cloruro de cesio,

precipitación selectiva, por ejemplo precipitación con PEG (polietilenglicol), eliminar el agente de inactivación y/o el compuesto de aldehído estabilizante.

Para ajustar las condiciones de estabilización (temperatura, concentración del compuesto de aldehído estabilizante y la duración), se puede realizar una cuantificación de los viriones de FCV. Cualquier técnica apropiada que permita cuantificar viriones puede utilizarse, por ejemplo una ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para la proteína de cápside de FCV. Antes de la cuantificación con ELISA, los viriones se separan del cultivo viral tratado con técnicas conocidas por la persona experta en la técnica, por ejemplo la cromatografía de exclusión de tamaño, ultracentrifugación sobre un gradiente de sacarosa, ultracentrifugación sobre un gradiente de cloruro de cesio, precipitación selectiva, por ejemplo precipitación con PEG (polietilenglicol).

Con formaldehído:

- La concentración final puede ser de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 0,8 g/l, preferiblemente de aproximadamente 0,075 g/l a aproximadamente 0,6 g/l y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 0,5 g/l.

- La temperatura puede ser de aproximadamente 2°C a aproximadamente 37°C, preferiblemente de aproximadamente 2°C a aproximadamente 22°C y más preferiblemente de aproximadamente 4°C a aproximadamente 7°C.

En una realización de la invención, la composición inmunogénica o de vacuna comprende FCV estabilizado e inactivado liofilizado y un excipiente liofilizado, por ejemplo, aminoácidos, por ejemplo ácidos glutámicos, carbohidratos, por ejemplo lactosa y mezclas de los mismos, por ejemplo SPGA (sacarosa/fosfato/glutamato/albúmina; EP-A-0.496.135). En otra realización, la composición inmunogénica o de vacuna es líquida y comprende el FCV en una solución fisiológica o solución tampón.

Otra realización de la descripción es un proceso para producir FCV inactivado y estabilizado, que comprende hacer reaccionar FCV con un agente de inactivación y un compuesto de aldehído estabilizante formado de una cadena de de alquilo lineal C1-C5 que comprende un grupo aldehído cuando la cadena es C1 y dos grupos aldehído terminales cuando la cadena es C2-C5, y opcionalmente un grupo aldehído puede ser reemplazado por un grupo cetona o un grupo epoxi cuando la cadena es la cadena C2-C5. Las realizaciones preferidas para el agente de inactivación y el compuesto de aldehído estabilizante y sus condiciones de uso se han descrito anteriormente.

El proceso de la descripción comprende el cultivo de FCV, el tratamiento con el agente de inactivación y el compuesto de aldehído estabilizante. La adición del compuesto de aldehído estabilizante se puede hacer antes, durante o después de la etapa de inactivación. La neutralización del agente de inactivación y/o el compuesto de aldehído estabilizante se puede realizar tal como se ha descrito anteriormente.

Los viriones de FCV inactivados y estabilizados se pueden concentrar mediante técnicas de concentración convencionales, por ejemplo mediante ultrafiltración y a continuación opcionalmente purificarse por medios de purificación convencionales, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, ultracentrifugación sobre un gradiente de sacarosa, ultracentrifugación sobre un gradiente de cloruro de cesio, o precipitación selectiva por ejemplo en presencia de polietilenglicol (PEG). El FCV inactivado y estabilizado se puede almacenar a aproximadamente 5°C.

Se debe entender como una realización adicional de la invención que cualquiera de las composiciones inmunogénicas o de vacuna descritas en el presente documento puede comprender FCV inactivado, cuyo FCV puede ser inactivado utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En una realización adicional de la descripción, se proporciona un equipo o caja de vacunación multivalente que comprende, envasado por separado, una valencia de FCV de acuerdo con la descripción en un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable, y preferiblemente con un adyuvante, y por lo menos una valencia de otro patógeno felino. La valencia de FCV puede servir como el disolvente para otra valencia felina, en particular valencia atenuada, recombinante o de polinucleótido proporcionada en forma liofilizada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislados Virales e Hibridomas

Los calicivirus felinos (FCV) se obtuvieron mediante frotis faríngeos tomados sobre gatos que exhiben signos de infección con calicivirus felinos. Estos FCV tienen diferentes orígenes geográficos.

Las cepas FCV 431, 337, J5, 388b, 220 y 393 se aislaron en Gran Bretaña y fueron proporcionadas por el Profesor O. Jarrett de la Universidad de Glasgow, UK.

Las cepas FCV A2, G1, G3, F3031, F1, H3-2 y H1-4 se aislaron en Francia por el solicitante.

Las cepas FCV RML1, RML2, RML3, RML5, RML6, RML7 y FML9 se aislaron en los EUA por el solicitante.

Las muestras faríngeas se recogieron en medio mínimo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco BRL), suplementado con suero de ternero fetal al 5% (Bayer Diagnostic), con antibióticos, más particularmente con 50 mg/l de gentamicina. Cada aislado se congela a -70°C mientras que se espera a ser probado. El anticuerpo monoclonal 44, obtenido del hibridoma identificado 431 2 o 17 E9 T, es específico para la cepa FCV 431.

Ejemplo 2: Amplificación de los Aislados Virales

Se cultivan células de la línea de riñón de gato (Riñón Felino Crandell-Reese o CRFK No. ATCC CCL-94, Crandell y colaboradores, In Vitro 1973. 9. 176-185) en una placa de 96 pocillos o en un Falcon de 25 cm² (Falcon) con medio DMEM suplementado con suero de ternero fetal al 5%, que contiene aproximadamente 100.000 células por ml. Las células se cultivan a 37°C en una atmósfera que contiene el 5% de CO₂. Después de 3 días, la capa de células llega a la confluencia. El medio de cultivo a continuación se reemplaza con medio DMEM libre de suero suplementado con 50 mg/l de gentamicina y la alícuota descongelada de los aislados virales de FCV (Ejemplo 1) se añaden en la proporción de un volumen de 100 µl de diluciones en serie cuatro veces por pocillo para la clonación por dilución limitante de los virus FCV o de 1 ml por Falcon.

Cuando el efecto citopático (ECP) se completa (24-48 horas después del inicio del cultivo), las suspensiones virales se recolectan y se congelan a -70°C. 3 a 4 pasajes sucesivos son generalmente necesarios para la producción de un lote viral. El lote viral se almacena a -70°C.

Ejemplo 3: Producción del Suero

Para cada virus FCV, se produjo un antisuero al inocular gatitos mediante la ruta oronasal con 10^{6.0}CCID₅₀ del virus FCV relevante. Los gatitos libres de patógeno específico (SPF) tenían de 10 a 14 semanas de edad. El suero de cada animal se recolectó un mes después de la infección. Los sueros se inactivaron con calor (30 minutos a 56°C), se distribuyeron, se tomaron en alícuotas y se almacenaron a -20°C.

Ejemplo 4: Neutralización de Suero Cruzado in Vitro

Las pruebas de neutralización de suero cruzado se llevaron a cabo entre 18 aislados en campo obtenidos por frotis faríngeos realizados sobre gatos que exhiben signos de calicivirosis felina. 7 de estos tienen como origen geográfico Francia, son los aislados identificados como A2, F3031, G1, G3, F1, H3-2 y HI-4. 4 tienen como origen geográfico Gran Bretaña, son los aislados identificados como J5, 337, 388b y 431. Finalmente, 7 tienen como origen geográfico los EUA, son los aislados identificados como RML1, RML2, RML3, RML5, RML6, RML7 y RML9.

El suero obtenido de cada aislado (Ejemplo 3) se probó para su capacidad para neutralizar los 18 aislados. Los sueros se diluyeron en serie tres veces con medio DMEM en placas de cultivo de células de 96 pocillos. 0,05 ml del medio de cultivo que contiene aproximadamente 100 CCID₅₀ de la cepa viral seleccionada se adicionó a 0,05 ml del suero diluido producido como en el Ejemplo 2. Esta mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C en una incubadora bajo una atmósfera que contiene 5% de CO₂.

0,15 ml de una suspensión de células CRFK que contiene aproximadamente 100.000 células por ml se adicionaron a continuación a cada mezcla. El efecto citopático se observó mediante la microscopía de contraste de fases después de 4 días de cultivo a 37°C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂. Los títulos neutralizantes de cada suero se calcularon de acuerdo con el método de Karber. Los títulos se dan en la forma de la dilución más alta que inhibe el efecto citopático para el 50% de los pocillos. Los títulos se expresan en log₁₀. El título mínimo así encontrado fue de 0,7 log₁₀ VN₅₀. Cada suero se tituló por lo menos dos veces, preferiblemente tres veces.

La figura 1 proporciona todos los títulos neutralizantes obtenidos durante la neutralización de suero cruzado llevada a cabo entre estas 18 cepas de FCV y estos 18 sueros.

Ejemplo 5: Pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta (IIF)

Las pruebas IIF se llevaron a cabo sobre placas de 96 pocillos que contienen las células CRFK cultivadas en monocapas infectadas con los virus FCV a ser probados.

Se cultivan 200 µl por cavidad de una suspensión de células CRFK que contiene 90.000 células/ml en medio F15 (Gibco BRL, Cat #045-1075) que contiene suero de ternero fetal al 5% en una placa de 96 pocillos. En la confluencia, 320 CCID₅₀ de FCV se inoculan en 100 µl del medio F15. Cuando los primeros focos de CPE aparecen, las células a continuación se enjuagan con PBS frío sin calcio o magnesio (PBS, Sigma), y a continuación se fijan a -20°C durante 30 minutos con acetona fría que contiene 5% v/v de agua. Después del secado, las células infectadas y fijadas se ponen en contacto durante 30 minutos a 37°C con 100 µl por cavidad de fluido ascítico correspondiente al anticuerpo monoclonal 44 anti-FCV 431 (hibridoma 431 2 O 17 E9 T, diluido en 1/5000 aproximadamente en solución tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 7,6).

