



CSA236881

Organización CSA Ltda



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

08-7307

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: PROCEDIMIENTOS DE ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS, NUEVOS
CALICIVIRUS FELINOS Y TRATAMIENTOS PARA INMUNIZAR ANIMALES
CONTRA PARAOVIRUS Y HERPES VIRUS FELINO

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC.

DIRECCIÓN: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 E.U.A

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 25 de Enero de 2008

P2007/000227

**PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD** 28 Feb. 2008
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2007/000227****SOLICITUD DE:**

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)**Nombre:** PFIZER PRODUCTS INC.**Dirección:** Eastern Point Road, Groton, CT
06340, E.U.A.**Nacionalidad o Domicilio:** ESTADOUNIDENSE**Lugar de Constitución:** Estados Unidos de
América.**Teléfono:** **Fax:****E-mail:****IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre:** CARLOS R. OLARTE**Dirección:** World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10**Teléfono:** 601-7700 **Fax:** 601-7799**E-mail:** office@olarteraisbeck.com**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 79782747Bta
TP 74.295**INVENTOR (ES)**
(72)**Nombre:** VER PAGINA ADJUNTA**Dirección:** VER PAGINA ADJUNTA**Nacionalidad o Domicilio:** VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/002018 Fecha Julio, 17 2006

Publicación Internacional No. WO 2007/012944 Fecha Febrero 1, 2007

6

**Título (54) PROCEDIMIENTOS DE ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS, NUEVOS
CALICIVIRUS FELINOS Y TRATAMIENTOS PARA INMUNIZAR ANIMALES CONTRA
PARAOVIRUS FELINO Y HERPES VIRUS FELINO****Clasificación Internacional (51)** A61K 38/16, A61K 39/12, A61K 48/00, C07K 16/08,
C07K 16/10, C12N 15/40**Prioridad**SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Julio 28, 2005

(31) Número de Solicitud

60/703,109

9

Comprobante de pago No. 08 - 5,432**Fecha**

Enero 21, 2008

10

ANEXOS

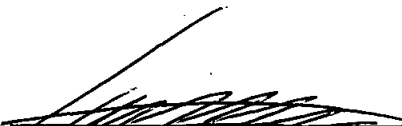
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Ver Exp. N° 06-051.744. Adjunto copia simple
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2006/002018

DAVID LOWERY EARL

Pfizer Global Research and Development 7000
Portage Road, Kalamazoo MI 49001-0199
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

SING RONG

Pfizer Global Research and Development 7000
Portage Road, Kalamazoo MI 49001-0199
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

PAUL GUIMOND MARK

Pfizer Global Research and Development 7000
Portage Road, Kalamazoo MI 49001-0199
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

PAULA CLARE MUNNS

Pfizer Global Research and Development 7000
Portage Road, Kalamazoo MI 49001-0199
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

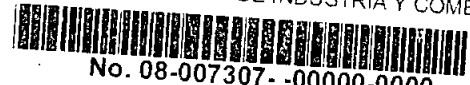
CASSIUS TUCKER McAllister

Pfizer Global Research and Development 7000
Portage Road, Kalamazoo MI 49001-0199
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

THOMAS NEWBUY JACK

Pfizer Global Research and Development, 601
West Cornhusker Highway, Lincoln, NE 68521
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-007307- -00000-0000

Fecha: 2008-01-25 16:04:07 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 221

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 5,432
FECHA : ENERO 21 DE 2008

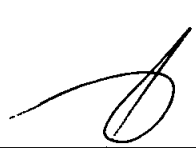
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	3966098	21/01/2008	8,766,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por **PFIZER PRODUCTS, INC.**, a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por **Grover F. Fuller, Jr.** el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de **Grover F. Fuller, Jr.**, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por **Susan Z. Killian**, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mi el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 25.1
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No. 0138 del 11/2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRES RIVERA IGLESIAS
C. G. S. 11773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES / INGLES - ESPAÑOL
RESOLUCION No. 0130 DE FEBRERO DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

7

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Fue firmado por: Norman Goodman

3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado

4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

Se certificó:

5. En Nueva York, Nueva York

6. El 22 de noviembre de 2005

7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York.

8. Bajo el Número **NYC-10404952A**

9. Aparece Sello del Estado de Nueva York

10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:

Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. E. 30.11.73
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
REGISTRO FONOLÓGICO DE FEBRERO DE 1962
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street
City New York
State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of **PFIZER PRODUCTS INC.**

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That **PFIZER PRODUCTS INC.**, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

4. Que con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan Z. Killian



SUSAN Z. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01K16116521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
this 11th day of Nov. 2005
Susan Z. Killian

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. El presente documento público fue firmado por: BRIAN JACKSON, JR.
3. Que actuó en su calidad de Notario Público en y para El Distrito de Columbia.
4. Y lleva el sello del Notario Público BRIAN JACKSON, JR.,

Se certifico

5. En Washington, D.C
6. El 28 de diciembre de 2007
7. Por el secretario de Distrito de Columbia.
8. Bajo el Número **185181**
9. Lleva el Sello.
10. Firmado por Stefhanie D. Scott, Secretario de Estado

CESION

Para la valiosa consideración pagada por mi (nosotros) by PFIZER PRODUCTS INC. una corporación organizada bajo las leyes del estado de Connecticut, Estados Unidos de America que es dirección completa de la oficina de correos Eastern Poin Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de America, Yo (nosotros) vende y asigna por este medio a PFIZER PRODUCTS INC, toda mi (nuestra) derecha, titulo e interés en y para mi (nuestro) invención para una nueva y útil mejora dentro de "PROCEDIMIENTOS DE ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS, NUEVOS CALICIVIRUS FELINOS Y TRATAMIENTOS PARA INMUNIZAR ANIMALES CONTRA PARAOVIRUS FELINO Y HERPES VIRUS FELINO" cuanto la Republica de Colombia se refiere, como completamente dispuesto descrito en la especificación yo (nosotros) autoriza por este medio a comisión de patentes de Colombia a publicar la patente dicha a PFIZER PRODUCTS INC de acuerdo a esta asignación.

Dando fe yo (nosotros) tiene

(firma ilegible) David Earl LOWERY

Kalamazoo, MI 14 de Junio de 2006 – David Earl LOWERY

(firma ilegible) Sing RONG

Kalamazoo, MI 14 de Junio de 2006 – Sing RONG

(firma ilegible) Paul Mark GUIMOND

Kalamazoo, MI 14 de Junio de 2006 – Paul Mark GUIMOND

(firma ilegible) Paula Munns CLARE

Kalamazoo, MI 26 de Junio de 2006 – Paula Munns CLARE

(firma ilegible) Cassius McAllister TUCKER

Kalamazoo, MI 15 de Junio de 2006 – Cassius McAllister TUCKER

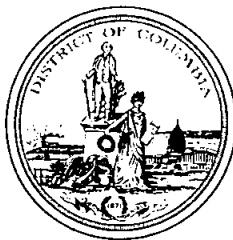
(firma ilegible) Thomas Jack NEWBY

Lincoln NE, USA 21 de Junio de 2006 – Thomas Jack NEWBY

Distrito de Columbia: SS

Suscrito y firmado ante mí el 18 de diciembre de 2007

Brian Jackson, Jr. Notario Publico D.C.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
United States of America
2. This public document has been signed by BRIAN JACKSON, JR.
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT
OF COLUMBIA
4. bears the seal/stamp of BRIAN JACKSON, JR., NOTARY PUBLIC, D.C.

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 28th day of DECEMBER 2007
7. by Secretary of the District of Columbia
8. No. 185181
9. Seal/Stamp



10. Signature

STEPHANIE D. SCOTT

S A
14

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER PRODUCTS INC.** a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America**, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER PRODUCTS INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **METHODS OF VACCINE ADMINISTRATION, NEW FELINE CALICIVIRUSES, AND TREATMENTS FOR IMMUNIZING ANIMALS AGAINST FELINE PARAOVIRUS AND FELINE HERPES VIRUS** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER PRODUCTS INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

Kalamazoo, MI 14 June 2006
Place, date and signature - David Earl LOWERY

David Earl Lowery

Kalamazoo, MI 14 June 2006
Place, date and signature - Jing RONG

Jing Rong

Kalamazoo, MI 14 June 2006
Place, date and signature - Paul Mark GUIMOND

Paul Mark Guimond

Kalamazoo, MI 26 June 2006
Place, date and signature - Paula Munns CLARE

Paula Munns Clare

Kalamazoo, MI 15 June 2006
Place, date and signature - Cassius McAllister TUCKER

Cassius McAllister Tucker

Lincoln NE USA 21 June 2006
Place, date and signature - Thomas Jack NEWBY

Thomas Jack Newby

NOTARIAL PUBLIC
STATE OF CONNECTICUT
My Comm. Expires 12/31/2006
Notary Public for the State of Connecticut
I hereby certify that the foregoing is a true and correct copy of the original as the same appears in my records.

