

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 555**

51 Int. Cl.:

A61K 39/125 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2012 E 14164842 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2772266**

54 Título: **Vacuna contra la rinitis equina**

30 Prioridad:

14.03.2011 US 201161452390 P

21.07.2011 US 201161510226 P

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

17.03.2020

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA
INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**HAYES, PHILLIP WAYNE;
HENNESSY, KRISTINA J.;
VIEL, LAURENT y
DIAZ-MENDEZ, ANDRÉS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 748 555 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 rinitis equina

5 Antecedentes de la invención

Las infecciones respiratorias víricas equinas se asocian habitualmente con el movimiento de los caballos y anualmente se registran brotes respiratorios en todo el mundo. La gripe equina 2 (AE2-H3N8), herpesvirus equino 1 y 4 (EHV1/4) y los virus de la rinitis equina A y B (ERAV y ERBV, respectivamente) se encuentran entre los virus más importantes aislados de las vías respiratorias altas durante brotes respiratorios.

En particular, se ha detectado ERAV en la enfermedad respiratoria febril aguda en caballos (Li *et al.*, J. Clin. Microbiol. 35:937-943; 1997). De manera similar, Un estudio reciente en Ontario descubrió que ERBV y ERAV son muy prevalentes en la población de caballos (Díaz-Méndez *et al.*, The Canadian Journal of Veterinary Research 74:271-278; 2010). Los signos clínicos de infección por ERAV son inespecíficos y difíciles de diferenciar de otras infecciones víricas respiratorias, incluyendo infecciones de virus del herpes y gripe equina. Se han identificado cepas no citopáticas de este virus en brotes respiratorios equinos (Li *et al.*, J. Clin. Microbiol. 35:937-943; 1997) lo que dificulta su diagnóstico. Por otro lado, ERAV y ERBV, que son virus de ARN monocatenarios, tienen potencial de mutación, haciendo que la capacidad del sistema inmunitario para proteger a un animal contra la enfermedad provocada por una cepa de ERAV/ERBV dada no esté clara.

Además, Campbell *et al* 1982 (Vet Microbiol.; 7(6): 535-44) describen la inactivación del herpesvirus equino de tipo 1 (EHV1) y el rinovirus equino de tipo 1 (ERhV1). Asimismo, Kriegshauser *et al* 2005 (Vet Microbiol.; 106 (3-4): 293-6) describen anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rinitis equina A y B en caballos.

Existe la necesidad de métodos y medicamentos para prevenir enfermedades respiratorias o para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con dichas enfermedades, incluyendo los asociados con los virus de la rinitis equina A y B.

30 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona:

- 35 (1) Una composición inmunógena que comprende una cepa inactivada del virus de la rinitis equina B (ERBV) que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829.
- (2) La composición inmunógena de (1), dicha composición inmunógena comprende además una o más cepas del Virus de la Rinitis Equina A (ERAV) inactivado.
- (3) La composición inmunógena de (1) o (2) en la que la cepa, antes de la inactivación, provoca enfermedad respiratoria detectable en el 100 % de los caballos seronegativos tras la exposición a la cepa.
- 40 (4) La composición inmunógena de (1) a (3), en donde dicha composición inmunógena comprende además al menos un antígeno o una cepa inactivada o viva, atenuada del virus del herpes equino y/o una cepa inactivada o viva, atenuada del virus de la gripe equina.
- 45 (5) La composición inmunógena de (1) a (4), en donde dicha composición inmunógena comprende además al menos un antígeno de una o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en el virus del Nilo Occidental, virus de la encefalomiélitis equina oriental, virus de la encefalomiélitis equina occidental, virus de la encefalomiélitis equina venezolana y toxoide tetánico, y combinaciones de los mismos.
- (6) La composición inmunógena de (1) a (5) para su uso en un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de síntomas clínicos asociados con o provocados por ERBV en un animal o una manada de animales que comprende la etapa de administrar dicha composición inmunógena a un animal que lo necesite.
- 50 (7) La composición inmunógena de (6), en donde la incidencia de síntomas clínicos provocados por uno o más de dichos patógenos en una manada de animales está reducida en comparación con una manada que no recibe dicha composición inmunógena.
- (8) La composición inmunógena para el uso de (6), en donde la administración de al menos una dosis de dicha composición inmunógena proporciona una duración de inmunidad de al menos 12 meses contra uno o más de dichos patógenos.
- 55 (9) La composición inmunógena para el uso de (6) a (8), en donde dicha composición inmunógena es segura para su uso en potros o caballos de 4 meses de edad o más.

Se desvelan composiciones inmunógenas que comprenden una o más cepas de ERAV inactivado o vivo, atenuado, que cuando están vivas y activas y sin atenuar son virulentas (es decir, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso 100 % de caballos seronegativos, cuando se exponen a propósito al virus, presentan enfermedad respiratoria observable, en particular secreción nasal y/u ocular), que pueden cultivarse a títulos altos en cultivo para producir una vacuna que pueda inducir títulos altos de anticuerpos en suero contra ERAV cuando se administran, por ejemplo, a un equino, por ejemplo, dando como resultado un título de suero de al menos 1:112 y, preferentemente, al menos 1:200, 1:500, 1:750 o 1:1000. Además, las cepas crecen bien en cultivo y son muy eficaces para producir, por ejemplo, a un título de al menos 10⁶ DICT₅₀/ml, más preferentemente al menos 10⁷ DICT₅₀/ml, 10⁸ DICT₅₀/ml o incluso 10⁹

- DICT₅₀/ml. De manera similar, también se descubrió que composiciones que comprendían una o más cepas de ERBV inactivado, que cuando están vivas y activas y no atenuadas también son virulentas (como se ha definido anteriormente para ERAV), crecían bien en cultivo, a un título de al menos 10⁶ DICT₅₀/ml, más preferentemente 10⁷ DICT₅₀/ml, 10⁸ DICT₅₀/ml o incluso 10⁹ DICT₅₀/ml, que eran muy eficaces para producir e inducir altos títulos de anticuerpos en suero
- 5 en animales después de inmunización, por ejemplo, dando como resultado un título de suero de al menos 1:120 y preferentemente al menos 1:200, 1:500, 1:750 o 1:1000. Las composiciones tanto de ERAV como de ERBV, y combinaciones de las mismas, son capaces de reducir la duración, gravedad e incidencia de la enfermedad en un animal tal como un caballo que ha sido inmunizado con las composiciones e infectado posteriormente.
- 10 En consecuencia, la presente divulgación proporciona una composición inmunógena que comprende una o más cepas de ERAV o ERBV inactivado o vivo, atenuado, en donde la cepa de ERAV o la cepa de ERBV, antes de la inactivación o atenuación, provoca enfermedad respiratoria detectable en al menos el 50 % de los caballos seronegativos expuestos a la cepa o crece en cultivo celular hasta 10⁶ DICT₅₀/ml o superior o, cuando se usa como vacuna en equinos a una dosis de 10⁶ DICT₅₀ o superior, da como resultado un título de suero de al menos 1:112.
- 15 En determinados aspectos de la divulgación, la cepa, cuando está viva y sin atenuar, provoca enfermedad respiratoria detectable (por ejemplo, secreción ocular y/o nasal detectable) en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso 100 % de los caballos seronegativos tras la exposición a la cepa.
- 20 La cepa se puede dejar crecer en cultivo celular hasta un título de al menos 10⁶ DICT₅₀/ml, más preferentemente 10⁷ DICT₅₀/ml, 10⁸ DICT₅₀/ml o incluso 10⁹ DICT₅₀/ml. La administración de una composición inmunógena que contiene la cepa da como resultado un título en suero de al menos 1:120 y preferentemente al menos 1:200, 1:500, 1:750 o 1:1000.
- 25 En las composiciones inmunógenas de la divulgación, la o las cepas de ERAV o ERBV preferentemente incluyen ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828) y/o cepa de ERBV 07-103042 (referencia de ATCC PTA-11829). Además, las composiciones inmunógenas de la divulgación contienen al menos una cepa de ERAV que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una identidad superior al 95 % con la SEQ ID NO: 2 o codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos con una identidad superior al 95 % con la SEQ ID NO: 3, en donde
- 30 dicha cepa de ERAV, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras. La composición inmunógena de la divulgación también puede incluir una cepa de ERAV que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 2 o codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.
- 35 Las composiciones inmunógenas de la divulgación también pueden incluir una cepa de ERBV que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una identidad superior al 95 % con el transcrito inverso de la secuencia genómica de la cepa ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 o codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos con una identidad superior al 95 % con la poliproteína codificada por el genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829, en donde dicha cepa de ERBV, cuando no
- 40 está inactivada, está activa para infectar y replicar en células hospedadoras. La cepa de ERBV también puede comprender una secuencia genómica que es la secuencia genómica de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 o codifica una poliproteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la poliproteína codificada por el genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829.
- 45 En un aspecto específico, la composición inmunógena de la divulgación comprende el virus de la rinitis equina A (ERAV) y el virus de la rinitis equina B (ERBV), en donde la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 y la cepa de ERBV tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829.
- Además, la divulgación incluye además composiciones inmunógenas multivalentes que comprenden virus o antígenos atenuados vivos o inactivados de virus distintos de ERAV o ERBV que provocan enfermedades en équidos. En particular, la divulgación proporciona composiciones inmunógenas que comprenden, además de ERAV y/o ERBV inactivado o vivo, atenuado, al menos un antígeno o una cepa inactivada o viva, atenuada, del virus del herpes equino (EHV) y, en aspectos particulares, el EHV se selecciona del grupo que consiste en EHV-1 y EHV-4, y una combinación de los mismos, más específicamente, el virus del herpes equino se selecciona del grupo que consiste en EHV-1, EHV-
- 50 4, cepas depositadas en la ATCC con los n.º de referencia PTA-9525 y PTA-9526, y una combinación de los mismos.
- La divulgación proporciona además una composición inmunógena, que, además de la cepa inactiva o viva, atenuada, de ERAV y/o ERBV, al menos una cepa inactivada o viva, atenuada, o al menos un antígeno del virus de la gripe equina. En aspectos específicos, el virus de la gripe equina se selecciona del grupo que consiste en virus de Clado 1, virus de Clado 2, Gripe A/Sudáfrica/2003, Gripe A/equina-2/Ohio/03, Gripe A/equina-2/New Market/2/93, Gripe A/equina-2/Kentucky/95, Gripe A/equina-2/Richmond/1/2007, cepas depositadas en la ATCC con los n.º de referencia PTA-9522, PTA-9523 y PTA-9524, y combinaciones de los mismos. Las composiciones inmunógenas pueden incluir, además de ERAV y/o ERBV inactivado o vivo, atenuado, al menos un antígeno o una cepa inactiva o viva, atenuada, del virus del herpes equino y al menos un antígeno o una cepa inactivada o viva, atenuada, del virus de la gripe equina.
- 60
- 65 Las composiciones inmunógenas de la divulgación pueden incluir, además de ERAV y/o ERBV inactivado o vivo,

atenuado, al menos un virus inactivado o vivo, atenuado, o al menos un antígeno de una o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en virus del Nilo Occidental, virus de la encefalomiелitis equina oriental, Virus de la encefalomiелitis equina occidental, Virus de la encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico, y combinaciones de los mismos. Como alternativa, la composición inmunógena, además de ERAV y/o ERBV inactivado o vivo, 5 atenuado, comprende una o más cepas inactivadas o vivas, atenuadas, o antígenos de cepas de encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental, virus de la encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico. En aspectos específicos, el virus del Nilo Occidental es una de las cepas seleccionadas del grupo que consiste en el de origen equino 2005, depositado en la ATCC con el número de referencia PTA-9409; NAEE159, depositado en el aislado del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos con el número de referencia 405330; NY2002Nassau; 10 NY2002Clinton; NY2002Queens; GA20021; GA20022; TX20021; TX20022; IN2002; NY2003Albany; NY2003Suffolk; NY2003Chatauqua; CO20031; CO20032; TX2003; TX2003Harris4; TX2003Harris6; TX2003Harris7; TX2003Harris10; AZ2004; y TX2004Harris4; y combinaciones de los mismos. En composiciones inmunógenas que comprenden el virus de la encefalomiелitis equina occidental, la cepa puede ser la cepa depositada en la ATCC con el número de referencia PTA-9410. En composiciones que comprenden el virus de la encefalomiелitis equina venezolana, la cepa puede ser la 15 cepa depositada en la ATCC con el número de referencia PTA-9411. En composiciones inmunógenas que comprenden el virus de la encefalomiелitis equina oriental, la cepa puede ser la cepa depositada en la ATCC con el número de referencia PTA-9412. Además, en composiciones inmunógenas que comprenden el virus del herpes equino, la cepa puede seleccionarse del grupo que consiste en las cepas depositadas en la ATCC con los números de referencia PTA-9525 o PTA-9526, y combinaciones de las mismas.

En aspectos específicos de la divulgación, una o más de las cepas en la composición inmunógena están presentes en una cantidad de aproximadamente $10^{2.0}$ DICT₅₀/ml a aproximadamente $10^{10.0}$ DICT₅₀/ml por dosis. La composición puede incluir además un vehículo farmacéutico adecuado, tal como un diluyente, adyuvante, agente antimicrobiano, conservante, agente inactivador o combinación de los mismos. En aspectos particulares, la composición inmunógena 20 comprende un adyuvante, específicamente, HRA-5.

La divulgación proporciona además métodos para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con o causados por el virus de la rinitis equina A o el virus de la rinitis equina B en un animal o una manada de animales que comprenden la etapa de administrar una composición inmunógena que comprende una o más cepas 30 de ERAV o ERBV inactivados o vivos, atenuados, en donde la cepa de ERAV o la cepa de ERBV, antes de la inactivación o atenuación, provoca enfermedad respiratoria detectable en al menos el 50 % de los caballos seronegativos expuestos a la cepa o crece en cultivo celular hasta 10^6 DICT₅₀/ml o superior o, cuando se usa como vacuna en equinos a una dosis de 10^6 DICT₅₀ o superior, da como resultado un título de suero de al menos 1:112. En particular, la o las cepas de ERAV o ERBV preferentemente incluyen ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828) y/o cepa de ERBV 07-103042 (referencia de ATCC PTA-11829). Además, la cepa de ERAV puede comprender una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una identidad superior al 95 % con la SEQ ID NO: 2 o codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos con una identidad superior al 95 % con la SEQ ID NO: 3, en donde dicha cepa de ERAV, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras, o la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos 40 que comprende la SEQ ID NO: 2 o codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Además, o como alternativa, la cepa de ERBV puede comprender una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una identidad superior al 95 % con el transcrito inverso de la secuencia genómica de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 o codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos con una identidad superior al 95 % con la poliproteína codificada por el genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829, en donde dicha cepa de ERBV, cuando no está inactivada o atenuada, está activa para infectar y replicar en células hospedadoras. La cepa de ERBV también puede comprender una secuencia genómica que es la secuencia genómica de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 o codifica una poliproteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la poliproteína codificada por el genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829.

Además de proporcionar métodos para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con o provocados por ERAV o ERBV en un animal o una manada de animales, los métodos de la divulgación pueden reducir adicionalmente la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con o causados por uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en el virus del Nilo Occidental, virus de la encefalomiелitis equina oriental, virus de la encefalomiелitis equina occidental, virus de la encefalomiелitis equina venezolana y *Clostridium tetani* en un animal o una manada de animales mediante la administración de una composición inmunógena de la divulgación. Los métodos de la divulgación también incluyen métodos para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con o provocados por ERAV o ERBV en un animal o una manada de animales además de reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos 60 asociados con o provocados por uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que consiste en: virus de la encefalomiелitis equina oriental, virus de la encefalomiелitis equina occidental, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, virus del herpes equino y *Clostridium tetani* en un animal o una manada de animales mediante la administración de una composición inmunógena de la divulgación.

La divulgación también proporciona métodos para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con o provocados por ERAV y/o ERBV, así como uno o más de los patógenos seleccionados del grupo que

consiste en: virus del Nilo occidental, virus de la encefalomiелitis equina oriental, virus de la encefalomiелitis equina occidental, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, virus del herpes equino, virus de la gripe equina y *Clostridium tetani* en un animal o una manada de animales, que comprende la etapa de administrar una composición inmunógena de la divulgación.

5 En relación con los métodos de la divulgación, la incidencia de los síntomas clínicos provocados por uno o más de dichos patógenos en una manada de animales se reduce de aproximadamente 10 % - 50 % en comparación con una manada que no recibe la composición inmunógena. Los métodos de la divulgación, en aspectos particulares, proporcionan una duración de la inmunidad de al menos 12 meses contra uno o más de los patógenos presentes en la composición inmunógena. En los métodos de la divulgación, la composición inmunógena se administra a un équido, preferentemente un caballo. El esquema de dosificación puede incluir la administración de la composición inmunógena en una o más dosis. Las dosis para los métodos de la divulgación pueden formularse en formas de dosificación de 0,5 ml a 2,5 ml. Preferentemente, los métodos de la divulgación administran composiciones inmunógenas que son seguras para su uso en potros o caballos de 4 meses de edad o mayores.

15 La divulgación también proporciona métodos para producir una composición inmunógena que comprende una o más cepas de virus de la rinitis equina A (ERAV) o virus de la rinitis equina B (ERBV) inactivados de la siguiente manera:

- a) infectar una línea celular susceptible con ERAV o ERBV;
- 20 b) cultivar la línea celular infectada en medios de cultivo hasta que se logre un efecto citopático (CPE);
- c) recoger los medios;
- d) filtrar los medios para producir un medio filtrado; y
- e) poner en contacto los medios filtrados con un agente inactivador para obtener el ERAV o ERBV inactivado.

25 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una representación gráfica de la proporción de positivos para virus a lo largo del tiempo.

30 La Fig. 2 es una representación gráfica de la proporción de positivos para capa leucocitaria a lo largo del tiempo.

La Fig. 3 es una representación gráfica de los títulos de neutralización en suero a lo largo del tiempo.

La Fig. 4 es una representación gráfica de las puntuaciones nasales medias a lo largo del tiempo.

35 La Fig. 5 es una representación gráfica de las puntuaciones oculares medias a lo largo del tiempo.

La Fig. 6 es una alineación de ClustalW de una parte del virus de la rinitis equina A ERAV/ON/05 (parte 5' UTR, SEQ ID NO: 1) con ERAV/PERV-1 (número de referencia: DQ272578 (SEQ ID NO: 14)). Las inserciones de nucleótidos de ERAV/ON/05 se muestran en negrita y las supresiones en sombreado.

40 La Fig. 7 es un gráfico de medias de puntuación clínica total de grupos de control, infectados y reinfectados del Ejemplo 4.

45 La Fig. 8 es un gráfico de medias de temperatura corporal de grupos de control, infectados y reinfectados del Ejemplo 4.

La Fig. 9 es una tabla que muestra títulos para virus de la rinitis equina A (ERAV) y el virus de la rinitis equina B (ERBV) en grupos de control, infectados y reinfectados del Ejemplo 4. La prueba de neutralización del virus (VN) se usó para medir títulos de anticuerpos en muestras de suero.

50 Descripción detallada de la invención

Se desvelan composiciones inmunógenas que comprenden una o más cepas de ERAV inactivado, que cuando están vivas y activas son virulentas (es decir, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso 100 % de caballos seronegativos, cuando se exponen a propósito al virus, presentan enfermedad respiratoria observable, en particular secreción nasal y/u ocular), que pueden cultivarse a títulos altos en cultivo para producir una vacuna que pueda inducir títulos altos de anticuerpos en suero contra ERAV cuando se administran, por ejemplo, a un equino, por ejemplo, dando como resultado un título de suero de al menos 1:112 y, preferentemente, al menos 1:200, 1:500, 1:750 o 1:1000. Además, las cepas crecen bien en cultivo y son muy eficaces para producir, por ejemplo, a un título de al menos 10⁶ DICT₅₀/ml, más preferentemente 10⁷ DICT₅₀/ml, 10⁸ DICT₅₀/ml o incluso 10⁹ DICT₅₀/ml. De manera similar, también se descubrió que composiciones que comprendían una o más cepas de ERBV inactivado, que cuando están vivas y activas y no atenuadas también son virulentas (como se ha definido anteriormente para ERAV), crecían bien en cultivo, a un título de al menos 10⁶ DICT₅₀/ml, más preferentemente 10⁷ DICT₅₀/ml, 10⁸ DICT₅₀/ml o incluso 10⁹ DICT₅₀/ml, que eran muy eficaces para producir e inducir altos títulos de anticuerpos en suero en animales después de inmunización, por ejemplo, dando como resultado un título de suero de al menos 1:120 y preferentemente al menos 1:200, 1:500, 1:750 o 1:1000. Las composiciones tanto de ERAV como de ERBV, y combinaciones de las mismas, son capaces de

reducir la duración, gravedad e incidencia de la enfermedad en un animal tal como un caballo que ha sido inmunizado con las composiciones e infectado posteriormente.

5 En un aspecto, se desvela una composición inmunógena que comprende una o más cepas de ERAV y/o ERBV inactivados. Como alternativa, las cepas pueden atenuarse por medios rutinarios y el virus vivo, atenuado, usarse en la composición de vacuna. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En determinados aspectos, la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11828, depositado en la colección americana de cultivos tipo el 14 de abril de 2011.

20 En algunas realizaciones de la invención, el ERBV es la cepa 07-103042, que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829, depositado en la colección americana de cultivos tipo el 14 de abril de 2011. En algunos aspectos de la divulgación, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

30 En un aspecto se desvela una composición inmunógena que comprende ERAV y ERBV inactivado (o, como alternativa, vivo, atenuado). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828). En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con el n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

55 En un aspecto de la divulgación, junto con la o las cepas inactivadas o vivas, atenuadas, de ERAV y/o ERBV, las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento comprenden además al menos un antígeno o una cepa adicional inactivada o viva, atenuada, del virus del herpes equino (EHV). En algunos aspectos, las composiciones comprenden al menos un antígeno de EHV. En algunos aspectos, el EHV se selecciona del grupo que consiste en EHV-1, EHV-4, cepas depositadas en la ATCC con los n.º de referencia PTA-9525 y PTA-9526, y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma

inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828). En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

En un aspecto de la divulgación, junto con la o las cepas inactivadas (o atenuadas) de ERAV y/o ERBV, las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento comprenden además al menos un antígeno o una cepa adicional inactivada o atenuada del virus de la gripe equina (EIV). En algunos aspectos, las composiciones comprenden al menos un antígeno de EIV. En algunos aspectos, el EIV se selecciona del grupo que consiste en virus de Clado 1, virus de Clado 2, Gripe A/Sudáfrica/2003, Gripe A/equina-2/Ohio/03, Gripe A/equina-2/New Market/2/93, Gripe A/equina-2/Kentucky/95, Gripe A/equina-2/Richmond/1/2007 y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828). En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

En un aspecto de la divulgación, junto con la o las cepas inactivadas (o vivas, atenuadas) de ERAV y/o ERBV, las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento comprenden además al menos un antígeno o una cepa adicional inactivada o viva, atenuada, del virus de la gripe equina y al menos un antígeno o una cepa adicional inactivada o viva, atenuada, del virus del herpes equino. En algunos aspectos, las composiciones comprenden al menos un antígeno de EHV y al menos un antígeno de EIV. En algunos aspectos, el EHV es EHV-1 o EHV-4 o una combinación de los mismos y el EIV se selecciona del grupo que consiste en virus de Clado 1, virus de Clado 2, Gripe A/Sudáfrica/2003, Gripe A/equina-2/Ohio/03, Gripe A/equina-2/New Market/2/93, Gripe A/equina-2/Kentucky/95, Gripe A/equina-2/Richmond/1/2007 y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828). En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

En un aspecto de la divulgación, junto con la o las cepas inactivadas (o vivas, atenuadas) de ERAV y/o ERBV, las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento comprenden además al menos un antígeno o virus inactivado de una o más cepas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en virus de la gripe equina, virus del herpes equino, virus del Nilo occidental, virus de la encefalomiелitis equina oriental, virus de la encefalomiелitis equina occidental y virus de la encefalomiелitis equina venezolana y/o toxoide tetánico, y combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no esté inactivada ni atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828). En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

En un aspecto de la divulgación, junto con la o las cepas inactivadas (o vivas, atenuadas) de ERAV y/o ERBV, las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento comprenden además al menos un virus adicional inactivado o vivo, atenuado, de una cepa seleccionada del grupo que consiste en virus del Nilo Occidental, virus de la encefalomiелitis equina oriental, virus de la encefalomiелitis equina occidental y virus de la encefalomiелitis equina venezolana y/o toxoide tetánico, y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828). En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

En un aspecto, se desvela un método para preparar la composición inmunógena de la presente divulgación. El método comprende en general las etapas de combinar un ERAV y/o ERBV inactivados o vivos, atenuados, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la cepa de

ERAV es ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828). En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, el método comprende además la etapa de añadir uno o más antígenos de virus equinos adicionales o virus equinos inactivados o vivos, atenuados. En otro aspecto, el método comprende además la etapa de añadir un adyuvante adecuado a la composición.

En un aspecto, se desvela un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de síntomas clínicos asociados con o provocados por ERAV o ERBV en un animal o una manada de animales que comprende administrar una composición inmunógena como se desvela en el presente documento a un animal que lo necesite. En algunos aspectos, el animal es un caballo.

Los aspectos anteriormente mencionados pueden contener además una o más de las siguientes características descritas a continuación.

En un aspecto, se desvela una composición que comprende al menos una cepa de ERAV y/o ERBV inactivados (o, como alternativa, vivos, atenuados) y que contienen además muchos o todos los componentes antigénicos y proteínas relevantes del virus del Nilo Occidental (WNV) patógeno o cepa inactivada o viva, atenuada, de WNV.

En un aspecto, se desvela una composición de vacuna que comprende una o más cepas de ERAV y/o ERBV inactivados (o vivos, atenuados) en combinación con una o más cantidades inmunológicamente eficaces de componentes antigénicos o uno o más cepas inactivadas o vivas, atenuadas, seleccionadas del grupo que consiste en el virus del Nilo Occidental (WNV), encefalomiелitis equina venezolana (VEE), encefalomiелitis equina oriental (EEE), encefalomiелitis equina occidental (WEE), toxoide tetánico (T), virus del herpes equino (EHV), incluyendo tipos 1 y 4, virus de la gripe equina (EIV) y combinaciones de los mismos, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, dichos aspectos incluirán un adyuvante, tal como un carbómero y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otros aspectos, el adyuvante es HRA-5, un carbómero o aceite mineral.

En algunos aspectos de la divulgación, las composiciones también incluyen ERAV y/o ERBV inactivados o vivos, atenuados, en combinación con las siguientes cepas víricas inactivadas o vivas, atenuadas, o antígenos y combinaciones de cepas y antígenos: virus del Nilo occidental; encefalomiелitis equina oriental; encefalomiелitis equina occidental; encefalomiелitis equina venezolana; toxoide tetánico; encefalomiелitis equina oriental y encefalomiелitis equina occidental; encefalomiелitis equina oriental y encefalomiелitis equina venezolana; encefalomiелitis equina oriental y toxoide tetánico; encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental y encefalomiелitis equina venezolana; encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental y toxoide tetánico; encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental, encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico; encefalomiелitis equina occidental y encefalomiелitis equina venezolana; encefalomiелitis equina occidental y toxoide tetánico; encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico; y encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico, o antígenos o componentes antigénicos de los mismos. Una combinación preferida de estas combinaciones especificadas incluye ERAV y/o ERBV en combinación con antígenos o componentes antigénicos de virus inactivados del virus del Nilo Occidental, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental, encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico. Otra combinación preferida incluye ERAV y/o ERBV en combinación con antígenos o componentes antigénicos de la encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental, encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico. Los ERAV preferidos incluyen ERAV/ON/05 (número de referencia de ATCC PTA-11828), la cepa de ERAV que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). La cepa de ERAV también puede comprender una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. El ERBV preferido es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829, o que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una

secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En cada combinación especificada, se puede usar un adyuvante o combinación de adyuvantes tal como, HRA-5, carbómero o con carboxipol. La cepa NJO de la encefalomiелitis equina oriental, la cepa Fleming de la cepa de encefalomiелitis equina occidental y la cepa TC-83 de la cepa de encefalomiелitis equina venezolana son cepas representativas de estos componentes de vacuna.

Otros aspectos preferidos de la presente divulgación incluyen composiciones inmunógenas preparadas usando cada una de las vacunas de combinación especificadas enumeradas anteriormente y añadiendo antígenos o virus inactivados o atenuados del Herpesvirus equino, preferentemente de tipo 1, tipo 4, (EHV1 y/o EHV4) o combinaciones de los mismos.

Más variaciones adicionales de cada una de las vacunas de combinación especificadas o composiciones inmunógenas enumeradas anteriormente, incluyendo las que incluyen EHV1 y/o EHV4, se pueden realizar añadiendo antígenos o virus inactivados o atenuados del virus de la gripe equina (EIV). Los aspectos preferidos de la divulgación que incorporan el virus de la gripe equina incluyen ERAV y/o ERBV inactivado o vivo, atenuado, y al menos una cepa inactiva o viva, atenuada, de cada uno de WNV, virus de la gripe equina y toxoide tetánico; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa inactivada o viva, atenuada, de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, toxoide tetánico y encefalomiелitis equina oriental; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, toxoide tetánico, encefalomiелitis equina oriental y encefalomiелitis equina occidental; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, toxoide tetánico, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental; y encefalomiелitis equina venezolana; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina y encefalomiелitis equina oriental; ERAV y/o ERBV y, al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina y encefalomiелitis equina occidental; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina y encefalomiелitis equina venezolana; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina oriental y encefalomiелitis equina occidental; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina oriental y encefalomiелitis equina venezolana; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina oriental y encefalomiелitis equina occidental; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina venezolana; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina occidental y toxoide tetánico; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina venezolana, encefalomiелitis equina oriental y toxoide tetánico, en donde las cepas mencionadas anteriormente están inactivadas o vivas, atenuadas. En cada aspecto especificado pueden estar presentes una o más cepas inactivadas o vivas, atenuadas, del virus de la gripe equina. Las cepas preferidas del virus de la gripe equina incluyen gripe A/equina-2/Ohio/03, Gripe A/equina-2/New Market/2/93, Gripe A/equina-2/Kentucky/95 y combinaciones de los mismos. En todas las combinaciones enumeradas anteriormente, se prefiere usar al menos dos cepas inactivadas o vivas, atenuadas, del virus de la gripe equina y se prefiere más usar al menos 3 cepas del virus de la gripe equina.

Los aspectos preferidos de la divulgación que incorpora el virus del herpes equino incluyen: ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, toxoide tetánico y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, toxoide tetánico, encefalomiелitis equina oriental y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, toxoide tetánico, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, toxoide tetánico, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental; encefalomiелitis equina venezolana y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina y encefalomiелitis equina oriental; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina occidental y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina venezolana y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina venezolana y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental y ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina venezolana y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina occidental, encefalomiелitis equina venezolana y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental, toxoide tetánico y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina venezolana, toxoide tetánico y virus del herpes equino; ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina venezolana, encefalomiелitis equina occidental, toxoide tetánico y virus del herpes equino; y ERAV y/o ERBV y al menos una cepa de cada uno de WNV, virus de la gripe equina, encefalomiелitis equina venezolana, encefalomiелitis equina oriental, toxoide tetánico y virus del herpes equino, en donde las cepas mencionadas anteriormente están inactivadas o vivas, atenuadas. En todas las combinaciones enumeradas anteriormente, se prefiere usar al menos dos cepas de virus de la gripe equina inactivado o vivo, atenuado, y se prefiere más usar al menos 3 cepas de virus de la gripe equina inactivado o vivo,

atenuado. Adicionalmente, en todas las combinaciones anteriores, se prefiere que la "al menos una" cepa del virus del herpes equino se seleccione del grupo que consiste en EHV-1 y EHV-4 inactivados. En algunas formas preferidas, se incluirán cepas tanto inactivadas como vivas,, atenuadas, EHV-1 y EHV-4, en la composición inmunógena. En otras formas preferidas, solo se incluirá EHV-1. En una combinación preferida, la cepa inactivada o viva, atenuada, de ERAV es ERAV/ON/05, una cepa de ERAV que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). La cepa de ERAV también puede comprender una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En otras combinaciones preferidas, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829, o que comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica).