Después de dos enjuagues de PBS, la unión de los anticuerpos se visualiza mediante la incubación bajo las mismas condiciones de un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con isotianato de fluoresceína (Biosys, FITC conjugado en 2 mg/ml) y diluido 1/150 en solución tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 7,6. La lectura se hace bajo un microscopio óptico bajo luz UV.

Este anticuerpo monoclonal se probó con respecto a cada uno de los aislados del panel. Éste se une exclusivamente a las células CRFK infectadas con FCV 431.

Esta prueba se puede utilizar para determinar los equivalentes de la cepa FCV 431. Estos equivalentes son aquellos a los cuales se une el anticuerpo monoclonal 44.

Se observa que el anticuerpo monoclonal 44 es un anticuerpo neutralizante conformacional y que la neutralización está correlacionada con la protección. La Figura 2 muestra perfiles de IFA de los aislados mediante la utilización de anticuerpos monoclonales anti-p66 (FCV 431); anticuerpo monoclonal 44 es específico a FCV 431.

Ejemplo 6: Sinergia

32 gatitos SPF no vacunados de aproximadamente 9 semanas de edad se dividen mediante aleatorización en 4 grupos (identificados de A a D) de 8 gatitos cada uno, cada grupo de aloja en una caja aislada.

Después de descongelar las suspensiones virales (Ejemplo 2) y diluirse en PBS para obtener el título deseado, los gatos se vacunan mediante inyección subcutánea de 1 ml de inoculo de FCV G1 en $10^{3,3}$ CCID₅₀/ml para el grupo B, de 1 ml de inoculo FCV 431 en $10^{3,5}$ CCID₅₀/ml para el grupo C, de 0,5 ml de inoculo FCV G1 en $10^{3,3}$ CCID₅₀/ml y 0,5 ml de inoculo FCV 431 en $10^{3,5}$ CCID₅₀/ml (en un sitio de inyección diferente) para el grupo D. El grupo A sirve como grupo de control.

La mitad de cada grupo A a D se distribuye aleatoriamente en dos grupos 1 y 2 y se alojan en cajas separadas. Los animales se estimulan en el día 31 después de la vacunación (d31).

Los animales en el grupo 1 se estimulan mediante la administración de 1 ml de cepa viral de estimulación FCV 220 que tiene un título de $10^{7,2}$ CCID₅₀/ml mediante la ruta oronasal (0,5 ml mediante la ruta oral y 0,25 ml en cada fosa nasal).

Los animales en el grupo 2 se estimulan mediante la administración de 1 ml de la cepa viral de estimulación FCV 393 que tiene un título de $10^{6,8}$ CCID₅₀/ml mediante la ruta oronasal (0,5 ml mediante la ruta oral y 0,25 ml en cada fosa nasal).

Las cepas virulentas FCV 220 y 393 se seleccionaron debido a que están distantes en la neutralización de suero cruzado de las cepas virales FCV G1 y 431.

Cualquier contaminación cruzada entre las dos cajas es cuidadosamente evitada. El monitoreo clínico de los animales en ambos grupos se hace al tomar la temperatura rectal y los exámenes clínicos de los animales (estado general, presencia de úlceras de la lengua y del paladar, presencia de gingivitis, presencia de rinitis, presencia de conjuntivitis, presencia de cojera, muerte del animal).

La puntuación clínica total para cada animal se calculó mediante la adición de las puntuaciones obtenidas para cada grupo de signos clínicos de acuerdo con la siguiente escala:

- temperatura rectal:

0- menos de 39°C.

1- mayor que o igual que 39°C y menos que 39,5°C.

2- mayor que o igual que 39,5°C y menor que 40°C.

3- mayor que o igual a 40°C.

- estado general:

0- comportamiento normal

1- agotamiento

- úlceras de la lengua y del paladar (algunos de los diámetros de todas las úlceras, si hay varias):

0- ausencia de úlcera

1- diámetro de 1 a 5 mm

2- diámetro de 6 a 10 mm

3- diámetro mayor que 10 mm

- gingivitis:

0- ausencia de gingivitis

1- gingivitis

- rinitis:

0- ausencia de rinitis

1- rinitis con descarga nasal serosa

2- rinitis con moco a descarga nasal mucopurulenta

- conjuntivitis:

- 0- ausencia de conjuntivitis
- 1- conjuntivitis con descarga serosa
- 2- conjuntivitis con descarga mucopurulenta

5 -cojera:

- 0- ausencia de cojera
- 1- cojera

-muerte:

- 0- supervivencia
- 10 5- muerte.

Las puntuaciones clínicas medias obtenidas son los siguientes:

Grupo/estimación	FCV 220	FCV393
Control (grupo A)	31	30
FCV G1 (grupo B)	5	23
FCV 431 (grupo C)	6	18
FCV G1+FCV 431 (grupo D)	2	9

15 Los resultados así obtenidos muestran sinergia entre las cepas FCV G1 y FCV 431 por una diferencia significativa entre el valor promedio obtenido para las mejores cepas y el obtenido para la combinación de las dos cepas (prueba de Kruskal-Wallis).

20 Ejemplo 7: Producción de Vacuna Inactivada

Las células CRFK se cultivan a 37 °C en matraces rodantes de 2 litros (850 cm²) en medio de Eagle modificado (MEM, Gibco BRL) suplementado con 2,5% de hidrolizado de lactalbumina (Gibco BRL) y suero de ternero fetal al 5% (Gibco BRL). 300 ml de una suspensión celular en medio MEM que contiene aproximadamente 100.000 células/ml se añaden por matraz rodante. Después de 3 días, la capa de células es confluyente. El medio de cultivo de células a continuación se reemplaza con MEM libre de suero y el virus FCV se añade a una multiplicidad infección (moi) de 0,5 CCID₅₀/célula. El cultivo viral se mantiene a 37°C durante 24 a 48 horas hasta que se obtiene un efecto citopático para la capa celular completa. La suspensión viral se recolecta y a continuación se clarifica sobre un filtro de bolsa que tiene una porosidad de 1,5 µm. El título del virus FCV en la recolección es de 8,5 +/-0,3 log₁₀ CCID₅₀/ml.

30 El virus se inactiva con etilenimina a la concentración de aproximadamente 8 mM a 22°C durante 18 horas.

La etilenimina se prepara inmediatamente antes del uso al disolver 28 g de gránulos de hidróxido de sodio en 200 ml de agua destilada y al adicionar 68,1 g de bromoetilamina (BEA) correspondiente a una solución 1,2 M aproximadamente (H. Bahnmann, Arch. Virol., 1975, 47, 47-56). La suspensión viral inactivada se concentra 100 veces sobre un cartucho de ultrafiltración de tipo Ultrasette con un corte de 100 kDa (Filtren) y a continuación se congela a -70°C.

La suspensión viral inactivada después de la descongelación se diluye 1/33 en solución tampón PBS (NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; KH₂PO₄ 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 2 H₂O 1,44 g/l). La vacuna se prepara de la misma manera: 167 ml de fase acuosa que consiste en la dilución del virus inactivado se emulsifican en 83 ml de una fase oleosa que contiene 7% p/v de oleato de anhidromanitol, 8% p/v de ácido oleico etoxilado que contiene 11 moléculas de óxido de etileno (EO) en promedio y 85% v/v de aceite de parafina líquida ligera (tipo de Farmacopea Europea) con la ayuda de un emulsionante de turbina Silverson a 32°C durante 2 minutos. La vacuna a continuación se almacena a 5°C.

45 Un método alternativo para preparar la vacuna consiste en formarse en una emulsión mediante tres pasos a través de un homogenizador de alta presión modelo Y110 (Microfluidics Corp.) a una presión de 600 bar y una temperatura de entre 30 y 40°C la mezcla de 5% p/v de escualano, 2,5% p/v Pluronic.RTM. L121, 0,2% p/v Tween 80, 92,3% v/v de suspensión viral inactivada diluida 1/46 en solución tampón PBS después de la descongelación. La vacuna a continuación se almacena a 5°C.

50 Otro método alternativo consiste en preparar una solución que contiene 0,4% p/v de Carbopol® 974P en solución salina fisiológica (NaCl 9 g/l). El pH se ajusta a 7,3-7,4 con hidróxido de sodio. Esta solución de Carbopol® a continuación se mezcla en partes iguales con la suspensión del virus FCV inactivado diluido 1/25 después de la descongelación. La vacuna a continuación se almacena a 5°C.

55 La fase acuosa de las emulsiones o la fase acuosa mezclada con Carbopol® consiste en una dilución en PBS de la suspensión viral inactivada concentrada correspondiente a la cepa FCV 431 o a la cepa FCV G1 o una mezcla en partes iguales de las cepas de FCV 431 y G1.

60 Ejemplo 8: Inmunogenicidad de FCV 431 Inactivada

19 gatitos SPF no vacunados de aproximadamente 9 semanas de edad se dividen mediante aleatorización en 2 grupos (identificados de A y B), el primero con 12 gatitos y el segundo con 7 gatitos, cada grupo se aloja en una caja aislada.

La vacuna se prepara con el adyuvante compuesto de oleato de anhidromanitol, ácido oleico etoxilado y aceite de parafina líquida ligera como se describe en el Ejemplo 7.

Los gatos se vacunan dos veces (DO y D28) mediante la inyección subcutánea de 1 ml del inoculo FCV 431 en 10^7 CCID₅₀/ml para el grupo A. El grupo B sirve como el grupo de control.

Los animales se estimulan en el día 42 después de la primera vacunación (D42) mediante la administración de 1 ml de la cepa viral de estimulación FCV 431 que tiene un título de 10^6 CCID₅₀/ml por la ruta oronasal (0,5 ml por la ruta oral y 0,25 ml en cada fosa nasal).

