

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 126**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2007 PCT/US2007/082537**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2008 WO08070332**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2007 E 07871240 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2076280**

54 Título: **Vacuna contra la gripe felina y método de uso**

30 Prioridad:

25.10.2006 US 854351 P

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

21.02.2020

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL BV (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**LAKSHMANAN, NALLAKANNU P.;
LUM, MELISSA A.;
STERNER, FRANK J. y
BETHKE, FREDERICK RANDALL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 744 126 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra la gripe felina y método de uso

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas, kits que comprenden dichas vacunas, y a métodos de uso de dichas vacunas para proteger felinos de infecciones por el virus de la gripe.

10 Antecedentes de la invención

Las infecciones respiratorias en animales, caracterizadas por tos u otros síntomas, han sido reconocidas durante un largo tiempo. Dichas infecciones pueden ser particularmente comunes cuando animales no vacunados se alojan en circunstancias de alta densidad. Se sabe que son provocadas por, por ejemplo, virus del herpes, calicivirus o virus de la gripe, con y sin otros organismos que puedan afectar o complicar dichas infecciones respiratorias. Dichas afecciones no han sido generalmente directamente mortales, aunque pueden conducir a infecciones más graves y a muerte.

Los virus de la gripe conocidos por infectar una familia de animales no son normalmente capaces de infectar otras familias de animales. Sin embargo, se ha observado recientemente una enfermedad respiratoria que infecta galgos de carreras, que produjo la muerte de varios perros. En enero de 2004, la Dra. Cynda Crawford empezó supuestamente a investigar las muertes de galgos en un circuito en Jacksonville, Florida, donde 24 galgos contrajeron la enfermedad y 8 murieron. La Dra. Crawford informó que los perros, que no tenían inmunidad natural al virus, se infectaron todos si se expusieron al virus, y 80 % de los perros infectados desarrollaron síntomas. También informó que virus era una gripe H3N8, que está estrechamente relacionada con una cepa de la gripe equina. Véase *New York Times.com*, septiembre de 22, 2005. Véase también Crawford, P.C., et al., "Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs", *Science*, 310, pp. 482-85 (21 de octubre de 2005).

La solicitud de patente de EE.UU. N° 60/673.443, presentada el 21 de abril de 2005, y 11/409.416, presentada el 21 de abril de 2006, y la solicitud de patente internacional N° PCT/US2006/015090, presentada el 21 de abril de 2006 (publicada como WO06/116082), también describen el trabajo de la Dra. Crawford con el virus de la gripe equina que infecta a caninos. La solicitud de patente de EE.UU. N° 60/779.080, presentada el 3 de marzo de 2006, describe el uso del virus de la gripe equina como vacunas contra la gripe en caninos.

Gore et al. (*Veterinary Therapeutics*, Verterinary Learning System, vol. 7, no. 3, p213-222 (2006)) describen que los gatos que se vacunaron contra el virus de la rinotraqueítis felina, calicivirus felino y virus de la panleucopenia felina tuvieron una duración de tres años de inmunidad.

Enserink (*Science* vol. 309, no. 5744, p2147 (2005)) informa que un virus de la gripe equina H3N8 estuvo infectando perros.

La Información sobre la Gripe Canina del Programa de Medicina de Albergues de Davis Koret en UC (www.sheltermedicine.com/portal/is_canine_influenza_update.shtml) describe que se ha informado de gripe canina desde 2004, pero sigue siendo relativamente poco común en la mayoría de las áreas en los EE.UU.

Songserm et al. (*Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, no. 4, p681-683 (2006)) informan de una infección por virus H5N1 en un gato doméstico.

Kuiken et al. (*Science* vol. 309, no. 5744, p2147 (2005)) describen que se encontró un virus de la gripe aviar H5N1 en gatos y se encontró que era poco usual, ya que generalmente se considera que los gatos domésticos son resistentes a enfermedad de infección por el virus de la gripe A.

Kuiken et al. (*Nature*, vol. 440, p741-742, (2006)) describen que existe un número creciente de informes de Asia y Europa de gatos domésticos que mueren de gripe aviar H5N1.

En *Eurosurveillance* (vol. 11, edición 13 (2006)), el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades informa que la gripe de tipo A/H5N1 puede infectar gatos. Recomienda evitar el contacto entre gatos y aves en áreas con infecciones por H5N1.

Beeler (*Veterinary Clinics of North America small Animal Practice*, vol. 39, no. 2, p251-264, (2009)) describe gripe en perros y gatos. Se desvela que no existen cepas de la gripe bien adaptadas conocidas en los gatos y que la única cepa en gatos H5N1 solo está parcialmente adaptada y no es altamente transmisible entre miembros de la misma especie. Los experimentos mostraron que los gatos pueden infectarse con gripe A humana y los gatos propagan el virus y pueden infectar otros gatos, pero estos gatos no enfermaron.

Harder et al. (*Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 134, p54-60 (2010)) proporciona una visión general

de gripe en perros y gatos. Desvela que los experimentos mostraron que los gatos que se infectaron experimentalmente con cepas de la gripe, se infectaron, pero estos gatos no desarrollaron signos clínicos. Solo algunos virus se pudieron transmitir a otros gatos. El único virus de la gripe aislado de gatos en condiciones naturales fue H5N1.

5 Vahlenkamp et al. (Journal of General Virology vol. 89, p968-974 (2008)) mostraron que los gatos se podrían proteger contra una infección por H5N1 por exposición a alta dosis letal por vacunación de un virus de la gripe aviar H5N6 adyuvantado inactivado.

10 El documento de patente WO2007/042884 desvela vacunas para el tratamiento de gripe canina por vacunas que comprenden virus H3N8 o H7N7 de equino o perros.

Hanshaw et al. (Experimental Biology 2007 Annual Meeting April 28, 2 de mayo de 2007) informa del desarrollo de un modelo de ratón para infección por gripe H3N8 canina.

15 El documento de patente WO2006/116082 desvela vacunas que comprenden virus de la gripe capaces de infectar cánidos.

20 El documento de patente WO2006/138248 desvela vacunas para la protección de la infección por Bartonella en gatos.

AVMA Bulletin, 2007 (Canine Influenza Backgrounder) proporciona una visión general de la gripe canina, tal como el agente causante, distribución, transmisión, signos clínicos, diagnóstico, tratamiento, morbimortalidad, prevención y control.

25 La Universidad de Florida publicó una hoja informativa sobre la gripe canina (www.vetmed.ufl.edu/pr/nw_story/canineinflufactsheet.htm) que proporciona información sobre la gripe canina como un patógeno recientemente emergente en perros.

30 Daly et al. (Vet. Res. Vol. 35 p411-423 (2004)) desvela una visión general del control del virus H3N8 de la gripe equina A. Desvela que el virus equino de la gripe H3N8 divergió en dos linajes dependiendo de la geografía.

Newton et al. (Preventive Veterinary Medicine vol. 46 p129-141 (2009)) desvela factores de riesgo para la gripe equina en caballos pura sangre que se administraron con una vacuna inactivada.