Las composiciones inmunógenas como se desvela en el presente documento pueden administrarse en cualquier dosis inmunógenamente eficaz. En un aspecto preferido, la composición inmunógena se administra como una dosis única. Preferentemente, la dosis tiene un volumen total entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 2,5 ml, más preferentemente entre aproximadamente 0,6 ml y aproximadamente 2,0 ml, incluso más preferentemente entre aproximadamente 0,7 ml y aproximadamente 1,75 ml, aún más preferentemente entre aproximadamente 0,8 ml y aproximadamente 1,5 ml, incluso más preferentemente entre aproximadamente 0,9 ml y aproximadamente 1,25 ml, siendo la más preferida una dosis única de 1,0 ml.

En otro aspecto de la divulgación, se administra la composición inmunógena, administrándose una primera dosis antes de la administración de una segunda dosis (de refuerzo). Preferentemente, la segunda dosis se administra al menos aproximadamente 15 días después de la primera dosis. Más preferentemente, la segunda dosis se administra entre aproximadamente 15 y aproximadamente 28 días después de la primera dosis. Aún más preferentemente, la segunda dosis se administra al menos aproximadamente 17 días después de la primera dosis. Aún más preferentemente, la segunda dosis se administra entre aproximadamente 17 y aproximadamente 25 días después de la primera dosis. Aún más preferentemente, la segunda dosis se administra al menos aproximadamente 19 días después de la primera dosis. Aún más preferentemente, la segunda dosis se administra entre aproximadamente 19 y aproximadamente 23 días después de la primera dosis. Lo más preferentemente, la segunda dosis se administra al menos aproximadamente 21 días después de la primera dosis. En un aspecto preferido, tanto la primera como la segunda dosis de la composición inmunógena están en la misma cantidad. Preferentemente, cada dosis está en las cantidades preferidas especificadas anteriormente, siendo más preferida una dosis de aproximadamente 1 ml para la primera y segunda dosis. Además del régimen de primera y segunda dosis, un aspecto alternativo comprende dosis posteriores adicionales. Por ejemplo, una tercera, cuarta o quinta dosis podría administrarse en estos aspectos. Preferentemente, los regímenes posteriores de tercera, cuarta y quinta dosis se administran en la misma cantidad que la primera dosis, siendo el intervalo temporal entre las dosis coherente con el tiempo entre la primera y la segunda dosis mencionadas anteriormente, aunque el tiempo también puede variar.

En un aspecto de la divulgación, la composición inmunógena se administra en tres dosis. En algunos aspectos, las tres dosis se administran a intervalos de tres semanas.

En un aspecto de la divulgación que comprende ERAV, preferentemente ERAV/ON/05, la cantidad de ERAV en la composición inmunógena es al menos aproximadamente 10^{20} DICT₅₀/dosis. Más preferentemente, la cantidad de ERAV está entre aproximadamente 10^{20} DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{10.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERAV es al menos aproximadamente $10^{2.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERAV está entre aproximadamente $10^{2.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERAV es al menos aproximadamente $10^{3.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERAV está entre aproximadamente $10^{3.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERAV es al menos aproximadamente $10^{3.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERAV está entre aproximadamente $10^{3.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERAV está entre aproximadamente $10^{6.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{8.5}$ DICT₅₀/dosis. Más preferentemente, la cantidad de ERAV está entre aproximadamente $10^{7.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Los valores de DICT₅₀ de un ERAV inactivado o atenuado o cualquier otra vacuna inactivada o atenuada se refieren en general al contenido vírico en la vacuna final que, sin embargo, es equivalente al

contenido vírico calculado para la composición de vacuna antes de la inactivación de su virus. Preferentemente, la composición inmunógena de la presente divulgación estimula anticuerpos neutralizantes de suero contra ERAV en un título de al menos 1:112, 1:300, 1:500, 1:700, 1:900, 1:1000 o 1:1500

5 En un aspecto de la divulgación que comprende ERBV, preferentemente una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829, la cantidad de ERBV es al menos aproximadamente $10^{2.0}$ DICT₅₀/dosis. Más preferentemente, la cantidad de ERBV está entre aproximadamente $10^{2.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{10.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERBV es al menos aproximadamente $10^{2.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERBV está entre aproximadamente $10^{2.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERBV es al menos aproximadamente $10^{3.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERBV está entre aproximadamente $10^{3.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERBV es al menos aproximadamente $10^{3.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERBV está entre aproximadamente $10^{3.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la cantidad de ERBV está entre aproximadamente $10^{6.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{8.5}$ DICT₅₀/dosis. Más preferentemente, la cantidad de ERBV está entre aproximadamente $10^{7.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Los valores de DICT₅₀ de un ERBV inactivado o cualquier otra vacuna inactivada se refieren en general al contenido vírico en la vacuna final que, sin embargo, es equivalente al contenido vírico calculado para la composición de vacuna antes de la inactivación de su virus. Preferentemente, la composición inmunógena de la presente divulgación estimula anticuerpos neutralizantes de suero contra ERBV a un título de al menos 1:4 o superior. En algunos aspectos, el título es al menos 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14 o 1:15 o superior. En algunos aspectos, el título es al menos 1:64, 1:256 o 1:512 o superior. En algunos aspectos, el título es al menos 1:1024 o superior. En algunos aspectos, el título es al menos 1:2048, 1:1536, 1:3072, 1:4096, 1:6144, 1:8192, 1:12288 o 1:32769 o superior. En algunos aspectos, el título no es más de 1:300, 1:1050, 1:32000, 1:70000 o 1:140000.

25 En un aspecto, en cada dosis de un aspecto de la presente divulgación que comprende uno o más antígenos equinos adicionales, la cantidad de encefalomiелitis equina oriental o encefalomiелitis equina venezolana en cualquier dosis es preferentemente al menos aproximadamente $10^{5.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis está entre aproximadamente $10^{5.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis es de al menos aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis está entre aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis es de al menos aproximadamente $10^{6.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis está entre aproximadamente $10^{6.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis es de al menos aproximadamente $10^{7.0}$ DICT₅₀/dosis. Lo más preferentemente, la dosis está entre aproximadamente $10^{6.7}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.2}$ DICT₅₀/dosis.

40 En un aspecto de la divulgación que comprende WNV o antígeno inactivado o destruido, la cantidad de WNV o antígeno es al menos aproximadamente $10^{2.0}$ DICT₅₀/dosis. Más preferentemente, el WNV o antígeno está entre aproximadamente $10^{2.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{10.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, el WNV o antígeno es al menos aproximadamente $10^{2.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, el WNV o antígeno está entre aproximadamente $10^{2.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, el WNV o antígeno es al menos aproximadamente $10^{3.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, el WNV o antígeno está entre aproximadamente $10^{3.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, el WNV o antígeno es al menos aproximadamente $10^{3.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, el WNV o antígeno está entre aproximadamente $10^{3.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Lo más preferentemente, el WNV o antígeno está entre aproximadamente $10^{7.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Los valores de DICT₅₀ de una vacuna de WNV inactivado o cualquier otra vacuna inactivada se refieren en general al contenido de antígeno en la vacuna final que, sin embargo, es equivalente al contenido de antígeno calculado para la composición de vacuna antes de la inactivación de su antígeno. Preferentemente, la composición inmunógena de la presente divulgación estimula anticuerpos neutralizantes de suero contra WNV a un título de al menos 1:4 o superior. En algunos aspectos, el título es al menos 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14 o 1:15 o superior. En algunos aspectos, el título no es más de 1:300, 1:1050, 1:32000, 1:70000 o 1:140000. En un aspecto preferido, en cada dosis de un aspecto de la presente divulgación que comprende antígeno equino adicional, la cantidad de encefalomiелitis equina oriental o encefalomiелitis equina venezolana en cualquier dosis es preferentemente al menos aproximadamente $10^{5.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis está entre aproximadamente $10^{5.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis es de al menos aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis está entre aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis es de al menos aproximadamente $10^{6.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis está entre aproximadamente $10^{6.5}$ DICT₅₀/dosis y aproximadamente $10^{9.5}$ DICT₅₀/dosis. Aún más preferentemente, la dosis es de al menos aproximadamente $10^{7.0}$ DICT₅₀/dosis. Lo más preferentemente, la dosis está entre aproximadamente $10^{6.7}$ DICT₅₀ y aproximadamente $10^{9.2}$ DICT₅₀/dosis.

65 Preferentemente, el antígeno de la encefalomiелitis equina occidental, cuando está presente en la composición de la presente divulgación, está en una cantidad de al menos aproximadamente $10^{6.2}$ UFP/ml. Aún más preferentemente, la cantidad está entre aproximadamente $10^{6.2}$ UFP/ml y aproximadamente $10^{10.2}$ UFP/ml. Aún más preferentemente, la cantidad es al menos aproximadamente $10^{6.7}$ UFP/ml. Aún más preferentemente, la cantidad está entre

aproximadamente $10^{6.5}$ UFP/ml y aproximadamente $10^{9.7}$ UFP/ml. Aún más preferentemente, la cantidad es al menos aproximadamente $10^{7.2}$ UFP/ml. Aún más preferentemente, la cantidad está entre aproximadamente $10^{7.2}$ UFP/ml y aproximadamente $10^{9.2}$ UFP/ml. Aún más preferentemente, la cantidad es al menos aproximadamente $10^{7.7}$ UFP/ml siendo entre aproximadamente $10^{6.5}$ UFP/dosis y aproximadamente $10^{9.0}$ UFP/ml la más preferida.

5 En otro aspecto preferido, la cantidad de toxoide tetánico, si está presente en la composición de la presente divulgación, está en una cantidad de al menos aproximadamente 3 UPC, más preferentemente, entre aproximadamente 3 UPC y aproximadamente 20 UPC, aún más preferentemente, al menos aproximadamente 4 UPC y lo más preferentemente, al menos aproximadamente 5 UPC pero no más de aproximadamente 20 UPC.

10 En un aspecto alternativo de la divulgación, donde están presentes una o más cepas del virus de la gripe equina, la cantidad de gripe equina presente en la composición está en una cantidad de al menos aproximadamente $10^{5.0}$ DICT₅₀/ml. Más preferentemente, la gripe equina está en una cantidad de entre aproximadamente $10^{5.0}$ DICT₅₀/ml y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/ml y, más preferentemente, al menos aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/ml. Aún más preferentemente, la cantidad es entre aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/ml a aproximadamente $10^{8.0}$ DICT₅₀/ml y, más preferentemente, la cantidad es al menos aproximadamente $10^{6.5}$ DICT₅₀/ml. Aún más preferentemente, la cantidad es entre aproximadamente $10^{6.5}$ DICT₅₀/ml a aproximadamente $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml, siendo la cantidad más preferida entre aproximadamente $10^{6.7}$ DICT₅₀/ml y aproximadamente $10^{7.3}$ DICT₅₀/ml.

20 En un aspecto de la divulgación que comprende virus del herpes equino, la cantidad de virus del herpes equino en cada dosis es al menos aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/ml. Más preferentemente, el virus del herpes equino está presente en la composición en una cantidad de entre aproximadamente $10^{6.0}$ DICT₅₀/ml y aproximadamente $10^{9.5}$ DICT₅₀/ml y, más preferentemente, en una cantidad de aproximadamente $10^{7.0}$ DICT₅₀/ml. Aún más preferentemente, el virus del herpes equino está presente en una cantidad entre aproximadamente $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/ml y, más preferentemente, en una cantidad de aproximadamente $10^{8.0}$ DICT₅₀/ml. Aún más preferentemente, el virus del herpes equino está presente en una cantidad de entre aproximadamente $10^{8.0}$ DICT₅₀/ml y aproximadamente $10^{9.0}$ DICT₅₀/ml y, lo más preferentemente, en una cantidad de aproximadamente $10^{8.50}$ DICT₅₀/ml.

30 En otro aspecto preferido adicional de la divulgación, se desvela una composición de vacuna que comprende las cepas cronológicamente contemporáneas y epidemiológicamente prevalentes de ERAV y/o ERBV. Preferentemente, la composición comprende ERAV/ON/05 y/o una cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En aspectos específicos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). Dicha composición mejorará en general la eficacia de la composición.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un método de reducción de la incidencia y/o gravedad de los signos clínicos asociados con, infección por ERAV y/o ERBV en un animal, preferentemente un caballo. Dichos métodos comprenden en general la etapa de administrar una composición de vacuna que comprende una cepa inactivada o viva, atenuada de un ERAV y/o ERBV y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En aspectos particulares, el ERAV es ERAV/ON/05, o la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC
 5 PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos preferidos, un adyuvante,
 10 en particular HRA-5, se añade a la composición y, en otras formas preferidas, no se proporciona adyuvante.

En un aspecto preferido alternativo de la divulgación, el método comprende administrar una composición de vacuna que comprende una o más cepas inactivadas o vivas, atenuadas, de ERAV y/o ERBV en combinación con cantidades inmunológicamente eficaces de componentes antigénicos o cepas inactivadas de otros patógenos equinos.
 15 Preferentemente, la cepa de ERAV es ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828) y la cepa de ERBV tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En determinados aspectos de este tipo, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos
 20 de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada o viva, atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia
 25 genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma
 30 de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y
 35 replicación vírica).

En algunos aspectos del método de divulgación, los patógenos en combinación con las cepas de ERAV y/o ERBV, se seleccionan del grupo que consiste en antígenos o cepas inactivadas o atenuadas de EHV y EIV y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, los patógenos son antígenos. En algunos aspectos, el EHV es EHV-1 o EHV-4 o
 40 una combinación de los mismos. En otros aspectos, el EIV se selecciona del grupo que consiste en virus de Clado 1, virus de Clado 2, Gripe A/Sudáfrica/2003, Gripe A/equina-2/Ohio/03, Gripe A/equina-2/New Market/2/93, Gripe A/equina-2/Kentucky/95, Gripe A/equina-2/Richmond/1/2007 y combinaciones de los mismos.

En otros aspectos más del método de la divulgación, los patógenos en combinación con las cepas de ERAV y/o ERBV, se seleccionan del grupo que consiste en antígenos o cepas inactivadas o atenuadas de WNV, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental y encefalomiелitis equina venezolana, y toxoide tetánico, y combinaciones de los mismos, y que son más preferentemente las combinaciones descritas anteriormente. En otro aspecto preferido,
 45 la vacuna de la presente divulgación se combina con un adyuvante adecuado y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación proporciona reducción de la incidencia y/o gravedad de síntomas clínicos asociados con, infección por ERAV y/o ERBV en una manada. Preferentemente, la gravedad y/o incidencia de síntomas clínicos en animales que reciben la composición inmunógena de la presente divulgación se reducen al menos 10 % en comparación con animales que no reciben dicha administración cuando ambos grupos (animales que reciben y
 50 animales que no reciben la composición) se provocan con o se exponen a infección por ERAV y/o ERBV. Más preferentemente, la incidencia o gravedad se reduce al menos 20 %, incluso más preferentemente, al menos 30 %, aún más preferentemente, al menos 40 %, incluso más preferentemente, al menos 50 %, aún más preferentemente, al menos 60 %, incluso más preferentemente, al menos 70 %, aún más preferentemente, al menos 80 %, incluso más preferentemente, al menos 90 %, aún más preferentemente, al menos 95 % y, lo más preferentemente, al menos
 55 100 %, en donde los animales que reciben la composición de la presente divulgación no presentan síntomas clínicos o, como alternativa, presentan síntomas clínicos de gravedad reducida. Provechosamente, la presente divulgación también proporciona protección contra cepas heterólogas (en relación con la cepa usada en la composición) de patógenos.

La presente divulgación proporciona además un método para estimular anticuerpos neutralizantes de suero o de hemaglutinación de suero contra un patógeno seleccionado del grupo que consiste en ERAV, ERBV, WNV, WEE,
 65

- VEE, EEE, EHV, EIV y combinaciones de los mismos mediante la administración de una composición de acuerdo con la presente divulgación descrita en el presente documento. En aspectos particulares, el ERAV es ERAV/ON/05, o la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una 5' UTR que comprende la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERAV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERAV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). En algunos aspectos, la cepa de ERAV comprende una secuencia genómica que, cuando se transcribe de forma inversa, tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o que codifica una poliproteína con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el ERBV es una cepa que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. En algunos aspectos, la cepa de ERBV comprende una secuencia genómica cuyo transcrito inverso tiene una secuencia de nucleótidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del transcrito inverso del genoma de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829 y, cuando no está inactivada o atenuada, es activa para infectar y replicar en células hospedadoras y/o codifica proteínas de ERBV funcionales, o que codifica una poliproteína que tiene una secuencia de aminoácidos con más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o más de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de la cepa con n.º de referencia de ATCC PTA-11829, conteniendo dicha poliproteína proteínas de ERBV funcionales (es decir, activas en infección y replicación vírica). Preferentemente, las composiciones de la presente divulgación estimulan anticuerpos neutralizantes de suero contra ERAV y/o ERBV en un título de al menos 1:112, 1:120, 1:300, 1:500, 1:1000 o 1:1024, o superior.
- 25 La composición inmunógena de la presente divulgación proporciona una duración prolongada de inmunidad contra todas las cepas presentes en la vacuna. Preferentemente, la duración de la inmunidad contra ERAV y/o ERBV es de al menos 1 mes, más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 2 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 3 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 4-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 6-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 7-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 8-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 9-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 10-24 meses y, lo más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 12-24 meses.
- 35 La composición inmunógena de la presente divulgación también proporciona una duración prolongada de inmunidad contra todos los antígenos presentes en la vacuna. Preferentemente, la duración de la inmunidad contra el Nilo Occidental es de al menos 1 mes, más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 2 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 3 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 4-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 6-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 7-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 8-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 9-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 10-24 meses y, lo más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 12-24 meses.
- 45 Preferentemente, la duración de la inmunidad contra EIV es de al menos 1 mes, más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 2 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 3 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 4-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 6-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 7-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 8-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 9-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 10-24 meses y, lo más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 12-24 meses.
- 55 Preferentemente, la duración de la inmunidad contra EHV es de al menos 1 mes, más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 2 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 3 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 4-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 6-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 7-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 8-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 9-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 10-24 meses y, lo más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 12-24 meses.
- 65 Preferentemente, la duración de la inmunidad contra la encefalomiелitis equina occidental es de al menos 1 mes, más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 2 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 3 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 4-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 6-24 meses, incluso más

preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 7-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 8-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 9-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 10-24 meses y, lo más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 12-24 meses.

5 Preferentemente, la duración de la inmunidad contra la encefalomiелitis equina oriental es de al menos 1 mes, más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 2 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 3 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 4-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 6-24 meses, incluso más
10 preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 7-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 8-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 9-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 10-24 meses y, lo más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 12-24 meses.

15 Preferentemente, la duración de la inmunidad contra la encefalomiелitis equina venezolana es de al menos 1 mes, más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 2 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 3 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 4-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 6-24 meses, incluso más
20 preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 7-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 8-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 9-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 10-24 meses y, lo más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 12-24 meses.

25 Preferentemente, la duración de la inmunidad contra el toxoide tetánico es de al menos 1 mes, más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 2 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 3 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 4-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 6-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 7-24 meses, aún más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 8-24 meses, incluso más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 9-24 meses, aún más
30 preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 10-24 meses y, lo más preferentemente, la duración de la inmunidad es de al menos 12-24 meses.

Preferentemente, la duración de la inmunidad de al menos 12 meses se refiere además a cualquier combinación de antígenos que forman la composición inmunógena de la presente divulgación.

35 En un aspecto de la divulgación que comprende un ERAV y/o ERBV inactivado (o, como alternativa, atenuado vivo) como se desvela en el presente documento, la composición inmunógena mejora la excreción de ERAV y/o ERBV infecciosos para evitar la propagación del virus a otros animales susceptibles. En algunos aspectos, las composiciones evitan la excreción del virus.

40 En un aspecto de la divulgación que comprende el antígeno de EIV y/o EHV, como se ha descrito anteriormente, la composición inmunógena mejora la excreción de EIV y/o EHV infecciosos para evitar la propagación del virus a otros animales susceptibles.

45 En un aspecto, las composiciones de acuerdo con la presente divulgación descritas en el presente documento superan la interferencia de la inmunidad materna adquirida pasivamente y estimulan la inmunidad activa y una reducción en la incidencia o gravedad de signos clínicos de infección por EIV en animales vacunados contra EIV.

50 En un aspecto de la presente divulgación, una composición inmunógena que comprende ERAV y/o ERBV, VEE, WEE, EEE, tétanos, WNV, rinoneumonitis equina y gripe equina, todos como se describen en el presente documento, demuestra eficacia contra ERAV, ERBV, VEE, WEE, EEE, tétanos, WNV, rinoneumonitis equina y gripe equina después de la administración de acuerdo con la presente divulgación. Preferentemente, dicha composición incluirá además un adyuvante, preferentemente HRA-5, aceite mineral y/o un carbómero, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En formas preferentes, la composición se administrará en una sola dosis de 1 ml. En algunos aspectos, la
55 composición se administra en dos dosis o preferentemente tres dosis, con cada dosis separada por 1, 2, 3 y 4 semanas.

Cada una de las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento que incluyen ERAV, en particular ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC: PTA-11828) y otras cepas como se han descrito anteriormente, y/o ERBV, en particular una cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829 u otras como también se ha
60 descrito anteriormente, puede administrarse como se describe de modo que reduzcan la incidencia o disminuyan la gravedad de los síntomas clínicos asociados con ERAV y/o ERBV, tales como pirexia, elevaciones de temperatura, aumento de los ruidos pulmonares, linfadenopatía, secreción nasal, secreción ocular, faringitis, edema de las piernas, tos y, en el caso de ERAV, mayor incidencia de aborto en yeguas preñadas. En algunos aspectos, las composiciones disminuyen la cantidad o duración de la secreción nasal u ocular o el tiempo durante el que se presentan dichos
65 síntomas. En algunos aspectos, los animales inoculados con las composiciones no muestran síntomas clínicos de infección por ERAV y/o ERBV una semana o más después de la exposición a ERAV y/o ERBV. En otros aspectos, los

animales inoculados con las composiciones no muestran síntomas clínicos de infección por ERAV y/o ERBV cuando se exponen a ERAV y/o ERBV. Los síntomas clínicos de ERAV y ERBV pueden puntuarse según la Tabla 3 en el Ejemplo 2, Tabla 14 en el Ejemplo 4 o Tabla 17 en el Ejemplo 5.

- 5 Cada una de las composiciones inmunógenas descritas en el presente documento que incluyen el antígeno de EIV o EIV inactivado y se pueden administrar como se describe de modo que reduzcan la incidencia o disminuyan la gravedad de los síntomas clínicos asociados con el virus de la gripe equina.
- 10 La presente divulgación también proporciona un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con el virus del herpes equino, que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente que contienen antígeno de EHV o EHV inactivado o atenuado a un animal.
- 15 La presente divulgación también proporciona un método para reducir la incidencia de síntomas clínicos asociados con el virus del Nilo Occidental que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas que incluye el antígeno de WNV o WNV inactivado o atenuado, como se describe en el presente documento, a un animal.
- 20 La presente divulgación también proporciona un método para reducir la incidencia de síntomas clínicos asociados con el virus de la gripe equina que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente, que incluye un antígeno de EIV o EIV inactivado o atenuado, a un animal.
- 25 La presente divulgación proporciona además un método para reducir la incidencia de síntomas clínicos asociados con el virus del herpes equino que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas que incluye el antígeno de EHV o EHV inactivado o atenuado, a un animal.
- 30 La presente divulgación proporciona un método para reducir la incidencia de infección vírica en una manada que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente a un animal, en donde la reducción de la incidencia de infección, en comparación con manadas que no reciben la composición inmunógena, es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 % de reducción. En un aspecto, las composiciones desveladas en el presente documento reducen la infección por ERAV en 10 % a 50 %. En otros aspectos, las composiciones desveladas en el presente documento reducen la infección por ERBV en 10 % a 50 %.
- 35 La presente divulgación también proporciona un método para reducir la incidencia de síntomas clínicos asociados con el virus de la gripe equina que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas descritas anteriormente a un animal, en donde la reducción de los signos clínicos, en comparación con animales que no reciben la composición inmunógena, es una reducción de al menos 10 % en los signos clínicos.
- 40 La presente divulgación proporciona un método para reducir la incidencia y gravedad de los síntomas clínicos de ERAV o ERBV en una manada, en donde los síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en pirexia, elevaciones de temperatura, aumento de los ruidos pulmonares, linfadenopatía, secreción nasal, secreción ocular, faringitis, tos, edema de piernas y, en el caso de ERAV, mayor incidencia de aborto en yeguas preñadas.
- 45 La presente divulgación proporciona un método para reducir la incidencia y gravedad de los síntomas clínicos de EHV en una manada, en donde los síntomas clínicos se seleccionan del grupo que consiste en enfermedad respiratoria, aborto, complicaciones reproductivas, enfermedad neurológica, enfermedad del sistema nervioso central y combinaciones de los mismos.
- 50 La presente divulgación proporciona un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con el virus del herpes equino que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento, que incluye un antígeno de EHV o EHV inactivado o atenuado, a un animal.
- 55 La presente divulgación proporciona un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con el virus de la gripe equina en una manada, que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento, que incluye un antígeno de EIV o EIV inactivado o atenuado, a un animal.
- 60 La presente divulgación proporciona un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con el virus del Nilo occidental en una manada, que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento, que incluye un antígeno de WNV o WNV inactivado o atenuado, a un animal.
- 65 La presente divulgación proporciona un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con encefalomiелitis equina oriental en una manada, que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento que incluye un antígeno de virus

de EEE o virus de EEE inactivado o atenuado, a un animal.

La presente divulgación proporciona además un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con encefalomiелitis equina occidental en una manada, que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento, que incluye un antígeno del virus de WEE o un virus de WEE inactivado o atenuado, a un animal.

La presente divulgación proporciona además un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de los síntomas clínicos asociados con encefalomiелitis equina venezolana en una manada, que comprende la etapa de administrar una cualquiera de las composiciones inmunógenas desveladas en el presente documento, que incluye un antígeno del virus de VEE o un virus de VEE inactivado atenuado, a un animal.

Los aspectos anteriormente mencionados de la divulgación pueden usarse en una terapia de combinación o como parte de un programa de inmunización en combinación con otros agentes inmunógenos y vacunas. En un aspecto, las composiciones desveladas en el presente documento se usan en combinación con los agentes inmunógenos y las vacunas descritas en el documento WO 2010/025469.

La presente divulgación también proporciona un método para preparar una cualquiera de las composiciones inmunógenas como se ha descrito anteriormente y en el presente documento, que comprende las etapas de combinar un ERAV o ERBV inactivado o vivo, atenuado, con un vehículo farmacéutico adecuado. En formas preferentes, este método comprende además la etapa de añadir uno o más antígenos equinos o virus inactivados o atenuados. Un grupo preferido de antígenos y virus equinos se selecciona del grupo que consiste en virus del Nilo Occidental, encefalomiелitis equina occidental, encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina venezolana, EHV y EIV, y toxoide tetánico, y combinaciones de los mismos. En algunas formas preferidas, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además una etapa de filtración, en donde el producto final está en una forma más pura.

"Aproximadamente" se refiere a +10 % de la cantidad especificada.

"Animales", como se usa en el presente documento, incluye animales domesticados, incluyendo perros y animales con pezuñas, incluyendo équidos y, específicamente, caballos. En algunos aspectos, el término también se refiere a un ser humano.

Los "adyuvantes", como se usa en el presente documento, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), aceite no metabolizable, aceites minerales y/o de plantas/vegetales y/o animales, polímeros, carbómeros, tensioactivos, compuestos orgánicos naturales, extractos vegetales, hidratos de carbono, colesterol, lípidos, emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua, HRA-3 (polímero reticulado de sacárido de ácido acrílico), HRA-3 con aceite de semilla de algodón (CSO) o preferentemente HRA-5 (polímero reticulado de polioli de ácido acrílico). La emulsión puede basarse en particular en aceite de parafina líquida ligero (del tipo de la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide tal como escualano o escualeno; aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más en particular aceites vegetales, oleato de etilo, di(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferentemente tensioactivos no iónicos, en particular, ésteres de sorbitano, de manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados, y bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, especialmente L121. Véase Hunter *et al.*, The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.) John Wiley and Sons, NY, págs. 51-94 (1995) y Todd *et al.*, Vaccine 15:564-570 (1997). En un aspecto preferido, el adyuvante está a una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 %, preferentemente a una concentración de aproximadamente 2 % a 30 %, más preferentemente a una concentración de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 %, aún más preferentemente a una concentración de aproximadamente 7 % a aproximadamente 22 % y lo más preferentemente a una concentración de aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 % en volumen del producto final.

Como se usa en el presente documento, "un vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéutico" incluye todos y cada uno de los excipientes, disolventes, medios de cultivo, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes inactivadores, agentes antimicrobianos, antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción y similares. Dichos ingredientes incluyen los que son seguros y apropiados para su uso en aplicaciones veterinarias. En algunos aspectos preferidos, y especialmente los que incluyen composiciones inmunógenas liofilizadas, los agentes estabilizantes para su uso en la presente divulgación incluyen estabilizantes para liofilización o criodesecación.

Los "diluyentes" pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina

y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetracético, entre otros.

En un aspecto preferido, se prepara la composición inmunógena de la presente divulgación que comprende un conservante y un estabilizante; y, más preferentemente, se prepara la composición inmunógena de la presente divulgación que comprende anfotericina, formaldehído, gentamicina, EDTA, glicerol y combinaciones de los mismos.

Una "composición inmunógena o inmunológica" se refiere a una composición de materia que comprende al menos un antígeno, que induce una respuesta inmunológica en el hospedador de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores, y/o linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T gamma-delta, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el hospedador presentará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de modo que se potencie la resistencia a una nueva infección y/o se reducirá la gravedad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará mediante una reducción o falta de signos clínicos normalmente presentados por un hospedador infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o una menor duración o una disminución del título bacteriano en los tejidos o líquidos corporales o excreciones del hospedador infectado.

La expresión "que necesite dicha administración" o "que necesite dicho tratamiento de administración", como se usa en el presente documento significa que la administración/tratamiento está asociado con el refuerzo o la mejora de la salud o cualquier otro efecto medicinal positivo en la salud de los animales que reciben la composición inmunógena de acuerdo con la presente divulgación, tal como reducir la incidencia o la gravedad de una infección o enfermedad vírica.

"Virus de la rinitis equina A (ERAV)" se refiere a un *Aphthovirus* en la familia *Picornaviridae* y anteriormente se conocía como rinovirus equino 1. "ERAV" como se usa en el presente documento incluye formas inactivadas. En un aspecto, el ERAV es la cepa ERAV/ON/05 que tiene el número de referencia PTA-11828 depositada el 14 de abril de 2011 en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, apartado de correos 1549 Manassas, VA 20108 EE. UU.) de acuerdo con el Tratado de Budapest y que se recuperó del cultivo celular de riñón de conejo 13 (RK-13) de un hisopo nasal de un caballo en Ontario, Canadá en 2005. El ERAV/ON/05 cuando se transcribe de forma inversa y se secuencian tiene la SEQ ID NO: 1 en su región 5' UTR.

La secuencia genómica transcrita inversa de ERAV/ON/05 es la SEQ ID NO: 2.

La poliproteína codificada por la secuencia genómica de ERAV/ON/05 es la SEQ ID NO: 3.