NOTARIAL PUBLIC
STATE OF CONNECTICUT
My Comm. Expires 12/31/2006
Notary Public for the State of Connecticut
I hereby certify that the foregoing is a true and correct copy of the original as the same appears in my records.

I HEREBY CERTIFY THAT THIS
IS THE ORIGINAL DOCUMENT



District of Columbia: SS
Subscribed and Sworn to before me
this 26th day of December, 20 07
Brian Jackson, Jr.
Brian Jackson, Jr., Notary Public, D.C.
My Commission Expires February 29, 2012

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 February 2007 (01.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/012944 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 38/16 (2006.01) C07K 14/08 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) C07K 16/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/40 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2006/002018

(22) International Filing Date: 17 July 2006 (17.07.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/703,109 28 July 2005 (28.07.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER PRODUCTS INC. [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LOWERY, David, Earl [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001-0199 (US). RONG, Sing [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001-0199 (US). GUIMOND, Paul, Mark [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001-0199 (US). CLARE, Paula, Munns [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001-0199 (US). TUCKER, Cassius, McAllister [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001-0199 (US). NEWBUY, Thomas, Jack [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 601 West Cornhusker Highway, Lincoln, NE 68521 (US).

(74) Agents: FULLER, Grover, F., Jr. et al.; Pfizer Inc., 150 East 42nd Street, New York, NY 10017-5612 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
26 April 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS OF VACCINE ADMINISTRATION, NEW FELINE CALICIVIRUSES, AND TREATMENTS FOR IMMUNIZING ANIMALS AGAINST FELINE PARAOVIRUS AND FELINE HERPES VIRUS

(57) Abstract: The present invention relates to a vaccine for immunizing a cat against feline viruses. The present invention also relates to a nucleic acid clone that encodes the capsid protein of the isolated feline calicivirus. The present invention further relates to a live or killed vaccine comprising the isolated feline calicivirus, a subunit vaccine comprising the capsid protein of the isolated feline calicivirus, a nucleic acid vaccine comprising a nucleic acid clone of the isolated feline calicivirus, and a recombinant virus vector vaccine comprising nucleic acid encoding the capsid protein of the isolated feline calicivirus. The present invention also relates to a method for identifying a feline calicivirus useful for producing a vaccine composition and for assays for diagnosing cats infected with feline calicivirus. Also disclosed is a method of immunizing animals, especially cats, against disease, in particular against feline calicivirus (FCV). The method includes administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second FCV vaccines. The first vaccine is administered orally or parenterally (e.g., subcutaneously, intramuscularly, and the like). The second vaccine is administered orally or oronasally N days following administration of the first vaccine, wherein N is an integer from 3 to 120, inclusive. A third vaccine administration may also be given. The present invention also describes methods and materials for treating and immunizing animals with vaccine, and in particular cats against both FPV or Feline Parvovirus, which has also been called Panleukopenia or FPL and against another disease, FHV or Feline Herpes Virus, which has also been called Feline Rhinotracheitis Virus.

WO 2007/012944 A3

METHODS OF VACCINE ADMINISTRATION, NEW FELINE CALICIVIRUSES, AND
TREATMENTS FOR IMMUNIZING ANIMALS AGAINST FELINE PARAOVIRUS AND
FELINE HERPES VIRUS

FIELD OF INVENTION

[0001] The present invention relates to providing new ways to administer various vaccines to various animals. It discloses several isolated feline caliciviruses (FCV). It discloses new methods of presenting FCV vaccines to cats. The present invention also relates to nucleic acid clones that encode feline caliciviruses. It relates to FCV capsid proteins, live or killed vaccines, a subunit vaccine comprising the capsid protein, a nucleic acid vaccine, and a recombinant virus vector vaccine comprising nucleic acids encoding the capsid protein of the isolated feline calicivirus. The present invention also relates to a method for identifying a feline calicivirus useful for producing a vaccine composition and assays for diagnosing cats infected with feline calicivirus. The present invention also provides for new ways to administer new and old FCV vaccines to felines.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Caliciviruses are reported to be an important cause of illness in cats. A wide variety of symptoms are observed such as fever, rhinitis, sneezing, mild conjunctivitis, ocular discharge, vesicles in the external nares, oral mucosa or on the tongue, pneumonia, tracheal bronchitis, diarrhea, muscle soreness, stiff gate, and hyperesthesia. Opportunistic bacterial infections often accompany FCV infections, which complicate treatment and recovery. Severe FCV infections may lead to death, especially in juvenile cats. It should be noted that such signs, although reportedly common in natural cases, are not always prominent in experimental infections. It would appear that various field strains of feline calicivirus (FCV) either differ in their disease-causing potential, or that concurrent infection with other agents influences the disease symptoms.

[0003] Vaccines against feline calicivirus have been available for more than two decades. Although numerous FCV serotypes exist, certain strains, such as F9, were found to induce antibodies against a broad range of FCV strains. See J. L. Bittle & W. J. Rubic, *Am. J. Vet. Res.* 37:275-78 (1976). As a result, the earliest vaccines against feline calicivirus employed a modified or attenuated version of the FCV-F9 strain. See U.S. Patent No. 3,937,812 to J. L. Bittle & W. J. Rubic, which is herein incorporated by reference in its entirety.

[0004] While the vaccines from FCV-F9 and other commercially available vaccines provide protection from many field isolates, it is not true that these vaccines prevent infection from all strains. Moreover, as FCV continues to evolve, FCV-F9 based vaccine provides protection against fewer and fewer field isolates (Lauritzen et al., 1997, *Vet Microbiology*, 56:55-63). In addition, veterinary practitioners have expressed concerns over the efficacy of vaccines based on a single serotype. Indeed, field studies suggest that vaccines derived from the FCV-F9 strain provide insufficient immunity against many strains of feline calicivirus. See, e.g., N. C. Pederson et al., *Feline Pract.* 13(1):26-35 (1983); S. Dawson et al., *Vet. Rec.* 132:346-50 (1993). Practitioners have also raised concerns about the administration of a modified live virus that may, in some circumstances, cause disease in otherwise healthy animals. Researchers have reported that inadvertent oral dosing of a subcutaneously-administered FCV vaccine resulted in acute disease. See R. C. Povey, *Feline Pract.* 7(5):12-16 (1977). There is, therefore, continued interest in developing a vaccine, which by itself or in combination with other vaccines, would provide the desired protection upon vaccination of a cat. We describe several isolates here which have been isolated from cats and provide a means of providing broad protection in immunized cats.

[0005] INFORMATION DISCLOSURE

U.S. PATENT DOCUMENTS

3937812 Feb. /1976 Bittle et al., 3944469 Mar. /1976 Bittle et al.
 4486530 Dec. /1984 David et al., 4786589 Nov. /1988 Rounds et al.,
 5169789 Dec. /1992 Bernstein et al., 5229293 Jul. /1993 Matsuura et al.
 5266313 Nov. /1993 Esposito et al., 5338683 Aug. /1994 Paoletti et al.
 5494807 Feb. /1996 Paoletti et al., 5559041 Sep. /1996 Kang et al.
 5561064 Oct. /1996 Marquet et al., 5580859 Dec. /1996 Felgner
 5585100 Dec. /1996 Mond et al., 5589384 Dec. /1996 Liscombe
 5589466 Dec. /1996 Felgner, 5620845 Apr. /1997 Gould et al.
 5656448 Aug. /1997 Kang et al., 5693761 Dec. /1997 Queen et al.
 5693762 Dec. /1997 Queen et al., 5695928 Dec. /1997 Stewart et al.
 5703055 Dec. /1997 Felgner, 5716784 Feb. /1998 DiCesare
 5716822 Feb. /1998 Wardley, 5718901 Feb. /1998 Wardley
 5725863 Mar. /1998 Daniels et al., 5728587 Mar. /1998 Kang et al.
 5800821 Sep. /1998 Acheson et al., 5977322 Nov. /1999 Marks et al.
 6010703 Jan. /2000 Maes et al., 6355246 Mar/2002 Kruger et al.