Se monitorizaron el nivel de anticuerpo neutralizantes anti-FCV 431 y la puntuación clínica. La puntuación clínica total para cada animal se calculó mediante la adición de las puntuaciones obtenidas para cada grupo de los signos clínicos de acuerdo con la escala indicada en el Ejemplo 6.

Los resultados obtenidos en los siguientes:

Título de anticuerpo neutralizante Anti-FCV 431 expresado como log₁₀ VN₅₀/ml:

Grupo	Anticuerpo en DO	Anticuerpo en D28	Anticuerpo en D42
Vacuna de FCV 431 (grupo A)	0,24	1,61	2,87
Control (grupo B)	0,24	0,24	0,24

Puntuaciones clínicas medias durante el período de D42 a D56:

Grupo	Puntuación Clínica
Vacuna de FCV 431 (grupo A)	0,7
Control (grupo B)	33,7

Estos resultados muestran una protección clínica excelente contra la estimulación homóloga y buena seroconversión.

Ejemplo 9: Preparación de virus FCV 100869 Inactivados y estabilizados

Se cultivaron células CRPK (células de Riñón Felino Crandell-Reese, accesibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo bajo el número CCL-94) en el biogenerador a 37°C, pH 7,2, 30% de oxígeno y 50 rpm (rotación por minuto). El medio de cultivo fue constituido con el medio de Eagle modificado (MEM, Gibco BRL) suplementado con suero de ternero fetal al 5% y adicionado con 1,5 g/l de microportadores Cytodex 1. Las células se introdujeron en el cultivo a una concentración final de $0,2 \times 10^6$ células/ml.

Después de 4 días, la agitación se detuvo y los microportadores se separaron por decantación. El medio de cultivo de células se reemplazó con MEM libre de suero y el virus de las cepas 100869 FCV se adicionó en una multiplicidad de infección (moi) de 0,5 CCID₅₀/célula. El cultivo viral se mantuvo a 37°C, pH 7,2, 30% de oxígeno y 50 rpm durante 18 horas hasta que se obtuvo un efecto citopático.

La suspensión se enfrió a 10°C y se agitó fuertemente antes de detener la agitación y los microportadores a continuación se separaron por decantación y se eliminaron.

La suspensión viral se recolectó y se clarificó sobre un filtro que tiene una porosidad de 1,5 µm.

La suspensión viral se inactivó con etilenimina a una concentración de 8 mM a 22°C durante 18 horas. La etilenimina se preparó al disolver 36 g de gránulos de hidróxido de sodio en 257,5 ml de agua destilada y al adicionar 87,5 g de bromoetilamina (BEA) correspondiente aproximadamente una solución de 1,2 M de etilenimina.

Al final del periodo de inactivación de 18 horas, la suspensión viral inactivada se estabilizó mediante la adición de formaldehído a una concentración de 0,5 g/l y se agitó a 10°C durante 24 horas.

La suspensión viral inactivada y estabilizada se concentró mediante ultrafiltración aproximadamente doce veces sobre una membrana de corte de 150 kDa.

La suspensión viral inactivada, estabilizada y concentrada se purificó mediante cromatografía de filtración en gel (columna BPG 100/950 empacquetada con 6FF Sepharose) con una solución tampón de carga y solución tampón de

elución que comprende solución salina tamponada de fosfato (PBS) sin calcio y sin magnesio, pH 7,4.

La fracción viral se concentró mediante ultrafiltración aproximadamente 100 veces sobre la membrana de corte de 100 kDa.

Ejemplo 10: Neutralización de Suero Cruzado in Vitro

Las pruebas de neutralización de suero cruzado se realizaron utilizando las mismas técnicas que se han descrito en el Ejemplo 4 anterior. Las pruebas de neutralización de suero cruzado se llevaron a cabo entre un total de 51 cepas de calicivirosis felina. Estas cepas incluyeron:

- A2, F1, G1, H3-2, G3, F3031, 11-4, y F3, las cuales se originaron en Francia;
- 388b, 431, 419, 337, J1, J5, 220, y 393, las cuales se originaron en Reino Unido;
- RML1, RML2, RML3, RML4, RML5, RML6, RML7, RML8, RML9, 98A-13445, 98A-4417, 98A-49529, 98A-4568, 968384-97, 31383-97, 98A-46260, 941421-96, 98A-8107, 98A-49526, 93182-98, 98A-10305, 98A-49052, las cuales se originaron en los Estados Unidos; y
- 94580, 33585-1, 89391, 88287, 100869-1, las cuales se originaron en Estados Unidos y se consideran hipervirulentas.

El suero se obtuvo de gatos después de la inmunización con cepas vivas de cada aislado. El suero también se obtuvo después de la vacunación con vacunas comercialmente disponibles, especialmente aquellas que utilizaron las cepas 255 y F9.

El suero se probó por su capacidad para neutralizar los 51 aislados. Los sueros se diluyeron en serie tres veces con medio DMEM en placas de cultivo de células de 96 pocillos. Se añadieron 0,05 ml del medio de cultivo que contienen aproximadamente 100 CCID₅₀ de la cepa viral seleccionada a 0,05 ml del suero diluido. Esta mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C en una incubadora bajo una atmósfera que contiene 5% de CO₂.

Se añadieron a continuación 0,15 ml de una suspensión de células CRFK que contiene aproximadamente 100.000 células por ml a cada mezcla. El efecto citopático se observó mediante la microscopía de contraste de fases después de 4 días de cultivo a 37°C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂. Los títulos neutralizantes de cada suero se calcularon de acuerdo con el método de Karber. Los títulos se dan en forma de la dilución más alta que inhibe el efecto citopático para el 50% de los pocillos. Los títulos se expresan en log₁₀. El título mínimo así encontrado fue de 0,7 log₁₀ VN₅₀. Cada suero se tituló por lo menos dos veces, preferiblemente tres veces.

Los resultados de los títulos neutralizantes se muestran en la figura 3. Las cepas G1 y 431 mostraron amplia neutralización cruzada que incluyó neutralización exitosa del 93% y 98%, respectivamente, de todos los sueros probados, y fueron exitosos contra por lo menos algunos de los sueros de todas las localizaciones geográficas, incluyendo las cepas de Estados Unidos hipervirulentas. Además, las cepas hipervirulentas 94580, 89391, 88287 y 100869 también mostraron amplia neutralización cruzada, con neutralización exitosa de 100%, 86%, 100%, y 93% de todas las cepas, respectivamente.

Una tabla y gráfica que comparan la actividad de neutralización de suero cruzado para cada cepa como porcentaje de las cepas totales, cepas Europeas y cepas de los Estados Unidos se encuentra en la figura 4. La amplia neutralización cruzada mostrada en las Figuras 3 y 4 por las cepas que incluyen G1, 431, 94580, 89391, 88287 y 100869 indicó que estas cepas pueden ser altamente efectivas cuando se utilizan en preparaciones de vacunas contra la infección de FCV.

Ejemplo 11: Eficacia de la vacuna M725 contra FCV100869

Cinco gatitos SPF de 8 semanas de edad se vacunaron en D0 y D28 con RMB725. RB725 se obtuvo al reconstituir gránulos liofilizados que comprenden una vacuna contra rinotraqueitis felina (cepa de FHV F2 atenuada), calicivirosis (antígeno FCV G 1/431 inactivado), clamidiosis (cepa 905 atenuada de *Chlamydia felis*), panleucopenia infecciosa (cepa PLI IV atenuada) como una vacuna contra leucemia felina (viruela de canario-FeLV = vCP97) como diluyente. La vacuna se constituyó tal que cada dosis contenía 2,67 log₁₀ de unidades ELISA del antígeno FCV431/G1.

En D56, los gatitos vacunados y 5 controles se estimularon con FCV100869 por la vía de la ruta oronasal. FCV 100869-1 es una cepa hipervirulenta que es antigénicamente distinta de las cepas vacunables. La cepa de estimulación se diluyó en solución tampón salina fisiológica (pH 7,15) para obtener una suspensión que titula entre 6,0 y 6,5 log₁₀ CCID₅₀/ml.

Después de la estimulación, los gatitos se monitorizaron para los signos clínicos, la excreción de FCV y anticuerpos de ELISA. Las puntuaciones clínicas se estimaron de acuerdo con la monografía No.1101 de la Farmacopea Europea para definir la intensidad de los síntomas como se indica a continuación:

		Puntuación
Temperatura rectal	37°C < T° < 39,5°C	0

	T° > 39,5°C	1
	T° < 37°C	2
Condición del cuerpo general	Buena	0
	Depresión	2
	Muerte (o eutanasia por razón ética)	10
Ulceración oronasal	Ausencia	0
	Pequeñas y pocas en número	1
	Grandes y numerosas	3
Descarga nasal	Ausencia	0
	Ligera	1
	Copiosa	2
Descarga ocular	Ausencia	0
	Presencia	1
Edema de la cara o miembros	Ausencia	0
	Presencia	1
Ulceración cutánea y/o necrosis (cara, orejas, o planta de la pata)	Ausencia	0
	Presencia	1
Pérdida de peso entre el día interesado y el día previo del pasaje	Ausencia	0
	Presencia	2

Se recogieron frotis faríngeos 2, 4, 6, 8, 10 y 14 días después de la estimulación (es decir en D56, D58, D60, D62, D64, D66 y D70). Los frotis se almacenaron a -70°C en medio F15 enriquecido con antibiótico (3 ml del medio/frotis) hasta el aislamiento viral. Se obtuvieron muestras de sangre en tubos secos el día de la estimulación (D56) y 14 días después (D70). Los sueros se almacenaron a -20°C hasta la titulación de los anticuerpos de FCV.

Todos los gatos de control desarrollaron signos clínicos después de la estimulación. Se observaron úlceras oronasales (grandes y numerosas para 3 de cada 5 de los controles y pequeñas y pocas para 2 de cada 5 controles) y descarga nasal que dura 3 (1 de cada 5 controles) o 6 a 8 días (4 de cada 5 controles) en todos los animales de control. Se registró descarga ocular en un gato. Además, un gato de control mostró depresión.