Las cepas de ERAV útiles en las composiciones inmunógenas de la divulgación tienen secuencias de nucleótidos 5' UTR transcritas de forma inversa que tienen más de 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, las cepas de ERAV tienen secuencias genómicas que cuando se transcriben de forma inversa en ADN son más de 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la SEQ ID NO: 2 o tienen secuencias codificantes de poliproteínas que son más de 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la secuencia codificante de poliproteínas en la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, los ERAV tienen poliproteínas con una secuencia de aminoácidos más de 95 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 o a la secuencia de VP1 dentro de la SEQ ID NO: 3. En otros aspectos más, el ERAV tiene una proteína L, VP2, VP3, VP4, VP0, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C o 3D, que tienen una secuencia de aminoácidos con más de 80 %, más de 90 %, más de 99 % o 100 % de identidad con la misma proteína que se encuentra en la SEQ ID NO: 3. Todas las cepas de ERAV son, cuando no están inactivadas o atenuadas, infecciosas y capaces de replicarse en células hospedadoras.

"Virus de la rinitis equina B (ERBV)" se refiere a un *Erbovirus* en la familia *Picornaviridae* y anteriormente se conocía como rinovirus equino 2. "ERBV" como se usa en el presente documento incluye formas inactivadas. En una realización, el ERBV es una cepa depositada en la ATCC que se recuperó del cultivo celular de riñón de conejo 13 (RK-13) de un hisopo nasal de un caballo en Ontario, Canadá (número de referencia de ATCC: PTA-11829) que se depositó en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, apartado de correos 1549 Manassas, VA 20108, EE. UU.) el 14 de abril de 2011 según el Tratado de Budapest. Las cepas de ERBV útiles en las composiciones inmunógenas de la divulgación tienen secuencias genómicas que cuando se transcriben de forma inversa en ADN son más de 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas al transcrito inverso de la secuencia genómica de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829, o tienen secuencias codificantes de poliproteínas que son más de 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la secuencia codificante de poliproteína de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829. En algunos aspectos, las cepas de ERBV útiles tienen poliproteínas con una secuencia de aminoácidos más de 95 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de poliproteína de la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829. En otros aspectos más, el ERBV tiene una proteína L, VP4, VP2, VP3, VP1, 2A, 2B, 2C, 3A (Vpg), 3B, 3Cpro, 3Dpol que tienen una secuencia de aminoácidos con más de 80 %, más de 90 %, más de 99 % o 100 % de identidad con la misma proteína encontrada en la cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829. Todas las cepas de ERBV son, cuando no están inactivadas o atenuadas, infecciosas y capaces de replicarse en células hospedadoras.

La expresión antígeno de "virus del Nilo Occidental" significa, pero sin limitación, los componentes del virión de WNV que son inmunógenos cuando están presentes en un animal, y más en particular componentes proteicos, tales como proteínas de envoltura y no estructurales, del WNV que provocan respuestas inmunitarias humorales o celulares cuando están presentes en un animal. Dichos antígenos pueden incluir ADN, subunidades proteicas, virus vivos modificados y virus inactivado. En formas preferidas de la divulgación, el antígeno o antígenos de WNV comprenden cepas de WNV inactivadas o destruidas, e incluso más preferentemente, dominante norteamericano.

La expresión "(cepas de) virus del Nilo occidental norteamericano" se refiere a, pero sin limitación, ninguna cepa del virus del Nilo Occidental que se haya descubierto en el continente norteamericano. Preferentemente, una cepa del virus del Nilo occidental norteamericano tiene una identidad de secuencia con la cepa NY99 (n.º de referencia de GenBank AF196835 o secuencia de referencia del NCBI NC_00942.1 de al menos 97 %, incluso más preferentemente, al menos 98 %, aún más preferentemente, al menos 98,5 %, más preferentemente, al menos 99 %, incluso más preferentemente, al menos 99,2 % y, más preferentemente, de al menos 99,4 %. WN02 es un ejemplo representativo de una cepa de WNV que se puede denominar cepa del virus del Nilo occidental dominante norteamericano. Específicamente, las cepas dominantes norteamericanas son las que tienen al menos 1 cambio de nucleótidos que da como resultado un cambio de aminoácidos de los aislados de WN99. La cepa NY99 (n.º de referencia de GenBank AF196835) actúa como una cepa de referencia para determinar si una cepa es dominante norteamericana. Además, estas cepas pueden tener uno o más cambios silenciosos de aminoácidos. En algunos aspectos, el cambio de nucleótidos da como resultado un cambio de aminoácidos en una proteína de envoltura de la cepa y, más preferentemente, el cambio de nucleótidos da como resultado un cambio de aminoácidos de valina a alanina. Preferentemente, este cambio de aminoácidos está asociado con una mayor capacidad de replicación en el hospedador intermedio, en concreto, el mosquito. Más preferentemente, las cepas dominantes norteamericanas incluyen una mutación de U a C (y preferentemente ambas) y una mutación de C a U en las posiciones 1442 y 2466 (en comparación con una cepa norteamericana, por ejemplo, NY 99), respectivamente. Aún más preferentemente, las cepas dominantes norteamericanas incluyen además una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína E y la mutación de C a U en la posición 9352 en la secuencia que codifica la proteína NS5 (de nuevo en comparación con una cepa norteamericana, por ejemplo, NY 99). Estas mutaciones preferidas se muestran en el análisis filogenético de los aislados del virus del Nilo occidental norteamericano, 2001-2004: Evidence For the Emergence of a Dominant Genotype, C. Todd Davis, *et al.*, *Virology* 342, pág. 252-265 (2005). Las cepas del virus del Nilo occidental, para los fines de la presente divulgación, no se limitan a las cepas del virus del Nilo occidental de caballo y equinas, sino que abarcan, sin limitación, las cepas del virus del Nilo occidental de origen aviar, origen asinino, origen porcino, origen humano, origen mamífero y origen equino.

La "identidad de secuencia" como se conoce en la técnica se refiere a una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, a saber, una secuencia de referencia y una secuencia dada para comparar con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de que las secuencias se hayan alineado de manera óptima para producir el mayor grado de similitud de secuencia, según lo determinado por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. Tras dicho alineamiento, la identidad de secuencia se determina posición a posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si, en esa posición, los nucleótidos o restos de aminoácidos son idénticos. El número total de dichas identidades de posición se divide después por el número total de nucleótidos o restos en la secuencia de referencia para proporcionar el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Parte I*, Griffin, A.M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H. y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia están codificados en programas informáticos disponibles públicamente, que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Los ejemplos de dichos programas incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en el NCBI y otras fuentes (Manual de BLAST, Altschul, S. *et al.*, NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). Estos programas alinean de manera óptima las secuencias usando pesos de hueco predeterminados para producir el mayor nivel de identidad de secuencia entre las secuencias dadas y las de referencia. Como ilustración, por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, 85 %, preferentemente 90 %, incluso más preferentemente 95 % de "identidad de secuencia" con una secuencia de nucleótidos de referencia, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia polinucleotídica dada puede incluir hasta 15, preferentemente hasta 10, incluso más preferentemente hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85 %, preferentemente 90 %, incluso más preferentemente 95 % de identidad con respecto a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 15 %, preferentemente 10 %, incluso más preferentemente 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede suprimirse o sustituirse con otro nucleótido, o varios nucleótidos hasta 15 %, preferentemente 10 %, incluso más preferentemente 5 % del total de

nucleótidos en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones 5' y 3' terminal de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. De manera análoga, por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos dada que tiene al menos, por ejemplo, 85 %, preferentemente 90 %, incluso más preferentemente 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos dada del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia polipeptídica dada puede incluir hasta 15, preferentemente hasta 10, incluso más preferentemente hasta 5 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia polipeptídica dada que tenga al menos 85 %, preferentemente 90 %, incluso más preferentemente 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 15 %, preferentemente hasta 10 %, incluso más preferentemente, hasta 5 % de los restos de aminoácidos en la secuencia de referencia pueden suprimirse o sustituirse con otro aminoácido, o varios aminoácidos hasta 15 %, preferentemente hasta 10 %, incluso más preferentemente, hasta 5 % del número total de restos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los restos en la secuencia de referencia o en el o los grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Sin embargo, las sustituciones conservadoras no se incluyen como una coincidencia cuando se determina la identidad de secuencia. En la presente divulgación, se entiende que la SEQ ID NO: 1 (5' UTR) y la SEQ ID NO: 2 son las secuencias de ADN que resultan de la transcripción inversa de la 5' UTR y el genoma completo de ERAV/ON/05, respectivamente. De forma análoga, la SEQ ID NO: 3 se refiere a la secuencia de aminoácidos correspondiente a la poliproteína codificada por la secuencia genómica de ERAV/ON/05. Por tanto, se entiende que el porcentaje de identidad de una cepa de ERAV dada en comparación con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 se refiere a la secuencia de ADN correspondiente resultante de transcripción inversa y secuenciación.

"DICT₅₀" se refiere a la dosis infecciosa de cultivo tisular que infecta al 50 % de las células en un cultivo inoculado con el virus.

Para los fines de la presente invención, los términos "cepa" y "aislado" tienen el mismo significado y se usan indistintamente.

Los "signos clínicos" o "síntomas clínicos" para ERAV y ERBV incluyen, pero sin limitación, pirexia, elevación de temperatura, aumento de los ruidos pulmonares, linfadenopatía, secreción nasal, secreción ocular, y tos y faringitis. Otros signos o síntomas más incluyen anemia, anorexia, linfadenitis de la cabeza y el cuello, edema de las piernas, letargo y dolor. Adicionalmente, los signos clínicos de infecciones por ERAV y/o ERBV pueden incluir los asociados con el virus del herpes equino y el virus de la gripe equina. En un aspecto, los signos clínicos para ERAV incluyen tos, faringitis, pirexia, elevaciones de temperatura, aumento del tamaño de los ganglios linfáticos submandibulares, secreción nasal y secreción ocular. En determinados aspectos, los signos clínicos de ERAV incluyen una mayor incidencia de aborto en yeguas preñadas. En otro aspecto, los signos clínicos para abordar mediante una composición inmunológica desvelada en el presente documento son los de infecciones respiratorias, tales como los provocados por uno o más de ERAV, ERBV, EIV, EHV-1 y EHV-4.

Los "signos clínicos" o "síntomas clínicos" del virus del Nilo Occidental, para los fines de la presente divulgación, incluyen, pero sin limitación, síntomas o lesiones asociados con encefalitis, viremia, anorexia, depresión, fiebre, debilidad, trastornos de la marcha, parálisis de las extremidades posteriores, deficiencia visual, ataxia, deambulación sin rumbo, convulsiones, incapacidad para tragar, coma, debilidad posterior, parálisis, mala coordinación, depresión y comportamiento relacionado, temblores, convulsiones, movimiento de remo de las extremidades, problemas neurológicos, hinchazón del sistema nervioso central, muerte y combinaciones de los mismos. Los signos clínicos presentados por un animal infectado varían dependiendo de la gravedad de la infección.

Los "signos clínicos" o "síntomas clínicos" del virus del herpes equino, para los fines de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, aborto, deficiencias neurológicas, enfermedad respiratoria, deficiencias y fallo del aparato reproductor y síntomas relacionados con el sistema nervioso central. Adicionalmente, los síntomas clínicos de EHV1 incluyen, pero sin limitación, el fenómeno de los potros infectados con EHV1, que presentan complicaciones respiratorias, que transmiten el virus a los miembros mayores de la manada que después presentan deficiencias reproductivas, incluyendo aborto, y deficiencias neurológicas, normalmente presentadas en el sistema nervioso central.

Los "signos clínicos" o "síntomas clínicos" de la encefalomiелitis equina oriental, encefalomiелitis equina occidental y encefalomiелitis equina venezolana, para los fines de la presente divulgación son los síntomas que se sabe que normalmente están asociados con la encefalomiелitis, incluyendo, pero sin limitación, fiebre, signos nerviosos como sensibilidad al sonido, periodos de emoción e inquietud, lesiones cerebrales, somnolencia, orejas caídas, movimiento en círculos, trastornos de la marcha, parálisis, pérdida de apetito, depresión, presión de la cabeza contra la pared, falta de coordinación, discapacidad a largo plazo, daño cerebral, muerte y combinaciones de los mismos. "Seguridad",

como se usa en el presente documento, se refiere a la ausencia de consecuencias adversas en el animal vacunado después de la vacunación, incluyendo, pero sin limitación, posible reversión del virus de la vacuna a virulencia y efectos secundarios clínicamente significativos, tales como enfermedad sistémica persistente o inflamación inaceptable en el sitio de administración de la vacuna.

5 "Reducción de la incidencia y/o gravedad de los signos clínicos" o "reducción de la incidencia y/o gravedad de los síntomas clínicos", como se indica en el presente documento, significa reducir el número de animales infectados en un grupo, reducir o eliminar el número de animales que presentan signos clínicos de infección o reducir la gravedad de cualquier signo clínico que esté presente en los animales, en comparación con infección de tipo silvestre. Por ejemplo, dichos signos clínicos incluyeron viremia, fiebre, respuesta de anticuerpos, secreción ocular, secreción nasal e histopatología. Preferentemente, estos se reducen en animales que reciben la composición de la presente divulgación en al menos 10 % en comparación con los animales que no reciben la vacunación, que pueden infectarse. Más preferentemente, se reducen los signos clínicos en animales que reciben la composición de la presente divulgación en al menos 20 %, más preferentemente en al menos 30 %, incluso más preferentemente en al menos 40 % e incluso más preferentemente en al menos 50 %.

"Duración de la inmunidad", como se usa en el presente documento, se refiere al número mínimo de días durante los que un animal produce una respuesta inmunógena de manera que el animal sea relativamente inmune a contraer un virus y/o se beneficie de la reducción de la incidencia y/o gravedad de los signos clínicos, como se describe en el presente documento.

Las expresiones "inactivado" y "virus inactivado" se refieren a un virus previamente virulento que se ha calentado o tratado químicamente para inactivar, destruir o modificar de otro modo el virus para eliminar sustancialmente sus propiedades virulentas conservando al mismo tiempo su inmunogenicidad. En un aspecto preferido, los virus inactivados desvelados en el presente documento se inactivan mediante tratamiento con un agente inactivador. Los agentes inactivadores adecuados incluyen beta-propiolactona, etilenimina binaria, glutaraldehído y formaldehído. En algunos aspectos, el agente inactivador es formaldehído.

Se entiende que las expresiones "vacuna" y "composición inmunógena", cuando se usan en el presente documento, se usan indistintamente.

Cualquier cepa o aislado del virus del Nilo occidental se puede usar de acuerdo con la presente divulgación. En un aspecto preferido, el aislado se selecciona entre uno o más de los siguientes: aislado de Nueva York (norteamericano del noreste) (WNNY 99), origen equino, 1999, aislado de Nueva York (norteamericano del noreste) (WN-NY 99), origen corvino, 1999, aislado 292206 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA 2004), origen asinino, aislado 405330 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA 2005), origen equino, aislado norteamericano (WN-Texas-2002/2003), aislado costero del sureste de Texas 2002, aislado de México (Tabasco) 2003 y combinaciones de los mismos y, en un aspecto más preferido, el aislado se selecciona entre uno o más de los siguientes: aislado 292206 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA 2004), origen asinino, aislado 405330 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA 2005), origen equino, aislado norteamericano (WN-Texas-2002/2003), aislado costero del sureste de Texas 2002, aislado de México (Tabasco) 2003 y combinaciones de los mismos. En un aspecto más preferido, el aislado es el aislado 405330 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA 2005), origen equino, individualmente o en combinación con uno o más aislados como se ha enumerado anteriormente. En un aspecto adicionalmente preferido, se incluyen los aislados que forman parte de los aislados del virus del Nilo Occidental norteamericanos. En otro aspecto preferido más, se incluyen aislados del virus del Nilo Occidental dominantes norteamericanos. Además de los enumerados anteriormente, los aislados específicos incluyen, pero sin limitación, WN02 y aislados que tienen al menos 1, preferentemente al menos 2 e incluso más preferentemente al menos 3 cambios de nucleótidos que dan como resultado al menos un cambio de aminoácido de los aislados WN NY99 y se son más preferentes cepas con el cambio de aminoácido de valina a alanina en la posición 159 de la proteína de la envoltura. Las cepas dominantes norteamericanas más preferentes incluyen, pero sin limitación: NY2002Nassau, NY2002Clinton, NY2002Queens, GA20021, GA20022, TX20021, TX20022, IN2002, NY2003Albany, NY2003Suffolk, NY2003Chatauqua, CO20031, CO20032, TX2003, TX2003Harris4, TX2003Harris6, TX2003Harris7, TX2003Harris10, AZ2004 y TX2004Harris4, y combinaciones de los mismos. Las cepas del virus del Nilo Occidental útiles en la vacuna o composición inmunógena de la presente divulgación pueden ser cualquier cepa o aislado. En un aspecto preferido, la cepa del virus del Nilo occidental dominante norteamericano usada es E-159 (origen equino) o E-159 (origen asinino). Una cepa representativa de dicha cepa de WNV dominante norteamericana incluye la cepa de origen equino 2005 depositada en la ATCC (n.º de referencia de ATCC: PTA-9409), ubicada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209, el 14 de agosto de 2008, según las disposiciones del Tratado de Budapest. Las cepas de gripe equina útiles en la vacuna o composición inmunógena de la presente divulgación pueden ser cualquier cepa o aislado. Las cepas representativas incluyen Equi-2/Ohio/03, depositada con el n.º de referencia de ATCC: PTA-9522, Equi-2/Kentucky/95, depositada con el n.º de referencia de ATCC: PTA-9523 y Equi-2/New Market/2/93, depositada con el n.º de referencia de ATCC: PTA-9524. Los n.º de referencia ATCC de cepas representativas PTA-9522, PTA-9523 y PTA-9524 fueron depositados cada uno en la ATCC en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209 el 23 de septiembre de 2008, según las disposiciones del Tratado de Budapest.

Las cepas de virus del herpes equino ("EHV") útiles en la vacuna o composición inmunógena de la presente divulgación

5 pueden ser cualquier cepa o aislado. Las cepas representativas incluyen EHV Subtipo 1, depositada con el n.º de referencia de ATCC: PTA-9525 y EHV Subtipo 4, depositada con el n.º de referencia de ATCC: PTA-9526. Los n.º de referencia ATCC de cepas representativas PTA-9525 y PTA-9526 fueron depositados cada uno en la ATCC en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209 el 23 de septiembre de 2008, según las disposiciones del Tratado de Budapest.

10 Las cepas de encefalomiелitis equina occidental útiles en la vacuna o composición inmunógena de la presente divulgación pueden ser cualquier cepa o aislado. Una cepa representativa incluye la cepa Fleming, depositada en la ATCC (n.º de referencia de ATCC: PTA-9410), ubicada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209, el 14 de agosto de 2008, según las disposiciones del Tratado de Budapest.

15 Las cepas de encefalomiелitis equina venezolana útiles en la vacuna o composición inmunógena de la presente divulgación pueden ser cualquier cepa o aislado. Una cepa representativa incluye la cepa TC-83, depositada en la ATCC (n.º de referencia de ATCC: PTA-9411), ubicada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209, el 14 de agosto de 2008, según las disposiciones del Tratado de Budapest.

20 Las cepas de encefalomiелitis equina oriental útiles en la vacuna o composición inmunógena de la presente divulgación pueden ser cualquier cepa o aislado. Una cepa representativa incluye la cepa NJO, depositada en la ATCC (n.º de referencia de ATCC: PTA-9412), ubicada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209, el 14 de agosto de 2008, según las disposiciones del Tratado de Budapest.

25 Las cepas de toxoide tetánico útiles en la vacuna o composición inmunógena de la presente divulgación pueden ser cualquier cepa o aislado. Una cepa representativa es la tomada de una semilla maestra de *Clostridium tetani* del Instituto de Laboratorios del Departamento de Salud Pública de Massachusetts en Boston, Massachusetts.

30 La vacuna o composición inmunógena como se desvela en el presente documento es segura para su administración en especies susceptibles a ERAV o ERBV, en particular équidos, a cualquier edad. En un aspecto preferido, la presente divulgación es segura para su administración a potros de 12 meses de edad o mayores, más preferentemente, es segura para su administración a potros de 10 meses de edad o mayores, más preferentemente, es segura para su administración a potros de 8 meses o mayores, más preferentemente, es segura para su administración a potros de 6 meses de edad o mayores, más preferentemente, es segura para su administración a potros de 4 meses de edad o mayores, más preferentemente, es segura para su administración a potros de 2 meses de edad o mayores, más preferentemente, es segura para su administración a potros de 1 mes de edad o mayores, incluso más preferentemente, es segura para su administración a potros entre 1 día y 1 mes de edad y, lo más preferentemente, es segura para su administración a potros de 1 día de edad o mayores.

40 Las composiciones como se desvelan en el presente documento pueden administrarse de cualquier manera convencional. Los ejemplos de métodos de administración incluyen cualquiera que permita el acceso de las células del sistema inmunitario a la composición inmunógena, incluyendo oral, transdérmica/intradérmica, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal, intrapulmonar o cualquier combinación de las mismas. En un aspecto preferido, la vacuna se administra por vía parenteral, preferentemente por vía intranasal, por vía subcutánea o por vía intramuscular y, en el aspecto más preferido, la vacuna se administra por vía intramuscular.

45 En un aspecto, se desvela un método para preparar una composición inmunógena que comprende un ERAV y/o ERAB como se desvela en el presente documento. En un aspecto, el método comprende:

- a) infectar una línea celular susceptible con ERAV o ERBV;
- 50 b) cultivar la línea celular infectada en medios de cultivo hasta que se logre un efecto citopático (CPE);
- c) recoger los medios;
- d) filtrar los medios para producir un medio filtrado; y
- 55 e) poner en contacto los medios filtrados con un agente inactivador para obtener el ERAV o ERBV inactivado.

60 En un aspecto de la divulgación, el método comprende proporcionar la cepa ERAV/ON/05 o una cepa de ERBV que tenga el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829. Estas cepas se usan para infectar una línea celular susceptible que tiene propiedades ventajosas de crecimiento y secreción útiles para la preparación de vacunas. Una línea celular susceptible preferida es una línea celular Vero tal como una línea celular Vero76 o E-Vero.

65 Los medios de cultivo adecuados incluyen E199. Este medio puede complementarse con solución de L-glutamina y un antibiótico tal como solución de sulfato de gentamicina. En algunos aspectos, el medio de cultivo es E199 suplementado con solución de L-glutamina (hasta 2 mM) y solución de sulfato de gentamicina (hasta 30 µg/ml). En algunos aspectos, se recogen líquidos víricos cuando el efecto citopático CPE alcanza 75 % o más. Los medios

recogidos se agrupan y filtran, tal como a través de cartuchos de filtro de polipropileno con un tamaño de poro de 5,0 micrómetros. Las cepas se inactivan químicamente, tal como mediante tratamiento con solución de formaldehído al 0,1-0,2 % durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo de 48 horas a 72 horas, y los líquidos resultantes se concentran. En algunos aspectos, se añaden a continuación conservantes y adyuvantes. Los conservantes adecuados incluyen uno o más de anfotericina B, sulfato de gentamicina y formaldehído. En otros aspectos, el adyuvante es HRA-5. En otros aspectos más, el adyuvante es HRA-3 con aceite de algodón (CSO).

En un aspecto y de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento, se desvela una composición inmunógena que comprende ERAV/ON/05 y/o una cepa de ERBV que tiene el n.º de referencia de ATCC: PTA-11829 y anfotericina B, sulfato de gentamicina, formaldehído y HRA-5 preparados según los métodos desvelados en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se exponen a continuación para ilustrar realizaciones específicas de la presente invención. Estos ejemplos son meramente ilustrativos y se entiende que no limitan el alcance o los principios subyacentes de la presente invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra una realización de una composición de virus de la rinitis equina A de acuerdo con la presente divulgación

Materiales y métodos

La cepa del virus de la rinitis equina A ERAV/ON/05 (n.º de referencia de ATCC PTA-11828) se recuperó del cultivo de células de riñón de conejo 13 (RK-13) de un hisopo nasal de un caballo en Ontario, Canadá. El virus se pasó una vez por células E-Vero para producir una reserva maestra de pretitulación alta y después se diluyó con medios de cultivo celular para producir el virus de semilla maestra. La reserva celular maestra es una línea celular E-Vero cultivada y mantenida usando E199 complementado con solución de L-Glutamina (hasta 2 mM) y solución de sulfato de gentamicina (hasta 30 µg/ml). Se produjo ERAV/ON/05 inactivado de acuerdo con el siguiente procedimiento general.

La reserva celular maestra congeladas se descongela a temperatura ambiente (18-26 °C) y se usa para inocular una serie de matraces preesterilizados T-25 cm² hasta T-150 cm² o frascos rotatorios PETG preesterilizados de 850 cm² o 1050 cm². Las células descongeladas se suspenden en medio de cultivo a una tasa de 0,15 a 0,40 ml por cm². Las células se incuban a 36-38 °C durante hasta siete días. Los cultivos sembrados a partir de reserva congelada se pueden volver a alimentar con medio para eliminar el sulfóxido de dimetilo residual (DMSO), para eliminar residuos excesivos, para estimular el crecimiento de cultivos que no han alcanzado la confluencia o para mantener la viabilidad de los cultivos confluyentes. Las células se pasan mediante decantado del medio gastado y adición de 1-10 ml (dependiendo del tamaño del recipiente), de solución de tripsina-EDTA al 25 % a cada recipiente. Los recipientes se agitan suavemente hasta que las células se desprenden de la superficie. Las células se retiran de los recipientes mediante aclarado con medio de cultivo y se agrupan entre sí. El intervalo de pases de cultivo celular es de uno a veinte.

Antes de la inoculación, se decantan del medio de cultivo celular las células que tienen al menos 90 % de confluencia. La lámina celular se aclara con 20-50 ml de medio de infección de virus (E199 complementado con solución de L-Glutamina (hasta 2 mM) y solución de sulfato de gentamicina (hasta 30 µg/ml), después se vuelve a alimentar con medios de infección de virus a la tasa de 0,15 a 0,40 ml/cm². Después se inoculan los recipientes a una Multiplicidad de Infección (MOI) de 0,0005 a 0,005. Los cultivos en frasco rotatorio se incuban a 36-38 °C durante dos a cinco días a 0,2-0,4 rpm.

Durante el periodo de crecimiento, los cultivos se comprueban para determinar el CPE microscópicamente y para determinar la contaminación a gran escala macroscópicamente. Los cultivos inadecuados se descartan después de la esterilización.

Se recogen líquidos de virus cuando el CPE alcanza el 75 % o más. Se hacen girar frascos rotatorios para retirar las células sueltas y los líquidos se agrupan en botellas de vidrio, plástico o PETG estériles de 2-20 l, recipientes de polipropileno estériles de 20 l o tanques de acero inoxidable estériles de 2-200 l apropiados para aclaraciones. Los líquidos agrupados se pueden mantener durante hasta siete días a 2-8 °C antes de la aclaración.

Solo se recogen líquidos de cultivos en monocapa que muestren pruebas de infección vírica. Se desechan los frascos que indiquen contaminación. Se recoge una muestra de líquidos agrupados, aclarados, antes de la inactivación para valoración por DICT₅₀. Pueden usarse líquidos con un título de 10^{6,2} DICT₅₀/ml o mayor en la preparación del producto final. Se pueden mezclar múltiples lotes para lograr los títulos mínimos.

Los lotes recogidos se aclaran por filtración usando cartuchos de filtro de polipropileno con un tamaño de poro de 5,0 micrómetros. Los lotes de recogida posteriores a la clarificación pueden almacenarse durante hasta siete días a 2-

8 °C. Los líquidos aclarados se inactivan después con solución de formaldehído, USP, 0,1-0,2 % por volumen, transferido a un recipiente secundario y mantenido a temperatura ambiente (18-26 °C) con agitación durante un mínimo de 48 a 72 horas. Se toma una muestra de líquidos inactivados para la prueba de certeza de inactivación antes de la concentración. El material del lote inactivado se mantiene a 2-8 °C antes de la concentración. Los líquidos de virus inactivados, aclarados, se concentran por un factor de 5X a 50X usando cartuchos de membrana de ultrafiltración de flujo tangencial con valores de corte de peso molecular de no más de 10.000 Dalton PM.

Se pueden añadir varios adyuvantes adecuados a la formulación de vacuna, más preferentemente HRA-5. Otros adyuvantes incluyen HRA-3 con aceite de semilla de algodón (CSO). Se pueden emplear etapas de procesamiento normales tales como mezcla, combinación, microfluidificación y emulsión, del adyuvante y/o los antígenos de virus recogidos con otros ingredientes.

El producto se ensambla después en la formulación final. En un método de procesamiento por lotes en una realización ejemplar, las cantidades necesarias de adyuvante y diluyente MEME se combinan en un recipiente estéril y el pH se ajusta a aproximadamente 6,3-6,7 con hidróxido de sodio. ERAV, sulfato de gentamicina, formaldehído y anfotericina B se añaden uno cada vez durante la mezcla constante. El pH se ajusta a 6,8-7,0 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico y la serie se mezcla durante un mínimo de 18 horas a 2-8 °C. La serie a granel completa se transfiere después a un recipiente de almacenamiento adecuado y se almacena a 2-8 °C. La anfotericina B se puede añadir a una concentración de hasta 2,5 µg/ml del volumen de diluyente como conservante. Se añade sulfato de gentamicina a una concentración de hasta 30 µg/ml del volumen del diluyente como conservante. Se añade formaldehído a una concentración de 0,1 % del volumen de diluyente como conservante. Se añade un adyuvante tal como HRA-5 a una concentración de 10 % v/v del volumen de serie final.

La vacuna se administra mediante inyección hipodérmica normal, con vacunas de refuerzo si se desea.

Ejemplo 2

Esta investigación se llevó a cabo para obtener una evaluación de la eficacia de una vacuna contra el virus de la rinitis equina A para proteger a los caballos de la exposición al virus de la rinitis equina A.

Materiales y métodos

Se preparó una vacuna de ERAV de dosis alta A-9 ($10^{7.5}$ DICT₅₀/ml) y dosis baja A-10 ($10^{7.0}$ DICT₅₀/ml) según el Ejemplo 1.

Tabla 1: Formulación de vacuna A-9 (1 ml):

| | |
|---|-----------------------------------|
| ERAV/ON/05 | $10^{7.5}$ DICT ₅₀ /ml |
| HRA-5 | 100 µl |
| Diluyente, MEM-E+ que contiene gentamicina, 30 µg/ml de volumen de diluyente y formaldehído, 0,1 % del volumen de diluyente | c.s. |

Tabla 2: Formulación de vacuna A-10 1 (1 ml):

| | |
|---|-----------------------------------|
| ERAV/ON/05 | $10^{7.0}$ DICT ₅₀ /ml |
| HRA-5 | 100 µl |
| Diluyente, MEM-E+ que contiene gentamicina, 30 µg/ml de volumen de diluyente y formaldehído, 0,1 % del volumen de diluyente | c.s. |

Se preparó una formulación de 1 ml de placebo V-05 como en las vacunas A-9 y A-10 pero sin el antígeno ERAV/ON/05.

Se dividieron un total de 44 caballos al azar en uno de tres grupos de tratamiento que consisten en un grupo de control de placebo V-05 de 15 caballos, un grupo de dosis baja A-10 de 14 caballos y un grupo de dosis alta A-9 de 15 caballos. Los caballos fueron vacunados con un producto de dosis de 1 ml con HRA-5 como adyuvante para tres dosis totales, con un intervalo de 21 días entre dosis. Los caballos se expusieron posteriormente 21 días después de la tercera vacunación mediante aerosolización intranasal con una dosis de $10^{7.0}$ DICT₅₀/ml de Rinitis A nebulizada durante un periodo de cuatro minutos. Los caballos se evaluaron para determinar signos clínicos de signos de temperatura, exudado nasal, secreción ocular diaria. Se tomó sangre para neutralización de suero (SN) semanalmente.