6,534,066 B1 Mar/2003 Poulet et al.

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0484382 Mar. /1995 EP, WO2004/083390

OTHER PUBLICATIONS

Burroughs, J.N and Brown, F., *J. Gen. Virol.*, 22, pp. 281-285 (1974).

Clarke and Lambden in *J. Gen. Virol.* 78: 291-301 (1997).

Griest, N.R., 1979, *Diagnostic methods in clinical virology* (3rd ed.), pp. 84-85, Blackwell

J. L. Bittle & W. J. Rubic, *Am. J. Vet. Res.* 37:275-78 (1976).

Lauritzen et al., *Vet Microbiology* 56: 55-63 (1997).

Maky, Brian W.J. and Kangro, Hillar O. 1996, *Virology methods manual*, pp. 35-37,

Academic Press, New York.

Motin et al., *Infect. Immun.* 64: 4313-4318 (1996).

N. C. Pederson et al., *Feline Pract.* 13(1):26-35 (1983).

Oglesby, A.S., et al., *Virology* 44, pp. 329-341 (1971).

Poulet et al., *Veterinary Microbiology* 106: 17-31 (2005).

Poulet et al., *Archives of Virology* 145: 243-261 (2000).

R. C. Povey, *Feline Pract.* 7(5):12-16 (1977).

S. Dawson et al., *Vet. Rec.* 132:346-50 (1993).

Scientific Publishers, Oxford, UK.

Soergel, M.E., et al., *Intervirology*, 5, pp 239-244 (1975).

Yokoyama, N., et al., *Vaccine*, vol. 14, No. 17/18, pp. 1657-1663 (1996).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides new strains of and relates to several isolated feline caliciviruses (FCV). It also discloses new methods of presenting vaccines to animals and particularly, FCV vaccines to cats. The present invention also relates to nucleic acid clones that encode feline caliciviruses. It relates to FCV capsid proteins, live or killed vaccines, a subunit vaccine comprising the capsid protein, a nucleic acid vaccine, and a recombinant virus vector vaccine comprising nucleic acids encoding the capsid protein of the isolated feline calicivirus. The present invention also relates to a method for identifying a feline calicivirus useful for producing a vaccine composition and assays for diagnosing cats infected with feline calicivirus. The present invention also provides for new ways to administer new and old FCV vaccines to felines. Also described herein are methods and materials for treating and immunizing animals

with vaccine, and in particular cats, against both FPV or Feline Parvovirus, which has also been called Parvovirus or FPL and against another disease, FHV or Feline Herpes Virus, which has also been called Feline Rhinotracheitis Virus. Described below are novel combinations of vaccines, that when presented to a feline in the manner described allow for effective oral/oral and subq/oral deliveries of both FPV and or FHV vaccines.

[0006] In particular the present invention discloses the following vaccines for immunizing cats against feline calicivirus. A FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein, (SEQ ID 13) and sequences having at least about 91.2%, 95% and 99% identity. A DNA vaccine comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (SEQ. ID 12) and sequences having at least about 78.7%, and 79.2% sequence identity and allowing for conservative substitutions.

[0007] A vaccine comprising a FCV-49 capsid protein or an isolated FCV-49 capsid protein wherein said capsid protein comprises a protein sequence from strain FCV-49 (SEQ ID 15) and sequences having at least about 92.7%, 95% and 99% identity; wherein said capsid protein is provided in an effective amount. A DNA vaccine comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-49 capsid protein or an isolated FCV-49 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (SEQ. ID 14) and sequences having at least about 78.9%, i.e. 79.4% (78.9 + 0.5) sequence identity and allowing for conservative substitutions.

[0008] A vaccine comprising a FCV-26391-4 capsid protein, or an isolated FCV-26391-4 capsid protein, wherein said capsid protein comprises protein sequences from strain FCV-26391-4. A vaccine comprising an FCV-26391-4 capsid protein wherein said capsid protein comprises protein sequence (SEQ ID 17) and sequences having at least about 91.8%, 95% and 99% identity. A DNA vaccine comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-26391-4 capsid protein or an isolated FCV-26391-4 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (SEQ. ID 16) and sequences having at least about 78.4%, i.e. 78.9% (78.4 + 0.5) sequence identity.

[0009] A vaccine where the polynucleotide is selected from the group consisting essentially of SEQ ID NOS. 12, 14, 16. The vaccines may be either alone or in any combination of the following: where it contains an adjuvant, wherein the FCV component is live, wherein the FCV component is attenuated, wherein the FCV component is inactivated, which may include at least

one other feline calicivirus strain selected from the group consisting of FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255, and FCV-2280.

[0010] A vaccine to immunize cats against feline calicivirus which comprises a nucleotide sequence of a FCV capsid protein selected from the group consisting of a polypeptide having 93% or greater identity with SEQ ID NO. 13, 15, or 17, wherein the FCV isolate is not strain 213-95, and wherein the nucleic acid sequence is operably linked to a heterologous promoter sequence, in an effective amount to produce an immune response, and a pharmaceutically acceptable carrier. A vaccine to immunize cats against feline calicivirus which comprises a nucleotide sequence of a FCV capsid protein selected from the group selected from the group consisting essentially of SEQ ID NOS. 12, 14 and 16. A vaccine wherein the nucleotide sequence is in any of the following: a plasmid, a recombinant virus vector, or any other nucleotide vector.

[0011] A vaccine wherein the recombinant virus vector is selected from the group consisting of feline herpesvirus, raccoon poxvirus, canary poxvirus, adenovirus, Semliki Forest virus, Sindbis virus, and vaccinia virus.

[0012] There are also descriptions of an immunogenic compositions comprising a veterinarily acceptable vehicle of excipient and an isolated strain of FCV that binds to a monoclonal antibody selected from the monoclonal antibodies described herein as 23, 26, 41, 44 and 56. In some versions of the invention the immunogenic composition comprising a veterinarily acceptable vehicle of excipient and an isolated strain of FCV *selectively* binds to a monoclonal antibody selected from the monoclonal antibodies described herein as 23, 26, 41, 44 and 56. These immunogenic compositions include compositions where the FCV strain is inactivated, where said FCV strain is a vaccine, and where the composition comprises an adjuvant.

[0013] The vaccines described here may include include at least one other feline pathogen, selected from the group consisting of feline herpesvirus, feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, *Chlamydia psittaci*, and feline parvovirus, rabies virus and Bordetella bronchiseptica. The vaccine may also additionally comprises or be administered with an adjuvant.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0014] The present invention provides a vaccination regimen that significantly reduces mortality associated with feline calicivirus (FCV) and enhances the safety profile of FCV vaccines. Furthermore, the claimed vaccination regimen induces a broader serum cross neutralization profile than existing FCV-F9 vaccine protocols, which should provide better immunity across different strains of the feline calicivirus.

[0015] One aspect of the present invention provides a method of immunizing animals with vaccines, in particular, a cat against feline calicivirus. Two other feline diseases, FPV and FHV also have novel treatments described herein. The method comprises administering to the cat therapeutically effective amounts of a first vaccine, a second vaccine, and, optionally a third vaccine administration may also be given either within 120 days as above, or more often, after about a year as an annual booster. The first vaccine is administered parenterally (e.g., subcutaneously, intramuscularly, etc.). The second vaccine is administered orally or oronasally about *N* days following administration of the first vaccine, and the third vaccine is administered parenterally, orally, or oronasally about *M* days following administration of either the first or the second vaccines. Here, *N* and *M* are independently integers from 3 to 120, inclusive. Also preferred is where *N* is about 3 weeks and about 2-4 weeks. In addition we present one aspect of the invention where certain identified vaccines may be administered as two oral doses, with no need for a first parenteral administration. Annual boosters are also advised.