En cambio, los gatos vacunados se presentaron con menos signos clínicos severos: específicamente se desarrollaron úlceras oronasales de tamaño pequeño en 2 de cada 5 gatos vacunados y no se desarrollaron úlceras de cualquier tamaño en los gatos vacunados restantes. También, los gatos vacunados desarrollaron ligera descarga nasal que duró 1-2 días (3 de cada 5 vacunados) o 4-6 días (2 de cada 5 vacunados). Ninguno de los gatos vacunados desarrolló descarga ocular.

La hipertermia se registró en 3 de 5 controles de una a cinco ocasiones separadas en los días 1 a 6 después de la estimulación. En cambio, ningún gato vacunado presentó hipertermia. La hipertermia alcanzó un pico en D61 para los animales de control, tal como se muestra en la figura 5.

Los gatitos se pesaron un día antes de la estimulación, y en los días 4, 8, 10, 12 y 14 después de la estimulación (es decir en D55, D60, D64, D66 y D70). El crecimiento fue poco afectado por la estimulación, con la pérdida de peso puntual que se registró en 2 de 5 controles contra 1 de 5 vacunados. En promedio, el crecimiento fue más lento en los animales de control que en los vacunados. El peso medio de los gatos vacunados en D70 se subestimó y apareció menor que los controles debido a la exclusión de un gato vacunado cuyo peso no se ha registrado. No obstante, la ganancia de peso diaria relativa fue más alta para los vacunados que para los controles (8,8 frente a 7,2), se representa en la Figura 6.

Todos los gatos de control presentados con excreción de FCV alcanzaron títulos altos en D60 y disminuyeron desde D62 hasta el final del período de observación. La excreción de FCV alcanzó un pico en D58 en los vacunados, a continuación disminuyó y estuvo por debajo del límite de detección desde D64 con la excepción de un gato en D70. La caída viral se observó en todos los vacunados pero fue muy baja para 2 vacunados. En promedio, la excreción viral fue más alta y duró más tiempo en los controles que en los vacunados como se muestra en la figura 7 (ANOVA sobre el área bajo la curva; $p=0,007$).

Los gatos se evaluaron para el desarrollo de anticuerpos de FCV, y se determinó que todos los gatos vacunados desarrollaron anticuerpos de FCV después de la segunda inyección, mientras que los controles permanecieron seronegativos. La estimulación indujo un efecto de refuerzo en los vacunados y la producción de anticuerpos de FCV en los gatos de control. Los títulos de anticuerpo de FCV medios por grupo después de la estimulación se muestran en la figura 8.

En conjunto, la puntuación global media del grupo de control (27,8) fue más alto (4,6 veces) que la puntuación para el grupo vacunado (6) (ANOVA; $P=0.01$). Esta diferencia estaba principalmente unida a las úlceras oronasales que

fueron mucho más severas en los controles que en los vacunados. Además, las puntuaciones de todos los otros parámetros clínicos (condición del cuerpo general, pérdida de peso, hipertermia, descargas nasal y ocular) fueron más altos en los controles que en los vacunados, tal como se muestra en la Figura 9. Por lo tanto se puede concluir que la vacuna RMB725 fue exitosa para proteger gatos vacunados de la estimulación con FCV 100869-1.

Ejemplo 12: Eficacia de la vacuna M725 contra FCV100869

El Ejemplo 11 se repitió utilizando la misma vacuna pero teniendo un contenido de antígeno FCV inferior (2,05 log₁₀ unidades ELISA /dosis contra 2,67 log₁₀ unidades ELISA de FCV431/G1 antígeno). Además, un número reducido de animales se utilizó en cada grupo. Como resultado, no se realizó el análisis estadístico debido al bajo número de animales incluidos en este estudio.

Como se muestra en las Figuras 10 y 11, la administración de la vacuna redujo los signos clínicos sistémicos y locales a pesar de la severidad de la estimulación y el bajo contenido de antígeno en la vacuna. Aunque uno de los dos controles murió de infección de FCV hipervirulenta, los gatos vacunados sobrevivieron a la estimulación.

En este experimento, la severidad de la estimulación estaba relacionada con el título de inoculo. Un título muy alto se utilizó para inducir la infección hipervirulenta. Estos es consistente con los informes de campo que sugieren que los adultos podrían ser más sensibles a las cepas hipervirulentas de FCV que los gatitos (un fenómeno similar se describe con RHDV en conejos). Consecuentemente, ahora se ha demostrado que aun en presencia de una estimulación con un alto título de inoculo, la vacunación fue suficiente para reducir significativamente los síntomas desarrollados por los gatos vacunados en comparación a los gatos de control.

Ejemplo 13: Inmunogenicidad de FCV 100869 Inactivada y Estabilizada

18 gatitos SPF (libre de patógeno específico), de 8 semanas de edad, fueron aleatorizados en 3 grupos de 6 animales.

Virus de FCV 100869 inactivados y estabilizados (obtenidos como se describe en 03.0699.P) se diluyen en agua fisiológica, pH 7,1. La vacuna A contiene una cantidad de virus equivalente a 5 ml de cultivo crudo de FCV antes de la inactivación por dosis de 1 ml. La vacuna B contiene una cantidad de virus equivalente a 5 ml de cultivo crudo de FCV antes de la inactivación por dosis de 0,4 ml.

Los gatitos del grupo A reciben una dosis de la vacuna en cada uno de D0 y D28. Las dosis se administran simultáneamente con una jeringa y una aguja. Los gatitos del grupo B reciben una dosis de vacuna B en cada uno de D0 y D28. Las dosis se administran mediante un inyector libre de aguja, Vitajet®. Los gatitos del grupo C permanecen sin vacunar como animales de control.

En el día 56, todos los gatitos (vacunados y no vacunados) se estimulan mediante la ruta oronasal con una cepa de FCV hipervirulenta y heteróloga (FCV 94580) (0,25 ml por fosa nasal y 0,5 ml oralmente, 10^{6,0} CCID₅₀/ml).

Los anticuerpos neutralizantes Anti-FCV, pesos del animal, temperatura rectal, condiciones generales, síntomas generales y locales y excreciones virales se observan durante las dos semanas de post-estimulación. La puntuación utilizada para el cálculo de la puntuación global es la siguiente:

Parámetros	Observaciones	Puntuación
Temperatura rectal	T° ≥ 39,5°C	1
	T° ≤ 37°C	2
Condición del cuerpo general	Depresión	2
	Muerte	10
Ulceración oronasal	Pequeñas y pocas en número	1
	Grandes y numerosas	3
Descarga nasal	Ligera	1
	Copiosa	2
Descarga ocular	Presente	1
Peso	Pérdida de peso	2
Semblante o edema del miembro	Presente	1
Necrosis cutánea o ulceración	Presente	1

REFERENCIAS

- Bahnmann, H. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Aren. Virol.* 1975; 47(1):47-56.
- Baker, R.J. Oncology: Feline Fibrosarcomas in Vaccination Sites. *Feline Practice.* 1998; 26(5): 18-20.
- Baulch-Brown, C. y colaboradores, Feline calicivirus: a need for vaccine modification? *Aust. Vet. J.* 1997. 75