Virus de exposición

El virus de exposición se produjo en cultivo tisular en células E-Vero. Se determinó que el título del virus de exposición era $1 \times 10^{6.9}$ DICT₅₀/ml el día de exposición. El virus de exposición se diluyó en la mañana de la exposición 1:10 con medios de cultivo tisular para efectuar un título de $1 \times 10^{5.9}$ DICT₅₀/ml.

Método de exposición intranasal

Sedivet® (clorhidrato de romifidina), un sedante y analgésico, se administró por vía intravenosa a cada caballo antes de la exposición a una dosis de 50 µg/kg de peso corporal. Cada caballo se expuso después a aproximadamente 10^{6,2} DICT50 de virus de la rinitis equina A. El virus de exposición se administró por vía intranasal como un aerosol producido por un nebulizador en un AeroMask equino (Trudell Medical International, Ontario, Canadá) mediante el siguiente método.

Se colocaron cuatro mililitros de 10^{5,9} DICT₅₀/ml de virus de exposición en el vaso del nebulizador en el dispositivo AeroMask. Se instaló una manguera de presión desde un compresor de aire hasta la toma de entrada del nebulizador. Después se insertó el tubo de salida en la Aero Mask unida a la cabeza del caballo que se exponía y se aplicaron aproximadamente 68,95 kPa (10 psi) de presión de aire a la toma de entrada durante tres minutos. Durante este tiempo, se aerosolizaron aproximadamente dos mililitros de líquido de virus de exposición directamente en las narinas del caballo que se exponía.

Neutralización de suero

En este estudio se empleó una prueba de neutralización de suero de microtitulación convencional. En este estudio se empleó una prueba de neutralización de suero de microtitulación convencional. Todos los sueros se ensayaron en placas de microtitulación de fondo plano estériles usando cinco pocillos por dilución y una serie de diluciones de 8 pocillos para cada uno de los 5 pocillos de ensayo. Cada uno de los 5 pocillos de ensayo contenía 25 µl de dilución de suero mezclada con 25 µl del virus indicador y 150 µl de una suspensión de células eVero recién plantadas que contenía aproximadamente 5 X 10⁴ células. El virus indicador de ensayo usado fue el virus de la rinitis equina de tipo I. Los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero se expresan como títulos de DI₅₀ de Reed-Muench.

Para la realización del ensayo, se realizaron diluciones dobles de cada suero de ensayo en una placa de microtitulación de fondo plano estéril usando cinco pocillos repetidos por suero de ensayo y una serie de diluciones de 8 pocillos. Se realizaron diluciones con un instrumento de pipeteo de un solo canal o multicanal de volumen ajustable usando puntas de microtitulación estériles. El volumen de suero añadido a cada uno de los 5 pocillos de la primera fila fue de 50 µl. Todos los otros pocillos contenían 25 µl de DMEM (sin FBS). Después de la dilución en serie por la placa, se descartaron 25 ml de la última fila. Se añadieron 25 µl de una dilución predeterminada del virus indicador a cada pocillo de ensayo. Las placas se mezclaron e incubaron durante una hora a 37 °C en CO₂ al 5 %. Al concluir el periodo de incubación, se añadieron 150 µl de una suspensión que contenía 4 x 10⁶/ml de células eVero a cada pocillo de ensayo y control celular. Las placas se incubaron a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 5 días, momento en el cual las placas se examinaron microscópicamente para detectar el CPE normal del virus de la rinitis equina.

Evaluación de exudado nasal

Todas las observaciones de exudado nasal se realizaron antes de la recogida de los hisopos nasofaríngeos. El día de la exposición y durante 10 días después de la exposición, las fosas nasales y el hocico de cada uno de los 44 caballos vacunados y de control se examinaron y clasificaron usando la descripción de clasificación y puntuación enumerada a continuación.

Las puntuaciones de 0 a 6 se asignaron en función de la gravedad de la enfermedad indicada por cada una de las siguientes clasificaciones:

Tabla 3: Puntuaciones

| Puntuación | Descripción de los síntomas |
|------------|--|
| 0 | Esencialmente normal indica que el caballo estaba limpio y esencialmente exento de exudado nasal |
| 1 | Secreción serosa leve transparente que puede observarse con frecuencia en caballos tanto enfermos como normales |
| 1,5 | La secreción mucopurulenta muy leve indica que el moco definitivamente estaba presente en pequeñas cantidades en una o ambas narinas |
| 2 | La secreción serosa transparente moderada es indicativa de un aumento definido en el volumen sobre el observado normalmente |
| 2 | Ligeramente mucopurulenta es una secreción fácilmente observable en una o ambas narinas |
| 3 | Secreción serosa transparente y abundante que se observa en general solo en caballos enfermos |
| 4 | Moderadamente mucopurulenta indica que estaban presentes secreciones mucosas en grandes cantidades en ambas narinas |
| 6 | Mucopurulenta pesada indica que abundantes cantidades de secreción mucosa llenaban ambas narinas |

Evaluación ocular

La secreción ocular se evaluó diariamente en el momento de la evaluación del exudado nasal. Las puntuaciones de secreción ocular se registraron como 0=normal; 1=secreción ocular leve a moderada y 2=secreción ocular grave.

5 Aislado vírico nasofaríngeo

En cada día de prueba de observación, se tomaron hisopos profundos en cada fosa nasal de cada caballo vacunado y de control mediante una lanza quirúrgica estéril WECK-CELTM (Edward Week and Company, Inc., Research Triangle Park, N.C. 27709) unida a una pipeta de plástico estéril de 27,94 cm (11 pulgadas) de longitud. Tras la recogida, cada una de las dos lanzas quirúrgicas se colocó inmediatamente en un solo tubo que contenía 4 ml de medio de transporte refrigerado (E-199 complementado con gentamicina, L-glutamina, Pen/Strep 2X, anfotericina B 2X).

15 Para el aislamiento de virus, los tubos se mezclaron, los hisopos se retiraron de manera aséptica y el medio se centrifugó a 1500 rpm durante 10 a 15 minutos para retirar las partículas. El medio se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µl antes de la inoculación en células de cultivo tisular. Después de la filtración, se añadió 4-6 % de solución estéril de sacarosa al 85 % a cada muestra para congelar a -80 °C con el fin de ensayar todas las muestras simultáneamente.

20 Para el aislamiento de virus, los tubos se mezclaron, los hisopos se retiraron de manera aséptica y el medio se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos para retirar las partículas. El medio se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µl antes de la inoculación en células de cultivo tisular. Se usó un ml del medio de transporte aclarado para inocular una monocapa de dos días de 2 cm² de células E-Vero cultivadas en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos de la que se había retirado de manera aséptica el medio de cultivo. Después de la inoculación, se permitió que el inóculo se adsorbiera en la monocapa celular durante una hora a 37 °C en una incubadora humidificada que contenía una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después del periodo de adsorción, se añadió 1 ml adicional de medio de realimentación (E-199 que contenía suero bovino fetal (FBS) al 7 %, L-glutamina 2 mM, gentamicina Pen-Strep 2X y anfotericina B 2X) a cada pocillo. Tras la adición de medios de realimentación, las placas se incubaron después a 37 °C en una incubadora de CO₂. Cada pocillo de cultivo tisular de ensayo y control se examinó microscópicamente durante 7 días para detectar signos de efecto citopático (CPE) típico del virus de exposición ERAV. Se subcultivaron pocillos que eran negativos al final del periodo de observación de 7 días en células nuevas y se observaron durante 7 días adicionales.

MÉTODOS DE EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

35 Los datos de todos los caballos vacunados con A-9 o A-10 se combinaron para evaluación estadística. La influencia de la vacunación en la duración de la enfermedad (número de días con puntuaciones nasales >0) se evaluó usando el ensayo de Kruskal-Wallis y Hodges-Lehmann (el procedimiento NPAR1WAY en SAS, SAS Institute, Cary NC). La gravedad de la enfermedad se evaluó comparando el estado máximo de la enfermedad entre los caballos vacunados y los caballos de control. Las puntuaciones nasales se dividieron en ≤1,5 y >1,5 basándose en la distribución de los resultados. Se estimaron la fracción prevenida (FP) e intervalos de confianza (IC) al 95 %. Las puntuaciones oculares se evaluaron como presentes o ausentes y se estimaron la fracción evitada y los intervalos de confianza al 95 % (el procedimiento FREQ en SAS). Se usó análisis de medidas repetidas apropiado para datos continuos para evaluar el efecto de la vacunación sobre la temperatura corporal y los títulos de neutralización en suero (el procedimiento MIXED en SAS). La proporción de caballos que eran positivos para virus a lo largo del tiempo y positivos para capa leucocitaria se evaluó usando el ensayo exacto de Fisher en cada punto temporal (el procedimiento Freq). Las puntuaciones nasales y oculares se evaluaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon en cada punto temporal (el procedimiento NPAR1WAY).

50 Resultados y conclusiones

AISLAMIENTO DE VIRUS DE HISOPOS NAALES (excreción de virus) y CAPAS LEUCOCITARIAS (viremia)

55 La proporción de animales que fueron positivos para el virus fue significativamente menor en los grupos vacunados los días 2 a 7 (Tabla 4 posterior y Figura 1) en comparación con el grupo de control (P<0,05).

Tabla 4. Proporción de hisopo nasal positivo para virus a lo largo del tiempo (*P<0,05 frente a control, prueba exacta de Fisher cada día)

| Día | Control | A-9 | A-10 | A-9 + A-10 |
|-----|---------|-----|------|------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 25 | 7,1 | 7,7 | 7,4 |

(continuación)

| Día | Control | A-9 | A-10 | A-9 + A-10 |
|-----|---------|-------|-------|------------|
| 2 | 100 | 20* | 23,1* | 21,4* |
| 3 | 100 | 46,7* | 57,1* | 51,7* |
| 4 | 100 | 60* | 57,1* | 58,6* |
| 5 | 93,3 | 53,3* | 35,7* | 44,8* |
| 6 | 60 | 40 | 0* | 20,7* |
| 7 | 100 | 46,7* | 78,6 | 62,1* |
| 8 | 26,7 | 13,3 | 0 | 13,8 |
| 9 | 0 | 6,7 | 0 | 3,5 |
| 10 | 0 | 6,7 | 0 | 3,5 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Los animales positivos para capa leucocitaria fueron menos frecuentes en el grupo vacunado los días 4-7 en comparación con el grupo de control (Tabla 5 posterior y Figura 2).

5

Tabla 5: Proporción de capa leucocitaria positiva a lo largo del tiempo (*P<0,05 frente a control, prueba exacta de Fisher cada día)

| Día | Control | A-9 | A-10 | A-9 + A-10 |
|-----|---------|-------|------|------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 6,7 | 0 | 7,1 | 3,5 |
| 4 | 73,3 | 0* | 7,1* | 3,5* |
| 5 | 80 | 13,3* | 0* | 6,9* |
| 6 | 80 | 0* | 7,1* | 3,5* |
| 7 | 33,3 | 0* | 0* | 0* |
| 8 | 0 | 0 | 7,1 | 3,5 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 13,3 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 7,1 | 3,5 |

Neutralización de suero

Tabla 6: Sumario de temperatura corporal y neutralización sérica

| Variable | Valores de p | | |
|--------------------------------|--------------|----------|--------------|
| | Vacuna | Día | Vacuna * Día |
| Temperatura | 0,9269 | < 0,0001 | 0,0255 |
| Título de SN (en transformado) | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |

5 Los valores medios de temperatura corporal (temperatura rectal medida con la sonda de termómetro GSA Electronics calibrada) cada día de exposición siempre estuvieron dentro de los parámetros normales de temperatura corporal. Se encontraron grandes aumentos en los títulos de SN resultantes de la vacunación (véase también Fig. 3) después de la exposición.

10 Evaluación nasal y ocular

Los rangos medios para puntuaciones nasales fueron menores los días 4 a 10 y los días 12-13 en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control (Tabla 7 posterior y Figura 4). Los rangos medios para puntuaciones oculares fueron menores el día 7 en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control (véase también Figura 5).

15

Tabla 7: Rango medio para puntuación nasal y ocular a lo largo del tiempo (*P<0,05 frente a control; Prueba de suma de rangos de Wilcoxon cada día, A-9 y A-10 combinados).

| Día | Puntuación ocular | |
|------------------|-------------------|------------|
| | Control | A-9 + A-10 |
| 0 | 22,5 | 22,5 |
| 1 | 22,5 | 22,5 |
| 2 | 22,5 | 22,5 |
| 3 | 22,5 | 22,5 |
| 4 | 22,5 | 22,5 |
| 5 | 21,8 | 23,9 |
| 6 | 22,5 | 22,5 |
| 7 | 29,2 | 19,0* |
| 8 | 21,8 | 23,9 |
| Día | Puntuación ocular | |
| | Control | A-9 + A-10 |
| 9 | 21,5 | 24,4 |
| 10 | 22,5 | 22,5 |
| 11 | 22,5 | 22,5 |
| 12 | 21,5 | 24,4 |
| 13 | 22,0 | 23,5 |
| 14 | 22,5 | 22,5 |
| Puntuación nasal | | |
| Control | A-9 + A-10 | |
| 22,5 | 22,5 | |
| 22,5 | 22,5 | |

(continuación)

| Día | Puntuación ocular |
|------|-------------------|
| 23,9 | 21,8 |
| 26,2 | 20,6 |
| 27,7 | 19,8* |
| 20,2 | 19,5* |
| 28,5 | 19,4* |
| 29,2 | 19,0* |
| 30,1 | 18,5* |
| 27,4 | 19,9* |
| 28,1 | 19,6* |
| 37,2 | 20,1 |
| 30,7 | 18,3* |
| 28,8 | 19,2* |
| 25,6 | 20,9 |

Duración de la enfermedad: Evaluación de exudado nasal

5 Tabla 8: Sumario del efecto de la vacunación sobre la duración de la enfermedad (Número de días con puntuación nasal > 0)

| Grupo | Mínimo | cuantil 25 | cuantil 50 | cuantil 75 | Máximo |
|----------|--------|------------|------------|------------|--------|
| Control | 8 | 9 | 10 | 11 | 13 |
| Vacunado | 0 | 1 | 3 | 9 | 13 |

Tabla 9: Efecto de la vacunación sobre la duración de la enfermedad (puntuaciones nasales; *significativamente menor que el grupo de control mediante la prueba de Kruskal-Wallis $P < 0,05$)

| | Control | Vacunado | Cambio en días | Intervalo de confianza al 95 % |
|----------|---------|----------|----------------|--------------------------------|
| Duración | 10 | 3 | 7* | 3,8 días |

10 Se encontró larga duración de la secreción nasal en los controles después de la exposición (Tabla 8, véase también Figura 4). El grupo vacunado mostró una reducción significativa de la duración de la secreción nasal. Los controles experimentaron un mínimo de 8 días de secreción nasal frente a 11 vacunados (38 %) con 1 día o menos. Dos tercios de los vacunados tuvieron menor duración de la secreción nasal que el mínimo de 8 días en el grupo control. La duración fue de la primera a la última observación anómala, incluso si el caballo tuvo días normales entre medias. El número de días que los animales estuvieron enfermos con signos clínicos de enfermedad respiratoria (puntuación nasal > 0) fue significativamente más corto (cambio de 7 días) en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control.

20 Tabla 10: Puntuaciones nasales máximas -Diferencia significativa entre las dos distribuciones de puntuaciones (prueba de Kruskal-Wallis, $P = 0,0157$).

| Grupo | Puntuación nasal máxima | | | | | |
|----------|-------------------------|---------|-----------|-----------|---|---------|
| | 0 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 0 | 0 | 5 (33 %) | 9 (60 %) | 0 | 1 (7 %) |
| Vacunado | 4 (14 %) | 2 (7 %) | 13 (45 %) | 10 (34 %) | 0 | 0 |

Tabla 11: Puntuaciones nasales ($\leq 1,5$ y $> 1,5$)

| Grupo | % con puntuación | Valor de p | Fracción prevenida | Intervalo de confianza al 95 % |
|----------|------------------|------------|--------------------|--------------------------------|
| Control | 66,7 % | < 0,0588 | 0,48 | 0,042 |
| Vacunado | 34,5 % | | | 0,72 |

La vacunación también redujo la gravedad de la secreción nasal (puntuación máxima cualquier día después de la exposición). Las puntuaciones nasales máximas se compararon entre los grupos (Tabla 10). La puntuación nasal mínima para los caballos en el grupo control fue de 1,5. Los resultados se dividieron, por tanto, a puntuaciones $\leq 1,5$ y $> 1,5$ para la evaluación de la gravedad de la enfermedad (Tabla 11). La fracción prevenida fue del 48 % con un límite de confianza inferior mayor que 0. La distribución general de las puntuaciones nasales máximas se redujo significativamente con la vacunación (prueba de Kruskal-Wallis, $P=0,0157$).

10 Evaluación ocular

Tabla 12: Puntuaciones oculares (presentes o ausentes)

| Grupo | % con puntuación | Valor de p | Fracción prevenida | Intervalo de confianza al 95 % |
|----------|------------------|------------|--------------------|--------------------------------|
| Control | 66,7 % | < 0,0001 | 0,897 | 0,587 |
| Vacunado | 6,9 % | | | 0,9741 |

Ya que solo se han registrado dos valores para las puntuaciones oculares (0 o 2), los resultados se dividieron en presentes o ausentes en un individuo. La fracción prevenida se usó después para evaluar el efecto de la vacunación sobre la presencia de signos oculares. La vacuna redujo significativamente la gravedad de la secreción ocular resultante de la infección con ERAV. Las puntuaciones oculares medias a lo largo del tiempo también se muestran en la Figura 5.

Los datos de este estudio demuestran que la administración de dosis intramusculares del virus inactivado es capaz de inmunizar a un animal a altos niveles de detección de anticuerpos que previenen la enfermedad ocular y reducen la gravedad y duración de la secreción nasal. La vacuna fue muy eficaz en la prevención de cualquier secreción ocular después de la exposición a ERAV. La secreción nasal persistió durante un periodo relativamente largo después de la exposición, mientras que la secreción ocular alcanzó un máximo y disminuyó rápidamente. Por lo tanto, la vacuna mostró una mejora significativa en la secreción nasal durante un periodo prolongado (9 de 10 días consecutivos), mientras que la vacuna redujo significativamente la secreción ocular durante 1 día durante el cual los signos oculares fueron más graves. Además, la vacunación redujo significativamente la excreción del virus nasal durante los seis días sucesivos de excreción vírica máxima y la viremia también se redujo significativamente durante los cuatro días de viremia máxima dentro del periodo de exposición.

No se observaron reacciones adversas inaceptables ni en los sitios de inyección ni por la manifestación de signos de enfermedad sistémica. La vacuna es segura y bien tolerada para su administración en especies susceptibles a rinitis equina A, en particular équidos. Este estudio demuestra por tanto que las inyecciones intramusculares de 3 x 1 ml de las composiciones de ERAV del ejemplo redujeron significativamente la gravedad y la duración de la enfermedad respiratoria provocada por la exposición virulenta a ERAV.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la secuenciación y los estudios analíticos llevados a cabo en una cepa del virus de la rinitis equina A como se desvela en el presente documento.

Células y Virus

Se cultivaron células de riñón de conejo 13 (RK-13) (pases 100-160) en la mezcla nutritiva de medio de Eagle modificado por Dulbecco F12 HAM (DMEM F12) (Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, Ontario) con suero bovino fetal 2-5 % (FBS) (Sigma). El crecimiento celular y la propagación vírica se realizaron en una incubadora de CO₂ (5 %) a 37 °C. El aislado de ERAV ER-AV/ON/05 se propagó en células RK-13 y las alícuotas se almacenaron a -70 °C para trabajo posterior. Las monocapas de RK-13 se inocularon a 90 % de confluencia y el ARN se extrajo antes de que se observaran efectos citopáticos (CPE).

Titulación de virus y purificación de placas

Las células RK-13 se cultivaron en placas redondas de 3 cm, usando DMEM F12 con suero de ternera fetal al 2 %. Las células se infectaron a 90 % de confluencia y las placas se incubaron a 37 °C durante 72 horas. Después de 24 horas, se reemplazó el medio y se añadió una capa de agarosa al 0,7 %. Las placas se contaron y registraron cada 24 horas. A las 72 horas se retiró la capa de agarosa y las placas se tiñeron con cristal violeta y se contaron.

5 Para la purificación de placas, las células RK-13 se infectaron con ERAV/ON/05, se permitió la adsorción durante 45 minutos y el inóculo se retiró y se reemplazó con una capa de agarosa al 0,7 %. Las placas se revisaron cada 12 horas y las placas se clasificaron como pequeñas, medianas y grandes. Se seleccionaron cinco placas de cada tamaño, se recogieron en 300 µl de DMEM F12 y se congelaron a -70 °C. Se propagaron virus de cada tamaño de placa en células RK-13 y se extrajo ARN de las placas pequeñas y grandes para secuenciación del genoma de la UTR 5'.

Cinética de crecimiento vírico

10 Para estudiar las características de crecimiento de esta cepa, Se infectaron células RK-13 con ERAV/ON/05 y las muestras de sobrenadante se recogieron en diversos momentos para la titulación. Las células RK-13 se cultivaron en placas redondas individuales de 3 cm y se infectaron a 90 % de confluencia. Las placas se incubaron a 37 °C y se tomaron muestras de sobrenadante cada 4 horas comenzando a las 0 horas durante un periodo de 28 horas. Todas las muestras fueron tituladas usando la técnica de unidad de formación de placas (UFP) como se ha descrito anteriormente aquí.

Immunofluorescencia

20 Las células RK-13 se cultivaron en portaobjetos/cámara de cultivo tisular de vidrio (Miles Scientific, Inc., Naperville, Illinois) y se les inoculó ERAV/ON/05. Veintiocho horas después de la infección, se eliminó el medio de cultivo celular y las células se fijaron en acetona. Los portaobjetos se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento. Se usaron sueros de caballos infectados experimentalmente como fuente de anticuerpos de ERAV.

Extracción y secuenciación de ARN

25 Se extrajo ARN de monocapas de células infectadas. Las células se trataron con 1 ml de TRIzol (Invitrogen) 18-20 horas después de la infección y se realizó extracción según las recomendaciones del fabricante. Los sedimentos de ARN se eluyeron en 30 µl de agua sin RNasa y se mantuvieron a -70 °C para su uso posterior. Se sintetizó ADNc de primera cadena usando superscript II (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se llevó a cabo una reacción de PCR de 50 µl usando un conjunto de cebadores con sentido y antisentido. Para secuenciación del genoma, se usó el enfoque de desplazamiento de cebadores y los cebadores se diseñaron basándose en ocho secuencias de ERAV disponibles en GenBank. Las condiciones de PCR fueron: 4 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

35 La secuenciación de los extremos 5' y 3' se completó con los kits 5' RACE y 3' RACE (Invitrogen) según lo recomendado por el fabricante. Fueron necesarias varias PCR anidadas para amplificar el extremo 5' UTR.

Análisis de secuencia

40 La identificación preliminar del virus se completó mediante secuenciación parcial de la proteína estructural VP1 usando cebadores diseñados basándose en otras secuencias disponibles en GenBank.

Tabla 13: Cebadores usados para amplificar algunas de las regiones de ERAV.

| NOMBRE | SECUENCIA DEL CEBADOR | SEQ ID NO: | SITIO GENOMICO |
|--------------|------------------------------|------------|----------------|
| dirVP1último | 5' tgaatagcaagggccgtgtt 3' | 4 | 3087 |
| invVP1último | 5' accgttgtaaaagactggcaca 3' | 5 | 3671 |
| dirPC112 | 5' gtcagtaaaacgcaacaacat 3' | 6 | 112 |
| dirPC805 | 5' tgtgaagaatgtcctgaaggca 3' | 7 | 805 |
| invPC1749 | 5' accatccacctaaccagacga 3' | 8 | 1749 |
| dirPC5217 | 5' attggctttgtcaggtgttgaa 3' | 9 | 5217 |
| invPC5952 | 5' gtttctaacttgggacccgaa 3' | 10 | 5952 |
| dirPC6915 | 5' tggatttgagattggttctgca 3' | 11 | 6915 |
| invPC7511 | 5' gcgaacgaaactgaggattg 3' | 12 | 7511 |

45 Todos los cebadores fueron diseñados en Gene Runner versión 3.05 (Hastings Software Inc.). Las reacciones de secuenciación fueron preparadas y realizadas por la División de Servicios de Laboratorio de la Universidad de Guelph.

Todas las secuencias fueron ensambladas y editadas con EditSeq y SeqMan DNASTAR Lasergene 8 (DNASTAR Inc., Madison, WI, Estados Unidos). Los resultados de secuenciación se introdujeron en el software BLAST [Centro

Nacional de Información Biotecnológica, Bethesda, MD (NCBI)] y se compararon con entradas similares en GenBank. Se usó ClustalW2 [Instituto Europeo de Bioinformática, Dublín, Irlanda (EBI)] para alineación de secuencias múltiples y construcción preliminar del árbol filogenético. El árbol filogenético final se creó en MEGA 4.0 usando el método de máxima probabilidad compuesta y la fiabilidad se evaluó mediante muestreo con reposición con 1000 repeticiones. El análisis de las secuencias de nucleótidos se trazó en SimPlot Versión 3.5.1 (Baltimore, MD, Estados Unidos). Para investigar la posibilidad de recombinación vírica entre aislados de ERAV, se completó un análisis Bootscan en SimPlot (Versión 3.5.1) que comparaba las secuencias genómicas de todos los ERAV registrados disponibles en GenBank. Los sitios de escisión de poliproteínas se predijeron basándose en secuencias registradas en GenBank con los números de referencia: DQ272578 y NC003982.

Resultados

Caracterización inicial

La proteína vírica (VP1) del virus se amplificó, se secuenció parcialmente y se comparó con secuencias disponibles en GenBank (números de referencia: NC003982, DQ272577, DQ272128, DQ272127, DQ268580, DQ272578, L43052). Los resultados de esta comparación inicial demostraron una identidad máxima del 95 % con el virus de la rinitis equina A VP1.

Titulación de virus

El aislado de ERAV se propagó inicialmente en cultivo celular y se tituló mediante el método de unidades formadoras de placas. El título de virus de la reserva obtenido fue 5×10^7 UFP en la titulación inicial. Los experimentos posteriores no mostraron cambios drásticos en el título vírico después de 3 años de congelación inicial. Para los experimentos con animales se empleó el virus de reserva con el título inicial.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Todas las muestras de sobrenadante se titularon usando la técnica de UFP y los resultados se introdujeron en una hoja de cálculo para construir una curva de crecimiento. Como se ve en otros picornavirus, el aislado de Ontario mostró un aumento del título a las 4 horas después de la infección, llegando a una fase de meseta a las 12 horas después de la infección.

Immunofluorescencia

Las células RK-13 infectadas se visualizaron bajo el microscopio de inmunofluorescencia. Se detectaron señales de fluorescencia verde brillante en el citoplasma de las células infectadas con ERAV en comparación con señales negativas en las células infectadas con simulación.

Purificación de placas

La secuenciación de un fragmento de 426 nucleótidos en la 5' UTR en las placas pequeñas y grandes no mostró diferencias entre los tamaños de las placas a nivel de nucleótidos. Sin embargo, las características morfológicas fueron evidentemente diferentes en cultivos de células RK-13.

Secuenciación completa del genoma

La secuenciación del genoma del aislado de ERAV dio como resultado 7839 nucleótidos de longitud con un contenido de GC de 47 %, incluyendo la cola de poli(A). Se identificaron cuatro repeticiones idénticas (CTGTAGCGTCAGTAAAACGC SEQ ID NO: 13) separadas por 18, 21 y 18 nucleótidos en la 5' UTR. La 5' UTR de ERAV estaba compuesta de 940 nucleótidos con un contenido de GC de 54 %. Una sola poliproteína con 6747 nucleótidos (2248 aminoácidos) compone el genoma vírico con un contenido de GC de 46,8 %. La síntesis inicial de la proteína se detectó en el nucleótido 940 con el codón de inicio AUG y el final en el nucleótido 7686 con el codón de terminación UAA. De forma muy interesante, se identificó una segunda secuencia AUG después del codón de inicio. También se identificó una secuencia AUGAUG posterior de 58 nucleótidos cadena abajo del codón de inicio de la poliproteína. El análisis con Blastx (NCBI) de la poliproteína en este aislado mostró una identidad de nucleótidos de 96 % con respecto a otros ERAV registrados, sin embargo, cuando la secuencia del genoma de longitud completa del aislado de Ontario se alineó y comparó con otras usando ClustalW2 (EBI) y Blastx (NCBI), solo se observó una identidad máxima de 80 %. La composición de aminoácidos mostró una organización y longitud de proteínas (estructurales y no estructurales) idéntica a lo largo de todo el genoma. Estas comparaciones se realizaron con las secuencias señaladas del genoma de PERV-1 y PERV (números de referencia DQ272578 y NC003982).

La 3' UTR estaba compuesta por 110 nucleótidos con un contenido de GC del 24,3 % y una cola poli-A. Las alineaciones de las 5' UTR de todos los ERAV disponibles demostraron un porcentaje de identidad menor, que variaba del 73 % al 81 %. De manera similar, la 3' UTR se analizó por el mismo método y el porcentaje de identidad varió del 75 % al 81 %. Resulta interesante que se identificaron diversas inserciones (1 nucleótido, 2 nucleótidos y 13

nucleótidos) y dos supresiones pequeñas (2 nucleótidos y 3 nucleótidos) en la 5' UTR (Fig. 4). No se observaron otros cambios importantes en todo el genoma.

Análisis del genoma por SimPlot

5 El análisis de SimPlot mostró una similitud comparable (porcentaje) entre todos los aislados de ERAV en comparación con ERAV/ON/05. Sin embargo, las principales diferencias se identificaron en el nucleótido 1500 (59 % de similitud) y el nucleótido 4700 (65 % de similitud). No obstante, este análisis mostró que la similitud a lo largo del genoma estaba entre 70 % y 82 %. Para investigar más a fondo la gran divergencia en los genomas, se realizó una exploración (Bootscan) para identificar posibles sitios de recombinación. Estos análisis demostraron que el aislado de Ontario no había predicho sitios de recombinación con otros aislados de ERAV. No obstante, cuando se eliminó el aislado de Ontario del análisis, puede haberse producido posible recombinación entre otros aislados de ERAV en el pase.

Análisis

15 El ERAV no se busca ni recupera habitualmente de casos clínicos durante brotes respiratorios equinos. Por lo tanto, el aislamiento de ERAV de los casos clínicos ha sido fortuito y, en la mayoría de los casos, un desafío. Por estas razones, la tasa de recuperación y secuenciación de estos virus puede ser pequeña.

20 Durante años anteriores, los virus de la rinitis equina se clasificaron dentro de la familia *Picornaviridae*, pero no fueron asignados claramente a un género específico. En 1996, Li y colaboradores (Li F, Browning GF, Studdert MJ y Crabb BS. Equine rhinovirus 1 is more closely related to foot-and-mouth disease virus than to other picornaviruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 6; 93: 990-995) demostraron que ERAV estaba estrechamente relacionado con el virus de la glosopeda (FMDV) basándose en las características filogenéticas y la secuenciación de nucleótidos. De acuerdo con sus hallazgos y otros (Wutz G, Auer H, Nowotny N, Grosse B, Skern T y Kuechler E. Equine rhinovirus serotypes 1 and 2: relationship to each other and to aphthoviruses and cardioviruses. J Gen Virol 1996, 77: 1719-1730) se ha descubierto que el aislado de ERAV está estrechamente relacionado con los aislados L43052, DQ272578 y NC003982.