35 Existe una necesidad de vacunas y métodos de protección de cualquier especie dada de animal del virus de la gripe que pueda infectar otras especies de animales. La siguiente divulgación describe vacunas y métodos que son generalmente adecuados para tratar esta necesidad.

40 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas y métodos de protección de felinos de la propagación de la gripe usando un antígeno de la gripe de tipo H3 N8. La presente invención también se refiere a métodos de uso de dichas vacunas. Esta protección incluye reducir su extensión. Se cree que las vacunas, y métodos de la presente invención, son generalmente adecuados para su uso con cualquier miembro de la familia Felidae (o felino).

50 Brevemente, la presente invención se refiere a un método de protección de un felino de la propagación de la gripe H3N8 (es decir, prevenir la extensión de la infección de un felino a otro felino u otras especies (por ejemplo, humana, canina, equina, aves de corral). El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna que comprende al menos un antígeno de virus de la gripe de tipo H3 N8.

La presente invención también se refiere, en parte, a un método de protección de un felino de tener el virus de la gripe en secreción nasal u oral (es decir, prevenir, reducir el riesgo de, retrasar la aparición de, suprimir, mejorar, o erradicar el virus de la gripe felina en secreción nasal u oral) provocado por infección del virus de la gripe administrando al felino una composición que comprende un antígeno de la gripe de tipo H3 N8. El método comprende administrar al felino una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna que comprende al menos un antígeno de virus de la gripe de tipo H3 N8.

60 El antígeno de la gripe se puede administrar al felino en cualquier modo bien conocido para el experto. Las vías de administración no limitantes incluyen administración parenteral (que incluye administración subcutánea o intramuscular), u otras vías tales como administración intradérmica o transdérmica. El experto conoce bien dispositivos para administración parenteral, intradérmica o transdérmica y se pueden usar con la invención.

65 La invención se refiere a un método de protección de un felino de la propagación de la gripe H3N8, en donde el método comprende administrar al felino una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna que comprende: i) al menos un antígeno del virus de la gripe tipo H3 N8 y ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. El

(Los) antígeno(s) del virus de la gripe tipo H3 N8 pueden comprender uno o más virus inactivados. El (Los) antígeno(s) del virus de la gripe tipo H3 N8 pueden comprender uno o más del grupo que consiste en i) uno o más virus atenuados vivos; ii) una o más partículas de tipo virus; iii) una o más partículas de virus defectuosas. La vacuna puede comprender antígenos del virus de la gripe tipo H3 N8 de más de una cepa aislada de virus. La vacuna comprende al menos un antígeno de un virus de la gripe de tipo H3 N8. La vacuna se puede administrar por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía ocular, por vía mucosa o por vía oral. La vacuna se puede administrar por vía intranasal. La vacuna se puede administrar al felino una o más veces. La vacuna se puede administrar en combinación con al menos una vacuna seleccionada del grupo que consiste en una vacuna contra la rinotraqueítis, vacuna contra calicivirus, vacuna contra la panleucopenia, vacuna contra la clamidia, vacuna contra bordetella, vacuna contra el virus de la inmunodeficiencia felina, vacuna contra la leucemia felina o vacuna contra el virus de la rabia.

En el presente documento se describe un método de protección de un felino de lesiones respiratorias provocadas por el virus de la gripe, en donde el método comprende administrar al felino una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna que comprende: i) al menos un antígeno del virus de la gripe de tipo H3 N8, y ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La vacuna se puede administrar al felino antes de que el felino se infecte con el virus de la gripe. Este método puede comprender proteger el felino de las lesiones pulmonares provocadas por el virus de la gripe.

Otra realización de la invención se refiere a un método de protección de un felino de tener el virus de la gripe en secreción nasal u oral provocado por infección por el virus de la gripe, en donde el método comprende administrar al felino una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna que comprende: i) al menos un antígeno del virus de la gripe tipo H3 N8, y ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La vacuna se puede administrar al felino antes de que el felino se infecte con el virus de la gripe.

Otra realización de la invención se refiere a una vacuna contra la gripe felina, en donde la vacuna comprende: i) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un antígeno del virus de la gripe tipo H3 N8, y ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. El (Los) antígeno(s) de virus puede(n) comprender uno o más virus inactivados. El (Los) antígeno(s) de virus puede(n) comprender uno o más del grupo que consiste en i) uno o más virus atenuados vivos; ii) uno o más virus recombinantes; iii) una o más partículas de tipo virus; iv) una o más partículas de virus defectuosas; y v) uno o más ácido nucleicos que codifican el antígeno.

En el presente documento se describe un kit para proteger un felino de la infección por el virus de la gripe, en donde el kit comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna que comprende al menos un antígeno del virus de la gripe tipo H3 N8, y al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en:

- un aparato para administrar la vacuna al felino,
- un excipiente farmacéuticamente aceptable que ayuda en la administración de la vacuna al felino,
- un excipiente farmacéuticamente aceptable que potencia la respuesta inmunitaria del felino a la vacuna,
- un alimento para ser consumido por el felino simultáneamente con la vacuna, y
- un premio para ser consumido por el felino simultáneamente con la vacuna.

El kit puede comprender un aparato para administrar la vacuna al felino por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía ocular, por vía mucosa, o por vía oral. El kit puede comprender un aparato para administrar por vía intranasal la vacuna al felino.

La invención se refiere a un método de prevención de la extensión del virus de la gripe de un felino a uno o varios de otros animales, que comprende administrar al felino una vacuna contra la gripe que comprende un antígeno del virus de la gripe tipo H3 N8. El uno o varios de otros animales pueden incluir (sin limitación) caninos, equinos, humanos, otros felinos, o aves.

En el presente documento se describe un método de diagnóstico de un felino para gripe que comprende determinar el título de anticuerpos usando un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) o usando un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA).

Los beneficios adicionales de la invención del solicitante serán evidentes para un experto en la técnica a partir de la lectura de esta memoria descriptiva.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Esta descripción detallada de realizaciones preferidas está prevista solo para presentar a otros expertos en la técnica la invención del solicitante, sus principios y su aplicación práctica, de manera que otros expertos en la técnica puedan adaptar y aplicar la invención en sus numerosas formas, ya que pueden ser más adecuadas para los requisitos de un uso particular. Esta descripción detallada y sus ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la presente invención, están previstos para los fines de ilustración solo. La presente invención, por tanto, no se limita a las realizaciones preferidas descritas en esta memoria descriptiva, y puede ser modificada de

diversas formas.

5 Como se usa en el presente documento, el término "felino" se refiere a cualquier miembro de la familia Felidae. Los miembros de esta familia incluyen miembros salvajes, de zoológico y domésticos, tales como cualquier miembro de las subfamilias Felinae, Pantherinae o Acinonychinae. Los ejemplos no limitantes de especies incluidas dentro de la familia Felidae son gatos, leones, tigres, pumas, jaguares, leopardos, leopardos de las nieves, panteras, leones de las montañas de Norteamérica, guepardos, linces, gatos monteses, linceos africanos, o cualquier cruce de los mismos. Los gatos también incluyen gatos domésticos, gatos de compañía de raza pura y/o cruzados, gatos de exposición, gatos de laboratorio, gatos clonados y gatos salvajes o asilvestrados.