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO. 1:

Oligonucleotide primer, DEL-653

SEQ ID NO. 2:

Oligonucleotide primer, DEL-651

SEQ ID NO. 3:

Oligonucleotide primer, FCV-SR N2

SEQ ID NO. 4:

Oligonucleotide primer, FCV-SR N3

SEQ ID NO. 5:

Oligonucleotide primer, FCV-SR N4

SEQ ID NO. 6:

Oligonucleotide primer, FCV-SR N5

SEQ ID NO. 7:

Oligonucleotide primer, FCV-SR N6

SEQ ID NO. 8:

Oligonucleotide primer, FCV-SR N9

SEQ ID NO. 9:

Oligonucleotide primer, primer 2

SEQ ID NO. 10:

Oligonucleotide primer, FCV-SR C4

SEQ ID NO. 11:

Oligonucleotide primer, FCV-SR C8

SEQ ID NO. 12:

DNA sequence of FCV-21 capsid gene

Encoded amino acid sequence of FCV-49 capsid gene

SEQ ID NO. 13:

Encoded amino acid sequence of FCV-21 capsid gene

SEQ ID NO. 16:

DNA sequence of FCV-26391-4 capsid gene

SEQ ID NO. 14:

DNA sequence of FCV-49 capsid gene

SEQ ID NO. 17:

SEQ ID NO. 15:

Encoded amino acid sequence of FCV-26391-4 capsid gene

DEFINITIONS AND ABBREVIATIONS

[0016] "About," when used in connection with a measurable numerical variable, refers to the indicated value of the variable and to all values of the variable that are within the experimental error of the indicated value (e.g., within the 95% confidence interval for the mean) or within 10 percent of the indicated value, whichever is greater, unless about is used in reference to time intervals in weeks where "about 3 weeks," is 17 - 25 days, and about 2 - 4 weeks is 10 - 40 days.

[0017] "Active immunity" includes both humoral immunity and/or cell-mediated immunity against feline viruses induced by vaccinating a cat with the vaccine of the present invention.

[0018] "Antibody" refers to an immunoglobulin molecule that can bind to a specific antigen as the result of an immune response to that antigen. Immunoglobulins are serum proteins composed of "light" and "heavy" polypeptide chains having "constant" and "variable" regions and are divided into classes (e.g., IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM) based on the composition of the constant regions. An antibody that is "specific" for a given antigen indicates that the variable regions of the antibody recognize and bind a specific antigen exclusively—e.g., the antibody is able to distinguish a particular capsid protein from other known proteins by virtue of measurable differences in binding affinity, despite the existence of localized sequence identity, homology, or similarity between capsid proteins and other polypeptides. Specific antibodies may also interact with other proteins (for example, *Staphylococcus aureus* protein A or other antibodies in ELISA techniques) through interactions with sequences outside the variable region of the antibodies, and, in particular, in the constant regions of the molecule. Screening assays to determine binding specificity of an antibody are well known. For a comprehensive discussion of such assays, see Harlow et al. (ed.), *Antibodies: A Laboratory Manual* Chapter 6 (1988). Antibodies

may also recognize and bind fragments of FCV capsid proteins, provided that the antibodies are specific for FCV capsid proteins. Antibodies can be produced using methods known in the art.

[0019] "Antigen" or "immunogen" refers to a molecule that contains one or more epitopes (linear, conformational or both) that upon exposure to a subject will induce an immune response that is specific for that antigen. An epitope is the specific site of the antigen which binds to a T-cell receptor or specific antibody, and typically comprises about 3 amino acid residues to about 20 amino acid residues. The term antigen refers to subunit antigens—antigens separate and discrete from a whole organism with which the antigen is associated in nature—as well as killed, attenuated or inactivated bacteria, viruses, fungi, parasites or other microbes. The term antigen also refers to antibodies, such as anti-idiotypic antibodies or fragments thereof, and to synthetic peptide mimotopes that can mimic an antigen or antigenic determinant (epitope). The term antigen also refers to an oligonucleotide or polynucleotide that expresses an antigen or antigenic determinant in vivo, such as in DNA immunization applications.

[0020] "Excipient" refers to any component of a vaccine that is not an antigen.

[0021] FELOCELL 3 is FELOCELL 4 without *Chlamydia psittaci*

[0022] FELOCELL 4 contains modified-live feline rhinotracheitis virus [FHV], calicivirus [FCV-F9], panleukopenia virus [FPV] and *Chlamydia psittaci* [FCp]. FELOCELL 4A contains modified-live feline rhinotracheitis virus [FHV], calicivirus [FCV-21], panleukopenia virus [FPV] and *Chlamydia psittaci* [FCp]. FELOCELL 4A is FELOCELL 4 without FCV-F9, but with FCV-21. FELOCELL 3 A is FELOCELL 3 without FCV-F9, but with FCV-21. Felocell® 4, Felocell 4, or FELOCELL 4 or these words followed by the number "3" or "4" are vaccines where any variation of the name Felocell is owned by Pfizer.

[0023] "First vaccine," "second vaccine," "third vaccine," and the like, refer to separately administrable vaccines, which may be the same or different, and which in general may be administered in any order. Thus, a third vaccine may be administered to a subject before or after a second vaccine.

[0024] "Identity" with respect to percent amino acid sequence "identity" with respect to polypeptides is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the residues in the target sequences after aligning both sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Percent sequence identity is determined by conventional methods. Briefly, two amino

acid sequences are aligned to optimize the alignment scores using the ClustalW algorithm (Thompson et al.; Nuc. Ac. Res. 22:4673-4680; 1994) and PAM250 weight matrix (Dayhoff et al., "Atlas of Protein Sequence and Structure." National Biomedical Research Foundation. Washington, DC 5:345-358 (1978) and default parameters as provided by the program MegAlign (DNASTAR, Inc.; Madison, WI). The PAM250 weight matrix table is presented as **TABLE 1-1** (amino acids are indicated by the standard one-letter codes).

TABLE 1-1

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W
C	12																			
S	0	2																		
T	-2	1	3																	
P	-3	1	0	6																
A	-2	1	1	1	2															
G	-3	1	0	-1	1	5														
N	-4	1	0	-1	0	0	2													
D	-5	0	0	-1	0	1	2	4												
E	-5	0	0	-1	0	0	1	3	4											
Q	-5	-1	-1	0	0	-1	1	2	2	4										
H	-3	-1	-1	0	-1	-2	2	1	1	3	6									
R	-4	0	-1	0	-2	-3	0	-1	-1	1	2	6								
K	-5	0	0	-1	-1	-2	1	0	0	1	0	3	5							
M	-5	-2	-1	-2	-1	-3	-2	-3	-2	-1	-2	0	0	6						
I	-2	-1	0	-2	-1	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	5						
L	-6	-3	-2	-3	-2	-4	-3	-4	-3	-2	-2	-3	-3	4	2	6				
V	-2	-1	0	-1	0	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	4	2	4				
F	-4	-3	-3	-5	-4	-5	-4	-6	-5	-5	-2	-4	-5	0	1	2	-1	9		
Y	0	-3	-3	-5	-3	-5	-2	-4	-4	-4	0	-4	-4	-2	-1	-1	-2	7	10	
W	-8	-2	-5	-6	-6	-7	-4	-7	-7	-5	-3	2	-3	-4	-5	-2	-6	0	0	17

The percent identity is then calculated as:

Total number of identical matches _____ x 100

[length of the longer sequence + number of gaps
introduced into the longer sequence in order to align
the two sequences]

[0025] "Immune response" in a subject refers to the development of a humoral immune response, a cellular immune response, or a humoral and a cellular immune response to an antigen. A "humoral immune response" refers to one that is mediated by antibodies. A "cellular

immune response" is one mediated by T-lymphocytes or other white blood cells or both, and includes the production of cytokines, chemokines and similar molecules produced by activated T-cells, white blood cells, or both. Immune responses can be determined using standard immunoassays and neutralization assays, which are known in the art.

[0026] "Immunologically protective amount" or "effective amount to produce an immune response" of an antigen is an amount effective to induce an immunogenic response in the recipient that is adequate to prevent or ameliorate signs or symptoms of disease, including adverse health effects or complications thereof, caused by infection with the disease agent and in particular with feline calicivirus. Either humoral immunity or cell-mediated immunity or both may be induced. The immunogenic response of an animal to a vaccine composition may be evaluated, e.g., indirectly through measurement of antibody titers, lymphocyte proliferation assays, or directly through monitoring signs and symptoms after challenge with wild type strain. The protective immunity conferred by a vaccine can be evaluated by measuring, e.g., reduction in clinical signs such as mortality, morbidity, temperature number and overall physical condition and overall health and performance of the subject. The immune response may comprise, without limitation, induction of cellular and/or humoral immunity. The amount of a vaccine that is therapeutically effective may vary depending on the particular virus used, or the condition of the cat, and can be determined by a veterinary physician.