30 El aislado ERAV/ON/05 dio como resultado 7839 nucleótidos que incluyen la 5' UTR, la poliproteína, 3' UTR y la cola de poli-A. En comparación con los aislados de ERAV previamente detectados, el ERAV/ON/05 es una de las secuencias de ERAV más completas detectadas hasta la fecha. La mayoría de las otras secuencias carecen de información de la 5' UTR o son secuencias parciales de proteínas víricas individuales. Los datos de la 5' UTR revelaron la presencia de 3 repeticiones que se han detectado previamente en otros ERAV y que se encuentran habitualmente en el FMDV. Se ha sugerido que estas repeticiones pueden ser necesarias en la formación de las estructuras secundarias halladas en la 5' UTR, el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). El análisis de identidad mostró que la poliproteína del aislado ERAV/ON/05 porta una secuencia de nucleótidos muy conservada. Como un virus de ARN, el ERAV es propenso a las mutaciones constantes debido a la falta de corrección de errores por la polimerasa. Esto puede indicar que, a pesar de que este virus de ARN ha estado evolucionando de manera natural y con replicación constante, no se han introducido cambios genómicos significativos desde que se registró su primera secuencia genómica. Es evidente que las proteínas estructurales y no estructurales, que están codificadas dentro de la poliproteína, representan las regiones más conservadas del genoma.

45 Resulta interesante que la tasa de replicación vírica en cultivo celular fue rápida y eficaz. Se detectó un ciclo completo de replicación vírica en menos de 4 horas, llegando a una fase de meseta en 12 horas. Estas características son típicas de los picornavirus y pueden reflejar la actividad vírica *in vivo*. Dichas características podrían explicar la gravedad y velocidad de los signos clínicos en algunas infecciones víricas respiratorias equinas. Como se observa en otros virus, tales como poliovirus y FMDV, la presencia de pequeñas supresiones y/o inserciones en la 5' UTR se ha asociado con diferencias en el tamaño de las placas en el cultivo celular y gran virulencia *in vivo*. Los inventores han descubierto que el aislado ERAV/ON/05 genera diferentes tamaños de placas cuando infecta células RK-13. Para investigar y correlacionar la presencia de estas inserciones y supresiones en la 5' UTR en el aislado ERAV/ON/05, los inventores secuenciaron esta región a partir de virus purificados de placas de diferentes tamaños de placas y no encontraron discrepancias a nivel de nucleótidos. Este hallazgo puede indicar que la diferencia de tamaños de las placas puede deberse a un crecimiento y una replicación característicos de las células RK-13 y quizás no esté asociada con la presencia o ausencia de las secuencias que se encontraron en esta región.

Ejemplo 4

60 Este ejemplo muestra los resultados de un estudio diseñado para desarrollar un modelo fiable de infección por ERAV para investigar las características clínicas de ERAV/ON/05.

Materiales y métodos

65 En la primera fase, se infectó un potro de poni con ERAV/ON/05 para ajustar la dosis infecciosa y las técnicas de recogida de muestras. Se diseñó un segundo estudio piloto para comparar animales infectados y de control y para dominar las técnicas de muestreo. El principal estudio de infección se realizó en dos fases debido a la manipulación

de animales y las limitaciones temporales del muestreo. Un año después de la primera infección, cuatro ponis previamente infectados fueron seleccionados para un estudio de reinfección basándose en su título de ERAV. Se seleccionaron animales con un título intermedio y alto de ERAV para volver a exponerlos al aislado de Ontario.

5 Animales experimentales

Se seleccionó un total de 12 yeguas de ponis preñadas y se mantuvo a sus potros para la infección experimental por ERAV. Todas las yeguas y potros se mantuvieron en un grupo separado lejos del establo principal y se tomaron medidas de bioseguridad para prevenir la infección respiratoria vírica. Se tomaron muestras de sangre de todos los potros regularmente y se revisaron periódicamente los títulos de ERAV. Los potros se mantuvieron hasta que alcanzaron los 12 meses de edad. Estos animales no fueron vacunados contra ningún virus respiratorio durante este periodo y se mantuvieron las prácticas generales para garantizar condiciones de vida saludables. Todos los animales fueron desparasitados según el protocolo de manejo del rebaño. La socialización y el manejo de los animales se realizaron con regularidad. Los ponis se entrenaron para la prueba de función pulmonar (PFT). Una vez que los animales estuvieron acondicionados para los experimentos, fueron transportados en grupos a la unidad de aislamiento y aclimatados durante al menos una semana antes de la infección vírica.

Unidad de aislamiento

20 Todos los ensayos de infección se realizaron en la unidad de aislamiento de animales en el Departamento de Patobiología, en la Universidad de Guelph. Esta unidad de aislamiento contiene puestos individuales que están equipados con temperatura, humedad, flujo de aire e iluminación controlados. El acceso a los puestos estaba restringido a los investigadores y al personal de atención.

25 Criterios de selección

Todos los potros se manejaron con frecuencia y su estado de salud se verificó periódicamente. Basándose en el estado de salud y los parámetros serológicos, se eligieron los animales que se incluirían en estos experimentos. En ese momento, todos los ponis permanecieron seronegativos para el virus de la rinitis equina A (ERAV), virus de la rinitis equina B (ERBV), herpesvirus equino 1 y 4 (EHV1/4) y virus de la gripe equina 2 (AE2). Incluso aunque se detectaran títulos de anticuerpos AE2 al nacer, se observó una disminución constante durante los primeros 5 meses y no fueron detectables por la prueba de hemólisis radial simple (SRH) a los seis meses de edad. Para el ensayo de infección experimental de ERAV, se seleccionó un poni para utilizar. Posteriormente, se seleccionaron otros dos ponis para un segundo estudio piloto y se seleccionó un grupo de 8 ponis (cuatro infectados y cuatro controles) para el estudio de infección principal. Después de un año desde el primer ensayo de infección, se eligieron 4 ponis con títulos intermedios y altos para ERAV para un ensayo de reinfección.

Inóculo

40 El aislado de ERAV (ERAV/ON/05) recuperado de un caballo durante un brote respiratorio vírico equino en Ontario 2005 se propagó en células de riñón de conejo 13 (RK-13) y se almacenaron alícuotas a -70 °C para caracterización vírica y experimentos de infección vírica animal.

45 En resumen, para la preparación del inóculo, el aislado se propagó en células RK-13. Se infectaron placas redondas de 30 ml que contenían monocapas confluentes al 90 % con 500 µl de ERAV/ON/05 y se incubaron en presencia de CO₂ (5 %) a 37 °C durante 24-36 horas. Todas las placas se retiraron de la incubadora y se congelaron/descongelaron cuatro veces para provocar ruptura celular y liberación vírica de células intactas. Se agruparon sobrenadantes de todas las placas en un matraz y se centrifugaron a 6000 RPM durante 15 minutos para aclarar y desechar los restos celulares. El sobrenadante aclarado se dividió en alícuotas en viales de 10 ml para usarse como inóculo en los experimentos de infección vírica en animales. Adicionalmente, se separaron alícuotas pequeñas de 1 ml y se guardaron para titulación vírica. El virus se tituló usando el método de unidad formadora de placas (UFP).

Modelo animal

55 Los ponis fueron elegidos como modelo animal debido a la naturaleza del agente experimental (ERAV), tamaño del animal, disponibilidad y manejo.

Protocolo de infección

60 Se seleccionaron, entrenaron y usaron ponis de entre 8 y 12 meses de edad en los experimentos de infección. Debido a la gran cantidad de muestras para tomar, estos experimentos se dividieron en cinco secciones (dos estudios piloto, dos experimentos de infección principales y un experimento de reinfección). Durante los estudios piloto, se optimizaron el equipo, manejo de animales, dosis de inóculo, vía de administración y recogida de muestras. El estudio de reinfección se realizó un año después del ensayo de infección inicial. Los ponis en el grupo reinfectado se expusieron a la misma cepa vírica a la misma dosis usada durante la primera infección. Solo se recogieron examen clínico, muestras de sangre para evaluación de títulos e hisopos nasofaríngeos para aislamiento de virus de este grupo.

Mascarilla y nebulización

5 Para infección vírica, se equipó una AeroMask™ equina de tamaño pequeño con un sello de goma en el extremo de la narina. El tamaño se ajustó dependiendo de la cabeza del poni y no se modificaron las ventanas de respiración. La máscara estaba equipada con un conector de inhalador y una válvula en "T" unidireccional para la nebulización del virus. Se emplearon vasos de nebulizador de 6 ml convencionales para administrar el inóculo. La nebulización se realizó usando un compresor PM14 (Precision Medical Inc. Northampton, PA) con un flujo de gas de 9 LPM (litros por minuto). Este caudal y los vasos de suministro permiten el suministro constante de partículas respirables de más o
10 menos 5 micrómetros. Cada poni se nebulizó durante 45 minutos (tomando un descanso de 5 minutos cada 15 minutos) con 15 ml (volumen total) de inóculo o placebo. Se recogió un hisopo nasofaríngeo por poni después de la infección para garantizar la viabilidad del inóculo cuando se administró. Los ponis que se volvieron a infectar un año después fueron expuestos al virus por el mismo protocolo.

15 Examen clínico

Todos los ponis fueron evaluados clínicamente de forma regular desde el nacimiento. Antes de los estudios piloto y de infección, todos los ponis fueron evaluados diariamente y durante los experimentos de ensayo dos veces al día durante los primeros 10 días y una vez al día desde el día 11 hasta el día 21 después de la infección. El examen clínico
20 incluyó: Temperatura corporal (temperatura) (grados Celsius), frecuencia cardíaca (fc), frecuencia respiratoria (fr), llenado capilar (llen), movilidad gastrointestinal (gi), ruidos pulmonares (rp), secreción nasal (sn), secreción ocular (so) [presencia o ausencia y características], ganglios linfáticos (gl) [tamaño y características], deambulación y condición física general. El examen físico se realizó aproximadamente a la misma hora en cada poni todos los días, comenzando con los animales de control y pasando al grupo infectado. Cada examen animal tardó aproximadamente 10 minutos
25 cada vez y todos los datos individuales se registraron en un formulario de revisión diaria.

Prueba funcional pulmonar (PFT)

30 La PFT se llevó a cabo como ha sido descrito previamente por Hare y colaboradores (Hare JE, Viel L. Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. J Vet Intern Med 1998; 12(3):163-70). La prueba se realizó en todos los ponis de control e infectados antes de la infección (día 0) y los días 1, 7, 14 y 21 después de la infección. En resumen, los días de prueba, los ponis no se alimentaron por la mañana y estaban ligeramente sedados como se ha descrito anteriormente aquí para procedimientos de endoscopia. Se diseñó una mascarilla de goma para ajustarse perfectamente al hocico de los ponis. Un neumotacógrafo n.º 4 (Gould Electronics, Biltholven, Países Bajos) se unió a la mascarilla y se conectó a un conjunto de transductores que convierten las señales de flujo y presión en bucles de respiración que se registran en un ordenador (Pulmonary Mechanics Analyzer, Buxco Electronics Inc, Sharon, CT, Estados Unidos). El flujo se midió mediante neumotacografía y la presión pleural se evaluó mediante un globo esofágico (10 cm de longitud) que se colocó en el tórax medio a través de un tubo esofágico. Se introdujo un volumen total de 3 ml de aire en el globo. La diferencia de presión entre la presión pleural y la presión atmosférica (medida a la altura de las narinas) se consideró la presión transpulmonar (ΔP_{pl}).
40

Prueba de broncoprovocación

45 Se llevó a cabo exposición por broncoprovocación como parte de la prueba PFT. Para determinar la hiperreactividad de las vías respiratorias después de la infección por ERAV/ON/05, se expuso a los animales de control e infectados a dosis crecientes de histamina (duplicación de dosis) por nebulización con un compresor PM14 con un flujo de gas de 9 LPM (Precision Medical Inc. Northampton, PA). Los parámetros fisiológicos pulmonares se evaluaron inicialmente mediante la administración de solución salina fisiológica al 0,9 % (medida inicial), seguido de aumento de las dosis de histamina. Después de cada administración (2 minutos), los datos se registraron durante 3 minutos y posteriormente se analizó la fisiología respiratoria. Las dosis de histamina se iniciaron a 0,5 mg/ml y se aumentaron gradualmente hasta un máximo de 32 mg/ml. Se usaron distensibilidad dinámica (C_{din}) y ΔP_{pl} como parámetros para interrumpir la nebulización de histamina. Cuando C_{din} se redujo en dos tercios o ΔP_{pl} se duplicó durante la administración de histamina, se suspendió la nebulización. Posteriormente la dosis desencadenante de histamina se representó gráficamente y se calculó. Todos los ponis estuvieron ligeramente sedados e inmovilizados físicamente durante estos
50 procedimientos.
55

Técnicas de muestreoExtracción de sangre

60 Se recogieron muestras de sangre de la vena yugular derecha o izquierda. Se recogieron aproximadamente 10 ml de sangre en un tubo de tapón rojo (suero) de cada poni según el programa de recogida de muestras. Adicionalmente, también se recogieron de 3 a 5 ml de sangre para CBC (hemograma completo) y perfil. Todas las muestras se recogieron por la mañana y se procesaron el mismo día.
65

Las muestras de sangre para separación de suero se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos 30

minutos y después se centrifugaron a 3000 rpm en una centrífuga de sobremesa. El suero se separó en las 6 horas posteriores al tiempo de recogida y las alícuotas se marcaron y congelaron a -70 °C para su análisis posterior (anticuerpos contra ERAV, ERBV, AE2 y EHV1/4). Las muestras de sangre para CBC y perfil se procesaron el mismo día.

5

Hisopos nasofaríngeos

Se recogieron hisopos nasofaríngeos para aislamiento de virus los días previos al ensayo de infección y los días 0, 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17 y 21. Cada poni fue inmovilizado con un acial y se pasó un hisopo de 30 cm de longitud (Kalayjian Industries, Inc. Signal Hill, California) por la nariz derecha o izquierda hasta alcanzar la faringe. Se tomó la muestra girando el hisopo durante aproximadamente 5 a 10 segundos. El hisopo se retiró cuidadosamente y las puntas se cortaron en un vial que contenía 3 ml de medio de transporte de virus (VTM). Los viales que contenían los hisopos se agitaron y se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento. Para liberar las partículas víricas y las células unidas a los hisopos, los viales se agitaron en vórtex durante aproximadamente 20 segundos y el medio se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se congeló a -70 °C para su análisis posterior.

10

15

Muestreo de orina y heces

Se intentó el aislamiento de virus en muestras de orina y heces antes y después de la infección con ERAV/ON/05. La orina se recogió por la mañana después del examen clínico y/o la limpieza del puesto sosteniendo un vaso de recogida mientras los animales orinaban. Cuando la muestra no se pudo recoger a mano, al animal se le colocó una bolsa recolectora de plástico alrededor de los genitales. Esta bolsa se retiró después de que el animal hubiera orinado y se guardó una alícuota de 10 ml para aislamiento del virus. Las muestras fecales se recogieron a mano de estiércol fresco en el suelo del puesto. Se recogieron aproximadamente 5 ml de estiércol en un vaso de recogida y se añadieron 10 ml de solución salina estéril para disolver la muestra. Las muestras de orina y heces se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento.

20

25

Endoscopia superior e inferior

Se realizaron broncoscopia y LBA como se ha descrito anteriormente (Hare *et al.*, 1998). Se introdujo un endoscopio de fibra óptica flexible estéril, de 140 cm de longitud con un diámetro externo de 0,8 mm (Olympus, Corp., Tokio, Japón) a través de la nariz derecha o izquierda hacia la cavidad nasal hasta el nivel de la laringe. En este momento se evaluó la conformación de las vías respiratorias superiores. A continuación, se introdujo el broncoscopio en la tráquea y se registró la presencia o ausencia de inflamación y/o moco y sus características. Los datos se registraron en la hoja de evaluación diaria y todas las endoscopias se grabaron en video para su análisis posterior.

30

35

Biopsias con cepillo faríngeo y traqueal

Para evaluar la replicación vírica en las vías respiratorias superiores e inferiores, se tomó una biopsia con cepillo de la faringe, tráquea media y la carina de animales infectados y de control los días 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 21. Durante el examen endoscópico, se introdujo un cepillo de citología protegido (funda protectora) de 200 cm (Hobbs Medical Inc. Connecticut) a través del canal de biopsia en la ubicación predeterminada de la muestra y se recogió una muestra. Los cepillos se retrajeron en la funda protectora y se retiraron del broncoscopio. Para separar el tejido de muestra del cepillo, este se introdujo en 600 µl de VTM y se agitó en vórtex durante 10 a 20 segundos. Todas las muestras se mantuvieron en hielo y se transportaron al laboratorio para su análisis posterior (aislamiento de virus).

40

45

Lavado broncoalveolar (LBA)

En resumen, todos los ponis fueron sedados levemente con Romifidina (0,04 mg/kg, IV) y se introdujo un broncoscopio estéril de 0,8 mm DE (Olympus, Corp., Tokio, Japón) a través de la nariz derecha o izquierda en la tráquea hasta la altura de la carina. A medida que se introducía el broncoscopio, se administró una solución de lidocaína caliente al 0,2 % para reducir la tos y el malestar. Una vez que se redujo el reflejo de la tos, se adelantó el broncoscopio y se enclavó en un bronquio terminal proximal. Se administró un total de 250 ml de solución salina estéril caliente a través del canal de biopsia dividido en dos alícuotas. El líquido de LBA se recuperó por succión manual con una jeringa de 60 cm³ a través del canal de biopsia y se colocó en hielo. Se filtró el líquido y se realizaron alícuotas para aislamiento del virus, recuento celular y portaobjetos de cytopsin.

50

55

Cultivo de muestras clínicas

Las muestras recogidas se transportaron en hielo y se congelaron a -70°C para su inoculación posterior en cultivos celulares.

60

Se cultivaron células RK-13 (pases 100-160) en la mezcla nutritiva de medio de Eagle modificado por Dulbecco F12 HAM (DMEM F12) (Sigma-Aldrich Canada Ltd. Oakville, Ontario) con suero de ternera fetal 2-5 % (Sigma). El crecimiento y aislamiento celular se realizaron en una incubadora de CO₂ (5 %) a 37 °C. Se cultivaron monocapas de células RK-13 en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 90 % y se infectaron con las muestras clínicas

65

recogidas del ensayo de infección. En resumen, el 90 % del medio de cultivo se eliminó de cada uno de los pocillos y se añadieron a la monocapa 200 µl de la muestra para analizar. Las placas se colocaron en la plataforma basculante durante una hora y se añadieron 3 ml de medio después de transcurrido el tiempo. Las placas se incubaron y verificaron cada 24 horas para detectar efectos citopatógenos (CPE). Si se detectó CPE, se retiró el sobrenadante del pocillo y se congeló para su análisis posterior. Los resultados de la prueba de aislamiento de virus se registraron en una hoja de cálculo. Las placas se verificaron durante hasta 7 días y, si no se desarrolló CPE, se intentó un segundo pase usando 200 µl de sobrenadante del primer pase. Después de un segundo pase, si no se detectó CPE, la muestra se clasificó como negativa. Se guardó sobrenadante de muestras positivas y negativas para confirmar por reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR).

Análisis estadístico

Los resultados de aislamiento de virus y todas las puntuaciones clínicas (Tabla 7) se introdujeron en una hoja de cálculo.

Tabla 14. Sistema de puntuación para infección experimental con ERAV/ON05.

| Signo clínico | Grado | Puntuación |
|-------------------------------|--------------------------------------|------------|
| Tos | Ninguno | 0 |
| | Intermitente | 1 |
| | Frecuente | 2 |
| Membranas mucosas | Rosa | 0 |
| | Pálida | 1 |
| Auscultación gastrointestinal | Normal | 0 |
| | Anómala | 1 |
| Heces/orina | Normal | 0 |
| | Anómala | 1 |
| Ruidos pulmonares | Normal | 0 |
| | Ligeramente mayor | 1 |
| | Aumento notable en todo el tórax | 2 |
| | Crepitantes y sibilancias | 3 |
| Secreción nasal | Ninguna | 0 |
| | Serosa moderada/abundante | 1 |
| | Mucopurulenta | 2 |
| Secreción ocular | Ninguna | 0 |
| | Serosa | 1 |
| | purulenta | 2 |
| Adenitis | no palpable | 0 |
| | palpable (<1 cm) | 1 |
| | Agrandada (>1 cm) | 2 |
| Anorexia | Ninguna | 0 |
| | Leve a moderada | 1 |
| | Grave | 2 |
| Temperamento | Vivo, consciente y reactivo | 0 |
| | Apagado (cabeza baja, desinteresado) | 1 |
| Tiempo de perfusión | Normal (2 s) | 0 |
| | 3-4 s | 1 |
| | 5 s | 2 |

Los resultados de aislamiento de virus se clasificaron como positivos o negativos y los resultados se compararon entre los grupos. Para determinar si había una diferencia estadística entre las ubicaciones en el aislamiento de virus (en el grupo infectado), se usó una regresión logística condicional exacta en cada día y sitio. Se usó la misma prueba para determinar si había una diferencia estadística entre los grupos según el día de aislamiento. Se resumieron las puntuaciones clínicas y los totales se analizaron y se compararon entre los grupos.

Se empleó un modelo mixto lineal generalizado para analizar todos los parámetros clínicos. Los factores incluidos en el modelo fueron: poni, tratamiento y tiempo, así como sus interacciones. Ya que los animales se midieron a lo largo del tiempo, se usó el criterio de información de AKAIKE (AIC) para determinar una estructura de error para la autorregresión. Los supuestos del ANOVA se evaluaron mediante análisis residuales exhaustivos. Se realizaron una

prueba de Shapro-Wilk, una prueba de Kolmogorov-Smirnov, una prueba de Cramervon Mises y una prueba de Anderson-Darling para evaluar la normalidad general. Los residuos se representaron frente a valores predichos y variables explicativas (poni, tratamiento y tiempo) para buscar patrones que sugirieran valores atípicos, varianza desigual u otros problemas. Si los análisis de residuos indicaron una necesidad de transformación de los datos o los datos se presentaron como un porcentaje, se realizaron análisis en una escala logit o logarítmica. Si la prueba de f general fue significativa, se aplicó una prueba de Dunnett que regresa a la medida inicial dentro de un tratamiento o una prueba de Tukey entre tratamientos y sitios en cada momento.

La respuesta serológica se definió como un aumento cuádruple de los niveles de anticuerpos desde el momento inicial (día 0) hasta cualquiera de los puntos temporales en la recogida de muestras (días 7, 14 o 21). Se llevó a cabo análisis estadístico en SAS 9.1.3 (SAS institute Inc., 2004, Cary, NC). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Resultados

Este estudio fue diseñado para reproducir uniformemente la enfermedad clínica de ERAV en ponis y estudiar sus características *in vivo*. Los estudios piloto demostraron que ERAV/ON/05 nebulizado fue capaz de provocar enfermedad respiratoria clínica en ponis sanos (edad 10-12 meses). Se indujo inmunosupresión leve en todos los ponis, excepto en los animales re infectados, para imitar las condiciones naturales en acontecimientos estresantes (por ejemplo, movimiento para ventas, reubicación de campo, programas de vacunación, etc.). Los resultados del estudio de infección principal confirmaron los resultados observados durante los estudios piloto. Los ponis del grupo infectado (n=4) desarrollaron una enfermedad clínica respiratoria que consistió en un aumento de la temperatura corporal, linfadenopatía, aumento de los ruidos pulmonares, aumento de la mucosidad traqueal y aumento de la secreción nasal (Fig. 7-8). Ninguno de estos signos clínicos fue significativamente extremo para necesitar cuidado adicional de los animales o tratamiento de apoyo. Ni la frecuencia respiratoria, ni la frecuencia cardíaca fueron significativamente diferentes entre los grupos. Ninguno de los signos clínicos desarrollados por el grupo infectado se observó en los animales de control (n=4), que permanecieron sanos durante la duración de estos ensayos. El agente etiológico (ERAV) solo se recuperó de ponis en el grupo infectado durante hasta siete días (Tabla 8). Los ponis en el grupo re infectado (n=4) no desarrollaron signos respiratorios clínicos y permanecieron sanos durante los experimentos. El análisis estadístico de los datos recogidos durante estos ensayos demostró una diferencia significativa entre los animales infectados y de control.

Tabla 15. Sumario de excreción de virus de la rinitis equina A (ERAV). Resultados de aislamiento de virus a partir de muestras recogidas durante la infección experimental con ERAV/ON/05.

| Ubicación de la muestra | Día de recogida de muestras | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | Día 0 | Día 1 | Día 3 | Día 5 | Día 7 | Día 14 | Día 21 |
| Hisopo faríngeo | - | + | + | + | + | - | - |
| Biopsia con cepillo de faringe | - | + | + | + | + | - | - |
| Biopsia con cepillo de tráquea media | - | + | + | + | + | - | - |
| Biopsia con cepillo de carina | - | + | + | + | - | - | - |
| LBA | - | + | + | - | - | - | - |
| Plasma | - | + | + | + | - | - | - |
| Orina | - | + | - | - | + | - | + |
| Heces | - | - | - | - | - | - | - |

+ Se recuperó virus de la muestra clínica en cultivo celular (células RK-13)
 - No se recuperó virus de la muestra clínica
 LBA Lavado broncoalveolar

No se registró ni depresión ni pérdida de apetito en ninguno de los grupos. Además la hidratación, micción, defecación y movimientos gastrointestinales se mantuvieron sin cambios en todos los grupos durante los ensayos de infección. No hubo diferencias entre los animales re infectados y de control en las puntuaciones clínicas y la prueba de aislamiento de virus, ya que no se observó enfermedad clínica en los animales re infectados y el virus no pudo recuperarse de este grupo.

Hallazgos clínicos

Todos los ponis se consideraron sanos antes de estos experimentos. La exposición a ERAV/ON/05 indujo enfermedad respiratoria clínica en animales infectados en comparación con los controles y los animales re infectados. Los principales signos clínicos detectables por examen físico fueron pirexia, secreción nasal y linfadenopatía. El examen endoscópico también reveló la presencia de grandes volúmenes de moco e hiperemia en la tráquea media y las vías respiratorias inferiores de los animales infectados.

Temperatura rectal

No se encontraron diferencias significativas en la temperatura rectal diaria entre los grupos antes de la exposición vírica o al placebo. Se identificó un efecto significativo del tratamiento cuando los animales infectados se compararon con los controles y re infectados ($p = 0,002$). Cuando la temperatura corporal de los tres grupos se comparó en diferentes momentos, el grupo infectado fue significativamente diferente en comparación con los controles y los animales re infectados ($p = 0,028$). El aumento de la temperatura corporal se detectó 24 horas después de la infección solo en los animales infectados y fue significativamente diferente del día 2,5 al día 6 en comparación con los animales de control en los mismos puntos temporales ($p = <0,005$). El aumento de la temperatura corporal alcanzó un máximo el día 4 con una temperatura corporal media de $38,45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{ET}=0,15$) ($p = 0,001$) y persistió durante dos días más consecutivos (Fig. 8). No se encontraron diferencias estadísticas cuando las temperaturas corporales de los grupos de control y re infectados se compararon en diferentes momentos. Los animales en los grupos de control y re infectados no tuvieron un cambio significativo en la temperatura de su cuerpo al comparar la medida inicial con puntos individuales en el tiempo dentro de los grupos (días 1, 7, 14 y 21).

Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos submandibulares y retrofaríngeos se examinaron diariamente y se clasificaron como no palpables, palpables y grandes. La palpabilidad o agrandamiento de los ganglios linfáticos solo se registró en los animales infectados y re infectados. En todos los ponis infectados, el área submandibular se volvió sensible a la palpación el día dos y en la mayoría de los casos persistió durante hasta dos semanas. El tamaño de los ganglios linfáticos submandibulares en los animales infectados varió de 3 a 5 cm de longitud por de 2 a 3 cm de grosor y el análisis de las puntuaciones totales demostró una diferencia estadística entre los grupos ($p = <0,0001$) (Fig. 7). Resulta interesante que los ganglios linfáticos retrofaríngeos no fueron palpables de manera uniforme en todos los animales infectados, pero se registró un cambio significativo en el tamaño en un poni. Esta linfadenopatía no parecía interferir con el consumo de alimentos o agua y la sensibilidad a la palpación se hizo menos pronunciada a medida que avanzaban los días. Los ganglios linfáticos submandibulares fueron palpables en tres animales de los animales re infectados con un tamaño promedio de menos de un cm de longitud y 0,5 cm de grosor aproximadamente. Los animales de control no tuvieron cambios detectables en los ganglios linfáticos a la palpación durante los experimentos de infección.

Frecuencia cardíaca y respiratoria

La frecuencia respiratoria (FR) y la frecuencia cardíaca (FC) no fueron significativamente diferentes entre los grupos de tratamiento ($P = 0,1$) en cualquier punto temporal. En general, la FR y la FC estaban dentro de los parámetros fisiológicos normales y los cambios pequeños solo se asociaron con el manejo y la recogida de muestras. La media de FR más alta entre todos los grupos se identificó el día 0 y la media más baja de todos los grupos se registró el día 21.

Examen endoscópico

En el examen endoscópico, los animales infectados tuvieron un aumento de la cantidad de moco traqueal detectable del primer día que persistió hasta el día 21. Ni los animales de control ni los re infectados tenían secreciones de moco detectables en el examen endoscópico a lo largo de estos experimentos.

Las características del moco variaron de claro y seroso el día uno a mucoso los días 7-21. Las regiones de moco se distribuyeron uniformemente desde la tráquea superior hasta la bifurcación de la carina. Se observó hiperemia traqueal localizada en todos los animales infectados y en algunos animales de control a lo largo de estos experimentos. La carina en todos los animales infectados estaba embotada y en algunos casos hiperémica a partir del día tres. La sensibilidad al examen endoscópico aumentó notablemente el día siete en animales infectados y se observó broncoconstricción durante el LBA. La secreción nasal varió de leve a moderada en todos los ponis infectados y no estuvo presente en los grupos de control y re infectados. Se observó secreción nasal serosa durante el examen clínico durante aproximadamente 8 días en los animales infectados comenzando entre 36 y 48 horas después de la infección. Sin embargo, esta secreción no fue un reflejo del moco (características y volumen) observado durante el examen endoscópico. Se observó secreción ocular leve de manera esporádica en los animales infectados.

Serología

Un total de 12 ponis (de 10 a 12 meses de edad) se infectaron con ERAV/ON/05 o placebo por nebulización. Todos los ponis fueron serológicamente negativos para ERAV, ERBV, AE2 y EHV1/4 y en una condición saludable antes de los experimentos de infección. Después de la exposición a ERAV/ON/05 todos los animales infectados (100 %) se seroconvirtieron (aumento cuádruple) a ERAV determinado por la prueba de neutralización del virus (VN) (Fig. 9). Se observó una interacción significativa de tratamiento por día en animales infectados ($P = <0,0001$). Se encontró una diferencia estadística entre los animales infectados y re infectados en el inicio y el día 7 ($P = <0,001$). En el grupo re infectado no se encontraron diferencias estadísticas cuando los títulos de ERAV los días 7, 14 y 21 se compararon con los valores iniciales.

Los títulos de anticuerpos contra ERAV aumentaron significativamente en animales infectados desde el día 7 y en la mayoría de los casos alcanzaron el máximo el día 14 y se mantuvieron hasta el día 21 ($P = <0,001$). Por el contrario, todos los animales de control permanecieron seronegativos para ERAV y no se identificaron cambios detectables mediante la prueba de VN. Los animales en todos los grupos no mostraron un aumento en los niveles de anticuerpos o conversión serológica a ningún otro virus respiratorio (ERBV, AE2 y EHV1/4) durante estos experimentos (Fig. 9). Los animales en el grupo re infectado ($n=4$) no tuvieron una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos contra ERAV entre el inicio y el día 21 después de la infección. Sin embargo, se detectó un pequeño cambio en los niveles de anticuerpos contra ERAV en 3 ponis y un aumento cuádruple en un poni del mismo grupo (Fig. 9).

Aislamiento de virus

Las muestras de hisopo nasofaríngeo, cepillado laríngeo, cepillado traqueal, LBA, fecales y de orina fueron negativas para aislamiento de virus (virus respiratorios equinos) en todos los ponis antes de la infección (Tabla 8). Los hisopos obtenidos de la nasofaringe de animales infectados y de control después de completar la nebulización se cultivaron en células RK-13 y se recuperó ERAV en un primer paso de todos los animales infectados solamente. La RT-PCR usando cebadores que se dirigieron al gen de VP1 confirmó los diagnósticos positivos y negativos de ambos grupos.