10 Como se usa en el presente documento, "canino" se refiere a cualquier miembro de la familia canidae. Los ejemplos no limitantes de dichos miembros incluyen todas las razas de perros domésticos, perros salvajes, lobos, zorros, coyotes, chacales, dingos, hienas, dolos, culpeos y fénecs.

15 Como se usa en el presente documento, "equino" se refiere a cualquier miembro de la familia equidae. Los ejemplos no limitantes de dichos miembros incluyen caballos salvajes, todas las razas de caballos domésticos, burros, asnos salvajes, asnos domésticos, onagros, khurs, kiangs, cebras y cuagas.

20 Como se usa en el presente documento, "proteger" un felino de la propagación de un virus de la gripe H3N8 incluye, sin limitación, prevenir la extensión de la infección de un felino a uno o varios de otros felinos u otras especies reduciendo el riesgo de la extensión de la infección del virus de la gripe de un felino a uno o varios de otros felinos u otras especies, retrasar la aparición de la extensión de la infección del virus de la gripe de un felino a uno o varios de otros felinos u otras especies, suprimir la extensión de la infección del virus de la gripe de un felino a uno o varios de otros felinos u otras especies, mejorar la extensión de la infección del virus de la gripe de un felino a uno o varios de otros felinos u otras especies, atenuar la extensión de la infección del virus de la gripe de un felino a uno o varios de otros felinos u otras especies, o erradicar la extensión de la infección del virus de la gripe de un felino a uno o varios de otros felinos u otras especies. Los ejemplos no limitantes de otras especies incluyen humanos, equinos, caninos y aves de corral.

30 Como se usa en el presente documento, gripe felina se refiere a gripe causada por influenza en felinos. La gripe felina como se usa en el presente documento no se refiere a la gripe provocada por el virus del herpes felino o calicivirus felino.

35 Como se usa en el presente documento, un antígeno del virus de la gripe incluye una o más proteínas o péptidos o uno o más ácidos nucleicos de un virus de la gripe H3, N8 (por ejemplo, H3N8). Un antígeno del virus de la gripe también puede incluir viriones completos o parciales del virus de la gripe, o partículas de tipo virus de la gripe de un virus de la gripe H3, N8.

40 Como se usa en el presente documento, un "virus de la gripe H3" o "virus de la gripe de tipo H3" incluye cualquier cepa de la gripe en la que su proteína hemaglutinina se clasifica como que pertenece a H3 (por ejemplo, H3N8). Como se usa en el presente documento, un "virus de la gripe N8" o "virus de la gripe de tipo N8" incluye cualquier cepa de la gripe en la que su proteína neuraminidasa se clasifica como que pertenece a N8 (por ejemplo, H3N8). Un antígeno de un virus de la gripe H3, N8 puede ser cualquier antígeno del virus de la gripe de tipo H3 N8 asociado. Dicho antígeno puede ser las proteínas hemaglutinina o neuraminidasa (o regiones epitópicas de las mismas) u otras proteínas contenidas dentro de la gripe. Los antígenos del virus de la gripe de tipo H3, N8 incluyen todo o parte del virus de la gripe, así como hemaglutinina, neuraminidasa u otras proteínas del virus de la gripe o estructuras biológicas.

50 Los antígenos particulares de la cepa del virus de la gripe A/canino/Florida/43/2004 muestran homología significativa con las secuencias de otros virus de la gripe canina conocidos, virus de la gripe equina, virus de la gripe de tipo H3 y virus de la gripe de tipo N8. La Tabla 1 ilustra las similitudes entre las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes de hemaglutinina (o "HA"), neuraminidasa (o "NA") y nucleoproteína (NP) del virus de la gripe canina identificado como A/canino/Florida/43/2004 con otras cepas aisladas equinas de H3N8 (incluyendo la cepa aislada A/canina/Florida/242/2003). Cualquiera de las cepas descritas en la Tabla 1 son útiles como vacunas felinas según

55 la presente invención.

Tabla 1

Similitudes de secuencias de aminoácidos del gen de hemaglutinina, neuraminidasa y nucleoproteína entre virus de la gripe		
Gen (A/canino/Florida/43/2004)	Similitud de secuencias de aminoácidos	Gen del virus de la gripe usado para comparación
Hemaglutinina (HA)	88	equino/Algiers/72
HA	90	equino/Sao Paulo/6/69
HA	91	equino/Miami/1/63

(continuación)

Similitudes de secuencias de aminoácidos del gen de hemaglutinina, neuraminidasa y nucleoproteína entre virus de la gripe		
Gen (A/canino/Florida/43/2004)	Similitud de secuencias de aminoácidos	Gen del virus de la gripe usado para comparación
HA	93	equino/Newmarket/79
HA	94	equino/Kentucky/1/81
HA	95	Equi-2/Ludhiana/87
HA	96	Equino/Alaska/1/91
HA	97	equino/Tennessee/5/86
HA	98	equino/Kentucky/5/02
HA	99	equino/Ohio/1/2003
HA	99	A/canino/Florida/242/2003
Neuraminidasa (NA)	88	Eq/Algiers/72
NA	90	equino/Sao Paulo/6/69
NA	91	equino/Miami/1/63
NA	93	equino/Newmarket/79
NA	94	equino/Kentucky/1/81
NA	95	Equi-2/Ludhiana/87
NA	96	equino/Santiago/85
NA	97	equino/Tennessee/5/86
NA	98	equino/Kentucky/5/2002
NA	99	equino/Ohio/1/2003
NA	99	A/canino/Florida/242/2003
Nucleoproteína (NP)	94	equi/Miami/1/63
NP	97	equino/Kentucky/1/81
NP	99	equino/Kentucky/5/02
NP	99	equino/Ohio/1/2003
NP	99	A/canino/Florida/242/2003

Otros ejemplos de virus de la gripe H3 (o partes del mismo) que se pueden usar según la invención incluyen, sin limitación, equino-2/Kentucky/93, equino-1/Pennsilvania/63, equino/Wisconsin/03, equino/Kentucky/02, equino/Kentucky/93 y equino/New Market 2/93. Los ejemplos de otros virus de la gripe H3 que se pueden usar según la invención incluyen, sin limitación, los descritos en las patentes de EE.UU. N° 6.177.082, 6.398.774 o 6.436.408. La solicitud de patente de EE.UU. N° 11/409.416, presentadas el 21 de abril de 2006, y la solicitud de patente internacional N° PCT/US2006/015090, presentada el 21 de abril de 2006 (publicada como el documento de patente WO06/116082), también describen virus de la gripe de tipo H3 N8 que son útiles según la presente invención.

Se cree, sin embargo, que otros virus de la gripe de tipo H3, N8 se pueden usar según la presente invención.

Se cree que HA induce una respuesta de anticuerpos, y NA induce una respuesta celular.

Según la presente invención, se puede inmunizar un felino con una o más vacunas del virus de la gripe inactivadas (es decir, muertas) y/o atenuadas vivas o vacunas que comprenden una multiplicidad de antígenos del virus de la gripe de una o más cepas aislada de virus.