- (3):209-213.
 Bittle y colaboradores, Am. J. Vet. Res. 1960. 21:547-550.
 Clarke y Lambden (1997) J. Gen. Virol. 8: 291-301.
 Coutts y colaboradores, Isolation of feline respiratory viruses from clinically healthy cats at UK cat shows. Vet. Rec. 1994; 135 (23):555-556.
 5 Crandell y colaboradores, Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). In *Vi tro* 1973; 9 (3):176-185.
 Dawson y colaboradores, Investigation of vaccine reactions and breakdowns after feline calicivirus vaccination. Vet. Rec. 1993. 132:346-350.
 10 Dawson y colaboradores, Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralisation tests. Vet. Rec. 1993. 133:13-17.
 Ellis, T.M. Feline respiratory virus carriers in clinically healthy cats. Australian Vet. J. 1981; 57 (3):115-118.
 Patente europea No. 0 496 135.
 Fastier, L.B. A new feline virus isolated in tissue culture. Am. J. Vet. Res. 1957; 18:382-389.
 15 Fields, J. y colaboradores, Nature 1960. 186:778-780.
 Geissler, K. y colaboradores, Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations. Virus Res. 1997. 48:193-206.
 Gobar y colaboradores, World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. JAVMA 2002; 220 (10): 1477-82.
 20 Harbour, D.A. y colaboradores, Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. Vet. Rec. 1991. 128:77-80.
 Hurley y colaboradores, Update on feline calicivirus: new trends. Vet. Clin. Small Anim. 2003; 33:759-772.
 Johnson, R. P. y Povey, R.C. Feline calicivirus infection in kittens borne by cats persistently infected with the virus. Res. Vet. Sci. 1984. 31:114-119.
 25 Johnson, R.P. Antigenic change in feline calicivirus during persistent infection. Can. J Vet. Res. 1992. 56:326-330.
 Kahn y Gillespie. Feline viruses. X. Characterization of a newly-isolated picornavirus causing interstitial pneumonia and ulcerative stomatitis in the domestic cat. Cornell Vet. 1970. 60:669-683.
 Knowles, J.O. y colaboradores, Neutralization patterns among recent British and North American feline calicivirus isolates from different clinical origins. Vet. Rec. 1990; 127 (6): 125-7.
 30 Knowles, J.O. y colaboradores, Prevalence of feline calicivirus, feline leukaemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. Vet Rec. 1989. 124 (13):336-8.
 Lauritzen A. y Jarrett O. Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom. Vet. Microbiol. 1997. 56:55-63.
 Pedersen y colaboradores, Fel. Prac. 1983. 13:26-35.
 35 Pedersen y colaboradores, An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. Vet. Microbiol. 2000; 73:281-300.
 Pedersen, N.C. y colaboradores, Mechanisms for persistence of acute and chronic feline calicivirus infections in the face of vaccination. Vet. Microbiol. 1995. 47:141-156.
 Pharmeuropa 1996. 8(2).
 40 Poulet y colaboradores, Comparison between acute oral/respiratory and chronic stomatitis/gingivitis isolates of feline calicivirus: pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralisation studies. Arch. Virol. 2000: 145(2):243-261.
 Povey C. y Ingersoll J. Cross-protection among feline caliciviruses. Infection and Immunity 1975; 11:877-885.
 Povey, R.C. y Wilson, M.R. A comparison of inactivated feline viral rhinotracheitis and feline caliciviral disease vaccines with live-modified viral vaccines. Feline Practice 1978; 8(3):35-42.
 45 Povey y colaboradores, Immunogenicity and safety of an inactivated vaccine for the prevention of rhinotracheitis, caliciviral disease, and panleukopenia in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1980; 177 (4):347-350.
 Powell, M. and Newman, M., eds. Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, Plenum Press 1995.
 Radford, A.D. y colaboradores, The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and vaccine failures. Vaccine 1997. 15:1451-1458.
 50 Radford, A.D. y colaboradores, Endemic infection of a cat colony with a feline calicivirus closely related to an isolate used in live attenuated vaccines. Vaccine 2001. 19(31):4358-62.
 Radford, A.D. y colaboradores, Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV 1997. 93-99.
 Reubel y colaboradores, Acute and chronic faucitis of domestic cats. A feline calicivirus-induced disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1992; 22 (6):1347-60.
 55 Schorr-Evans y colaboradores, An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. J Feline Med Surg. 2003; 5(4):217-26.
 Tohya Y. y colaboradores, Characterization of the subunit particles of feline calicivirus. Nippon Juigaku Zasshi 1990; 52 (5): 955-61.
 Patente de Estados Unidos No. 2.909.462.
 60 Patente de Estados Unidos No. 5.753.103.
 Patente de Estados Unidos No. 6.355.246.
 Patente de Estados Unidos No. 6.534.066.
 Wardley, R.C. Feline calicivirus carrier state. A study of the host/virus relationship. Aren. Virol. 1976. 52 (3):243-249.
 Weeks, M.L. y colaboradores, Sequence analysis of feline caliciviruses isolated from the oral cavity of clinically normal domestic cats (*Felis catus*) in Florida. Research in Veterinary Science 2001. 71(3):223-5.
 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición inmunogénica o de vacuna que comprende un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable y al menos un calicivirus felino (FCV) aislado, en la que dicho al menos un calicivirus felino es la cepa de FCV 100869 depositada en ATCC bajo el número de acceso PTA 5930.
- 10 2. Composición, según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además la cepa 431 de calicivirus felino aislada y/o la cepa G1 de calicivirus felino aislada; en la que la cepa 431 de calicivirus aislada está depositada en la CNCM bajo el número de acceso 1-2166 y la cepa G1 de calicivirus felino aislada está depositada en la CNCM bajo el número de acceso 1-2167.
- 15 3. Composición, según la reivindicación 1 ó 2, en la que FCV está inactivado.
4. Composición, según la reivindicación 2 ó 3, en la que la composición proporciona una respuesta inmunitaria contra la cepa de calicivirus felino 100869.
- 20 5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición es una vacuna.
6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición comprende adicionalmente un adyuvante.
7. Composición de vacuna, según la reivindicación 1, para utilizar en la inmunización de un animal de la familia Felidae contra un FCV.
- 25 8. Utilización de una composición, según la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para la inmunización de un animal de la familia Felidae contra un FCV.

Suero Aislado	Sr A2	Sr F1	Sr G1	Sr H3-2	Sr G3	SrF 3031	Sr H1-4	Sr 388b	Sr 431	Sr 337	Sr J5	SrRMI								Sr 255	Sr F9
												1	2	3	5	6	7	9			
A2 (FR)	3.5	0.8	2.5	1.2	1.0	1.8	1.3	0.7	0.8	1.1	0.9	0.7	0.7	0.7	2.0	1.2	0.7	1.7	1.2	1.8	
F1 (FR)	1.2	3.0	2.2	1.9	0.9	1.1	1.0	1.9	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	
G1 (FR)	1.6	0.8	2.9	1.2	1.0	1.7	0.7	0.9	2.6	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	1.3	1.1	
H3-2 (FR)	0.7	0.7	0.7	2.8	0.7	0.7	0.9	0.8	1.3	0.7	1.1	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	
G3 (FR)	1.0	1.1	2.4	1.7	3.5	1.6	1.3	0.9	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	
F3031 (FR)	2.4	1.5	2.0	1.7	1.2	3.8	1.1	1.2	2.0	0.7	1.2	0.8	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	1.2	1.1	2.0	
H1-4 (FR)	0.7	0.7	1.1	1.2	0.7	0.7	3.2	0.7	1.3	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	
388b (UK)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	3.3	2.1	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	
431 (UK)	0.7	0.7	0.9	0.7	0.7	0.8	0.8	1.3	3.5	1.0	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	
337 (UK)	1.0	0.7	1.1	0.7	0.7	0.9	1.1	1.2	2.2	3.2	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.9	0.7	
J5 (UK)	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	1.1	0.8	1.6	0.7	3.3	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	
RMI1 (US)	0.7	0.7	1.0	1.2	0.7	0.7	0.7	1.1	1.6	0.7	1.0	2.7	0.7	0.7	0.7	1.0	1.3	0.7	0.7	0.7	
RMI2 (US)	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	0.7	1.3	0.7	2.3	0.7	0.7	1.3	1.3	1.8	0.7	0.7	
RMI3 (US)	0.7	0.7	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	1.3	1.5	1.8	1.0	2.6	2.2	3.1	2.0	1.3	1.8	1.2	0.7	0.7	
RMI5 (US)	1.2	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	1.5	1.9	0.7	0.9	0.8	0.7	0.7	2.4	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7	
RMI6 (US)	1.2	0.7	1.2	0.7	0.7	1.3	0.7	0.7	1.0	0.7	1.4	1.1	1.2	0.7	0.7	2.5	0.7	2.5	0.7	0.7	
RMI7 (US)	1.1	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	1.3	0.7	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	3.0	0.7	0.7	0.7	
RMI9 (US)	1.1	0.7	1.2	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	2.5	0.7	2.4	0.7	0.7	