[0027] "Intranasal" administration refers to the introduction of a substance, such as a vaccine, into a subject's body through or by way of the nose and involves transport of the substance primarily through the nasal mucosa.

[0028] "Isolated," when used to describe any particularly defined substance, such as a polynucleotide or a polypeptide, refers to the substance that is separate from the original cellular environment in which the substance such as a polypeptide or nucleic acid is normally found. As used herein therefore, by way of example only, a recombinant cell line constructed with a polynucleotide of the invention makes use of the "isolated" nucleic acid. Alternatively the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment may be used as a vaccine thus it would be considered to be isolated because it had been identified, separated and to some extent purified as compared to how it may exist in nature. If the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is produced in a recombinant bacterium or eukaryote expression vector that produces the antigen it is considered to exist as an isolated protein or nucleic acid. Example, a recombinant cell line constructed with a polynucleotide makes use of an "isolated" nucleic acid.

[0029] "Monoclonal antibody" refers to antibodies produced by a single line of hybridoma cells, all directed towards one epitope on a particular antigen. The antigen used to make the monoclonal antibody can be provided as an isolated protein of the pathogen or the whole pathogen. A hybridoma is a clonal cell line that consists of hybrid cells formed by the fusion of a myeloma cell and a specific antibody-producing cell. In general, monoclonal antibodies are of mouse origin; however, monoclonal antibody also refers to a clonal population of an antibody made against a particular epitope of an antigen produced by phage display technology or method that is equivalent to phage display or hybrid cells of non-mouse origin.

[0030] "N days," "N" interval or period of time or "M-days" following an event refers, respectively, to any time on the Nth or Mth day after the event. For example, vaccinating a subject with a second vaccine 3 days following administration of a first vaccine means that the second vaccine is administered at any time on the 3rd day after the first vaccine. This description is often applied to the interval between a first and second vaccination. Typically the preferred N interval is about 3 weeks, or 17 - 25 days, but also common is from about 2 - 4 weeks or 10 - 40 days, and the inventions here are effective with "N" period of time of between 3 and 120 days.

[0031] "Oral" or "peroral" administration refers to the introduction of a substance, such as a vaccine, into a subject's body through or by way of the mouth and involves swallowing or transport through the oral mucosa (e.g., sublingual or buccal absorption) or both.

[0032] "Oronasal" administration refers to the introduction of a substance, such as a vaccine, into a subject's body through or by way of the nose and the mouth, as would occur, for example, by placing one or more droplets in the nose. Oronasal administration involves transport processes associated with oral and intranasal administration.

[0033] "Parenteral administration" refers to the introduction of a substance, such as a vaccine, into a subject's body through or by way of a route that does not include the digestive tract. Parenteral administration includes subcutaneous administration, intramuscular administration, transcutaneous administration, intradermal administration, intraperitoneal administration, intraocular administration, and intravenous administration. For the purposes of this disclosure, parenteral administration excludes administration routes that primarily involve transport of the substance through mucosal tissue in the mouth, nose, trachea, and lungs.

[0034] "Passive immunity" refers to the protection against feline calicivirus provided to a cat as a result of vaccinating the cat with a vaccine comprising antibodies against the FCV strain or an immunogenic component or fragment of a component thereof.

[0035] "Pharmaceutically acceptable" refers to substances, which are within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of subjects without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit-to-risk ratio, and effective for their intended use.

[0036] "Polyclonal antibody" refers to a mixed population of antibodies made against a particular pathogen or antigen. In general, the population contains a variety of antibody groups, each group directed towards a particular epitope of the pathogen or antigen. To make polyclonal antibodies, the whole pathogen or an isolated antigen is introduced by inoculation or infection into a host that induces the host to make antibodies against the pathogen or antigen.

[0037] "Respiratory" administration refers to the introduction of a substance, such as a vaccine, into a subject's body through or by way of inhalation of a nebulized (atomized) substance. In respiratory administration, the primary transport mechanism involves absorption of the atomized substance through the mucosa in the trachea, bronchi, and lungs and is therefore different than intranasal or peroral administration.

[0038] "Single administrative dosage" means administered at or about the same day, that is all components administered within about 1 day. The components may or may not be in a single container.

[0039] "Specific for," when used to describe antibodies of the invention, indicates that the variable regions of the antibodies of the invention recognize and bind a specific virus strain exclusively (*i.e.*, are able to distinguish a particular FCV capsid protein from other known proteins by virtue of measurable differences in binding affinity, despite the existence of localized sequence identity, homology, or similarity between FCV capsid proteins and such polypeptides). It will be understood that specific antibodies may also interact with other proteins (for example, *S. aureus* protein A or other antibodies in ELISA techniques) through interactions with sequences outside the variable region of the antibodies, and, in particular, in the constant region of the molecule. Screening assays to determine binding specificity of an antibody of the invention are well known and routinely practiced in the art. For a comprehensive discussion of such assays, see Harlow *et al.* (Eds.), Antibodies: A Laboratory

Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6:

Antibodies that recognize and bind fragments of the FCV capsid proteins of the invention are also contemplated, provided that the antibodies are specific for FCV capsid proteins. Antibodies of the invention can be produced using any method well known and routinely practiced in the art.

[0040] "Specific immunogenic fragment" is meant a portion of a sequence that is recognizable by an antibody that is specific for the sequence, as defined in detail below.

[0041] "Subject" refers to any animal having an immune system, which includes mammals such as cats.

[0042] "Subunit vaccine" refers to a type of vaccine that includes one or more antigens, but not all antigens, which are derived from or homologous to, antigens from a pathogen of interest, such as a virus, bacterium, parasite or fungus. Such a composition is substantially free of intact pathogen cells or pathogenic particles, or the lysate of such cells or particles. Thus, a subunit vaccine can be prepared from at least partially purified, or substantially purified, immunogenic polypeptides from the pathogen or its analogs. Methods of obtaining an antigen or antigens in the subunit vaccine include standard purification techniques, recombinant production, or chemical synthesis.

[0043] "TCID₅₀" refers to "tissue culture infective dose" and is defined as that dilution of a virus required to infect 50% of a given batch of inoculated cell cultures. Various methods may be used to calculate TCID₅₀, including the Spearman-Kärber method which is utilized throughout this specification. For a description of the Spearman-Kärber method, see B. W. Mahy & H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).

[0044] "Therapeutically effective amount," in the context of this disclosure, refers to an amount of an antigen or vaccine that would induce an immune response in a subject (e.g., cat) receiving the antigen or vaccine which is adequate to prevent or ameliorate signs or symptoms of disease, including adverse health effects or complications thereof, caused by infection with a pathogen, such as a virus (e.g., FCV), bacterium, parasite or fungus. Humoral immunity or cell-mediated immunity or both humoral and cell-mediated immunity may be induced. The immunogenic response of an animal to a vaccine may be evaluated, e.g., indirectly through measurement of antibody titers, lymphocyte proliferation assays, or directly through monitoring signs and symptoms after challenge with wild type strain. The protective immunity conferred by

a vaccine can be evaluated by measuring, e.g., reduction in clinical signs such as mortality, morbidity, temperature number and overall physical condition and overall health and performance of the subject. The amount of a vaccine that is therapeutically effective may vary depending on the particular virus used, or the condition of the subject, and can be determined by a physician.

[0045] "Treating" refers to reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing a disorder, condition or disease to which such term applies, or to preventing one or more symptoms of such disorder, condition or disease.

[0046] "Treatment" refers to the act of "treating" as defined immediately above.

[0047] "Vaccine" refers to a composition that includes an antigen and encompasses so-called "subunit vaccines" as defined below. Administration of the vaccine to a subject results in an immune response. The vaccine may be introduced directly into the subject by any known route of administration, including parenterally, perorally, and the like.

PART 1

VACCINES, VIRUS STRAINS, CAPSID PROTEINS, AND ANTIBODIES OF THE INVENTION

[0048] The present invention provides vaccines that are based upon live or killed FCV strains selected from the group consisting of FCV-21, FCV-49 and FCV26391-4. The invention additionally provides nucleic acid vaccines encoding an FCV capsid protein from the FCV strains of the invention or specific immunogenic fragments thereof. The invention additionally provides isolated capsid protein derived from the FCV strains of the invention or specific immunogenic fragments thereof.