Un ejemplo de una vacuna inactivada útil según la presente invención es la vacuna EQUICINE II™, que se ha comercializado por Intervet Inc. (Millsboro, DE, EE.UU.) como una vacuna líquida. La vacuna EQUICINE II™ contiene virus de la gripe inactivado A/Pennsilvania/63 ("A/Pa/63") y virus de la gripe A/equino/Kentucky/93 ("A/KY/93") con carbopol (es decir, adyuvante HAVLOGEN® (Intervet Inc.)).

Otro ejemplo de una vacuna inactivada útil según la presente invención es el virus de la gripe equina A/equino/Ohio/03 ("Ohio 03"). En algunas realizaciones, dicha vacuna contiene el adyuvante CARBIGEN™, que es un adyuvante basado en polímero emulsionado comercialmente disponible de MVP Laboratories, Inc. (Ralston, NE). En dichas vacunas, una unidad de dosificación normalmente comprende al menos aproximadamente 250 unidades de HA del virus, desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 12.500 unidades de HA del virus, o desde aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 6200 unidades de HA del virus. La concentración recomendada del adyuvante CARBIGEN™ es desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 30 % (en masa).

Se pueden preparar vacunas atenuadas vivas mediante medios convencionales. Dichos medios incluyen

generalmente, por ejemplo, modificación de cepas patógenas sometiendo a pases *in vitro*, adaptación al frío, modificación de la patogenicidad del organismo por manipulación genética, preparación de quimeras, inserción de antígenos en vectores virales, selección de cepas naturales no virulentas, y otros métodos bien conocidos por el experto.

5 En algunas realizaciones, la cepa de virus atenuada viva se obtiene por pases seriados del virus no mutante a través de cultivo celular, animales de laboratorio, animales no hospedadores, o huevos. La acumulación de mutación genética durante dicho(s) pase(s) conduce normalmente a pérdida progresiva de la virulencia del organismo al hospedador original.

10 En algunas realizaciones, la cepa de virus atenuada viva se prepara por co-infección de células permisibles con un virus mutante atenuado y virus patógeno. El virus recombinante resultante deseado tiene la seguridad del virus atenuado con genes que codifican antígenos protectores del virus patógeno.

15 En algunas realizaciones, la cepa de virus atenuada viva se prepara por adaptación al frío. Un virus adaptado al frío tiene una ventaja de replicación solo a la temperatura encontrada en las vías respiratorias superiores. Un método de generación de un virus de la gripe equina adaptado al frío se ha descrito en la patente de EE.UU. N° 6.177.082 (incorporada por este documento como referencia en su totalidad). Un virus adaptado al frío resultante deseado confiere uno o más de los siguientes fenotipos: adaptación al frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y o atenuación.

20 En algunas realizaciones, la cepa de virus atenuado vivo se prepara por medios moleculares, tales como mutación puntual, delección, o inserción para convertir un virus patógeno en un virus no patógeno o menos patógeno en comparación con el virus original, mientras que se preservan las propiedades protectoras del virus original.

25 En algunas realizaciones, el virus atenuado vivo se prepara clonando el candidato de genes de antígenos protectores en un genoma de una gripe no patógena o menos patógena, u otro virus u otro organismo.

30 Se pueden preparar vacunas de virus inactivado (es decir, "muerto") inactivando el virus usando métodos convencionales. Normalmente, dichas vacunas incluyen excipientes que pueden potenciar una respuesta inmunitaria, así como otros excipientes que se usan convencionalmente en vacunas. Por ejemplo, en los ejemplos que siguen, la vacuna EQUICINE II™ comprende el adyuvante HAVLOGEN®. La inactivación del virus se puede llevar a cabo tratando el virus con productos químicos de inactivación (por ejemplo, formalina, beta-propiolactona ("BPL"), bromoetilamina ("BEA") y etilenimina binaria ("BEI")), o por métodos no químicos (por ejemplo, calor, congelación/descongelación, o sonicación) para inutilizar o disminuir la capacidad de replicación del virus.

35 En general, la vacuna se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para inducir una respuesta protectora en el paciente felino contra el virus diana. Normalmente, una dosificación es "terapéuticamente eficaz" si previene, reduce el riesgo de, retrasa la aparición de, reduce la extensión de, mejora, suprime o erradica la gripe o uno o más (normalmente dos o más) de sus síntomas. Los síntomas típicos de la gripe incluyen, por ejemplo, fiebre (para gatos, normalmente $\geq 103,0^{\circ}\text{F}$; $\geq 39,4^{\circ}\text{C}$), tos, estornudos, lesiones histopatológicas, descarga ocular, descarga nasal, vómitos, diarrea, depresión, pérdida de peso, atragantamiento, hemoptisis y/o estertores audibles. Otros síntomas frecuentemente más graves pueden incluir, por ejemplo, hemorragia en los pulmones, mediastino o cavidad pleural; traqueítis; bronquitis; bronquiolitis; bronconeumonía de apoyo; y/o infiltración del revestimiento epitelial y luces de las vías respiratorias de los pulmones con neutrófilos y/o macrófagos.

40 La vacuna se puede administrar como parte de una terapia de combinación, es decir, una terapia que incluye, además de la propia vacuna, administrar uno o más agentes activos, adyuvantes, terapias adicionales, etc. En ese caso, se debe reconocer que la cantidad de vacuna que constituye una cantidad "terapéuticamente eficaz" puede ser más o menos esa cantidad de vacuna que constituiría una cantidad "terapéuticamente eficaz" si la vacuna se fuera a administrar sola. Otras terapias pueden incluir las conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, medicaciones antivirales, analgésicos, medicaciones reductoras de la fiebre, expectorantes, medicaciones antiinflamatorias, antihistamínicos, antibióticos para tratar infección bacteriana que resulta de la infección por el virus de la gripe, descanso, y/o administración de fluidos. En algunas realizaciones, la vacuna de la presente invención se administra en combinación con una vacuna contra la rinitis, vacuna contra la calicivirus, vacuna contra la panleucopenia, vacuna de clamidia, vacuna de bordetella, vacuna contra el virus de la inmunodeficiencia, vacuna contra la leucemia felina o vacuna de la rabia.

45 50 55 60 65 En algunas realizaciones, por ejemplo, una dosis típica para una vacuna atenuada viva es o está por encima de aproximadamente 10^3 ufp/felino, y más normalmente desde aproximadamente 10^3 hasta aproximadamente 10^9 ufp/felino. En esta patente, "ufp" significa "unidades formadoras de placa". En algunas realizaciones, una dosis típica para una vacuna atenuada viva es o está por encima de aproximadamente 10^3 TCID₅₀/felino, y más normalmente desde aproximadamente 10^3 hasta aproximadamente 10^9 TCID₅₀/felino. En algunas realizaciones, una dosis típica para una vacuna atenuada viva es o por encima de aproximadamente 10^3 EID₅₀/felino, y más normalmente desde aproximadamente 10^3 hasta aproximadamente 10^9 EID₅₀/felino. En algunas realizaciones, una

dosis típica para una vacuna muerta es o está por encima de aproximadamente 40 unidades de HA, normalmente desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 10.000 unidades de HA, y más normalmente desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 6200 unidades de HA. En algunas realizaciones, la dosis es desde aproximadamente 6100 hasta aproximadamente 6200 unidades de HA.