Los resultados del aislamiento de virus de los ensayos de infección y re infección se resumen en la Tabla 8. Una diferencia significativa entre animales infectados, de control y re infectados se identificaron al comparar el aislamiento de virus entre grupos ($P = <0,05$). El ERAV solo se recuperó de animales en el grupo infectado en días específicos y áreas específicas del tracto respiratorio (Tabla 8). No se recuperaron otros virus de las muestras recogidas durante estos experimentos. Todos los ponis en el grupo de control fueron negativos en las pruebas de aislamiento de virus a lo largo del estudio. Una interacción de tratamiento por día en animales infectados se detectó por primera vez el día 7 y persistió los días 14 y 21 ($P = <0,05$).

La ubicación para la recuperación de virus varió desde las vías respiratorias inferiores los días 1, 3 y 5 hasta las vías respiratorias medias y superiores los días 1, 3, 5 y 7. El día uno, se aisló ERAV de la faringe y la carina de todos los ponis del grupo infectado y la tráquea media y LBA de 3 ponis del mismo grupo. Ningún intento de recuperación de virus de las heces en todos los grupos tuvo éxito. El aislamiento de virus de la orina y el plasma se logró solo en pocas ocasiones (Tabla 8). La recuperación de virus se redujo gradualmente desde el día 1 hasta el día 7 cuando el ERAV se recuperó de manera uniforme de las muestras clínicas. Esta última recuperación vírica se asoció con un aumento en el título de anticuerpos contra ERAV y una reducción de la puntuación de los signos clínicos (Figs. 7 y 9).

Prueba funcional pulmonar (PFT)

La hiperactividad de las vías respiratorias se evaluó basándose en la respuesta fisiológica y clínica a la provocación con histamina. Se representaron gráficamente datos de animales infectados y de control y se calcularon las dosis desencadenantes de histamina. Resulta interesante que los ponis de ambos grupos (infectados y de control) respondieron el día 0 a una dosis baja de histamina (<6 mg de histamina). En general, las dosis desencadenantes de histamina no superaron 13 mg. La reacción clínica de histamina (dependiente de la dosis) se observó como hiperventilación asociada con elevación abdominal y dificultad para respirar. La reacción fisiológica se detectó en la PFT por un descenso del 35 % en la distensibilidad dinámica pulmonar (C_{din}) o una duplicación de la presión transpulmonar (ΔP_{pl}) al comparar la administración de solución salina e histamina. Los ponis en el grupo infectado mostraron una pequeña reducción en la dosis desencadenante de histamina del día 0 al día 1. Sin embargo, esto no fue significativamente diferente entre los grupos. Se detectó una diferencia significativa entre infectados y controles el día 21 ($P = 0,02$).

Recuento diferencial de células de líquido LBA

Se realizaron recuentos diferenciales de células en los portaobjetos cytospin preparados a partir de alícuotas de líquido LBA. No se encontraron diferencias significativas en los recuentos de células entre los caballos en los diferentes grupos de tratamiento antes del ensayo de infección. No se detectó ningún efecto del tratamiento por día en los porcentajes de macrófagos y células epiteliales a lo largo de los experimentos. Se observó un aumento significativo en el número de neutrófilos el día 7 después de la infección en el grupo infectado ($P = <0,05$). Estos números no fueron significativamente diferentes en los animales control o re infectados al comparar el valor inicial con los días 7, 14 y 21. Los porcentajes medios de linfocitos, eosinófilos y mastocitos disminuyeron proporcionalmente el día 7 después de la infección en los animales infectados y se detectó una diferencia estadística ($P = <0,05$). Se observaron células

epiteliales ciliadas habitualmente en los portaobjetos de animales infectados y de control, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas, excepto en uno de los animales infectados que tuvo un recuento alto el día 7. En general, se detectó una inflamación supurante no séptica con presencia de células epiteliales y células gigantes esporádicas en los ponis infectados. Resulta interesante que no se observaron cambios importantes en el examen citológico en las muestras de los animales reinfectados.

Este estudio demuestra que ERAV/ON/05 indujo enfermedad respiratoria clínica en ponis infectados. La serología demostró que no había otros virus respiratorios presentes durante estos ensayos. La enfermedad se caracteriza por pirexia, secreción nasal, aumento de ruidos pulmonares y aumento del tamaño de ganglios linfáticos submandibulares. Adicionalmente, se detectaron endoscópicamente grandes volúmenes de moco en las vías respiratorias inferiores que persistieron hasta el día 21. El virus se aisló de las vías respiratorias superiores e inferiores hasta el día 7 correspondiente a la aparición de anticuerpos detectables del virus de la rinitis equina A (ERAV). Ninguno de los animales reinfectados desarrolló enfermedad clínica y solo un poni de este grupo tuvo un aumento cuádruple en los títulos de anticuerpos contra ERAV. Los ponis con anticuerpos contra ERAV preexistentes no desarrollaron enfermedad clínica cuando se expusieron al virus.

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra una realización de una composición de virus de la rinitis equina B de acuerdo con la presente invención.

Materiales y métodos

La cepa 07-10342 del virus de la rinitis equina B (n.º de referencia de ATCC PTA-11829) se recuperó del cultivo de células de riñón de conejo 13 (RK-13) de un hisopo nasal de un caballo en Ontario, Canadá. Se produjo 07-10342 inactivado siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1 para ERAV/ON/05.

Se prepararon las siguientes composiciones que contenían ERBV solo o en combinación con ERAV.

Tabla 16. Grupos de vacunas

| Grupo de vacunas | Vacuna | Títulos A/B | Adyuvante | Volumen |
|------------------|------------------------|-------------|---------------|---------|
| 1 (N=8) | Monovalente B - Alto | 7,5 | HRA-5 | 200 ml |
| 2 (N=8) | Monovalente B - Alto | 7,5 | HRA-3 con CSO | 100 ml |
| 3 (N=8) | Monovalente B - Bajo | 7,0 | HRA-5 | 200 ml |
| 4 | Bivalente A y B - Alto | 8,0/7,5 | HRA-5 | 200 ml |
| 5 | Bivalente A y B - Alto | 8,0/7,5 | HRA-3 con CSO | 100 ml |

Ocho caballos de cada uno de los grupos de vacunas 1, 2 y 3, se expusieron junto con ocho caballos de control con una dosis de exposición de 10^{6.6} DICT₅₀. Estado de enfermedad basado en las puntuaciones de secreción nasal y conjuntivitis como se indica en la Tabla 10. El efecto de la vacunación sobre la duración, gravedad e incidencia de la enfermedad se muestra en las Tablas 17-22.

Tabla 17. Puntuación del estado de la enfermedad

| Estado de la enfermedad | Puntuación nasal | Puntuación de conjuntivitis |
|-------------------------|------------------|-----------------------------|
| Normal (0) | 0 o 1 | 0 o 1 |
| Leve (1) | 0 o 1 | 2 |
| Leve (1) | 1,5, 2 o 3 | cualquiera |
| Moderado (2) | 4 o 6 | cualquiera |

El grupo vacunado mostró una reducción significativa (Tabla 18) en la duración de la secreción nasal, incluso en algunos casos sin signos de enfermedad respiratoria leve.

Tabla 18. Número de días con enfermedad respiratoria leve, moderada o grave

| Grupo de vacunas | Mínimo | cuantil 25 | cuantil 50 | cuantil 75 | Máximo |
|------------------|--------|------------|------------|------------|--------|
| Control (N=8) | 1 | 5 | 8 | 8 | 9 |
| 1 (N=8) | 0 | 0 | 1 | 3,5 | 7 |
| 2 (N=8) | 0 | 0,5 | 1 | 6,5 | 8 |
| 3 (N=8) | 0 | 1 | 1 | 3 | 6 |

El número de días que los animales estuvieron enfermos con signos clínicos de enfermedad respiratoria (puntuación nasal > 0) fue significativamente más corto en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control.

5

Tabla 19. Efecto de la vacunación sobre la duración de la enfermedad

| | Control | Vacunado | Cambio en días | Intervalo de confianza al 95 % |
|---------------------------|---------|----------|----------------|--------------------------------|
| Duración frente a Grupo 1 | 8 | 1* | 5 | 1, 8 días |
| Duración frente a Grupo 2 | 8 | 1* | 2 | 0, 8 días |
| Duración frente a Grupo 3 | 8 | 1* | 7 | 1, 7 días |

*Significativamente menor que el grupo de control mediante la prueba de Kruskal-Wallis (P<0,05)

La inmunización con ERBV también disminuyó la gravedad de la enfermedad con un porcentaje menor de vacunados que los controles que demostraban signos clínicos leves y moderados de enfermedad respiratoria a lo largo del estudio (Tabla 20).

10

Tabla 20. Sumario de la gravedad de la enfermedad basado en la puntuación respiratoria máxima

| Grupo de vacunas | Normal | Leve | Moderada |
|------------------|--------------|--------------|--------------|
| Control (N=8) | 0 % (0/8) | 87,5 % (7/8) | 12,5 % (1/8) |
| 1 (N=8) | 37,5 % (3/8) | 50,0 % (4/8) | 12,5 % (1/8) |
| 2 (N=8) | 25,0 % (2/8) | 75,0 % (6/8) | 0,0 % (0/8) |
| 3 (N=8) | 12,5 % (1/8) | 87,5 % (7/8) | 0,0 % (0/8) |

Se descubrió que la inmunización con ERBV reduce significativamente la incidencia de la enfermedad, en 37,5 %, 25 % y 12,5 % en los grupos vacunados 1, 2 y 3, respectivamente (Tablas 21 y 22).

15

Tabla 21. Efecto de la vacunación sobre la incidencia de la enfermedad (se agruparon estados de enfermedad de leve y moderado para los fines de esta evaluación)

| | Control (n=8) | Grupo (n=8) | Fracción prevenida | Intervalo de confianza al 95 % |
|--------------------------|---------------|-------------|--------------------|--------------------------------|
| Control frente a Grupo 1 | 1 | 62,5 % | 0,375 | -0,069, 0,6346 |
| Control frente a Grupo 2 | 1 | 75,0 % | 0,25 | -0,119, 0,4973 |
| Control frente a Grupo 3 | 1 | 87,5 % | 0,125 | -0,137, 0,3266 |

La vacunación también redujo la excreción de virus de las narinas, lo que indica una enfermedad clínica menor en los caballos vacunados, así como también demuestra la eficacia de la vacuna para prevenir la propagación de la enfermedad infecciosa a otros caballos potencialmente susceptibles (Tabla 22).

20

Tabla 22. Incidencia de positivos para el virus a lo largo del tiempo

| Día | Control | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| 0 | 0,250 | 0,25 | 0,000 | 0 |
| 1 | 0,625 | 0,25 | 0,125 | 0 |

25

(continuación)

| Día | Control | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| 2 | 0,125 | 0,00 | 0,000 | 0 |
| 3 | 0,125 | 0,00 | 0,000 | 0 |
| 4 | 0,250 | 0,00 | 0,000 | 0 |
| 5 | 0,125 | 0,00 | 0,000 | 0 |
| 6 | 0,125 | 0,00 | 0,000 | 0 |
| 7 | 0,125 | 0,00 | 0,125 | 0 |

Resultados y análisis

5 Se descubrió que las vacunas de ERBV inactivadas son capaces de inmunizar a un animal a altos niveles de detección de anticuerpos. Las vacunas redujeron la duración, gravedad e incidencia de la enfermedad en animales inmunizados expuestos a ERBV. La vacunación también redujo la excreción del virus infeccioso de caballos enfermos. No se observaron reacciones adversas inaceptables ni en los sitios de inyección ni por la manifestación de signos de enfermedad sistémica. La vacuna es segura y bien tolerada para su administración en especies susceptibles a rinitis equina B, en particular équidos.

Ejemplo 6

15 Este ejemplo ilustra un modelo de cobaya para su uso en un ensayo de potencia de liberación.

La vacuna 5 (A/B-1) y la vacuna 6 (A/B-2) se administraron cada una a cobayas (cinco cobayas por vacuna, 0,5 ml por vacunación intramuscular). Se administró una vacuna de refuerzo tres semanas después. Después de 19 días, se tomaron muestras de sangre de los cerdos y se analizó la sangre usando pruebas de neutralización de suero para ERAV y ERBV.

20 Tabla 23. Vacuna 5 (A/B-1) en lote con $10^{8,0}$ A/ $10^{7,5}$ B, con adyuvante de HRA-5

| Cobaya | Título de ERVA | Título de ERVB |
|----------------|----------------|----------------|
| 1 | >1414 | 280 |
| 2 | 1300 | 180 |
| 3 | 448 | 120 |
| 4 | 1123 | 360 |
| 5 | 893 | 1120 |
| Título inverso | 191 | 260 |

Tabla 24. Vacuna 6 (A/B-2) en lote con $10^{8,0}$ A/ $10^{7,5}$ B, con adyuvante de aceite de algodón HRA-3 +

| Cobaya | Título de ERVA | Título de ERVB |
|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 194 | 220 |
| 2 | 326 | 280 |
| 3 | 194 | 560 |
| 4 | 282 | 240 |
| 5 | Ninguna muestra | Ninguna muestra |
| Título inverso | 191 | 260 |

25 Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra una evaluación de exposición del virus de la rinitis A después de vacunación con una vacuna de virus muerto contra la rinitis equina A/rinoneumonitis/gripe de 2 dosis y protección contra infección respiratoria por rinitis equina A después de vacunación con la vacuna de virus muerto contra la rinitis A/rinoneumonitis/gripe.

30

Objetivo

5 El objetivo de este estudio de vacunación-exposición fue demostrar la eficacia de la rinitis equina A (n.º de referencia de ATCC PTA-11828) para vacuna de virus muerto contra la rinitis equina A/rinoneumonitis/gripe. La variable de resultado primaria usada para evaluar la eficacia de vacunación fue la reducción de la enfermedad respiratoria provocada por el virus de la rinitis equina A.

Material y métodos

10 La vacuna usada en este estudio es una vacuna contra la rinitis equina A/rinoneumonitis/gripe de la presente invención, vacuna de virus muerto.

A. VIRUS DE LA RINITIS EQUINA A

15 La cepa original del virus de la rinitis equina A (ERhA V) se obtuvo de la Universidad de Guelph, Laboratorio de sanidad animal, con el número de aislado 04-54188, y se recibió el 9 de septiembre de 2008 según el permiso de importación n.º 106930. El virus se pasó una vez por células E-Vero para producir una reserva premaestra de titulación alta y después se diluyó con medios de cultivo celular para producir el virus de semilla maestra (MSV). El MSV se designa como ERhA V (04-54188), MSV, Lote 091508A diluido, 24 de septiembre de 2008, y el USDA aprobó su uso para el Establecimiento 597 el 18 de junio de 2010.

25 El antígeno vírico de la rinitis equina A usada en vacunas evaluadas en este estudio fue un virus MSV+5 producido en el vigésimo pase de células E-Vero aprobadas por APHIS. Después del crecimiento, los líquidos víricos se filtraron, se inactivaron con formalina y se concentraron de acuerdo con el esquema de producción para el código de producto A522.20. Los líquidos víricos inactivados se analizaron para detectar virus vivos residuales después de la inactivación. Los resultados fueron satisfactorios. Se usaron líquidos víricos inactivados para formular la vacuna a un nivel de inclusión de antígeno de $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml.

30 1. Lote de combinación de vacunas experimentales de rinitis 122110

El lote de combinación de vacunas experimentales de rinitis 122110 se formuló basándose en títulos de preinactivación.

35 La vacuna formulada final contenía los siguientes ingredientes por cada 1 ml de dosis:

| | |
|---|-----------------------------------|
| Rinitis equina A | $10^{7.5}$ DICT ₅₀ /ml |
| EHV-1 | $10^{7.0}$ DICT ₅₀ /ml |
| EHV-4 | $10^{6.5}$ DICT ₅₀ /ml |
| Gripe A2/Ohio/03 | $10^{7.0}$ DICT ₅₀ /ml |
| Gripe A2/KY/95 | $10^{7.0}$ DICT ₅₀ /ml |
| Gripe A2/NewMarket/2/93 | $10^{7.0}$ DICT ₅₀ /ml |
| Adyuvante (MVP Laboratories, S.O. n.º 25) | 100 µl |
| Diluyente, que contiene MEM-E | c.s. |
| Gentamicina, 30 µg/ml de volumen de diluyente | |
| Formaldehído, 0,1 % del volumen de diluyente | |
| Anfotericina B, 2,5 µg/ml | |

B. Caballos Experimentales

1. Descripción de caballos experimentales

40 Cuarenta (40), de seis a ocho meses de edad, caballos de tiro cruzado comprados a Steve Waagen, Bottineau, Dakota del Norte recibieron un microchip a su llegada a Equine Resources, LLC, Butler, Mo. y fueron asignados a IVP (Producto Veterinario de Investigación) o Producto de Control (CP) basándose en un generador de números aleatorios después de haber sido explorados previamente para títulos de rinitis A de $\leq 1:4$.

45 Durante todo el estudio, los caballos fueron acuartelados en una sola parcela grande con pesebres, bebederos y comederos comunes. Tras la exposición, el personal de laboratorio asignó a cada animal un "código de establo" de 2 dígitos que se unió a un cabestro usado durante todo el periodo de tiempo posterior a la exposición y se usó para identificar caballos cuando se tomaron signos clínicos y muestras cada día. Durante cada día de observación, los caballos fueron acorralados en corrales y procesados aleatoriamente a través de potros de retención individuales.

50 La Tabla 25 resume el diseño de estudio:

Tabla 25: Diseño de estudio

| Grupo | N.º Animales de ensayo | Tratamiento | Dosis (intervalos de 21 días) | Vía de administración | Exposición (día de estudio) |
|-------|------------------------|-------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 1 | 20 | IVP | 2 x 1 ml | IM | D46 |
| 2 | 20 | CP | 2 x 1 ml | IM | D46 |

2. Programa de vacunación/exposición y muestreo

- 5 El 28 de enero de 2011 y el 18 de febrero de 2011, se administró lote de combinación de vacunas experimentales de rinitis 122110 por vía intramuscular en un volumen de dosis de 1 ml a cada uno de 20 caballos (grupo vacunado, IVP). Veinte caballos (grupo de control, CP) recibieron una dosis de 1 ml de MEM-E con adyuvante (producto experimental 005) que contenía los excipientes usados en la vacuna del lote 122110 (adyuvante, gentamicina, anfotericina B y formaldehído) pero sin antígenos. Todos los caballos se expusieron mediante aerosolización intranasal del virus virulento de la rinitis equina A el día de estudio 46 (25 días después de la vacunación de refuerzo) el 15 de marzo de 2011. La Tabla 26 muestra el programa de acontecimientos.

Tabla 26: Programa de acontecimientos:

| Fecha de calendario | Día de estudio | Acontecimiento de estudio |
|------------------------|----------------|---|
| 28 de enero de 2011 | 0 | Aleatorización de caballos a grupos Muestras de suero recogidas de todos los caballos IVP administrado al grupo 1 CP administrado al grupo 2 |
| 18 de febrero de 2011 | 21 | Muestras de suero recogidas de todos los caballos IVP administrado al grupo 1 CP administrado al grupo 2 |
| 15 de marzo de 2011 | 46 | Grupos de exposición 1 y 2 Temperaturas corporales Muestras de sangre completa (aislamiento de virus) Hisopos nasales (excreción de virus) Observaciones clínicas |
| 16-21 de marzo de 2011 | 47-52 | Temperaturas corporales Muestras de sangre completa (aislamiento de virus) Hisopos nasales (excreción de virus) Observaciones clínicas |
| 22 de marzo de 2011 | 53 | Muestras de suero Temperaturas corporales Muestras de sangre completa (aislamiento de virus) Hisopos nasales (excreción de virus) Observaciones clínicas |
| 23-28 de marzo de 2011 | 54-59 | Temperaturas corporales Muestras de sangre completa (aislamiento de virus) Hisopos nasales (excreción de virus) Observaciones clínicas |
| 29 de marzo de 2011 | 60 | Muestras de suero Temperaturas corporales Muestras de sangre completa (aislamiento de virus) Hisopos nasales (excreción de virus) Observaciones clínicas |

(continuación)

| Fecha de calendario | Día de estudio | Acontecimiento de estudio |
|--------------------------------|----------------|--|
| 30 de marzo-4 de abril de 2011 | 61-66 | Temperaturas corporales Muestras de sangre completa (aislamiento de virus) Hisopos nasales (excreción de virus) Observaciones clínicas |
| 5 de abril de 2011 | 67 | Muestras de suero Temperaturas corporales Muestras de sangre completa (aislamiento de virus) Hisopos nasales (excreción de virus) Observaciones clínicas Fin del estudio |

3. Inoculación por exposición intranasal de caballos

5 a. Virus de exposición

El lote de virus de exposición de la rinitis equina A 112108A se produjo en cultivo tisular en células E-Vero. Se determinó que el título del virus de exposición era $1 \times 10^{7.3}$ DICT₅₀/ml el día de exposición.

10 b. Método de exposición intranasal

Sedivet® (clorhidrato de romifidina), un sedante y analgésico, se administró por vía intravenosa a cada caballo antes de la exposición a una dosis de 50 µg/kg de peso corporal. El virus de exposición se administró por vía intranasal como un aerosol producido por un nebulizador en un AeroMask equino (Trudell Medical International, Ontario, Canadá) por el siguiente método: Se colocaron cuatro mililitros de $10^{7.3}$ DICT₅₀/ml de virus de exposición en el vaso del nebulizador en el dispositivo AeroMask. Se instaló una manguera de presión desde un compresor de aire hasta la toma de entrada del nebulizador. Después se insertó el tubo de salida en la AeroMask unida a la cabeza del caballo que se exponía y se aplicaron aproximadamente 68,95 kPa (10 psi) de presión de aire a la toma de entrada durante tres minutos. Durante este tiempo, se aerosolizaron aproximadamente dos mililitros de líquido de virus de exposición directamente en las narinas del caballo que se exponía. El virus de exposición se administró a caballos sin diluir, efectuando una cantidad de exposición de $1 \times 10^{7.6}$ DICT₅₀ en una dosis de 2 ml.

C. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN ANTES Y DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN

25 1. Evaluación de exudado nasal

Todas las observaciones de exudado nasal se realizaron antes de la recogida de los hisopos nasofaríngeos. El día de la exposición (D46) y durante 21 días después de la exposición, las fosas nasales y el hocico de cada uno de los 40 caballos vacunados y de control se examinaron y clasificaron usando la descripción de clasificación y puntuación enumerada a continuación.

Las puntuaciones de 0 a 6 se asignaron en función de la gravedad de la enfermedad indicada por cada una de las siguientes clasificaciones:

| Descripción de los síntomas | Designación de hoja de puntuación | Puntuación |
|--|-----------------------------------|------------|
| Esencialmente normal indica que el caballo estaba limpio y esencialmente exento de exudado nasal | EN | 0 |
| Secreción serosa leve transparente que puede observarse con frecuencia en caballos tanto enfermos como normales | C-1 | 1 |
| La secreción mucopurulenta muy leve indica que el moco definitivamente estaba presente en pequeñas cantidades en una o ambas narinas | VSM | 1,5 |
| La secreción serosa transparente moderada es indicativa de un aumento definido en el volumen sobre el normalmente observado/ligeramente mucopurulento es una secreción fácilmente observada en una o ambas narinas | C-2/SM | 2 |

(continuación)

| Descripción de los síntomas | Designación de hoja de puntuación | Puntuación |
|---|-----------------------------------|------------|
| Secreción serosa transparente y abundante que se observa en general solo en caballos enfermos | C-3 | 3 |
| Moderadamente mucopurulenta indica que estaban presentes secreciones mucosas en grandes cantidades en ambas narinas | MM | 4 |
| Mucopurulenta pesada indica que abundantes cantidades de secreción mucosa llenaban ambas narinas | HM | 6 |

2. Secreción ocular

5 La secreción ocular se evaluó diariamente en el momento de la evaluación del exudado nasal. Las puntuaciones de secreción ocular se registraron como 0 = normal; 1 = secreción ocular leve a moderada y 2 = secreción ocular grave.

3. Temperatura

10 Se registraron las temperaturas rectales diarias para cada uno de los 40 caballos vacunados y de control el día de la exposición y durante 21 días después de la exposición por medio de una sonda de termómetro electrónico, calibrado (GSA Electronics). Las temperaturas rectales diarias se registraron en grados Fahrenheit (°F).

15 4. Aislado vírico nasofaríngeo

20 En cada día de prueba de observación, se tomaron hisopos profundos en cada fosa nasal de cada caballo vacunado y de control mediante una lanza quirúrgica estéril WECK-CEL® (Edward Weck and Company, Inc., Research Triangle Park, N.C. 27709) unida a una pipeta de plástico estéril de 27,94 cm (11 pulgadas) de longitud. Tras la recogida, cada una de las dos lanzas quirúrgicas se colocó inmediatamente en un solo tubo que contenía 4 ml de medio de transporte refrigerado (E-199 complementado con gentamicina, L-glutamina, Pen/Strep 2X, anfotericina B 2X).

25 Para el aislamiento de virus, los tubos se mezclaron, los hisopos se retiraron de manera aséptica y el medio se centrifugó a 1500 rpm durante 10 a 15 minutos para retirar las partículas. El medio se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µ antes de la inoculación en células de cultivo tisular. Después de la filtración, se añadió 4-6 % de solución estéril de sacarosa al 85 % a cada muestra para congelar a -80 °C con el fin de ensayar todas las muestras simultáneamente.

30 El día del ensayo, se usó un ml del medio de transporte descongelado, aclarado, para inocular una monocapa de dos días de 2 cm² de células E-Vero cultivadas en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos de la que se había retirado de manera aséptica el medio de cultivo. Después de la inoculación, se permitió que el inóculo se adsorbiera en la monocapa celular durante al menos una hora a 37 °C en una incubadora humidificada que contenía una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después del periodo de adsorción, se añadió 1 ml adicional de medio de realimentación (E-199 que contenía L-glutamina 2 mM, gentamicina Pen-Strep 2X y anfotericina B 2X) a cada pocillo. Tras la adición de medios de realimentación, las placas se incubaron después a 37 °C en una incubadora de CO₂. Cada pocillo de cultivo tisular de ensayo y control se examinó microscópicamente durante 7 días para detectar signos de efecto citopático (CPE) típico del virus de exposición de la rinitis equina A. Se subcultivaron pocillos que eran negativos al final del periodo de observación de 7 días en células nuevas y se observaron durante 7 días adicionales.

40 Métodos de evaluación estadística

Los caballos fueron clasificados en un intervalo del estado de enfermedad respiratoria, diariamente. La clasificación del estado de enfermedad incluyó la combinación de las evaluaciones nasales y oculares. El algoritmo usado se detalla a continuación:

45

| Estado de la enfermedad | Puntuación nasal | Puntuación de secreción ocular |
|-------------------------|------------------|--------------------------------|
| Normal (0) | 0 o 1 | 0 o 1 |
| Leve (1) | 0 o 1 | 2 |
| Leve (1) | 1,5 | cualquiera |
| Moderado (2) | 2 o 3 | cualquiera |
| Grave (3) | 4, 5 o 6 | cualquiera |

La influencia de la vacunación en la duración de la enfermedad (número de días con al menos una enfermedad moderada) se evaluó usando la estimación de Hodges-Lehman (exacta) (el procedimiento NPAR1WAY en SAS, SAS Institute, Cary NC).

5 La gravedad de la enfermedad se evaluó comparando el estado máximo de la enfermedad entre los caballos vacunados y los caballos de placebo. Se calculó la fracción mitigada y los intervalos de confianza (IC, error típico asimétrico) al 95 % (el procedimiento FREQ en SAS).

10 La temperatura rectal y los títulos de neutralización de suero se analizaron mediante análisis de medidas repetidas apropiadas para datos continuos (temperatura y títulos de SN transformados por log; ANOVA). Se supuso que los títulos de SN eran 0 si el título se señalaba como <4 y 709 si el título se señalaba como >709. Los títulos de SN se transformaron por log antes del análisis. Los resultados de capa leucocitaria e hisopo nasal en cada día se compararon mediante la prueba exacta de Fisher.

15 Resultados

Un caballo, n.º 39 (grupo IVP) murió el día 62 del estudio. Tras la necropsia en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Misuri, se realizó el diagnóstico de esofagitis, gastritis y faringitis crónica-activa, difusa, necrotizante grave y submucosa enfisematosa, con colonias bacterianas de cocobacilos intralesionales y material vegetal, así como una pleuroneumonía fibrinosupurativa grave difusa del pulmón. La explicación más probable de esta muerte sugiere una ruptura previa de la mucosa, tal como una úlcera mucosa en el cardias del estómago que permitió la siembra de material vegetal en los tejidos conectivos asociados (se adjunta informe de patología).

25 **A. DURACIÓN**

La distribución de la duración de la enfermedad (número de días con enfermedad respiratoria moderada o grave) en días se resume en la Tabla 27. La mediana del número de días que se observaron animales en el grupo de placebo con enfermedad fue de 14. En el grupo vacunado, la mediana del número de días con enfermedad fue de 1. La duración de la enfermedad fue significativamente menor en los animales vacunados en comparación con los controles (Tabla 28; P <0,0001).

Tabla 27: Sumario del efecto de la vacunación sobre la duración de la enfermedad (número de días con enfermedad respiratoria moderada o grave)

| Grupo | Mínimo | cuantil 25 | cuantil 50 | cuantil 75 | Máximo |
|--------------------|--------|------------|------------|------------|--------|
| Control (N = 20) | 0 | 10 | 14 | 17 | 18 |
| Vacunados (N = 20) | 0 | 0 | 1 | 4 | 12 |

35 Tabla 28: Efecto de la vacunación sobre la duración de la enfermedad (número de días con enfermedad respiratoria moderada o grave)

| | Control | Vacunado | Cambio en días | Intervalo de confianza al 95 % |
|----------------------------|---------|----------|----------------|--------------------------------|
| Duración (mediana de días) | 14 | 1 | 11 | -14, -8 |

40 Gravedad

La distribución de la gravedad de la enfermedad se resume en la Tabla 29. La gravedad de la enfermedad fue significativamente menor en los caballos vacunados en comparación con los caballos con placebo (Tabla 30; fracción mitigada = 0,7550, IC al 95 % = 0,5518, 0,9582). Los resultados individuales se proporcionan en la Tabla 31.

45 En la Tabla 31, los valores para el caballo n.º 39 que murió el día 62 del estudio se señalan como 0 del día 62 al 67, pero en el análisis solo se consideran valores >1, por que no afecta al resultado. La duración es de 1 día para este caballo y la puntuación máxima es de 3.