[0049] For FCV strains, a good immune response is induced by antigenic determinant arising from the capsid protein. Here we describe and claim several strains of FCV including closely related capsid proteins and variants thereof. Specifically, we describe strain FCV-21 and protein sequence (SEQ ID 13) and sequences having 91.2%, 95% and 99% or more identity; strain FCV-49 and protein sequence (SEQ ID 15) and sequences having 92.7%, 95% and 99% or more identity; strain FCV-26391-4 and protein sequence (SEQ ID 17) and sequences having 91.8%, 95% and 99% or more identity.

[0050] The vaccine of the present invention is generally intended to be a prophylactic treatment which immunizes cats against disease caused by virulent strains of feline calicivirus. However, the vaccine is also intended for the therapeutic treatment of cats already infected with a virulent strain of feline calicivirus. For example, a vaccine comprising antibodies produced by immunizing a heterologous host with FCV capsid or immunogenic component thereof, is used for the therapeutic treatment of a feline calicivirus-infected cat.

[0051] However, even vaccines that provide active immunity, i.e., vaccines comprising FCV strains selected from the group consisting of FCV-21, FCV-49 and FCV 26391-4, or mutants thereof, or capsid proteins derived from the FCV strains of the invention, or a specific immunogenic fragments of their capsid proteins, would be expected to be effective when given as a therapeutic treatment against various diseases. Thus, the immunity that is provided by the present invention can be either active immunity or passive immunity, and the intended use of the vaccine can be either prophylactic or therapeutic.

[0052] The route of administration for any one of the embodiments of the vaccine of the present invention includes, but is not limited to, oronasal, intramuscular, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous, intravenous, intraarterial, intraocular, and oral as well as transdermal or by inhalation or suppository. The preferred routes of administration include oronasal, intramuscular, intraperitoneal, intradermal, and subcutaneous injection. The vaccine can be administered by any means that includes, but is not limited to, syringes, nebulizers, misters, needleless injection devices, or microprojectile bombardment gene guns (Biolistic bombardment).

[0053] The vaccine for any one of the embodiments of the present invention is formulated in a pharmaceutically accepted carrier according to the mode of administration to be used. One skilled in the art can readily formulate a vaccine that comprises a live or killed FCV-21, FCV-49 or FCV 26391-4, a capsid protein derived from any of the FCV strains of the invention, or an immunogenic fragment thereof, a recombinant virus vector encoding the FCV-21, FCV-49 or FCV 26391-4 capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof, or a DNA molecule encoding the FCV-21, FCV-49 or FCV 26391-4 derived capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof. In cases where intramuscular injection is preferred, an isotonic formulation is preferred. Generally, additives for isotonicity can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose. In particular cases, isotonic solutions such as phosphate buffered saline are preferred. The formulations can further provide stabilizers such as gelatin and

albumin. In some embodiments, a vaso-constrictive agent is added to the formulation. The pharmaceutical preparations according to the present invention are provided sterile and pyrogen-free. However, it is well known by those skilled in the art that the preferred formulations for the pharmaceutically accepted carrier which comprise the vaccines of the present invention are those pharmaceutical carriers approved in the regulations promulgated by the United States Department of Agriculture, or equivalent government agency in a foreign country such as Canada or Mexico or any one of the European nations, for live feline calicivirus vaccines, killed feline calicivirus vaccines, polypeptide (antigen) subunit vaccines, recombinant virus vector vaccines, antibody vaccines, and DNA vaccines. Therefore, the pharmaceutically accepted carrier for commercial production of the vaccine of the present invention is a carrier that is already approved or will be approved by the appropriate government agency in the United States of America or foreign country. The vaccine can further be mixed with an adjuvant that is pharmaceutically acceptable. In certain formulations of the vaccine of the present invention, the vaccine is combined with other feline vaccines to produce a polyvalent vaccine product that can protect cats against a wide variety of diseases caused by other feline pathogens. Currently, commercial manufacturers of feline vaccines, as well as end users prefer polyvalent vaccine products. Therefore, in a preferred embodiment, the present invention provides a polyvalent vaccine which immunizes cats against feline calicivirus and at least one other feline pathogen, preferably selected from the group consisting of feline herpesvirus, feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, feline Chlamydia, and feline panleukopenia virus.

[0054] Inoculation of a cat is preferably by a single vaccination that produces a full, broad immunogenic response. In another embodiment of the present invention, the cat is subjected to a series of vaccinations to produce a full, broad immune response. When the vaccinations are provided in a series, the vaccinations can be provided between about one day to four weeks or longer apart. In particular embodiments, the cat is vaccinated at different sites simultaneously. Additional details about the route and administration are found below in the section titled "Methods of Immunizing Cats against Calicivirus."

[0055] The vaccine compositions optionally may include vaccine-compatible pharmaceutically acceptable (*i.e.*, sterile and non-toxic) liquid, semisolid, or solid diluents that serve as pharmaceutical vehicles, excipients, or media. Diluents can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others. Stabilizers include albumin, among others. Any adjuvant known in the art may be used in the vaccine composition, including oil-based adjuvants

such as Freund's Complete Adjuvant and Freund's Incomplete Adjuvant, mycolate-based adjuvants (e.g., trehalose dimycolate), bacterial lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycans (i.e., mureins, mucopeptides, or glycoproteins such as N-Opaca, muramyl dipeptide [MDP], or MDP analogs), proteoglycans (e.g., extracted from *Klebsiella pneumoniae*), streptococcal preparations (e.g., OK432), Biostim™ (e.g., 01K2), the "Iscoms" of EP 109 942, EP 180 564 and EP 231 039, aluminum hydroxide, saponin, DEAE-dextran, neutral oils (such as miglyol), vegetable oils (such as arachis oil), liposomes, Pluronic® polyols. Adjuvants include, but are not limited to, the RIBI adjuvant system (Ribi Inc.), alum, aluminum hydroxide gel, cholesterol, oil-in water emulsions, water-in-oil emulsions such as, e.g., Freund's complete and incomplete adjuvants, Block co-polymer (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), AMPHIGEN® adjuvant, saponin, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) or other saponin fractions, monophosphoryl lipid A, Avridine lipid-amine adjuvant, heat-labile enterotoxin from *E. coli* (recombinant or otherwise), cholera toxin, or muramyl dipeptide, among many others. The immunogenic compositions can further include one or more other immunomodulatory agents such as, e.g., interleukins, interferons, or other cytokines. The immunogenic compositions can also include gentamicin and Merthiolate. While the amounts and concentrations of adjuvants and additives useful in the context of the present invention can readily be determined by the skilled artisan, the present invention contemplates compositions comprising from about 50 µg to about 2000 µg of adjuvant and preferably about 500 µg/2 ml dose of the vaccine composition. In another preferred embodiment, the present invention contemplates vaccine compositions comprising from about 1 µg/ml to about 60 µg/ml of antibiotic, and more preferably less than about 30 µg/ml of antibiotic.

[0056] The immunogenic compositions of the present invention can be made in various forms depending upon the route of administration. For example, the immunogenic compositions can be made in the form of sterile aqueous solutions or dispersions suitable for injectable use, or made in lyophilized forms using freeze-drying techniques. Lyophilized immunogenic compositions are typically maintained at about 4°C, and can be reconstituted in a stabilizing solution, e.g., saline or/and HEPES, with or without adjuvant.

[0057] In addition, the immunogenic and vaccine compositions of the present invention can include one or more pharmaceutically-acceptable carriers. As used herein, "a pharmaceutically-acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents,

adsorption delaying agents, and the like. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense of being compatible with the components of the invention and not deleterious to the subject to be immunized. Typically, the carriers will be sterile and pyrogen-free.

LIVE VACCINES

[0058] In one embodiment of the vaccine of the present invention, the vaccine comprises a live FCV vaccine, wherein the FCV component is selected from the group consisting of FCV-21, FCV-49 and FCV 26391-4. Because these strains were isolated in a non-virulent form they are particularly preferred for the preparation of a live vaccine which stimulates the cat's immune system without causing disease.

[0059] Methods for attenuating the viruses further are well known in the art and include such methods as serial passage in cell culture on a suitable cell line, or ultraviolet or chemical mutagenesis.