5 En algunas realizaciones preferidas, la vacuna comprende una vacuna atenuada viva a una concentración que es al menos aproximadamente $10^{0.5}$ ufp/felino superior al nivel de inmunogenicidad. En algunas realizaciones preferidas, la vacuna comprende una vacuna atenuada viva a una concentración que es al menos aproximadamente $10^{0.5}$ TCID₅₀/felino superior al nivel de inmunogenicidad. En algunas realizaciones preferidas, la vacuna comprende
10 una vacuna atenuada viva a una concentración que es al menos aproximadamente $10^{0.5}$ EID₅₀/felino superior al nivel de inmunogenicidad.

15 El nivel de inmunogenicidad se puede determinar experimentalmente por técnicas de estudio de valoración de dosis de exposición generalmente conocidas en la técnica. Dichas técnicas normalmente incluyen vacunar varios felinos con la vacuna a diferentes dosis, y luego exponer los felinos al virus virulento para determinar la dosis protectora mínima.

20 Los factores que afectan la pauta posológica preferida pueden incluir, por ejemplo, el tipo (por ejemplo, especie y raza), edad, peso, sexo, dieta, actividad, tamaño del pulmón y afecciones del sujeto; la vía de administración; la eficacia, seguridad y duración de los perfiles de inmunidad de la vacuna particular usada; si se usa un sistema de administración; y si la vacuna se administra como parte de una combinación de fármaco y/o vacuna. Así, la dosificación en realidad empleada puede variar para animales específicos y, por tanto, se puede desviar de las dosificaciones típicas expuestas anteriormente. La determinación de dichos ajustes de dosificación está
25 generalmente dentro de la experiencia de los expertos en la materia usando medios convencionales. Se debe observar además que los virus atenuados vivos generalmente son auto-propagadores; así, la cantidad específica de dicho virus administrado no es necesariamente crítica.

30 Se contempla que la vacuna se puede administrar al paciente felino una sola vez; o, alternativamente, dos o más veces durante días, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, la vacuna se administra al menos dos veces. En algunas de dichas realizaciones, por ejemplo, la vacuna se administra dos veces, administrándose la segunda dosis (por ejemplo, el refuerzo) al menos aproximadamente 2 semanas después de la primera. En algunas realizaciones, la vacuna se administra dos veces, administrándose la segunda dosis no más de 8 semanas después de la primera. En algunas realizaciones, la segunda dosis se administra desde aproximadamente 2 semanas hasta
35 aproximadamente 4 años después de la primera dosis, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 semanas después de la primera dosis, o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4 semanas después de la primera dosis. En algunas realizaciones, la segunda dosis se administra aproximadamente 4 semanas después de la primera dosis. En las realizaciones anteriores, la primera y posteriores dosificaciones pueden variar, tal como, por ejemplo, en cantidad y/o forma. Frecuentemente, sin embargo, las dosificaciones son las mismas que la cantidad y forma. Cuando solo se administra una dosis única, la cantidad de vacuna en esa dosis sola comprende
40 generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna. Cuando, sin embargo, se administra más de una dosis, las cantidades de vacuna en las dosis juntas pueden constituir una cantidad terapéuticamente eficaz.

45 En algunas realizaciones, la vacuna se administra antes de que el receptor felino se infecte con la gripe. En dichas realizaciones, la vacuna se puede administrar, por ejemplo, para prevenir, reducir el riesgo de, o retardar la aparición de la gripe o uno o más (normalmente dos o más) síntomas de la gripe.

50 En algunas realizaciones, la vacuna se administra después de que el receptor felino se infecte con la gripe. En dichas realizaciones, la vacuna puede, por ejemplo, mejorar, suprimir o erradicar la gripe o uno o más (normalmente dos o más) síntomas de la gripe.

55 La composición preferida de la vacuna depende de, por ejemplo, si la vacuna es una vacuna inactivada, vacuna atenuada viva, o ambas. También depende del método de administración de la vacuna. Se contempla que la vacuna comprenderá uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales, adyuvantes, otros potenciadores de la respuesta inmunitaria, y/o vehículos (conjuntamente denominados "excipientes"). Dichos excipientes generalmente se seleccionan para ser compatibles con el (los) principio(s) activo(s) en la vacuna. El uso de excipientes generalmente es conocido por los expertos en la técnica.

60 El término "farmacéuticamente aceptable" se usa adjetivamente para significar que el nombre modificado es apropiado para su uso en un producto farmacéutico. Cuando se usa, por ejemplo, para describir un excipiente en una vacuna farmacéutica, caracteriza el excipiente como que es compatible con los otros componentes de la composición y no desventajosamente perjudicial para el canino receptor previsto.

65 Las vacunas se pueden administrar mediante medios convencionales, que incluyen, por ejemplo, administración a la mucosa (tal como intranasal, oral, intratraqueal y ocular) y administración parenteral (tal como, sin limitación, administración subcutánea o intramuscular). Las vacunas también se pueden administrar por vía intradérmica o por vía transdérmica (incluyendo, sin limitación, mediante un parche dérmico o administración tópica). La administración

a la mucosa es frecuentemente particularmente ventajosa para vacunas atenuadas vivas. La administración parenteral es frecuentemente particularmente ventajosa para vacunas inactivadas.

5 Las vacunas mucosas pueden ser, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, tales como emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados para dichas vacunas incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua, solución salina, dextrosa, glicerol, lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ésteres alquílicos de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfóricos y sulfúricos, gelatina, goma arábiga, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y/o poli(alcohol vinílico). Los
10 excipientes también pueden comprender diversos humectantes, emulsionantes, agentes de suspensión, aromatizantes (por ejemplo, edulcorantes) y/o perfumantes.

Las vacunas mucosas orales también pueden ser, por ejemplo, formadas en comprimidos o encapsuladas para la conveniente administración. Dichas cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas también pueden comprender
15 agentes de tamponamiento, tales como citrato de sodio, o carbonato o bicarbonato de magnesio o cálcico. Los comprimidos y píldoras se pueden preparar además con recubrimientos entéricos.

Se contempla que la vacuna se puede administrar mediante el agua de beber y/o comida del paciente felino. Se
20 contempla además que la vacuna se puede administrar en forma de un premio o juguete.

La "administración parenteral" incluye inyecciones subcutáneas, inyecciones submucosas, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intraesternales, e infusión. Las preparaciones inyectables (por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles) se pueden formular según la técnica conocida usando
25 excipientes adecuados, tales como vehículos, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Estos normalmente incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, alcohol bencílico, alcohol bencílico, 1,3-butanodiol, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro sódico, aceites no volátiles suaves (por ejemplo, mono- o diglicéridos sintéticos), ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico),
30 dimetilacetamida, tensioactivos (por ejemplo, iónicos y no iónicos), propilenglicol y/o polietilenglicoles. Los excipientes también pueden incluir pequeñas cantidades de otras sustancias auxiliares, tales como agentes de tamponamiento del pH.