Figura 1

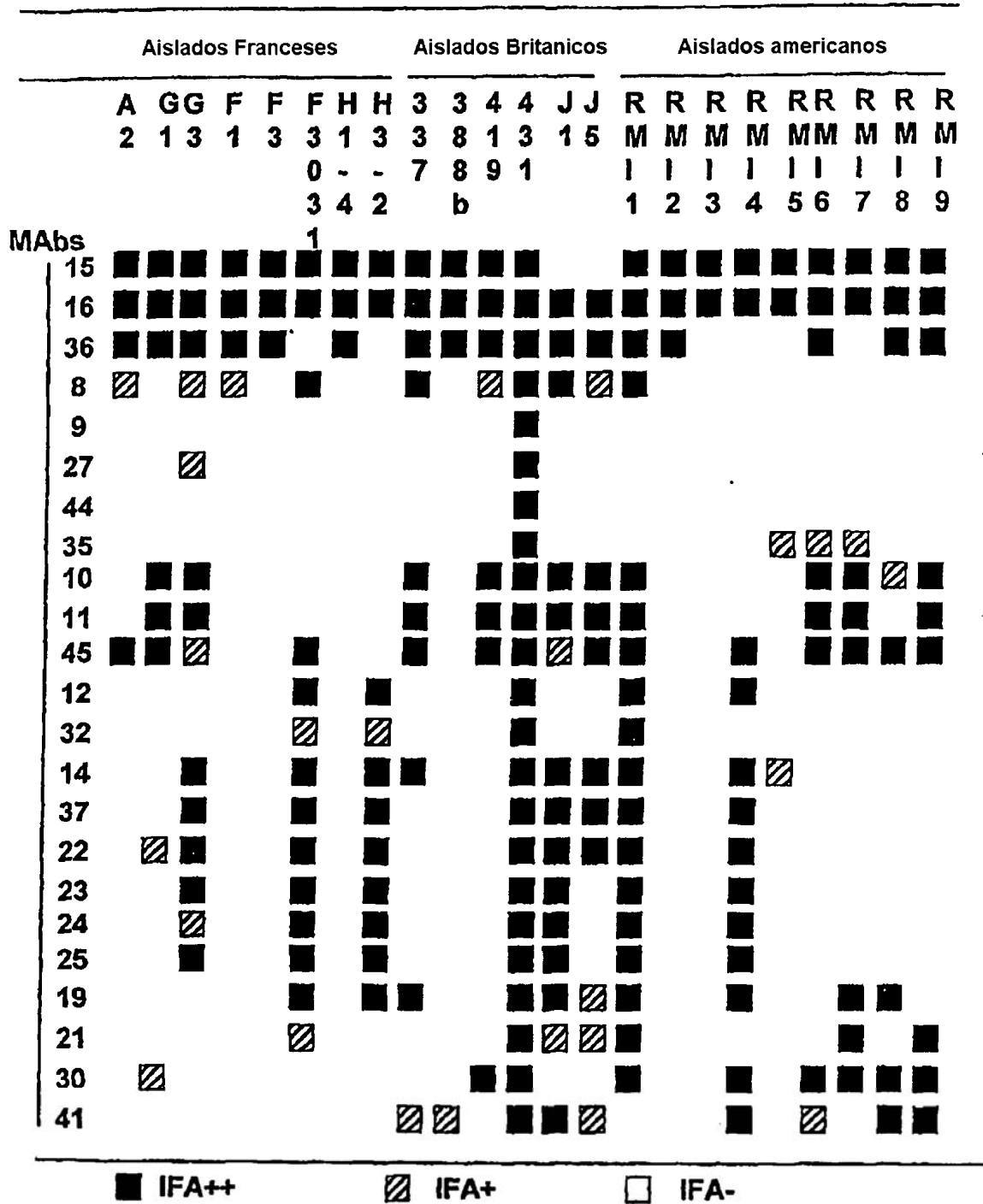


Figura 2

Suero	Aislado	Sr 25 S	Sr F9	Sr A2	Sr F1	Sr G1	Sr H3 -2	Sr G3	Sr F30 31	Sr H1- 4	Sr F3	Sr 388 b	Sr 431	Sr 419	Sr 337	Sr J1	Sr J5
V a c	255	3.3	2.2	2.3	1.6	2.5	1.7	2.0	2.6	1.3	2.5	3.1	3.1	2.1	2.9	2.3	2.5
	F9	1.6	3.0	2.8	1.6	2.7	2.1	1.7	3.0	1.9	2.5	2.9	2.0	2.1	2.5	2.1	2.4
F r a n c e s a	A2	1.2	1.8	3.5	0.8	2.5	1.2	1.0	1.8	1.3	1.7	0.7	0.8	0.8	1.1	0.7	0.9
	F1	0.7	1.0	1.2	3.0	2.2	1.9	0.9	1.1	1.0	1.0	1.9	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7
	G1	1.3	1.1	1.6	0.8	2.9	1.2	1.0	1.7	0.7	1.2	0.9	2.6	0.7	0.7	0.7	0.8
	H3-2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	2.8	0.7	0.7	0.9	0.7	0.8	1.3	0.7	0.7	1.3	1.1
	G3	0.8	0.7	1.0	1.1	2.4	1.7	3.5	1.6	1.3	1.5	0.9	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7
	F3031	1.1	2.0	2.4	1.5	2.0	1.7	1.2	3.0	1.1	2.1	1.2	2.1	0.7	0.7	1.3	1.2
	H1-4	0.7	0.7	0.7	0.7	1.1	1.2	0.7	0.7	3.2	0.8	0.7	1.3	0.7	0.7	0.7	1.0
	F3	0.7	1.2	0.8	0.8	2.2	0.9	0.7	0.8	0.9	3.3	0.7	0.9	0.7	0.7	1.1	0.8
U K	388B	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	3.3	2.1	0.7	0.7	1.1	0.9
	431	0.8	0.7	0.7	0.7	0.9	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	1.3	3.5	0.8	1.0	1.5	1.2
	419	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.2	2.5	0.7	0.9	0.7	0.7
	337	0.9	0.7	1.0	0.7	1.1	0.7	0.7	0.9	1.1	1.0	1.2	2.2	1.1	3.2	1.2	1.2
	J1	0.7	0.7	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7	1.3	1.1	1.0	1.2	1.9	0.9	0.7	1.9	1.3
	J5	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	1.1	0.8	0.8	1.6	0.7	0.7	1.1	3.3
	220		0.7														
	393		0.7														
U S	RM11	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	1.1	1.6	0.7	0.7	1.1	1.0
	RM12	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	0.9	0.7	1.3	1.3	1.3
	RM13	0.7	0.7	0.7	0.7	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	1.3	1.3	1.5	0.9	1.8	1.2	1.0
	RM14	0.7	0.7	0.8	0.7	1.3	1.0	1.1	1.5	0.7	0.7	0.7	1.6	0.7	0.7	0.7	0.7
	RM15	0.7	0.7	1.2	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.5	1.9	1.2	0.7	1.1	0.9
	RM16	0.7	0.7	1.2	0.7	1.2	0.7	0.7	1.3	0.7	0.7	0.7	1.0	1.2	0.7	1.2	1.4
	RM17	0.7	0.7	1.1	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	1.3	0.7	0.7	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7
	RM18	0.7	0.7	1.2	0.7	1.4	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7
	RM19	0.7	0.7	1.1	0.7	1.2	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7
	98A-13445	0.7	0.7			1.3							2.3				
	98A-4417	0.7	1.5			1.5							2.3				
	98A-49529	1.1	2.1			2.3							2.9				
	98A-4568	0.7	1.4			1.9							2.1				
	968384-97	0.9	1.0			2.6							2.6				
	31383-97	0.9	1.5			2.6							2.1				
	98A-46260	+	+			+							+				
	941421-96	0.7	0.7			1.0							1.2				
	98A-8107	0.7	0.7			1.0							1.0				
	98A-49526	0.7	0.7			1.2							1.5				
	93182-98	0.7	0.7			1.3							1.5				
	98A-10305	0.7	0.7			0.8							0.9				
	98A-49052	0.7	1.3			1.2							1.6				
	94580*	0.7	0.7	1.5	1.5	1.8	1.5	0.7	2.0	0.87 5	0.87 5	0.7	1.6	0.7	0.7	1.0	0.7
	33585.1*	0.7	0.7	0.7	0.7	1.3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
	89391*	0.7	0.7	1	1.625	0.9	1.5	0.87 5	1.37 5	1.37 5	0.7	1.25	1.4	0.7	0.7	1.25	0.7
	88287*	0.7	0.7	0.7	1.5	1.0	0.7	0.7	0.7	1.25	0.7	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	1.0
	100869.1*	0.7	0.7	0.7	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	1.75	0.87 5
% de cepas neutralizadas por suero																	
28	31	57	37	93	47	33	50	57	50	57	98	37	20	63	67		
Número de cepas neutralizadas por suero/número de cepas probadas																	
12	14	17	11	40	14	10	15	17	15	17	42	11	6	19	20		
43	45	30	30	43	30	30	30	30	30	30	43	30	30	30	30		
% de cepas neutralizadas por suero, entre cepas EUR																	
43	31	50	43	79	57	36	64	79	79	79	100	36	21	64	79		
% de cepas neutralizadas por suero, entre cepas de US																	
15	26	57	21	100	29	21	29	29	14	29	96	29	7	57	50		

Negrita: neutralización: título $>0.7 \log_{10}$ VN50
No neutralización: título $\leq 0.7 \log_{10}$ VN50

Blanco: no determinado

Cepas vacunales: FCV 255 (Meria)-Corifelin)
FCV F9 (otras vacunas)

* "Killers" de US

Figura 3

Suero		SrRMI											Sr	Sr	Sr	Sr
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	4	9	94580	89391	88287	100069.1
V a c	255	2.0	1.7	1.9	1.4	1.7	1.8	2.1	1.5	2.0	1.4	1.3	2.5	1.63	2.5	2.5
	F9	2.0	1.3	1.3	2.4	1.3	1.8	1.9	1.8	2.3	2.4	1.7	1.25	0.7	1.75	1.63
Francesa	A2	0.7	0.7	0.7	1.2	2.0	1.2	0.7	1.0	1.7	0.8	1.2	1.75	1.19	2.25	1.94
	F1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.5	1.00	2.94	1
	G1	1.1	0.7	0.7	0.7	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	2.38	1.30	1.75	2.5
	H3-2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.12	2.62	2.12	1.12
	G3	0.8	0.7	0.7	1.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.25	0.7	1.5	1.88
	F3031	0.7	0.7	0.7	1.1	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7		0.7	2	2.25	2.25	2.25
	H1-4	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.625	1.25	1.75	1.25
	F3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	2.125	1.75	2	1.375
U K	388B	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.375	1.25	1.875	1
	431	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.4	1.13	2.63	0.7
	419	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.125	0.875	1.5	1
	337	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	1.62	0.87	2	1.62
	J1	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	0.9	0.7	0.9	0.8	0.7	0.7	0.875	2.5	2	1.25
	J5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	2.125	2.25	2.625	1.625
	220											0.7	2.06	0.7	2.13	1.88
	393											0.7	1.31	1.62	1.88	1.88
U S	RMI1	2.7	0.7	0.7	1.0	0.7	1.0	1.3	0.7	0.7			1.5	0.7	1.25	1.5
	RMI2	0.7	2.3	0.7	1.0	0.7	1.3	1.3	1.2	1.8			1.38	1.75	1.38	0.7
	RMI3	2.6	2.2	3.1	2.1	2.0	1.3	1.8	1.0	1.2			2.13	1.63	2.13	1.5
	RMI4	0.7	0.7	0.7	1.7	1.4	1.0	0.8	0.8	1.0	2.8	1.1	1.75	1.13	1.75	1.88
	RMI5	0.8	0.7	0.7	0.8	2.4	1.3	0.7	0.8	0.7			1.87	0.7	1.62	1.37
	RMI6	1.1	1.2	0.7	1.0	0.7	2.5	0.7	2.1	2.5			nd	nd	nd	nd
	RMI7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	3.0	0.7	0.7			1	1	1.62	0.87
	RMI8	0.7	0.8	0.7	1.0	0.7	2.2	0.7	2.0	2.4			1.75	1.12	1.5	1.12
	RMI9	0.7	0.7	0.7	0.9	0.7	2.5	0.7	2.0	2.4	2.0	2.7	1.3	0.7	1.6	1.25
	98A-13445										0.9	1.0	2	1	1.75	0.7
	98A-4417										1.6	1.1	1.75	1.37	2	2.25
	98A-49529										2.5	1.6	1.75	1.37	1.62	1.25
	98A-4568										1.5	1.3	1.62	1.62	2.75	1.25
	968384-97										1.8	1.4	2	1.87	1.12	1.62
	31383-97										1.5	2.0	2.375	2	2.12	2.12
	98A-46260										+	+	3.5	3	2.75	2.12
	941421-96										0.7	0.7	2.12	2.12	1.5	1.37
	98A-8107										0.7	0.7	2.5	2	1.87	1.87
	98A-49526										0.7	0.7	0.87	1.75	1.62	1.25
	93182-98										0.7	0.7	1.5	1.12	1.25	1.12
	98A-10305										0.7	0.7	2.87	2.5	2	1.75
	98A-49052										1.5	0.7	2.25	1.75	2.12	1.75
	94580*										1.1	0.7	2.8	2.9	3.1	1.5
	33585.1*										0.7	0.7	3.2	2.2	2.9	4
	89391*										0.7	0.7	1.4	3.1	1.5	3.8
	88287*										0.7	0.7	1.4	4	4.6	1.9
	100869.1*										0.9	0.7	1.4	1.2	2.5	2.6
% de cepas neutralizadas por suero																
32	24	12	56	40	60	28	44	36	42	32	100	86	100	93		
Número de cepas neutralizadas por suero/número de cepas probadas																
8	6	3	14	10	15	7	11	9	16	12	44	38	44	44	41	
25	25	25	25	25	25	25	25	25	38	38	44	44	44	44	44	
% de cepas neutralizadas por suero, entre cepas EUR																
14	0	0	29	29	36	7	14	7	13	6	100	87	100	94		
% de cepas neutralizadas por suero, entre cepas de US																
44	44	11	89	44	89	56	78	67	60	45	100	88	100	92		
Negrita: neutralización: título >0.7 log10 VN50																
No neutralización: título <=0.7 log10 VN50																
Blanco: no determinado																
Cepas vacunales: FCV 255 (Merial-Corifelin)																
FCV F9 (otras vacunas)																