Tabla 29: Sumario de la gravedad de la enfermedad basado en la puntuación máxima de secreción nasal

| Grupo | Normal | Leve | Moderada | Grave |
|-------------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Control (N = 20) | 0 % (0/20) | 5 % (1/20) | 20 % (4/20) | 75 % (15/20) |
| Vacunado (N = 20) | 5 % (1/20) | 35 % (7/20) | 55 % (11/20) | 5 % (1/20) |

Tabla 30: Efecto de la vacunación sobre la gravedad de la enfermedad

| | Control n = 20 | Vacunados n = 20 | Fracción mitigada | Intervalo de confianza al 95 % |
|--|----------------|------------------|-------------------|--------------------------------|
| Gravedad (rango medio) | 28,05 | 12,95* | 0,7550 | 0,5518, 0,9582 |
| *Significativamente menor que el grupo de placebo según la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (P <0,05). | | | | |

Tabla 31: Resultados de animales individuales (las regiones sombreadas indican la duración de la enfermedad de moderada a grave)

| Caballo | Vac | Día 46 | Día 47 | Día 48 | Día 49 | Día 50 | Día 51 | Día 52 | Día 53 | Día 54 | Día 55 | Día 56 | Día 57 | Día 58 | Día 59 | Día 60 | Día 61 | Día 62 | Día 63 | Día 64 | Día 65 | Día 66 | Día 67 |
|-----------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 42849285 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42856542 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42857074 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42860382 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 42861051 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42876062 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42878629 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42889377 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 42889622 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42890836 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 43315773 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 108356559 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 108357033 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 108361284 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 108363552 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 108366283 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 108368584 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 108512267 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 108513075 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 108522069 | Combinación | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 31 (Continuación): Resultados de animales individuales (las regiones sombreadas indican la duración de la enfermedad de moderada a grave)

| Caballo | Vac | Día 0 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 | Día 8 | Día 9 | Día 10 | Día 11 | Día 12 | Día 13 | Día 14 | Día 15 | Día 16 | Día 17 | Día 18 | Día 19 | Día 20 | Día 21 | |
|-----------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| 18605089 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 42849558 | Placebo | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 42850873 | Placebo | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| 42861315 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 | 3 | 0 | 2 | 3 | 0 | 2 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 42865808 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| 42867036 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 42867892 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 42869592 | Placebo | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 |
| 42870316 | Placebo | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42874866 | Placebo | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 42876021 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 42879094 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 42879533 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42889258 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42890047 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 42891256 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 42892606 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 108339771 | Placebo | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| 108340611 | Placebo | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 108341625 | Placebo | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 |

B. TEMPERATURA RECTAL

5 Los resultados del análisis estadístico se resumen en la Tabla 32. La interacción de vacuna por día fue estadísticamente significativa. Se proporcionan análisis dentro del día en la Tabla 33 (apéndice). Los días 3, 4 y 5, los caballos en el grupo vacunado tuvieron temperaturas estadísticamente significativamente menores que las del grupo de placebo. El día 20, los caballos en el grupo vacunado tuvieron temperaturas significativamente mayores que los del grupo de placebo. Sin embargo, en todos los días, las diferencias entre los grupos de tratamiento no fueron clínicamente significativas y solo un caballo (n.º 39) tuvo una temperatura rectal mayor de 102 °F (39 °C) en cualquier día del estudio de exposición.

Tabla 32: Sumario del efecto de la vacunación sobre la temperatura rectal y los títulos de neutralización de suero

| Resultado | Valores de p | | |
|--------------|--------------|----------|--------------|
| | Vacuna | Día | Vacuna * Día |
| Temperatura | 0,5754 | < 0,0001 | 0,0006 |
| Título de SN | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |

1. Títulos de neutralización de suero

15 Los resultados del análisis estadístico se resumen en la Tabla 32. Los días 46 y 53, los caballos en el grupo vacunado tuvieron títulos significativamente mayores que los del grupo de placebo. El día 67, los caballos en el grupo vacunado tuvieron significativamente menores que los del grupo de placebo.

20 Análisis

Este estudio se realizó para demostrar la eficacia del componente del virus de la rinitis equina A de una vacuna de virus de la rinitis equina A inactivado en combinación con herpesvirus equino inactivado de tipo 1 y 4 y virus de la gripe equina. Se proporcionó vacunación en un formato de 2 dosis y se realizó exposición de virus virulento de la rinitis equina A 25 días después de la vacunación de refuerzo. Se evaluaron los caballos de control vacunados y tratados con placebo para evaluar el efecto de la vacunación sobre la reducción de la gravedad y la duración de la enfermedad respiratoria clínica. Se evaluaron diariamente signos clínicos, hisopos nasales y capas leucocitarias para detectar pruebas de enfermedad de rinitis equina A y la presencia del virus en los caballos expuestos.

30 Los resultados de este estudio de exposición muestran una reducción estadísticamente significativa y clínicamente importante tanto de la gravedad como de la duración de la enfermedad respiratoria en vacunados después de la exposición. Según lo confirmado por el análisis de fracción mitigada de las puntuaciones de enfermedad respiratoria en caballos vacunados con el IVP en comparación con caballos vacunados con el producto de control, los signos moderados/graves de enfermedad respiratoria se redujeron en 75,5 % (intervalo de confianza al 95 % 96 % a 55 %).

35 La duración de la enfermedad moderada/grave también se redujo significativamente en 11 días en caballos vacunados en comparación con caballos de control (intervalo de confianza al 95 % de duración de la enfermedad de 14 días a 8 días más corta). Además, la vacunación redujo significativamente la excreción del virus nasal durante los 5 días sucesivos de excreción vírica máxima y la viremia también se redujo significativamente durante los 4 días de viremia máxima dentro del periodo de exposición. Es importante destacar que el virus se recuperó de muestras de capa leucocitaria de caballos de control un total de 54 veces durante 5 días de estudio en comparación con solo 8 días

40 totales de viremia durante 4 días de estudio en caballos vacunados.

Conclusiones

45 Los datos de este estudio demuestran claramente que 2 dosis intramusculares x 1 ml de vacuna de virus muerto contra la rinitis equina A/rinoneumonitis/gripe (código de producto por determinar, sin licencia), administradas a intervalos de 21 días entre dosis a caballos, redujo significativamente la gravedad y duración de la enfermedad respiratoria provocada por exposición virulento a la rinitis equina A.

50 Los resultados del estudio ilustran el uso de esta vacuna para la inmunización de caballos de seis meses de edad o mayores contra la enfermedad respiratoria provocada por el virus de la rinitis equina A. Estos datos también establecen el lote de vacuna 122110 como una vacuna de referencia aceptable para las pruebas de potencia de series posteriores de vacuna contra la rinitis equina A/rinoneumonitis/gripe, virus muerto y vacuna contra la rinitis equina A, virus muerto

55 (Código de producto 1522.21, sin licencia).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

ES 2 748 555 T3

<120> VACUNA CONTRA LA RINITIS EQUINA

<130> 10-0144-PCT

5 <140>
<141>

<150> 62/510.226
<151> 21-07-2011

10 <150> 61/452.390
<151> 14-03-2011

15 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 353
<212> ADN
<213> Virus de la rinitis equina A

<400> 1

```

atgcctgtag cgtcagtaaa acgcggtaaa cataggcttt gactgtagcg tcagtaaaac      60
gcaacaacca tacgctgttg tgcctgtagc gtcagtaaaa cgcggaac gcaagcatta      120
actgtagcgt cagtaaaacg caacaacat acgctaagt gcctgaggcg tcagtaaacg      180
catacagcaa accagagctt cccggcttta agggttactg ctcgtaatga gagcacttgg      240
caatttgtca ggatttctg gtggttgtca cgggagagag gagcccgttt tcgggactg      300
ttcccaacaa acatttgtgc gcttcggcgc acaccccgct cagccccctg tca          353
    
```

30 <210> 2
<211> 7839
<212> ADN
<213> Virus de la rinitis equina A

<400> 2

```

ttcttttttt ttcccttccc tcatcaccg acgttggggg ggggggggtt gaaaaagttt      60
atgcctgtag cgtcagtaaa acgcggtaaa cataggcttt gactgtagcg tcagtaaaac      120
gcaacaacca tacgctgttg tgcctgtagc gtcagtaaaa cgcggaac gcaagcatta      180
actgtagcgt cagtaaaacg caacaacat acgctaagt gcctgaggcg tcagtaaacg      240
catacagcaa accagagctt cccggcttta agggttactg ctcgtaatga gagcacttgg      300
caatttgtca ggatttctg gtggttgtca cgggagagag gagcccgttt tcgggactg      360
ttcccaacaa acatttgtgc gcttcggcgc acaccccgct cagccccctg tcattgactg      420
gtcgaaggcg ctcgcaataa gactggtcgt cacttggtt ttctatccgt tcaggcttta      480
gcgcgccctc gcgcggcggg ttgtcaggcc cgtgtgctgt acagcaccag gtaaccggac      540
    
```

35

ES 2 748 555 T3

agcagcttgc tggatthttcc cggtgccatt gctctggatg gtgtcaccaa gctggtggat 600
 gaagagtgaa cctgatgaag caacacactt gtggtagcgc tgcccaaaag ggagcggaat 660
 tccccgccg cgaggcggtc ctctctggcc aaaagcccag cgtaaatagc gcctthttggg 720
 atgcaggtac cccacctgcc aagtgtgaag tggaatcagc ggatctctga ttggcctgt 780
 actgaactac accatctacc gctgtgaaga atgtcctgaa ggcaagctgg ttacagccct 840
 gatcaggagc cccatccatg actctogatt ggcatggggc caaaaattgt ctaagcagcg 900
 gcagggacgc gggagcgttt cctthtcatt ttgatttgca tgatggcggc gtctaaagtg 960
 tacagggttt gcgagcagac tcttctcgct ggcgccgtgc gcatgatgga caagthtttg 1020
 cagaagagag ttgtthttgt gccacaccta gataaacagg tacgcctgac aggtcttcac 1080
 aactatgaca acacatgttg gcttaatgcc ttgactcagt tgactcagat tcttggaatt 1140
 cggctthttg atgaacactt tggaaacaga ggtthgttca ctcgaaaac aattgattgg 1200
 gtgagtgacc aaactggaat aaaggattta aaatcaggag cgccaccctc cgtggtggtt 1260
 tacaagctct ggcaacacgg ccatttgatg gtcggcacca tggaaaagcc cagaccaatc 1320
 acgctthgtt ctgggcccaa agtgtgtctg tctgacatgt gggcgtgtgt ttctgccaa 1380
 cctggacacg cagtgttcta tctcttgact gatgaaggat ggatttgcat tgatgacaag 1440
 aaaatttatt atgaaacacc agagcccagc gatgtcttgg tcttgcacc ctatgatttt 1500
 gagtcaactc gaaaagatcc tcctaggctg caccaaagat acgaaaagcc tttcaaaaag 1560
 ttgtcaggag ctgggacctc tactccgaca accgggaatc agaatatgtc gggcaatagt 1620
 gggctcattg tccaaaattt ttacatgcaa caataccaaa attcaattga tgcagacctg 1680
 ggcgataatg tcatcagtc tgaaggccaa ggcagcaaca ctagtagctc tacctcctca 1740
 agccagtcgt ctggtthtagg tggatggttc tctagtctgc tcaacctagg taccaagcta 1800
 ctggctgaca aaaagacaga agaaaccaca aacattgagg acaggattga gacaacagtt 1860
 gtgggagtga cgattatcaa ttcacaaggg tcagttggca caacctattg ttactccaag 1920
 cctgacagca aagcgcctc cacagtgtct gaccgggtca cccggctggg gccaaactct 1980
 tctagacact acaccttcaa ggttgagag tggccacact cacaatccca tgggcacgcc 2040
 tggatttgcc cactgcccgg ggacaaactt aaaagatgg gcagthttca cgagggtggg 2100
 aaggcacacc acttggtgaa gaatggatgg gatgtggtt ttcagggtgaa tgctctthtt 2160
 gcccaactcg gagctcttht cgttgacgca gttcctgagt atgaacacac ccatgagaag 2220
 gctctaaaat ggtctgagct tgaagaacct gcttatacat atcagcagct ttcagtgtht 2280
 ccacatcaat tghtaaattt gagaacaaat tcttctgtac acttggttat gcctatatt 2340
 ggacctgggc caaccacgaa tttgacact cataaccctc ggaccattgt aatcttgatt 2400

ES 2 748 555 T3

| | |
|---|------|
| ttgtctgaac tgacagggcc tggccagact gtgcccgtca ccatgtcggg ggctcctatt | 2460 |
| gacgccatgg tgaatgggcc tctcccaaac ccagaggcac caattagagt ggtttcagta | 2520 |
| cctgagtcag attcgttcat gtcttctgtg ccagacaatt ctaccccgct ttatccaaag | 2580 |
| gttgtggtcc cccctcggca agtcccaggg aggttcacga attttattga tgtggctaaa | 2640 |
| cagacttact cattttgctc catctctggc aagccctatt ttgaggtgac aaatacttca | 2700 |
| ggagacgagc ctctgtttca gatggatgtc tccctcagtg ctgctgagtt gcacgggaca | 2760 |
| tatggtgcaa gcttgtcatc tttctttgca cagtacaggg gttcactaaa cttcaatttc | 2820 |
| atcttactg gagctgcgcc aaccaaagct aaattcttgg tcgccttcgt tcctccccac | 2880 |
| acagccgcbc ctaaaacgcy ggatgaagcc atggcgtgta tacacgcagt gtgggatgtc | 2940 |
| ggcttgaatt ctgccttttc tttcaatgtg ccttattcat ctccagctga ctttatggcc | 3000 |
| gtttactcgg cagaggcaac ggttgtgaat gtgtctggct ggctacaagt ttatgccttg | 3060 |
| actgctctca cttcaactga cattgctgtg aatagcaagg gccgtgtttt ggtggccggt | 3120 |
| tctgtgggc cagatttctc acttcgacac cccgtggatc tgctgacaa gcaggtcaca | 3180 |
| aatgtgggcy aggacgggga accaggtgaa actgagcccc gttatgctct gtctccagtg | 3240 |
| gacatgcatg ttcatacgga tgtcagcttc ctgctagaca gattttttga tgttgaaaca | 3300 |
| attgagcttt caaatttgac tgggtcacca accactcata ttttgaacct atttggctcc | 3360 |
| accgctcagt tggcatgggc taggctgttg aacacctgca catatttctt ttcaaatttg | 3420 |
| gagttgtcta tacaattcaa atttacaaca atgcctctt ccggtgaaaa aggcttcgtc | 3480 |
| tgggttaagt ggttcccgtt tggagcacca acaaaaacaa cagatgcatg gcagcttgaa | 3540 |
| ggcggaggca actccgtcag aattcaaaaa ctggctgtgg ctggcctctc acccaccggt | 3600 |
| atthtaaaa ttgctggctc gcggtcgcag gcatgtggct tcaatgtgcc ctacacttca | 3660 |
| atgtggcggy ttgtgccagt cttttacaac ggttggggcy cccccacaa agagaaagca | 3720 |
| acctacaatt ggcttccggg cgcacattht gggtcgatac ttttgacttc tgatgcacac | 3780 |
| gacaagggtg gctgttacct gcggtatcga ttcccgggg ctagcatgta ctgccaaga | 3840 |
| cctattccgc ccgcatcac ccggccggcy gataagacta ggcacaaatt ccctacaac | 3900 |
| attaacaaac agtgcactaa ttatgccctt cttaaattgg caggtgatgt agagagtaat | 3960 |
| cctggcccca ctatthtttc taaagcttct gctgatttga acgccctgtc cacctctctt | 4020 |
| ggtgagttga ctggtatgct taaggatttg aaagctaagg ctgaaactta ttccccctt | 4080 |
| tataaaatgg caaaaatggt gtttaaattg gccactctag cggttgccgc tatgagaaca | 4140 |
| aaagaccag ttgtagtgtt gatgttgata gctgattttg gattggaagt ttttgatacg | 4200 |
| ggtttcttct tctcgtatth tcaagagaaa ctgcagcctt atatgaagac cattcccggc | 4260 |
| aaagtttctg atthggttac agacgcagct actgctgcag ctcaaattcc aaaaggggtg | 4320 |

ES 2 748 555 T3

tattcttttg tgtcatcttt ctttgagaca ccagaaggtg tggttgagaa acaggtttct 4380
cttaggacta tcaatgatat ttttactctc ttgaaaaatt cggactggtt tattaagacg 4440
ctggttgctc tcaaaaagtg gctggtgtcg tggttcaaac aggaacagca agcagatgat 4500
gccctttatt ctgaattgga aaaataccct ttgtataaat tgaaattgaa ggaaccagac 4560
actcaggagg aggcccgcca gtggttcaaa gacatgcagc agagagcctt ggcagtgaag 4620
gataagggtt tattctctct gttgcaaadc cctcttgtga acttgcctac atcacgtcct 4680
gaaccggtt tgtgtgtgct gagaggcgcg tccggacagg gcaagtccta tttagcaaac 4740
atgatggctc aggctatttc tcttctccta actgggaaac agaacagtgt gtggagtgc 4800
ccaccgacc ccacatactt tgatggttat aacggacaag ctggtgtcat aatggatgac 4860
ttgggcaaaa accctaacgg agcagatttc aagtatttct gtcagatggt gtcaactaca 4920
gcctttgttc caccaatggc ccacttggat gacaagggaa ttccctttac ctctcctgtt 4980
gttatttgta ctacaaattt gcattcctct ttcaocccaa ttactgtgtc atgtcctgag 5040
gctctgaaaa gaaggttccg gtttgacgtg actgtttctg ctaagcctgg ttttgtgagg 5100
actgtggggt cgtctcagct tttgaacttg cctcttgcct tgaagcctgc tggctctcca 5160
cctcatccta tttttgagaa tgacatgcc attttgaatg gtcaggctgt gaaattggct 5220
ttgtcagggt ttgaagtgac cgcctttgag ttaattgaga tgattttgtc tgagggtcag 5280
aatagacagg acacacacaa gatgcctatt tttaaacagt cctggtctga tttgttcaag 5340
aagtgtacaa gtgatgagga acagaagtgt ttgcagttc tgattgatca caaggattct 5400
gaaattttga aggcgtttgt ttcagagcgc tctattatgc tgcatagaaga gtacatgaaa 5460
tgggagtctt atatgaccag aaggccaag tatcatcgct tggcggcaga ttttgctatg 5520
ttcttgtcta ttcttacatc attgattggt attttttgc tgggtgtattc tatgtatcag 5580
cttttcaaaa ctccagatga gcattcggct tatgaccag caaccaaacc aaagccaag 5640
acacaggaaa ttaagacact aaagattcgc acagaaacag gcgtgcctgc cacagacctg 5700
cagcagtcgg tgatgaaaaa tgttcagcca attgagttgt actgtgaggg taatctggtt 5760
actgactgct cagcactggg tgtttatgac aactoctact tggtagcttt acatttgttt 5820
gagtttgatt ttgacacatc tgtgctgggc gggcgcagc atagcaaggc agactgtgag 5880
aaggttgagt ttgagctcag cgtcggaggg gacatggtgt cgtctgatgc ctgtctgctt 5940
cgactccctt cgggtcccaa agttagaaac atacttcatt tgtttaccaa tgaaattgag 6000
ctcaaaaaga tgacccaaat tacaggaatt atgaattctc cacaccaagc acgtactgtg 6060
ttttttggca gttttttgac agttaagaaa tccattctta catctgatgg gactgtaatg 6120
cctaattgtt tgtcctatgc ggcccagacc tcacggggtt actgtggagc tgcaattgtg 6180

ES 2 748 555 T3

gccgggtctc cggctcgc at tataggcata cattccgctg gaactggctc agttgctttt 6240
 tgttctctgg tgtccagaga cgctttggag cggaccctgc ctcagaaaca aggaaatgtg 6300
 gtccgtttgg atgatgatgt aagagtgtct gttccgcgcc gtaccaaatt ggttaaataca 6360
 ttggcctacc ccattttcaa acccgatttt gggccagcac ctctgtccca gtttgacaaa 6420
 agattggcag acggcgtgaa acttgatgaa gttgtgtttg ctaagcacac aggagacaag 6480
 gagatctctg cacctgacca aaagtggctg ctccgcgcag ctcatgttta tgcccagaaa 6540
 gtcttctccc gcattgggtt tgataaccag gcattgaccg aggaggaggc catttgccggc 6600
 attcctggac ttgacaaaat ggaacaagac actgctccgg gcttacccta tgacacagcag 6660
 aacaagagaa gaaaagacat ttgtgacttt gagaaaggcc agttaaaggg ggctgctaag 6720
 ctccagaaaag agcggtttct taaaggagac tactccgatt tggctatca atcatttcta 6780
 aaggatgaaa ttcggccact tgaaaaagt agggctggca agaccggct gatcgatgtg 6840
 cccccgatgc cccatgtggt tgcggggcgg caactcctcg gccggtttgt ctccaaatc 6900
 cacgaagcaa atggatttga gattggttct gcaataggat gtgaccctga tgtggattgg 6960
 actcggtttg gccttgagct cgagcgggat aggtatgtt atgcctgtga ctattctcgg 7020
 tttgatgcca accacgctgc tgatgctatg agagttgttc tcaactattt cttctctgag 7080
 gaccacgggt tcgaccctgg tgtaccgcc ttcatcgagt ctcttattga ctcggtgcat 7140
 gcttatgaag agaagagata taatatttat ggaggtttac cctctgggtg ttcttgacc 7200
 tcaattttga atactgtttt gaataatgtt tacattcttg cagcaatgat gaaggctttt 7260
 gaaaattttg agcctgatga tattttggtt ttatgctatg gggatgattg cctcatagcc 7320
 tctgatttgg aaattgattt tcagaaactt gtcccctgtot ttgcagattt tgggcaagtt 7380
 attactactg ctgacaagac tgactttttt aaacttacca cgctttctga ggttactttt 7440
 ttgaagcgtg cttttgttcc tgacggggcg ctttacaagc cagttatgga tgtgaagacc 7500
 ctggaagcaa tcctcagttt cgttcgcctt ggtacacagg ctgagaagct cctctctggt 7560
 gcgcagttgg ccggccactg cgaaccggat gagtatgagc acctgtttca gccgtttgag 7620
 gggatgtatt acgtccctac ttggcgtgac ttgcgcctcc agtggttgat gaagcttga 7680
 tgctaaactt ttttttggtt ttgtttttct ttgtttttct tttaatctgt agagttaaga 7740
 tttttagatt aagagttttt tggaattaga taagagttta gtgagtagtt ttgagcaaaa 7800
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7839

<210> 3
 <211> 2248
 <212> PRT
 <213> Virus de la rinitis equina A

5

<400> 3

ES 2 748 555 T3

Met Met Ala Ala Ser Lys Val Tyr Arg Val Cys Glu Gln Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ala Gly Ala Val Arg Met Met Asp Lys Phe Leu Gln Lys Arg Val Val
20 25 30

Phe Val Pro His Leu Asp Lys Gln Val Arg Leu Thr Gly Leu His Asn
35 40 45

Tyr Asp Asn Thr Cys Trp Leu Asn Ala Leu Thr Gln Leu Thr Gln Ile
50 55 60

Leu Gly Ile Arg Leu Phe Asp Glu His Phe Gly Asn Arg Gly Leu Phe
65 70 75 80

Thr Arg Lys Thr Ile Asp Trp Val Ser Asp Gln Thr Gly Ile Lys Asp
85 90 95

Leu Lys Ser Gly Ala Pro Pro Leu Val Val Val Tyr Lys Leu Trp Gln
100 105 110

His Gly His Leu Asp Val Gly Thr Met Glu Lys Pro Arg Pro Ile Thr
115 120 125

Leu Trp Ser Gly Pro Lys Val Cys Leu Ser Asp Met Trp Ala Cys Val
130 135 140

Ser Ala Lys Pro Gly His Ala Val Phe Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly
145 150 155 160

Trp Ile Cys Ile Asp Asp Lys Lys Ile Tyr Tyr Glu Thr Pro Glu Pro
165 170 175

Asp Asp Val Leu Val Phe Ala Pro Tyr Asp Phe Glu Ser Leu Gly Lys
180 185 190

Asp Pro Pro Arg Leu His Gln Arg Tyr Glu Lys Ala Phe Lys Lys Leu
195 200 205

Ser Gly Ala Gly Thr Ser Thr Pro Thr Thr Gly Asn Gln Asn Met Ser
210 215 220

Gly Asn Ser Gly Ser Ile Val Gln Asn Phe Tyr Met Gln Gln Tyr Gln
225 230 235 240

Asn Ser Ile Asp Ala Asp Leu Gly Asp Asn Val Ile Ser Pro Glu Gly
245 250 255

ES 2 748 555 T3

Gln Gly Ser Asn Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Gln Ser Ser Gly
 260 265 270

Leu Gly Gly Trp Phe Ser Ser Leu Leu Asn Leu Gly Thr Lys Leu Leu
 275 280 285

Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Asn Ile Glu Asp Arg Ile Glu
 290 295 300

Thr Thr Val Val Gly Val Thr Ile Ile Asn Ser Gln Gly Ser Val Gly
 305 310 315 320

Thr Thr Tyr Cys Tyr Ser Lys Pro Asp Ser Lys Ala Pro Ser Thr Val
 325 330 335

Ser Asp Pro Val Thr Arg Leu Gly Pro Thr Leu Ser Arg His Tyr Thr
 340 345 350

Phe Lys Val Gly Glu Trp Pro His Ser Gln Ser His Gly His Ala Trp
 355 360 365

Ile Cys Pro Leu Pro Gly Asp Lys Leu Lys Lys Met Gly Ser Phe His
 370 375 380

Glu Val Val Lys Ala His His Leu Val Lys Asn Gly Trp Asp Val Val
 385 390 395 400

Val Gln Val Asn Ala Ser Phe Ala His Ser Gly Ala Leu Cys Val Ala
 405 410 415

Ala Val Pro Glu Tyr Glu His Thr His Glu Lys Ala Leu Lys Trp Ser
 420 425 430

Glu Leu Glu Glu Pro Ala Tyr Thr Tyr Gln Gln Leu Ser Val Phe Pro
 435 440 445

His Gln Leu Leu Asn Leu Arg Thr Asn Ser Ser Val His Leu Val Met
 450 455 460

Pro Tyr Ile Gly Pro Gly Pro Thr Thr Asn Leu Thr Leu His Asn Pro
 465 470 475 480

Trp Thr Ile Val Ile Leu Ile Leu Ser Glu Leu Thr Gly Pro Gly Gln
 485 490 495

Thr Val Pro Val Thr Met Ser Val Ala Pro Ile Asp Ala Met Val Asn
 500 505 510

ES 2 748 555 T3

Gly Pro Leu Pro Asn Pro Glu Ala Pro Ile Arg Val Val Ser Val Pro
515 520 525

Glu Ser Asp Ser Phe Met Ser Ser Val Pro Asp Asn Ser Thr Pro Leu
530 535 540

Tyr Pro Lys Val Val Val Pro Pro Arg Gln Val Pro Gly Arg Phe Thr
545 550 555 560

Asn Phe Ile Asp Val Ala Lys Gln Thr Tyr Ser Phe Cys Ser Ile Ser
565 570 575

Gly Lys Pro Tyr Phe Glu Val Thr Asn Thr Ser Gly Asp Glu Pro Leu
580 585 590

Phe Gln Met Asp Val Ser Leu Ser Ala Ala Glu Leu His Gly Thr Tyr
595 600 605

Val Ala Ser Leu Ser Ser Phe Phe Ala Gln Tyr Arg Gly Ser Leu Asn
610 615 620

Phe Asn Phe Ile Phe Thr Gly Ala Ala Ala Thr Lys Ala Lys Phe Leu
625 630 635 640

Val Ala Phe Val Pro Pro His Thr Ala Ala Pro Lys Thr Arg Asp Glu
645 650 655

Ala Met Ala Cys Ile His Ala Val Trp Asp Val Gly Leu Asn Ser Ala
660 665 670

Phe Ser Phe Asn Val Pro Tyr Ser Ser Pro Ala Asp Phe Met Ala Val
675 680 685

Tyr Ser Ala Glu Ala Thr Val Val Asn Val Ser Gly Trp Leu Gln Val
690 695 700

Tyr Ala Leu Thr Ala Leu Thr Ser Thr Asp Ile Ala Val Asn Ser Lys
705 710 715 720

Gly Arg Val Leu Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Asp Phe Ser Leu Arg
725 730 735

His Pro Val Asp Leu Pro Asp Lys Gln Val Thr Asn Val Gly Glu Asp
740 745 750

Gly Glu Pro Gly Glu Thr Glu Pro Arg Tyr Ala Leu Ser Pro Val Asp

ES 2 748 555 T3

Gly Pro Thr Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asn Ala Leu
1010 1015 1020

Ser Thr Ser Leu Gly Glu Leu Thr Gly Met Leu Lys Asp Leu Lys
1025 1030 1035

Ala Lys Ala Glu Thr Tyr Ser Pro Phe Tyr Lys Met Ala Lys Met
1040 1045 1050

Leu Phe Lys Leu Ala Thr Leu Ala Val Ala Ala Met Arg Thr Lys
1055 1060 1065

Asp Pro Val Val Val Val Met Leu Ile Ala Asp Phe Gly Leu Glu
1070 1075 1080

Val Phe Asp Thr Gly Phe Phe Phe Ser Tyr Phe Gln Glu Lys Leu
1085 1090 1095

Gln Pro Tyr Met Lys Thr Ile Pro Gly Lys Val Ser Asp Leu Val
1100 1105 1110

Thr Asp Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gln Ile Pro Lys Gly Val Tyr
1115 1120 1125

Ser Phe Val Ser Ser Phe Phe Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Glu
1130 1135 1140