La vacuna puede incluir uno o más excipientes que potencian una respuesta inmunitaria del paciente felino (que
35 puede incluir una respuesta de anticuerpos, respuesta celular, o ambas), aumentando así la eficacia de la vacuna. El uso de dichos excipientes (o "adyuvantes") puede ser particularmente beneficioso cuando se usa una vacuna inactivada. El (Los) adyuvante(s) puede(n) ser una sustancia que tiene un efecto directo (por ejemplo, citocina o Bacillé Calmette-Guerin ("BCG")) o indirecto (liposomas) sobre células del sistema inmunitario del paciente felino. Los ejemplos de adyuvantes frecuentemente adecuados incluyen aceites (por ejemplo, aceites minerales), sales metálicas (por ejemplo, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio), componentes bacterianos (por ejemplo, liposacáridos bacterianos, adyuvantes de Freund y/o MDP), componentes de planta (por ejemplo, Quil A), y/o una o
40 más sustancias que tienen un efecto de vehículo (por ejemplo, bentonita, partículas de látex, liposomas y/o Quil A, ISCOM). Como se observa anteriormente, los adyuvantes también incluyen, por ejemplo, adyuvante CARBIGEN™ y carbopol. Se debe reconocer que la presente invención engloba tanto vacunas que comprenden un adyuvante(s),
45 como vacunas que no comprenden ningún adyuvante.

Se contempla que la vacuna se puede liofilizar (o reducir de otro modo en volumen de líquido) para el almacenamiento, y luego se reconstituye en un líquido antes o en el momento de la administración. Dicha
50 reconstitución se puede lograr usando, por ejemplo, agua de calidad para vacuna.

La presente invención comprende además kits que son adecuados para su uso en realizar los métodos descritos anteriormente. El kit comprende una forma farmacéutica que comprende una vacuna descrita anteriormente. El kit también comprende al menos un componente adicional, y, normalmente, instrucciones para usar la vacuna con el
55 (los) componente(s) adicional(es). El (Los) componente(s) adicional(es) puede(n) ser, por ejemplo, uno o más componentes adicionales (tales como, por ejemplo, uno o más de los excipientes tratados anteriormente, comida y/o un premio) que se pueden mezclar con la vacuna antes o durante la administración. El (Los) componente(s) adicional(es) puede(n) comprender alternativamente (o adicionalmente) uno o más aparatos para administrar la vacuna al paciente felino. Dicho aparato puede ser, por ejemplo, una jeringa, inhalador, nebulizador, pipeta, fórceps, o cualquier vehículo de administración médicamente aceptable. En algunas realizaciones, el aparato es adecuado
60 para administración subcutánea de la vacuna. En algunas realizaciones, el aparato es adecuado para administración intranasal de la vacuna.

También se pueden usar otros excipientes y modos de administración conocidos en las ciencias farmacéuticas o biológicas.
65

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son simplemente ilustrativos, y no limitantes en ningún modo para el resto de la presente divulgación.

5 En los ejemplos que siguen, se usó A/canino/Florida/242/2003 como virus de exposición. Se sabe que tiene aproximadamente 99 % de homología con cepas aisladas A/canino/Florida/43/2004 (véase la Tabla 1), y se ha mostrado que induce síntomas de infección y seroconversión en gatos. El Ejemplo 2 ilustra la eficacia de una vacuna contra la gripe canina en gatos, que muestra la inhibición de los títulos de hemaglutinación (o "HI" o "HAI") en gatos
10 vacunados con antígeno A/canino/Florida/43/2004 inactivado en una composición de vacuna que comprende adyuvante CARBIGEN™. La Tabla 7 muestra títulos pre-vacunación, post-vacunación y post-segunda vacunación, así como post-exposición. Los resultados indican títulos de HI en cada etapa post-vacunación para los gatos vacunados, con poco o ningún aumento para los controles. La Tabla 8 ilustra los resultados del aislamiento de virus del mismo estudio. Aunque los animales expuestos no mostraron signos clínicos, eliminación de virus o histopatología positiva, los títulos positivos de HI (Tabla 7) indican títulos de anticuerpos significativos en animales
15 inmunizados.

Se debe observar que otras vacunas de antígeno del virus de la gripe canino, vacunas de antígeno del virus de la gripe equino, vacunas de antígeno del virus de la gripe H3 o N8 también están englobadas por la presente invención. Los ejemplos no limitantes de otros antígenos del virus de la gripe útiles según la presente invención se obtienen de las cepas de virus mostradas en la Tabla 1. Los descritos en esta memoria descriptiva y los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas, y no para limitar el alcance de la invención reivindicada.

25 **Ejemplo 1. Desarrollo de modelo de exposición a gripe felina.**

Este ejemplo ilustra que los felinos son susceptibles al virus de la gripe H3N8, y establece un modelo de exposición útil para medir la eficacia de una vacuna contra la gripe felina.

30 Procedimiento: Se asignaron aleatoriamente a 4 grupos catorce gatos de 13 semanas de edad comprados de un proveedor comercial (Tabla 2). Se expusieron gatos de 14 semanas de edad en el Grupo 1 y 2 a un virus de la gripe canina (A/Canina/Florida/242/2003) cultivado en huevo de pollo embrionado. Cada gato recibió un total de aproximadamente $10^{7.0}$ TCID₅₀ de virus en un volumen de 2 ml. Para la exposición simulada, los gatos se expusieron a 2 ml de líquido alantoideo sin virus.

35 Para la exposición intratraqueal, se administraron primero 2 ml del virus de exposición (Grupo 1) o líquido alantoideo sin virus (Grupo 3) a la tráquea, seguido por 2 ml de PBS usando un tubo de administración, que consistió en un tubo traqueal con manguito (tamaño 2,5, Rusch, Teleflex Medical, EE.UU.) y tubo de alimentación (tamaño 5Fr, 1,7 mm, / 16 pulgadas de longitud, Kendall, EE.UU.).

40 Para la exposición buconasal, se administraron 2 ml de virus de exposición (Grupo 2) o 2 ml de líquido alantoideo sin virus (Grupo 4) como una niebla usando un nebulizador. Se observaron los gatos para signos clínicos relacionados con la gripe durante 16 días post-exposición. Todos los gatos se alimentaron con una dieta de crecimiento estándar y el agua estuvo disponible a voluntad.

45 **Tabla 2. Diseño experimental**

Grupo	Tratamiento	Número de gatos	Exposición material	Vía de exposición
1	Exposición	5	Virus de exposición	Intratraqueal
2	Exposición	5	Virus de exposición	Buconasal
3	Exposición simulada	2	Líquido alantoideo sin virus	Intratraqueal
4	Exposición simulada	2	Líquido alantoideo sin virus	Buconasal

50 Para el aislamiento de virus, se recogieron diariamente hisopos nasales y bucofaríngeos en tubos que contenían 2 ml de medio de transporte de virus desde el día -2 (es decir, dos días antes de la exposición) hasta el día 14 post-exposición. Se recogieron muestras de sangre en el día 0 (antes de la exposición), y los días 7 y 14 post-exposición para la determinación del título de anticuerpos del virus de la gripe canina usando un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) como se describe en SAM 124 (USDA, Ames, IA) con modificación mínima (virus de la gripe canina en lugar de virus de la gripe equina) y por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Se registraron diariamente los signos clínicos post-exposición. Se observaron los gatos para signos clínicos desde los días 1-14. Al
55 terminar el estudio, se sacrificaron todos los gatos y se recogieron muestras de tejido para la evaluación histopatológica.