INACTIVATED VACCINES

[0060] In another embodiment of the present invention, the vaccine comprises an inactivated or killed FCV vaccine comprising an FCV strain selected from the group consisting of FCV-21, FCV-49 and FCV 26391-4. The inactivated vaccine is made by methods well known in the art. For example, once the virus is propagated to high titers, it would be readily apparent by those skilled in the art that the virus antigenic mass could be obtained by methods well known in the art. For example, the virus antigenic mass may be obtained by dilution, concentration, or extraction. All of these methods have been employed to obtain appropriate viral antigenic mass to produce vaccines. The calicivirus is inactivated by treatment with formalin, betapropiolactone (BPL), or with binary ethyleneimine (BEI), or other methods known to those skilled in the art.

[0061] Inactivation by formalin is performed by mixing the calicivirus suspension with 37% formaldehyde to a final formaldehyde concentration of 0.05%. The calicivirus-formaldehyde mixture is mixed by constant stirring for approximately 24 hours at room temperature. The inactivated calicivirus mixture is then tested for residual live virus by assaying for growth on a suitable feline cell line such as CRFK cells.

[0062] Inactivation by BEI is performed by mixing the calicivirus suspension of the present invention with 0.1 M BEI (2-bromo-ethylamine in 0.175 N NaOH) to a final BEI concentration

of 1 mM. The calicivirus-BEI mixture is mixed by constant stirring for approximately 48 hours at room temperature, followed by the addition of 1.0 M sodium thiosulfate to a final concentration of 0.1 mM. Mixing is continued for an additional two hours. The inactivated calicivirus mixture is tested for residual live calicivirus by assaying for growth on a suitable feline cell line such as NLFK cells.

[0063] The aforementioned inactivated calicivirus of the present invention is mixed with any one of the pharmaceutically carriers for formulating inactivated virus vaccines to the appropriate dosage level. The inactivated vaccine further can include, in addition to an FCV component selected from the group consisting of FCV-21, FCV-49 and FCV 26391-4 at least one other feline calicivirus strain, preferably selected from the group consisting of FCV-F9, FCV-M8, FCV-255, and FCV-2280. In a preferred embodiment, the vaccine further includes a vaccine for immunizing a cat against one or more other feline pathogens, preferably selected from the group consisting of feline herpesvirus, feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, feline Chlamydia, and feline panleukopenia virus.

RECOMBINANT VACCINES

[0064] In a further embodiment of the present invention, the vaccine comprises a recombinant virus vector containing a nucleic acid encoding an FCV capsid protein disclosed herein or a specific immunogenic fragment thereof.

[0065] In one particular embodiment, the recombinant virus vector is a feline herpesvirus that immunizes a cat against both feline calicivirus and feline herpesvirus. In another embodiment, the recombinant virus vector comprises one or more antigens preferably selected from the group consisting of feline herpesvirus, feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, feline Chlamydia, and feline panleukopenia virus, rabies virus and Bordetella bronchiseptica.

[0066] To make a recombinant virus vector that expresses the an FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof, a cDNA encoding the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is inserted into the genome of a virus vector such as herpesvirus, poxvirus, or adenovirus. U. S. Pat. No. 5,716,822 to Wardley et al. describes a method for inserting DNA encoding the feline calicivirus strain CFI-68 FIV capsid protein into the feline herpesvirus thymidine kinase gene. Other recombinant virus vector vaccines embraced by the present invention, include but are not limited to, adenovirus, adeno-associated virus, parvovirus,

and various poxvirus vectors to express the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof. In particular, the present invention includes recombinant poxvirus vector vaccines that express the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof made according to the methods taught in any one of U.S. Pat. Nos. 5,338,683 and 5,494,807 to Paoletti et al., which teach recombinant virus vaccines consisting of either vaccinia virus or canary poxvirus expressing foreign antigens; U.S. Pat. No. 5,266,313 to Esposito et al., which teaches recombinant raccoon poxvirus vectors expressing rabies virus antigens; and U.S. Pat. No. 6,010,703 to Maes et al., which teaches recombinant racoon poxvirus vectors that express the feline herpesvirus gD or gB antigens.

[0067] For any of the aforementioned recombinant virus vectors, the cDNA encoding the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is operably linked to a eukaryote promoter at the 5' end of the cDNA encoding the antigen and a eukaryote termination signal and poly (A) signal at the 3' end of the cDNA encoding the antigen. As used herein, the term "operably linked" means that the polynucleotide of the present invention (as a cDNA molecule) and a polynucleotide (DNA) containing an expression control sequence, e.g., transcription promoter and termination sequences, are situated in a vector or cell such that expression of the antigen encoded by the cDNA is regulated by the expression control sequence. Methods for cloning DNA such as the cDNA encoding the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof and operably linking DNA containing expression control sequences thereto are well known in the art. Examples of promoters suitable for expressing the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof in the recombinant virus vectors are the cytomegalovirus immediate-early (CMV) promoter, the Rous sarcoma virus long terminal repeat (RSV-LTR) promoter, the simian virus 40 (SV40) immediate-early promoter, and inducible promoters such as the metallothionein promoter. An example of a DNA having a termination and poly (A) signal is the SV40 late poly (A) region. Another example of a viral expression system suitable for producing the antigen is the Sindbis Expression system available from Invitrogen. The use of these commercially available expression vectors and systems are well known in the art.

NUCLEIC ACID OR DNA MOLECULE VACCINE

[0068] In an embodiment further still of the present invention, the vaccine is provided as a nucleic acid or DNA molecule vaccine that elicits an active immune response in the cat. The DNA molecule vaccine consists of DNA having a nucleic acid sequence which encodes the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof of a FCV-capsid protein disclosed herein.

[0069] In a preferred embodiment, the DNA molecule vaccine comprises the nucleic acid sequence of SEQ ID NOS: 12, 14, or 16, or a fragment thereof encoding SEQ ID NOS: 13, 15 or 17, or a specific immunogenic fragment of SEQ ID NOS: 13, 15 or 17. The nucleic acid encoding the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is operably linked at or near a transcriptional promoter. This enables transcription of the capsid protein, or a specific immunogenic fragment thereof, from the nucleic acid when the nucleic acid is inoculated into the cells of the cat. Preferably, the DNA molecule is a plasmid. Promoters that are useful for DNA vaccines are well known in the art and include, but are not limited to, the RSV LTR promoter, the CMV immediate early promoter, and the SV40 T antigen promoter. It is further preferred that the nucleic acid be operably linked, at or near the termination codon of the sequence encoding the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof, to a nucleic acid fragment comprising a transcription termination signal and poly (A) recognition signal. The DNA vaccine is provided to the cat in an accepted pharmaceutical carrier or in a lipid or liposome carrier similar to those disclosed in U.S. Pat. No. 5,703,055 to Felgner. The DNA vaccine can be provided to the cat by a variety of methods such as intramuscular injection, intrajet injection, or biolistic bombardment. Making DNA vaccines and methods for their use are provided in U.S. Pat. Nos. 5,589, 466 and 5,580,859, both to Felgner. Finally, a method for producing pharmaceutical grade plasmid DNA is taught in U.S. Pat. No. 5,561,064 to Marquet et al.

[0070] Therefore, using the abovementioned methods, DNA vaccines that express the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof are used to immunize cats against virulent feline calicivirus. The advantage of the DNA vaccine is that the DNA molecule is conveniently propagated as a plasmid which is a simple and inexpensive means for producing a vaccine, and since the vaccine is not live, many of the regulatory issues associated with live recombinant virus vector vaccines are not an issue with DNA vaccines. One skilled in the art

would appreciate that the DNA vaccine of the present invention can comprise synthetically produced nucleic acids that are made by chemical synthesis methods well known in the art.

ISOLATED AND PURIFIED FCV CAPSID PROTEIN

[0071] In an embodiment further still of the present invention, the vaccine consists of the isolated and purified FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof. In particular, a vaccine wherein the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:13, 15, 17. Preferably, the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is produced in a recombinant bacterium or eukaryote expression vector that produces the antigen that can be isolated and purified to make the vaccine. For example, the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is produced in a microorganism such as bacteria, yeast, or fungi, in a eukaryote cell such as a mammalian or an insect cell, or via a recombinant virus vector such as adenovirus, poxvirus, herpesvirus, Semliki Forest virus, baculovirus, bacteriophage, Sindbis virus, or Sendai virus. Suitable bacteria for producing the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof include *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, or any other bacterium that is capable of expressing heterologous polypeptides. Suitable yeast types for expressing the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, or any other yeast capable of expressing heterologous polypeptides. Methods for using the aforementioned bacteria, eukaryotic cells or recombinant virus vectors to produce antigens for vaccines are well known in the art.