Lys Gln Val Ser Leu Arg Thr Ile Asn Asp Ile Phe Thr Leu Leu
1145 1150 1155

Lys Asn Ser Asp Trp Phe Ile Lys Thr Leu Val Ala Leu Lys Lys
1160 1165 1170

Trp Leu Val Ser Trp Phe Lys Gln Glu Gln Gln Ala Asp Asp Ala
1175 1180 1185

Leu Tyr Ser Glu Leu Glu Lys Tyr Pro Leu Tyr Lys Leu Lys Leu
1190 1195 1200

Lys Glu Pro Asp Thr Gln Glu Glu Ala Arg Gln Trp Phe Lys Asp
1205 1210 1215

Met Gln Gln Arg Ala Leu Ala Val Lys Asp Lys Gly Leu Phe Ser
1220 1225 1230

Leu Leu Gln Ile Pro Leu Val Asn Leu Pro Thr Ser Arg Pro Glu
1235 1240 1245

ES 2 748 555 T3

Pro Val Val Cys Val Leu Arg Gly Ala Ser Gly Gln Gly Lys Ser
1250 1255 1260

Tyr Leu Ala Asn Met Met Ala Gln Ala Ile Ser Leu Leu Leu Thr
1265 1270 1275

Gly Lys Gln Asn Ser Val Trp Ser Cys Pro Pro Asp Pro Thr Tyr
1280 1285 1290

Phe Asp Gly Tyr Asn Gly Gln Ala Val Val Ile Met Asp Asp Leu
1295 1300 1305

Gly Gln Asn Pro Asn Gly Ala Asp Phe Lys Tyr Phe Cys Gln Met
1310 1315 1320

Val Ser Thr Thr Ala Phe Val Pro Pro Met Ala His Leu Asp Asp
1325 1330 1335

Lys Gly Ile Pro Phe Thr Ser Pro Val Val Ile Cys Thr Thr Asn
1340 1345 1350

Leu His Ser Ser Phe Thr Pro Ile Thr Val Ser Cys Pro Glu Ala
1355 1360 1365

Leu Lys Arg Arg Phe Arg Phe Asp Val Thr Val Ser Ala Lys Pro
1370 1375 1380

Gly Phe Val Arg Thr Val Gly Ser Ser Gln Leu Leu Asn Leu Pro
1385 1390 1395

Leu Ala Leu Lys Pro Ala Gly Leu Pro Pro His Pro Ile Phe Glu
1400 1405 1410

Asn Asp Met Pro Ile Leu Asn Gly Gln Ala Val Lys Leu Ala Leu
1415 1420 1425

Ser Gly Val Glu Val Thr Ala Phe Glu Leu Ile Glu Met Ile Leu
1430 1435 1440

Ser Glu Val Gln Asn Arg Gln Asp Thr His Lys Met Pro Ile Phe
1445 1450 1455

Lys Gln Ser Trp Ser Asp Leu Phe Lys Lys Cys Thr Ser Asp Glu
1460 1465 1470

Glu Gln Lys Met Leu Gln Phe Leu Ile Asp His Lys Asp Ser Glu
1475 1480 1485

ES 2 748 555 T3

Ile Leu Lys Ala Phe Val Ser Glu Arg Ser Ile Met Leu His Glu
1490 1495 1500

Glu Tyr Met Lys Trp Glu Ser Tyr Met Thr Arg Arg Ala Lys Tyr
1505 1510 1515

His Arg Leu Ala Ala Asp Phe Ala Met Phe Leu Ser Ile Leu Thr
1520 1525 1530

Ser Leu Ile Val Ile Phe Cys Leu Val Tyr Ser Met Tyr Gln Leu
1535 1540 1545

Phe Lys Thr Pro Asp Glu His Ser Ala Tyr Asp Pro Ala Thr Lys
1550 1555 1560

Pro Lys Pro Lys Thr Gln Glu Ile Lys Thr Leu Lys Ile Arg Thr
1565 1570 1575

Glu Thr Gly Val Pro Ala Thr Asp Leu Gln Gln Ser Val Met Lys
1580 1585 1590

Asn Val Gln Pro Ile Glu Leu Tyr Cys Glu Gly Asn Leu Val Thr
1595 1600 1605

Asp Cys Ser Ala Leu Gly Val Tyr Asp Asn Ser Tyr Leu Val Pro
1610 1615 1620

Leu His Leu Phe Glu Phe Asp Phe Asp Thr Ile Val Leu Gly Gly
1625 1630 1635

Arg Gln Tyr Ser Lys Ala Asp Cys Glu Lys Val Glu Phe Glu Leu
1640 1645 1650

Ser Val Gly Gly Asp Met Val Ser Ser Asp Ala Cys Leu Leu Arg
1655 1660 1665

Leu Pro Ser Gly Pro Lys Val Arg Asn Ile Leu His Leu Phe Thr
1670 1675 1680

Asn Glu Ile Glu Leu Lys Lys Met Thr Gln Ile Thr Gly Ile Met
1685 1690 1695

Asn Ser Pro His Gln Ala Arg Thr Val Phe Phe Gly Ser Phe Leu
1700 1705 1710

Thr Val Lys Lys Ser Ile Leu Thr Ser Asp Gly Thr Val Met Pro

ES 2 748 555 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------------|-----|-----------------|-----|-------------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------|
| 1715 | | | | | | 1720 | | | | | | | | | | 1725 |
| Asn Val | Leu Ser Tyr Ala | Ala | Gln Thr Ser Arg | Gly | Tyr Cys Gly | | | | | | | | | | | |
| 1730 | | | | | | 1735 | | | | | | | | | | 1740 |
| Ala Ala | Ile Val Ala Gly | Ser | Pro Ala Arg Ile | Ile | Gly Ile His | | | | | | | | | | | |
| 1745 | | | | | | 1750 | | | | | | | | | | 1755 |
| Ser Ala | Gly Thr Gly Ser | Val | Ala Phe Cys Ser | Leu | Val Ser Arg | | | | | | | | | | | |
| 1760 | | | | | | 1765 | | | | | | | | | | 1770 |
| Asp Ala | Leu Glu Arg Thr | Leu | Pro Gln Lys Gln | Gly | Asn Val Val | | | | | | | | | | | |
| 1775 | | | | | | 1780 | | | | | | | | | | 1785 |
| Arg Leu | Asp Asp Asp Val | Arg | Val Ser Val Pro | Arg | Arg Thr Lys | | | | | | | | | | | |
| 1790 | | | | | | 1795 | | | | | | | | | | 1800 |
| Leu Val | Lys Ser Leu Ala | Tyr | Pro Ile Phe Lys | Pro | Asp Phe Gly | | | | | | | | | | | |
| 1805 | | | | | | 1810 | | | | | | | | | | 1815 |
| Pro Ala | Pro Leu Ser Gln | Phe | Asp Lys Arg Leu | Ala | Asp Gly Val | | | | | | | | | | | |
| 1820 | | | | | | 1825 | | | | | | | | | | 1830 |
| Lys Leu | Asp Glu Val Val | Phe | Ala Lys His Thr | Gly | Asp Lys Glu | | | | | | | | | | | |
| 1835 | | | | | | 1840 | | | | | | | | | | 1845 |
| Ile Ser | Ala Pro Asp Gln | Lys | Trp Leu Leu Arg | Ala | Ala His Val | | | | | | | | | | | |
| 1850 | | | | | | 1855 | | | | | | | | | | 1860 |
| Tyr Ala | Gln Lys Val Phe | Ser | Arg Ile Gly Phe | Asp | Asn Gln Ala | | | | | | | | | | | |
| 1865 | | | | | | 1870 | | | | | | | | | | 1875 |
| Leu Thr | Glu Glu Glu Ala | Ile | Cys Gly Ile Pro | Gly | Leu Asp Lys | | | | | | | | | | | |
| 1880 | | | | | | 1885 | | | | | | | | | | 1890 |
| Met Glu | Gln Asp Thr Ala | Pro | Gly Leu Pro Tyr | Ala | Gln Gln Asn | | | | | | | | | | | |
| 1895 | | | | | | 1900 | | | | | | | | | | 1905 |
| Lys Arg | Arg Lys Asp Ile | Cys | Asp Phe Glu Lys | Gly | Gln Leu Lys | | | | | | | | | | | |
| 1910 | | | | | | 1915 | | | | | | | | | | 1920 |
| Gly Ala | Ala Lys Leu Gln | Lys | Glu Arg Phe Leu | Lys | Gly Asp Tyr | | | | | | | | | | | |
| 1925 | | | | | | 1930 | | | | | | | | | | 1935 |
| Ser Asp | Leu Val Tyr Gln | Ser | Phe Leu Lys Asp | Glu | Ile Arg Pro | | | | | | | | | | | |
| 1940 | | | | | | 1945 | | | | | | | | | | 1950 |

ES 2 748 555 T3

Leu Glu Lys Val Arg Ala Gly Lys Thr Arg Leu Ile Asp Val Pro
 1955 1960 1965

Pro Met Pro His Val Val Val Gly Arg Gln Leu Leu Gly Arg Phe
 1970 1975 1980

Val Ser Lys Phe His Glu Ala Asn Gly Phe Glu Ile Gly Ser Ala
 1985 1990 1995

Ile Gly Cys Asp Pro Asp Val Asp Trp Thr Arg Phe Gly Leu Glu
 2000 2005 2010

Leu Glu Arg Tyr Arg Tyr Val Tyr Ala Cys Asp Tyr Ser Arg Phe
 2015 2020 2025

Asp Ala Asn His Ala Ala Asp Ala Met Arg Val Val Leu Asn Tyr
 2030 2035 2040

Phe Phe Ser Glu Asp His Gly Phe Asp Pro Gly Val Pro Ala Phe
 2045 2050 2055

Ile Glu Ser Leu Ile Asp Ser Val His Ala Tyr Glu Glu Lys Arg
 2060 2065 2070

Tyr Asn Ile Tyr Gly Gly Leu Pro Ser Gly Cys Ser Cys Thr Ser
 2075 2080 2085

Ile Leu Asn Thr Val Leu Asn Asn Val Tyr Ile Leu Ala Ala Met
 2090 2095 2100

Met Lys Ala Phe Glu Asn Phe Glu Pro Asp Asp Ile Leu Val Leu
 2105 2110 2115

Cys Tyr Gly Asp Asp Cys Leu Ile Ala Ser Asp Leu Glu Ile Asp
 2120 2125 2130

Phe Gln Lys Leu Val Pro Val Phe Ala Asp Phe Gly Gln Val Ile
 2135 2140 2145

Thr Thr Ala Asp Lys Thr Asp Phe Phe Lys Leu Thr Thr Leu Ser
 2150 2155 2160

Glu Val Thr Phe Leu Lys Arg Ala Phe Val Pro Asp Gly Ala Leu
 2165 2170 2175

Tyr Lys Pro Val Met Asp Val Lys Thr Leu Glu Ala Ile Leu Ser
 2180 2185 2190

ES 2 748 555 T3

Phe Val Arg Pro Gly Thr Gln Ala Glu Lys Leu Leu Ser Val Ala
 2195 2200 2205

Gln Leu Ala Gly His Cys Glu Pro Asp Glu Tyr Glu His Leu Phe
 2210 2215 2220

Gln Pro Phe Glu Gly Met Tyr Tyr Val Pro Thr Trp Arg Asp Leu
 2225 2230 2235

Arg Leu Gln Trp Leu Met Lys Leu Gly Cys
 2240 2245

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

15 <400> 4
 tgaatagcaa gggccgtgtt 20

20 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

30 <400> 5
 accgttgtaa aagactggca ca 22

35 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

45 <400> 6
 gtcagtaaaa cgcaacaacc at 22

50 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

60 <400> 7
 tgtgaagaat gtcctgaagg ca 22

65 <210> 8

ES 2 748 555 T3

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

10

<400> 8
 accatccacc taaaccagac ga 22

15

<210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

25

<400> 9
 attggcttg tcagggttg aa 22

30

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

40

<400> 10
 gtttctaact ttggaccg aa 22

45

<210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

55

<400> 11
 tggattgag attggtctg ca 22

60

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <221> fuente

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 12
 gcgaacgaaa ctgaggattg 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

ES 2 748 555 T3

<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 13
ctgtagcgtc agtaaacgc

20

5

<210> 14
<211> 340
<212> ADN
<213> Virus de la rinitis equina A

10

<400> 14

```
acttttagga gatgaccaa cgcaagtaacc gcaagcaatt gcctgtagcg tcagtaaac      60
gcaatacaca agatttgagc ctgtagcgtc agtaaacgc tgcaaccaca agctattgac      120
tgtagcgtca gtaaacgca aacattcttg tggcgctcgc gtagcgctca agtgcagagc      180
ttcccggctt taagggttac tgctcgtaat gagagcacat gacattttgc caagatttcc      240
tggcaattgt cacgggagag aggagcccg tctcgggcac ttttctctca aacaatggtg      300
gcgcgcctcg gcgcgcccc cctttttcag cccctgtca                               340
```

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunógena que comprende una cepa inactivada del virus de la rinitis equina B (ERBV) que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-11829.
2. La composición inmunógena según la reivindicación 1, comprendiendo dicha composición inmunógena además una o más cepas de virus inactivado de la rinitis equina A (ERAV).
- 10 3. La composición inmunógena de las reivindicaciones 1 o 2 en la que la cepa, antes de la inactivación, provoca enfermedad respiratoria detectable en el 100 % de los caballos seronegativos tras la exposición a la cepa.
- 15 4. La composición inmunógena según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición inmunógena comprende además al menos un antígeno o una cepa inactivada o viva, atenuada del virus del herpes equino y/o una cepa inactivada o viva, atenuada del virus de la gripe equina.
- 20 5. La composición inmunógena según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición inmunógena comprende además al menos un antígeno de una o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en virus del Nilo occidental, virus de la encefalomiелitis equina oriental, virus de la encefalomiелitis equina occidental, virus de la encefalomiелitis equina venezolana y toxoide tetánico, y combinaciones de los mismos.
- 25 6. La composición inmunógena según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método para reducir la incidencia o disminuir la gravedad de síntomas clínicos asociados con o provocados por ERBV en un animal o una manada de animales que comprende la etapa de administrar dicha composición inmunógena a un animal que lo necesite.
- 30 7. La composición inmunógena para su uso según la reivindicación 6, en donde la incidencia de síntomas clínicos provocados por uno o más de dichos patógenos en una manada de animales está reducida en comparación con una manada que no recibe dicha composición inmunógena.
- 35 8. La composición inmunógena para su uso según la reivindicación 6, en donde la administración de al menos una dosis de dicha composición inmunógena proporciona una duración de inmunidad de al menos 12 meses contra uno o más de dichos patógenos.
9. La composición inmunógena para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicha composición inmunógena es segura para su uso en potros o caballos de 4 meses de edad o mayores.

FIG. 1

Proporción de positivos para virus a lo largo del tiempo

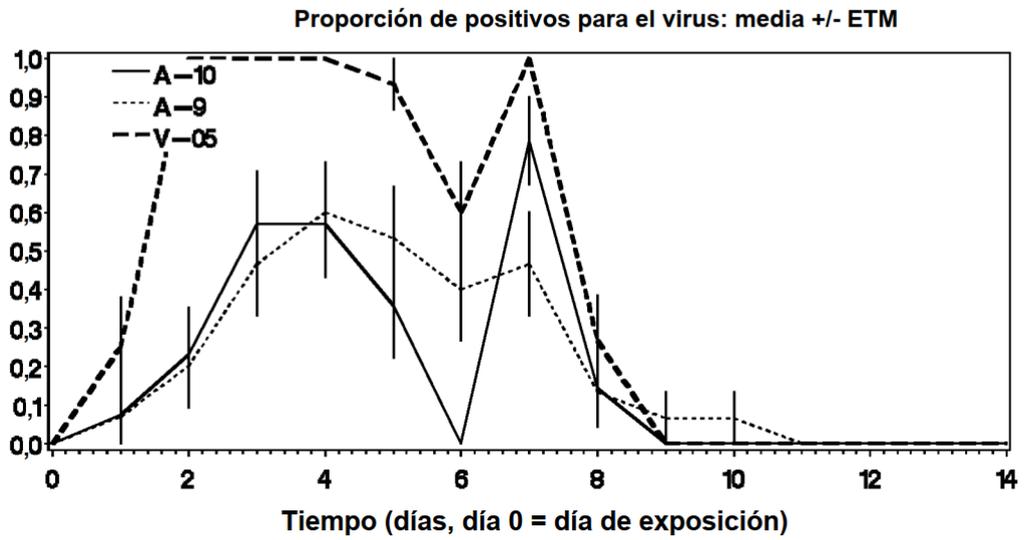


FIG. 2

Proporción de positivos para capa leucocítica a lo largo del tiempo

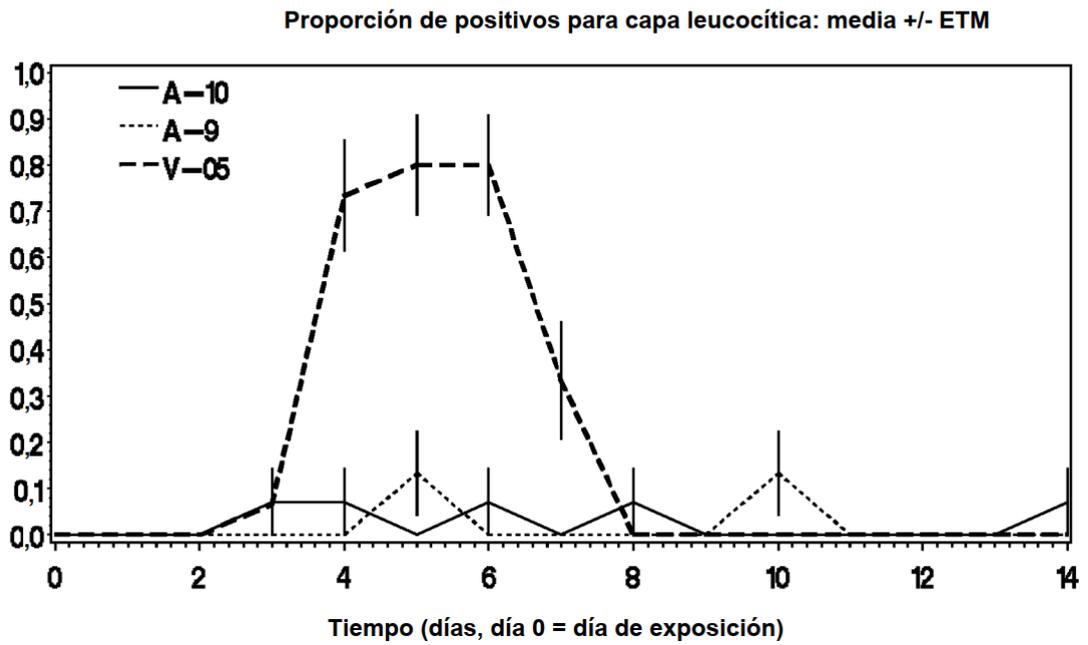


FIG. 3

Títulos de SN a lo largo del tiempo

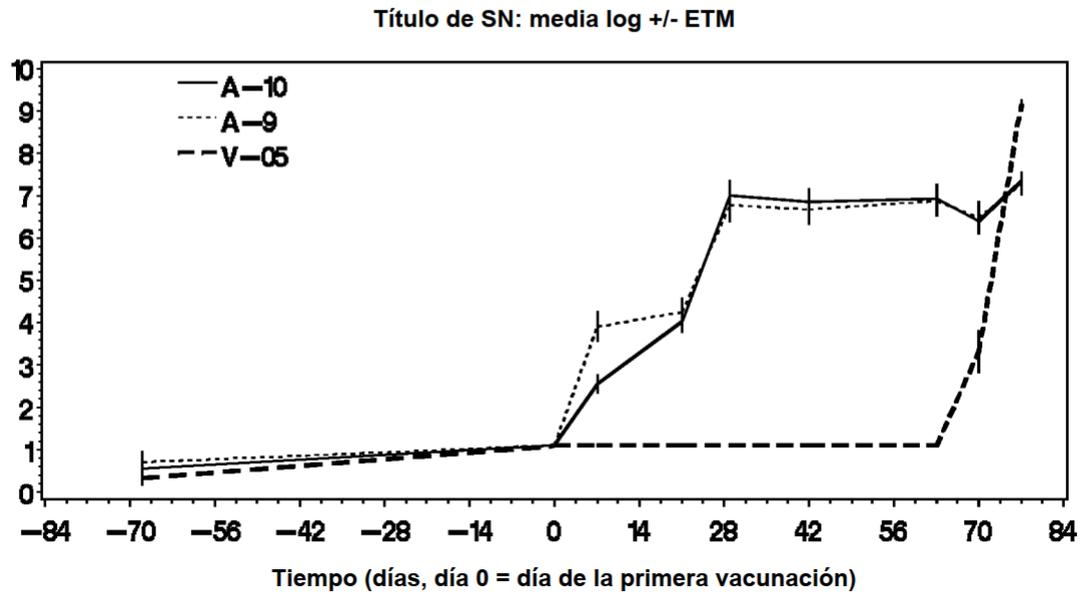


FIG. 4

Puntuaciones nasales medias a lo largo del tiempo

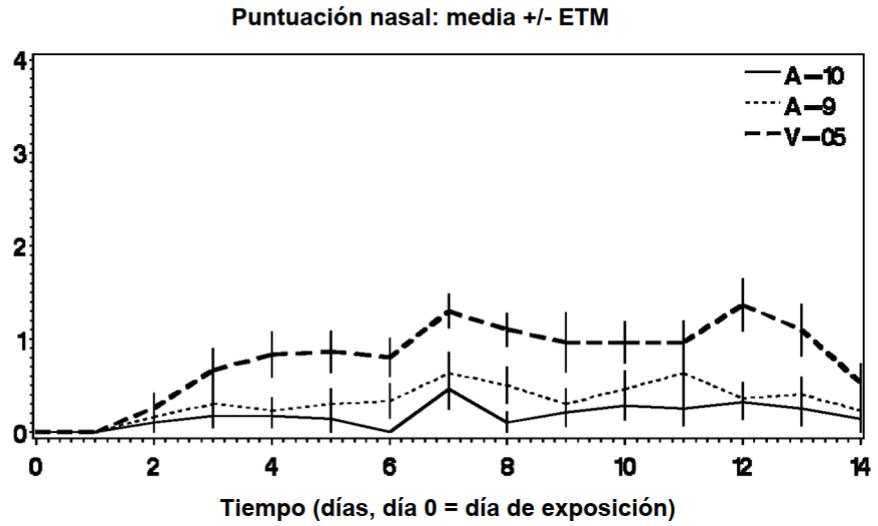


FIG. 5

Puntuaciones oculares medias a lo largo del tiempo

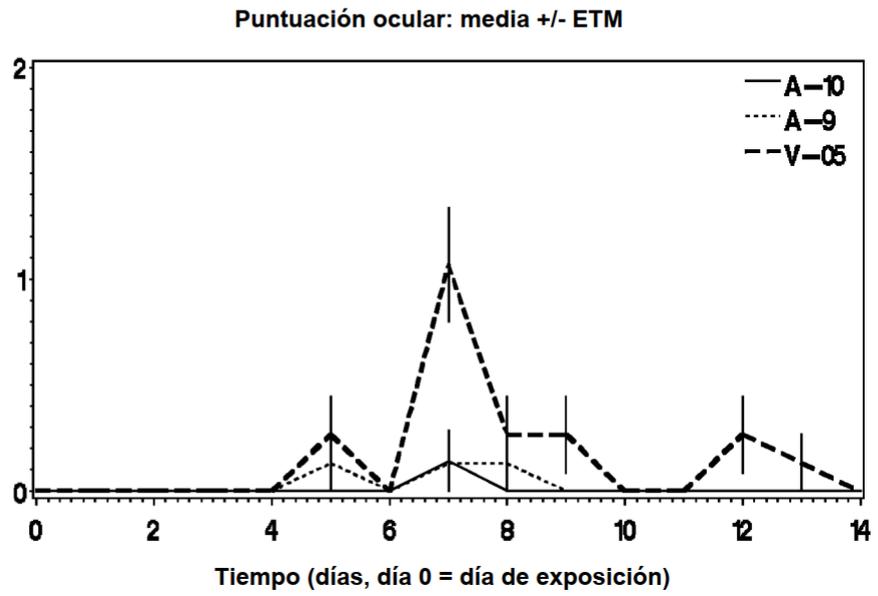


FIG. 6

Alineamiento de ClustalW de aislados de virus de la rinitis equina A (ERAV) que muestran inserciones (negrita) y supresiones (sombreado) de nucleótidos de la 5' UTR.

```

PERV-1      ACTTTTA--GGAGATGACCAAACGCAGTAACCGCAAGCAATTGCCTGTAGCGTCAGTAAAA 111
ERAV/ON/05  ATGCCTGTTAGCGTCAGTAAAAACGCGGTAAACATAGGCT--TTGACTGTAGCGTCAGTAAAA 119
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

PERV-1      CGCAATA--CACAAAGAT--TTGAGCCTGTAGCGTCAGTAAAAACGCTGCAACCACAAGCTAT 168
ERAV/ON/05  CGCAACAACCATACGCTGTTGTGCCTGTAGCGTCAGTAAAAACGCGGCAAACGCAAGC--AT 178
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

PERV-1      TGACTGTAGCGTCAGTAAAAACGCAA-----ACATTCTTGTGGCGCTCGCGTA 215
ERAV/ON/05  TAACTGTAGCGTCAGTAAAAACGCAACAACCATACGCTAATGTGCCTGAGGCGTCAGTAAA 238
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

PERV-1      -GCGCTCA--AGTGCAGAGCTTCCC GGCTTTAAGGGTTACTGCTCGTAATGAGAGCACAT 272
ERAV/ON/05  CGCATACAGCAAACCAGAGCTTCCC GGCTTTAAGGGTTACTGCTCGTAATGAGAGCACTT 298
            **   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

PERV-1      GACATTTTGCCAAGATTTCCTGGCAATTGTCACGGGAGAGAGGAGCCCGTTCTCGGGCAC 332
ERAV/ON/05  GGCAATTTGTCAGGATTTCCTGGTGGTTGTCACGGGAGAGAGGAGCCCGTTTTTCGGGCAC 358
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

PERV-1      TTTTCTCTCAAACAATGTTGGCGCGCCTCGGCGCGCCCCCCTTTTTTCAGCCCCCTGTCA 392
ERAV/ON/05  TGTTCC---CAACAACATTTGTGCGCTTCGGCGCACACCCCGCT---CAGCCCCCTGTCA 413
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
    
```

FIG. 7

Medias de puntuaciones clínicas totales de grupos de control, infectados y reinfectados.

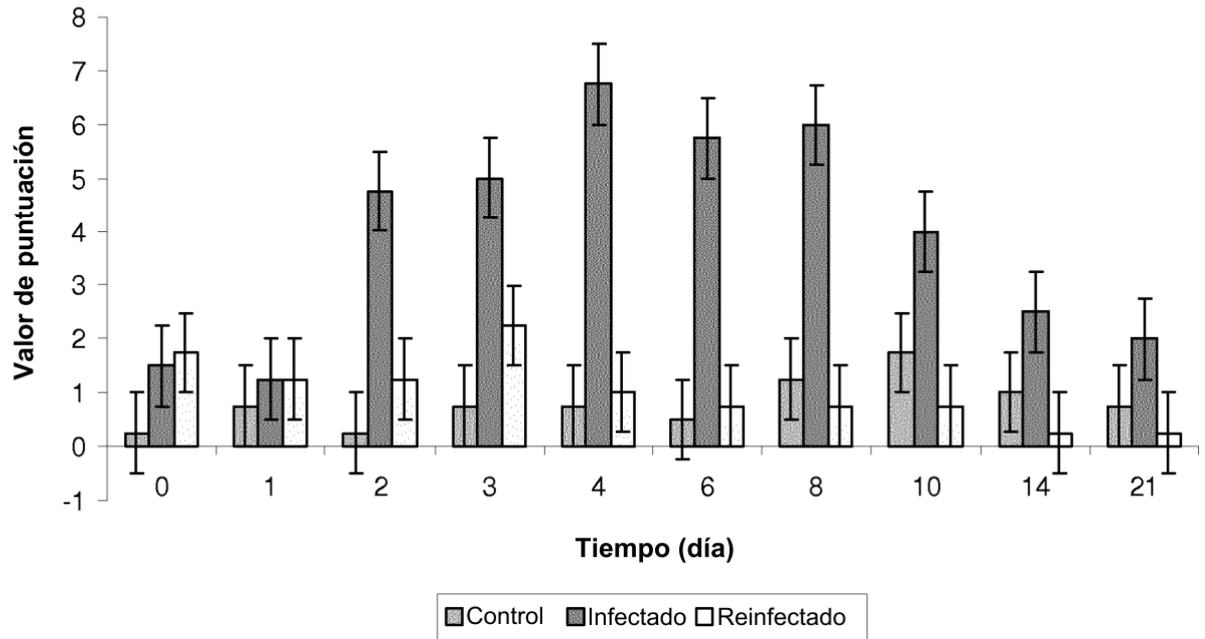


FIG. 8

Medias de temperaturas corporales de grupos de control, infectados y reinfectados.

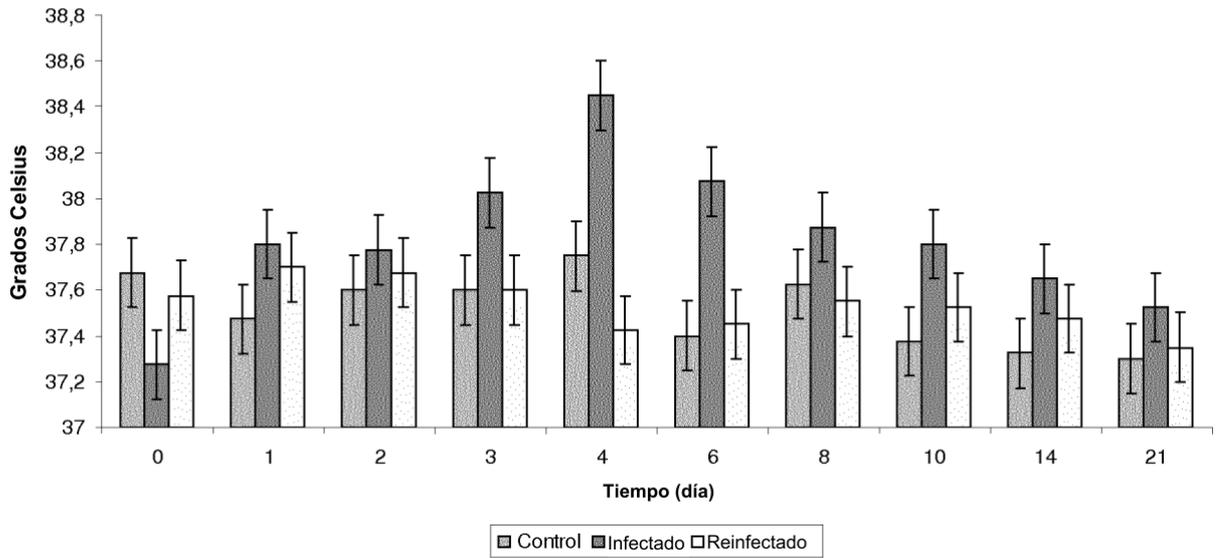


FIG. 9

Títulos para virus de la rinitis equina (ERAV) y virus de la rinitis equina B (ERBV) en grupos de control, infectados y reinfectados. Se usó el ensayo de neutralización de virus (VN) para medir los títulos de anticuerpos en muestras de suero.

| Grupo de control | | | | | Grupo infectado | | | | | Grupo reinfectado | | | | |
|-------------------|-------------|-------------|------------|----------------|-------------------|-------------|-------------|------------|----------------|--------------------|-------------|-------------|------------|----------------|
| Poni n.º 1 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 | Poni n.º 5 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 | Poni n.º 9 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 |
| Día 0 | <1:2 | 1:6 | ND | | Día 0 | <1:2 | 1:12 | ND | | Día 0 | 1:1536 | 1:48 | ND | |
| Día 7 | <1:2 | 1:4 | ND | NT | Día 7 | 1:512 | 1:6 | ND | NT | Día 7 | 1:1024 | 1:96 | ND | NT |
| Día 14 | <1:2 | 1:6 | ND | NT | Día 14 | 1:1536 | 1:8 | ND | NT | Día 14 | 1:1536 | 1:64 | ND | NT |
| Día 21 | <1:2 | 1:8 | ND | | Día 21 | 1:1536 | 1:16 | ND | | Día 21 | 1:1536 | 1:48 | ND | |
| Poni n.º 2 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 | Poni n.º 6 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 | Poni n.º 10 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 |
| Día 0 | <1:2 | 1:24 | ND | | Día 0 | <1:2 | 1:32 | ND | | Día 0 | 1:6144 | 1:64 | ND | |
| Día 7 | <1:2 | 1:32 | ND | NT | Día 7 | 1:256 | 1:24 | ND | NT | Día 7 | 1:12288 | 1:24 | ND | NT |
| Día 14 | <1:2 | 1:32 | ND | NT | Día 14 | 1:2048 | 1:16 | ND | NT | Día 14 | 1:8192 | 1:32 | ND | NT |
| Día 21 | <1:2 | 1:24 | ND | | Día 21 | 1:2048 | 1:12 | ND | | Día 21 | 1:32768 | 1:64 | ND | |
| Poni n.º 3 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 | Poni n.º 7 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 | Poni n.º 11 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 |
| Día 0 | <1:2 | 1:12 | ND | | Día 0 | <1:2 | 1:4 | ND | | Día 0 | 1:1024 | 1:24 | ND | |
| Día 7 | <1:2 | 1:16 | ND | NT | Día 7 | 1:64 | 1:4 | ND | NT | Día 7 | 1:1536 | 1:16 | ND | NT |
| Día 14 | <1:2 | 1:64 | ND | NT | Día 14 | 1:3072 | 1:3 | ND | NT | Día 14 | 1:2048 | 1:32 | ND | NT |
| Día 21 | <1:2 | 1:24 | ND | | Día 21 | 1:1536 | 1:4 | ND | | Día 21 | 1:1536 | 1:24 | ND | |
| Poni n.º 4 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 | Poni n.º 8 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 | Poni n.º 12 | ERAV | ERBV | AE2 | EHV 1/4 |
| Día 0 | <1:2 | 1:16 | ND | | Día 0 | <1:2 | 1:12 | ND | | Día 0 | 1:3072 | 1:4 | ND | |
| Día 7 | <1:2 | 1:32 | ND | NT | Día 7 | 1:256 | 1:16 | ND | NT | Día 7 | 1:2048 | 1:3 | ND | NT |
| Día 14 | <1:2 | 1:64 | ND | NT | Día 14 | 1:2048 | 1:16 | ND | NT | Día 14 | 1:2048 | 1:6 | ND | NT |
| Día 21 | <1:2 | 1:24 | ND | | Día 21 | 1:2048 | 1:16 | ND | | Día 21 | 1:4096 | 1:6 | ND | |

ERAV
ERBV
AE2
EHV1/4
ND
NT

Virus de la rinitis equina A (ensayo de neutralización de virus)
Virus de la rinitis equina B (ensayo de neutralización de virus)
Gripe equina 2 (H3N8) (ensayo de inhibición de hemaglutinina)
Herpesvirus equino 1 y 4 (ensayo de neutralización de virus)
No detectable (ensayo de hemólisis radial individual)
No ensayado