Resultados: Excepto algunos casos esporádicos de elevadas temperaturas corporales ($\geq 39,4$ °C (103 °F)), no se observaron signos relacionados con la gripe tras la exposición al virus por cualquier método de exposición. Tras la exposición, 1 de los 5 gatos expuestos por vía intratraqueal y 0 de los 5 gatos expuestos por vía buconasal tuvieron un título de HI medible, como se muestra en la Tabla 3. Mientras que por el método de ELISA, 4 de los 5 gatos del
60

grupo de exposición intratraqueal (Grupo 1) y 5 de los 5 gatos del grupo de exposición buconasal (Grupo 2) tuvieron un título superior al grupo de exposición simulado (< 400), como se muestra en la Tabla 3.

5 Se muestran los resultados del aislamiento de virus en las Tablas 4 y 5. Tras una exposición al virus de la gripe canina virulenta, se aisló el virus de la gripe canina de 1 de los 5 (20 %) gatos del Grupo 1 (intratraqueal), y 5 de los 5 (100%) gatos del Grupo 2 (bucanasal). No se aisló virus de los gatos ni en el Grupo 3 ni en el Grupo 4. Hubo una diferencia significativa (P = 0,048) en el porcentaje de gatos se eliminaron el virus (aislamiento de virus) entre la vía de exposición intratraqueal y buconasal (20 % frente a 100 %).

10 Conclusión: Los resultados de este estudio demuestran que: 1) tras la exposición de los gatos a un virus de la gripe H3N8, los gatos desarrollaron anticuerpo anti-virus de la gripe H3N8 que era medible por un ensayo de ELISA altamente sensible, 2) los gatos fueron susceptibles a infección por el virus de la gripe H3N8 y eliminaron el virus de exposición en secreciones nasales/orales 1 a 4 días tras la exposición, y 3) la vía de exposición (bucanasal frente a intratraqueal) tiene una influencia significativa (P= 0,048) en la eliminación de virus.

15

Tabla 3. Serología - Título de anticuerpos

ID de gato	Grupo	Tratamiento	Título de HI			Título de ELISA		
			Pre-expos.	1 semana post-expos.	2 semanas post-expos.	Pre-expos.	1 semana post-expos.	2 semanas post-expos.
AUF2	1	intratraqueal	<10	<10	<10	<400	<400	<800
AUF3	1	intratraqueal	<10	<10	<10	<400	<400	25600
AUG1	1	intratraqueal	<10	<10	<10	<400	<400	3200
AUG3	1	intratraqueal	<10	<10	<10	<400	<400	51200
QVO3	1	intratraqueal	<10	<10	40	<400	<400	25600
AUG2	2	Bucanasal	<10	<10	<10	<400	<400	25600
QVN1	2	Bucanasal	<10	<10	<10	<400	<400	12800
QVN2	2	Bucanasal	<10	<10	<10	<400	<400	6400
QVP2	2	Bucanasal	<10	<10	<10	<400	<400	12800
QVP4	2	Bucanasal	<10	<10	<10	<400	<400	6400
AUG4	3	Exposición simulada	<10	<10	<10	<400	<400	<400
QVN3	3	Exposición simulada	<10	<10	<10	<400	<400	<400
QVN4	4	Exposición simulada	<10	<10	<10	<400	<400	<400
QVN5	4	Exposición simulada	<10	<10	<10	<400	<400	<400

Tabla 4. Eliminación de virus

Grupo Nº	ID de gato	Tratamiento	Días post-exposición															
			-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	AUF2	intratraqueal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	AUF3	intratraqueal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	AUG1	intratraqueal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	AUG3	intratraqueal	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	QVO3	intratraqueal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	AUG2	Bucanasal	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	QVN1	Bucanasal	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
2	QVN2	Bucanasal	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
2	QVP2	Bucanasal	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
2	QVP4	Bucanasal	N	N	N	N	P	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N
3	AUG4	Exposición simulada	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	QVN3	Exposición simulada	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	QVN4	Exposición simulada	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	QVN5	Exposición simulada	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N – Ningún virus aislado de hisopos bucales o nasales
P – Virus aislado de hisopos nasales o bucales o nasales y bucales

Tabla 5 – Resumen de eliminación de virus

Grupo	Vía de exposición	Material de exposición	Porcentaje de eliminación de virus	Valor de p
1	Intratraqueal	Virus de exposición	20 % (1/5 gatos)	0,048 (Grupo 1 frente a 2)
2	Buconasal	Virus de exposición	100 % (5/5 gatos)	
3	Exposición simulada	Líquido alantoideo sin virus	0 % (0/2)	---
4	Exposición simulada	Líquido alantoideo sin virus	0 % (0/2)	---

Ejemplo 2. Eficacia de vacuna de virus H3N8 en felinos

5 En el siguiente estudio, se determinó la eficacia de una vacuna de virus H3N8 en gatos.

Procedimiento: Se asignaron aleatoriamente a 2 grupos veinte gatos de 7 semanas de edad comprados de un proveedor comercial (Tabla 6). Se vacunaron 10 gatos de 8 y 12 semanas de edad (Grupo 1) con una vacuna de virus de la gripe canina (A/canina/Florida/43/2004) inactivada adyuvantada con adyuvante CARBIGEN™ mediante vía subcutánea. Para la preparación de vacunas, se inactivó el virus A/canina/Florida/43/2004 por etilenimina binaria ("BEI") usando un método convencional. Cada dosis de la vacuna contuvo 5 % en masa de adyuvante CARBIGEN™, aproximadamente 1280 unidades de HA del virus inactivado, PBS suficiente para llevar el volumen total de la dosis hasta 1 ml y NaOH suficiente para ajustar el pH hasta entre 7,2 y 7,4. Se vacunaron con referencia diez gatos del Grupo 2 con 1 ml de PBS por vía subcutánea. Se recogieron muestras de suero de todos los gatos el día de la primera y segunda vacunación, los días 7 y 14 después de la primera y segunda vacunaciones para determinar los títulos de HI usando un protocolo estándar de virus de la gripe equina H3N8 (Supplemental Assay Method (SAM) 124, CVB, USDA, Ames, IA). Todos los gatos se alimentaron con una dieta de crecimiento estándar y el agua estuvo disponible a voluntad.