Figura 3

	Sr255	SrF9	SrA2	SrF1	SrG1	SrH3-2	SrG3	SrF3031	SrH1-4	SrF3	Sr388b	Sr431	Sr419	Sr337	SrJ	SrJ	SrJ
% cepas totales	28	31	57	37	93	47	33	50	57	50	57	98	37	20	63	1	5
% de cepas EU	43	31	50	43	79	57	36	64	79	79	79	100	36	21	64	79	79
% de cepas US	15	26	57	21	100	29	21	29	29	14	29	96	29	7	57	50	50

	SrRMI										94580	89391	88287	100869
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	4	9			
% cepas totales	32	24	12	56	40	60	28	44	36	42	32	86	100	93
% de cepas EU	14	0	0	29	29	36	7	14	7	13	6	87	100	94
% de cepas US	44	44	11	89	44	89	56	78	67	60	45	88	100	92

Figura 4

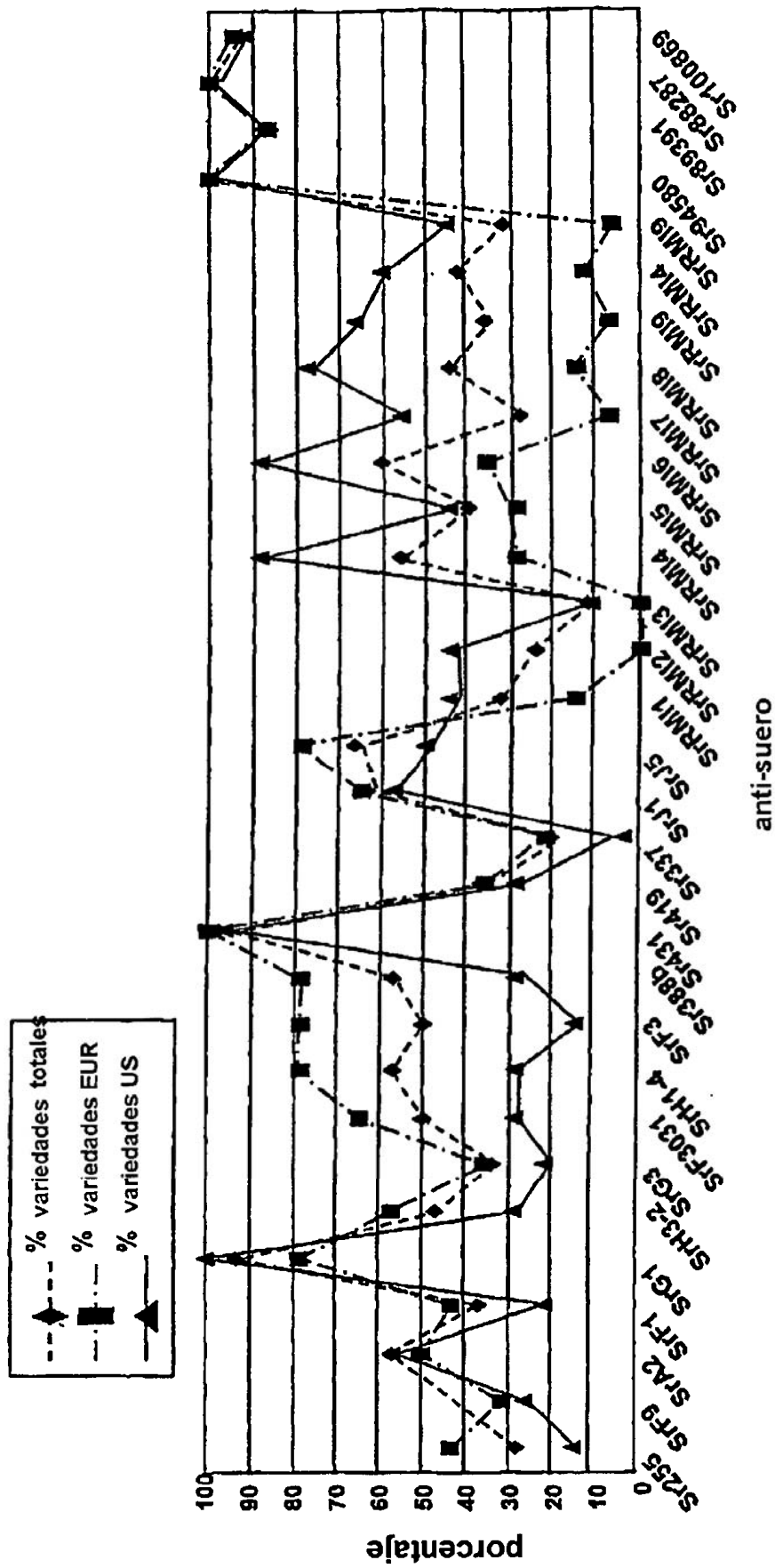


Figura 4

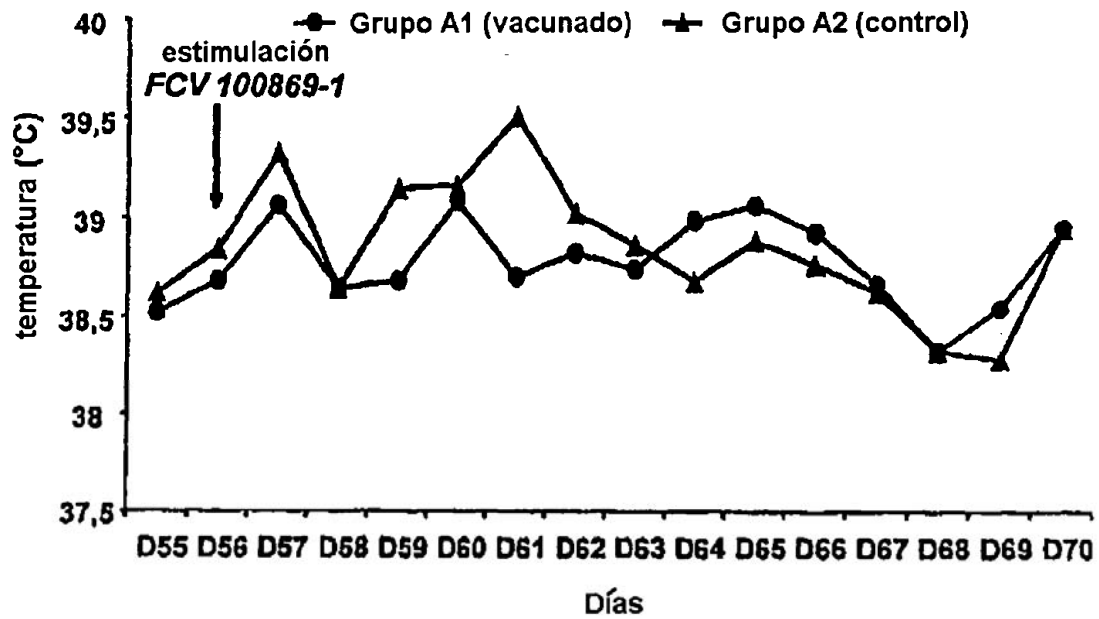


Figura 5

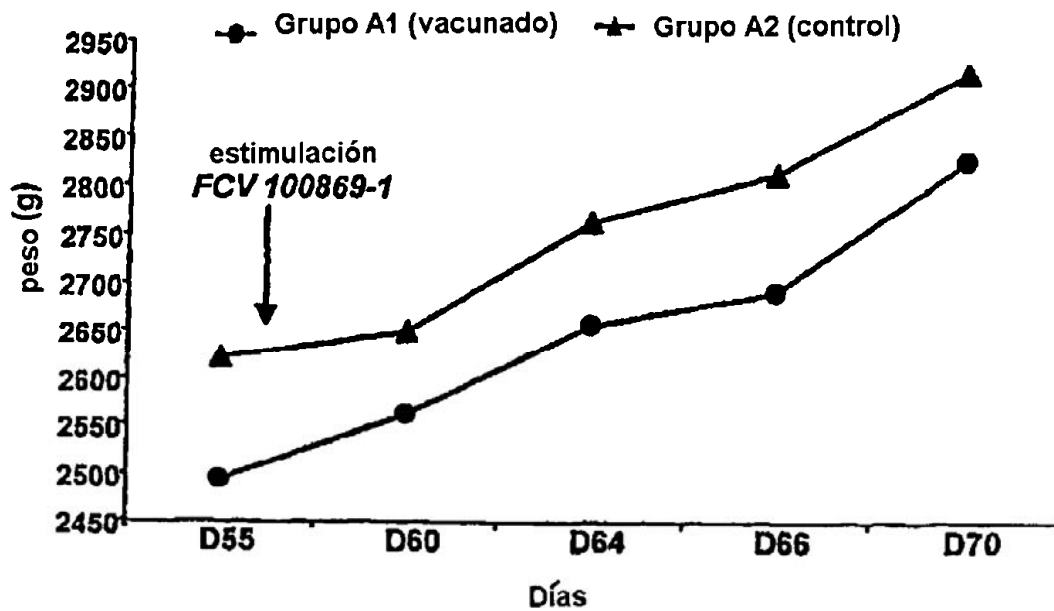