Tabla 6. Diseño experimental

Grupo	Tratamiento	Vía de vacunación	Número de gatos	Edad en la vacunación (semanas)	Exposición
1	Vacunar	SC	10	8 y 12	Sí
2	Control	N/A	10	N/A	Sí

Todos los gatos de control vacunados y de la misma edad se expusieron por vía buconasal a un virus de la gripe canina virulento ($10^{7.2}$ TCID₅₀ de A/Canina/Florida/242/2003 por gato) 2 semanas después de la segunda vacunación. El virus de exposición se administró como una niebla (2 ml/gato) usando un nebulizador. Los gatos se observaron para signos clínicos relacionados con la gripe durante 14 días post-exposición. Se recogieron diariamente hisopos nasales y bucofaríngeos en tubos que contenían 2 ml de medio de transporte de virus para el aislamiento de virus desde el día -2 (es decir, dos días antes de la exposición) hasta el día 14 post-exposición. Se recogieron muestras de sangre en los días 7 y 14 post-exposición para la determinación del título de HI. Se observaron los gatos para signos clínicos de gripe desde los días 1-14. Al fin del estudio, se sacrificaron todos los gatos y se recogieron muestras de tejido para evaluación histopatológica.

Resultados: Se presentan los resultados del título de HI en suero en la Tabla 7. Todos los gatos vacunados (Grupo 1) desarrollaron título de anticuerpos HI para la vacuna inactivada del virus de la gripe canina (H3N8) y todos los controles siguieron siendo negativos para anticuerpo HI (< 10) antes de la exposición. Tras la exposición, se observaron algunos casos esporádicos de elevadas temperaturas corporales ($\geq 39,4$ °C (103 °F)) tanto en gatos vacunados como de control. No se observaron otros signos relacionados con la gripe tras la exposición al virus.

Durante el periodo de observación post-exposición, 0 de los 10 gatos del Grupo 1 (vacunados) y 8 de los 10 gatos del Grupo 2 (controles) eliminaron el virus en secreción nasal o secreción bucal o ambas durante 1 a 3 días durante los primeros 7 días post-exposición (Tabla 8). La vacunación de gatos con la vacuna del virus de la gripe canina previno la eliminación de virus H3N8 en 100 % de los gatos (Tabla 9).

Conclusión: Los resultados de este estudio demuestran que: 1) todos los gatos vacunados desarrollaron anticuerpo HI tras la vacunación con la vacuna del virus de la gripe canina de tipo H3N8, 2) tras la exposición se observó un aumento doble mínimo en el título de anticuerpos HI en todos los gatos y 3) la vacunación de gatos con la vacuna del virus de la gripe canina (H3N8) previno la eliminación del virus de exposición de la gripe canina en 100 % de los gatos.

Tabla 7. Serología – Título de anticuerpos HI

Grupo N°	ID de gato	Tratamiento	Vía de vacunación	Título de HI							
				Días post-vacunación						Días post-exposición	
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	JCY2	Vacunar	SC	< 10	< 10	10	20	80	160	320	≥ 640
1	JCX1	Vacunar	SC	< 10	< 10	10	20	40	40	80	80
1	JCZ2	Vacunar	SC	< 10	< 10	<10	20	40	80	160	320

50

(continuación)

Grupo N°	ID de gato	Tratamiento	Vía de vacunación	Título de HI							
				Días post-vacunación						Días post-exposición	
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	JCZ3	Vacunar	SC	< 10	10	10	40	80	160	320	≥ 640
1	JCZ4	Vacunar	SC	< 10	< 10	20	160	320	320	≥ 640	≥ 640
1	JCZ5	Vacunar	SC	< 10	< 10	10	40	80	80	160	320
1	JCZ6	Vacunar	SC	< 10	< 10	10	80	160	320	≥ 640	≥ 640
1	JCZ7	Vacunar	SC	< 10	< 10	10	40	160	160	320	≥ 640
1	JDA2	Vacunar	SC	< 10	< 10	10	40	80	80	160	320
1	JDA3	Vacunar	SC	< 10	< 10	10	20	80	160	160	320
2	JDA4	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	<10	< 10	< 10	40
2	JDA5	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20
2	JCX2	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20
2	JCX3	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40
2	JCY1	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40
2	JCY3	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20
2	JCY4	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40
2	JCY5	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40
2	JCY6	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	<10	< 10	< 10	40
2	JCZ1	Control	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40

* Primera vacunación; ** Segunda vacunación; *** Día de exposición

Tabla 8. Eliminación de virus

Grupo N°	ID de gato	Tratamiento	Días post-exposición																
			-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	JCY2	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JCX1	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JCZ2	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JCZ3	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JCZ4	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JCZ5	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JCZ6	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JCZ7	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JDA2	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	JDA3	Vacunar	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JDA4	Control	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JDA5	Control	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JCX2	Control	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JCX3	Control	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JCY1	Control	N	N	N	N	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JCY3	Control	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JCY4	Control	N	N	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JCY5	Control	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JCY6	Control	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	JCZ1	Control	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N

N – Ningún virus aislado de hisopos bucales o nasales

P – Virus aislado de hisopos nasales o bucales o nasales y bucales

5

Tabla 9 – Resumen de eliminación de virus

Grupo	Tratamiento	Porcentaje de eliminación de virus	Valor de p
1	Vacunar	0 % (0/10 gatos)	0,0007
2	Control	80 % (8/10 gatos)	

Las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" en esta patente (incluyendo las reivindicaciones) se deben interpretar inclusivamente en vez de exclusivamente. Esta interpretación pretende ser la misma que la interpretación que estas palabras dan bajo la ley de patentes de Estados Unidos.

10

La descripción detallada anterior de realizaciones preferidas está previsto únicamente para presentar a otros expertos en la técnica la invención, sus principios y su aplicación práctica de manera que otros expertos en la técnica puedan adaptar y aplicar la invención en sus numerosas formas, ya que pueden ser más adecuadas para los requisitos de un uso particular. La presente invención, por tanto, no se limita a las realizaciones anteriores, y puede ser modificada de diversas formas.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de partículas del virus de la gripe H3N8 completamente inactivadas y/o partículas de tipo virus de la gripe H3N8 y/o partículas del virus de la gripe H3N8 defectuosas, un adyuvante y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso para proteger a un felino de la propagación del virus de la gripe H3N8 provocada por una infección de la gripe H3N8, comprendiendo dicho uso la etapa de administrar dicha vacuna a un felino
- 10 2. Vacuna para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada por que** la vacuna comprende partículas del virus de la gripe H3N8 completamente inactivadas y/o partículas de tipo virus de la gripe H3N8 y/o partículas del virus de la gripe H3N8 defectuosas de más de una cepa aislada.
- 15 3. Vacuna para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** dicha vacuna se administra por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía transdérmica, por vía ocular, por vía mucosa o por vía oral.
- 20 4. Vacuna para su uso según la reivindicación 3, **caracterizada por que** dicha vacuna se administra por vía intranasal.
- 25 5. Vacuna para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizada por que** dicha vacuna se administra una o más veces.
6. Vacuna para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizada por que** dicha vacuna comprende al menos un antígeno de un patógeno felino seleccionado del grupo que consiste en virus de la rinotraqueítis, calicivirus, virus de la panleucopenia, *Chlamidia*, *Bordetella*, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la leucemia felina y virus de la rabia.