Figura 6

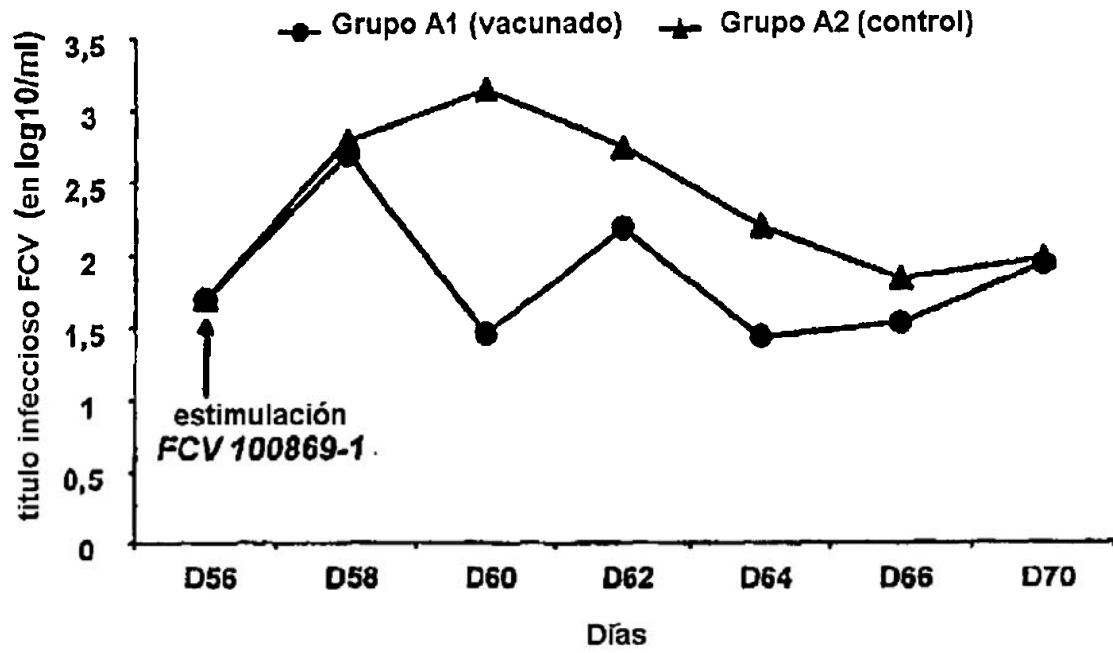


Figura 7

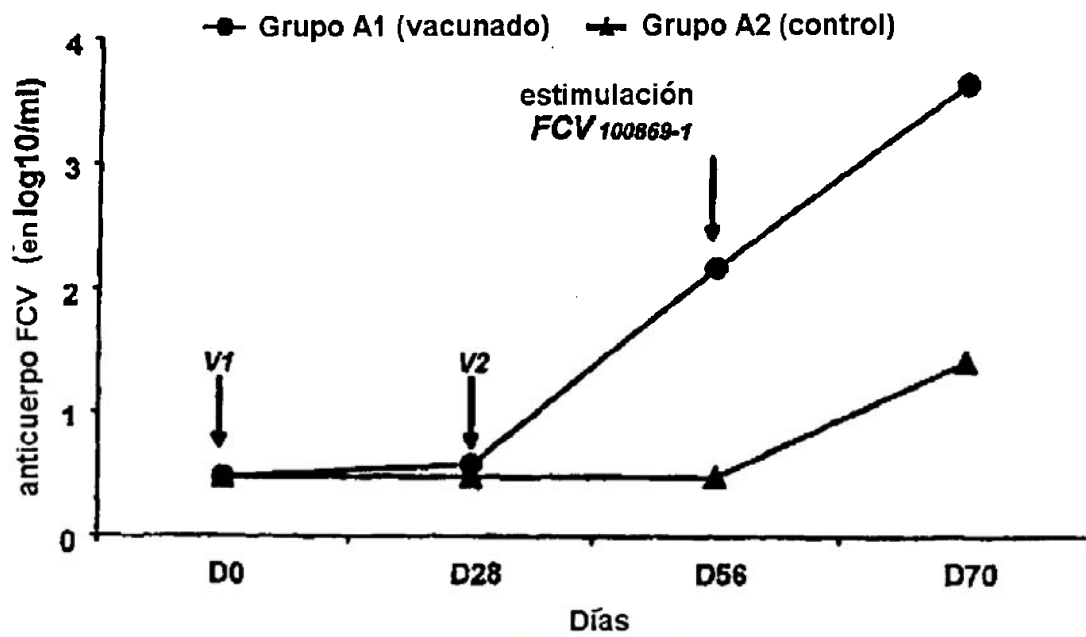


Figura 8

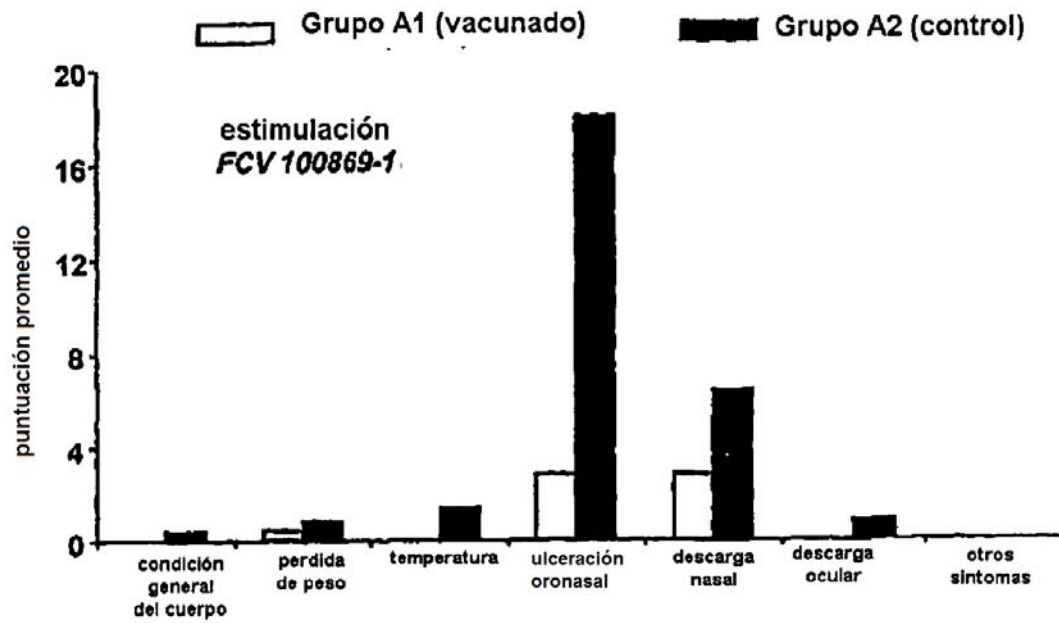


Figura 9

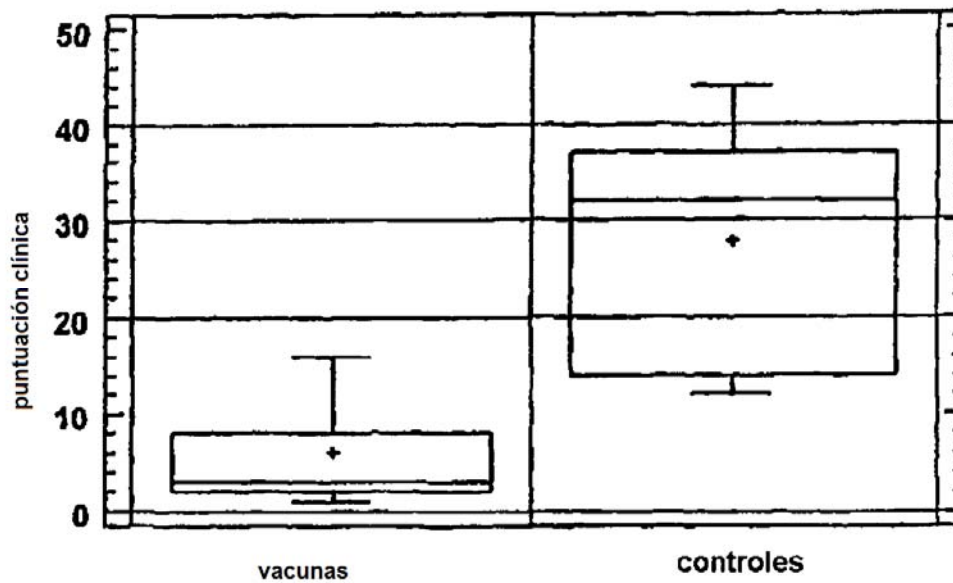


Figura 10

Grupo	Gatos	Síntomas generales				Síntomas Locales							
		condiciones generales del cuerpo	peso	temperatura	total	úlceras nasal y bucal	descarga nasal	descarga ocular	hinchazón subcutánea	necrosis de piel	úlceras de piel	total	puntuación global
vacunas	86623	0	6	4	10	7	6	0	10	0	16	23	33
	76918	0	6	4	10	3	5	3	6	0	14	17	27
	promedio	0	6	4	10	5	5.5	1.5	8	0	15	20	30
controles	84906	52	4	8	64	19	13	2	10	2	2	46	110
	60758	10	6	5	21	25	20	1	6	0	14	52	73
	promedio	31	5	6.5	42.5	22	16.5	1.5	8	1	8	49	91.5

Figura 11