[0072] To produce the vaccine consisting of the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof, the nucleic acid encoding the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is cloned into a plasmid, and the nucleic acid is operably linked to a promoter which effects the expression of the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof in a microorganism. Suitable promoters include, but are not limited to, T7 phage promoter, T3 phage promoter, β -galactosidase promoter, and the Sp6 phage promoter. Expression of the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof in a microorganism enables the capsid protein to be produced using fermentation technologies that are used commercially for producing large quantities of recombinant antigenic polypeptides. Methods for isolating and purifying antigens are well known in the art and include methods such as gel filtration, affinity chromatography, ion exchange chromatography, or centrifugation.

[0073] To facilitate isolation of the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof, a fusion polypeptide is made wherein the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is linked to another polypeptide which enables isolation by affinity chromatography. Preferably, a fusion polypeptide is made using one of the expression systems *infra*. For example, the cDNA nucleic acid sequence encoding the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is linked at either the 5' end or 3' end to a nucleic acid encoding a polypeptide. The nucleic acids are linked in the proper codon reading frame to enable production of a fusion polypeptide wherein the amino and/or carboxyl terminus of the capsid protein or portion thereof is fused to a polypeptide which allows for the simplified recovery of the antigen as a fusion polypeptide. The fusion polypeptide can also prevent the antigen from being degraded during purification. While a vaccine comprising the fusion polypeptide is efficacious, in some instances it can be desirable to remove the second polypeptide after purification. Therefore, it is also contemplated that the fusion polypeptide contains a cleavage site at the junction between the antigen and the polypeptide. The cleavage site consists of an amino acid sequence that is cleaved with an enzyme specific for the amino acid sequence at the site. Examples of such cleavage sites that are contemplated include the enterokinase cleavage site which is cleaved by enterokinase, the factor Xa cleavage site which is cleaved by factor Xa, and the GENENASE cleavage site which is cleaved by GENENASE (GENENASE is a trademark of New England Biolabs, Beverly, Mass.). The following are methods for producing the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof as a fusion polypeptide or as an isolated antigen free of the polypeptide.

[0074] An example of a procaryote expression system for producing the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof as a fusion polypeptide for use in vaccines is the Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System available from Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J., which uses the pGEX-4T-1 expression vector plasmid. The cDNA encoding the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is fused in the proper codon reading frame with the DNA encoding GST. The GST part of the fusion polypeptide allows the rapid purification of the fusion polypeptide using glutathione Sepharose 4B affinity chromatography. After purification, the GST portion of the fusion polypeptide can be removed by cleavage with a site-specific protease such as thrombin or factor Xa to produce an antigen free of the GST polypeptide. The capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof, free of the GST polypeptide, is produced by a second round of glutathione Sepharose 4B affinity chromatography.

40

[0075] Another method for producing a vaccine comprising the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is a method which links in-frame the cDNA encoding the antigen and DNA codons that encode polyhistidine. The polyhistidine preferably comprises six histidine residues which allows purification of the fusion polypeptide by metal affinity chromatography, preferably nickel affinity chromatography. To produce the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof free of the polyhistidine, a cleavage site such as an enterokinase cleavage site is fused in the proper reading frame between the codons encoding the polyhistidine and the codons encoding the antigen. The antigen is freed of the polyhistidine by cleavage with enterokinase, followed by a second round of metal affinity chromatography which binds the free polyhistidine. This method was shown to be useful for preparing the LcrV antigen of *Y. pestis*, which was disclosed in Motin et al. (Infect. Immun. 64: 4313-4318 (1996)). The Xpress System, available from Invitrogen, Carlsbad, California, is an example of a commercial kit that is available for making and then isolating polyhistidine- polypeptide fusion protein.

[0076] A method further still for producing a vaccine comprising the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof uses a method disclosed by Motin et al., Infect. Immun. 64: 3021-3029 (1995). Motin et al. disclosed a DNA encoding a fusion polypeptide consisting of the DNA encoding an antigen linked to DNA encoding a portion of protein A wherein DNA encoding an enterokinase cleavage site is interposed in the proper codon reading frame between the DNA encoding protein A and the antigen. The protein A enables the fusion polypeptide to be isolated by IgG affinity chromatography, and the capsid protein free of the protein A is produced by cleavage with enterokinase. The protein A is then removed by a second round of IgG affinity chromatography.

[0077] Another method for producing a vaccine comprising the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof is based on methods disclosed in U.S. Pat. No. 5,725,863 to Daniels et al, which is incorporated herein by reference in its entirety. Daniels et al. method can be used to make the FCV capsid vaccine which consists of enterotoxin molecule wherein each molecule has inserted therein upwards of 100 amino acid residues of the FCV capsid protein. Other methods for making fusion polypeptide vaccines which can be used to make the vaccines of the present invention is disclosed in U.S. Pat. No. 5,585, 100 to Mond et al. and U.S. Pat. No. 5,589,384 to Liscombe. Finally, the pMAL Fusion and Purification System available from New England Biolabs is another example of a method for making a fusion polypeptide wherein a maltose binding protein is fused to the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof. The maltose binding protein facilitates isolation of the fusion

polypeptide by amylose affinity chromatography. The maltose binding protein can be linked to the antigen by one of the above mentioned cleavage sites which enables the antigen to be made free of the maltose binding protein.

[0078] While bacterial methods are used to produce the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof for vaccines, it can be desirable to produce the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof in a eukaryote expression system. A particularly useful system is the baculovirus expression system that is disclosed in U.S. Pat. No. 5,229, 293 to Matsuura et al., which is incorporated herein by reference in its entirety. Baculovirus expression vectors suitable to produce the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof are the pPbac and pMbac vectors from Stratagene; and the Bac-N-Blue vector, the pBlueBac4.5 vector, pBlueBacHis2-A,B,C, and the pMelBac available from Invitrogen, Carlsbad, Calif.

[0079] Another eukaryote system useful for expressing the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof for vaccines is a yeast expression system such as the ESP Yeast Protein Expression and Purification System available from Stratagene. Another yeast expression system is any one of the Pichia-based expression systems from Invitrogen. Mammalian expression systems are also embraced by the present invention. Examples of mammalian expression systems are the LacSwitch II system, the pBK Phagemid, pXT1 vector system, and the pSG5 vector system from Stratagene; the pTarget mammalian expression vector system, the pSI mammalian expression vector, pCI mammalian expression vector, and pAdVantage vectors —available from Promega Corporation, Madison, Wis.; and the Ecdysone-Inducible Mammalian —Expression System, pCDM8, pcDNA1.1, and pcDNA1.1/Amp available from Invitrogen.

[0080] The present invention further includes an embodiment consisting of vaccines that comprise the FCV capsid protein or particular epitopes of the capsid protein as components of a heat-stable spore delivery system made according to the method taught in U.S. Pat. No. 5, 800,821 to Acheson et al., which is incorporated herein by reference in its entirety. Therefore, the present invention provides a genetically engineered bacterial cell containing a nucleic acid encoding the FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof. When the recombinant bacterial spore vaccine is orally administered to the cat, the spores germinate in the gastrointestinal tract of the cat and the bacteria expresses the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof which comes into contact with the cat's immune system and elicits an immune response. The vaccine has the advantage of being heat stable; therefore, it can be stored at room temperature for an indefinite period of time.

PASSIVE IMMUNITY VACCINES

[0081] While the above embodiments of the present invention provide active immunity against feline calicivirus, the present invention further comprises vaccines that provide passive immunity to feline calicivirus. A vaccine that elicits passive immunity against feline calicivirus consists of polyclonal antibodies or monoclonal antibodies that are against the FCV capsid protein, a specific immunogenic fragment thereof, or the whole FCV virus.

[0082] To make a passive immunity vaccine comprising polyclonal antibodies, the FCV capsid protein thereof, or a specific immunogenic fragment thereof is injected into a suitable host for preparing the antibodies, preferably the host is a horse, swine, rabbit, sheep, or goat. Methods for producing polyclonal antibody vaccines from these hosts are well known in the art. By way of example, the capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof or whole calicivirus FCV capsid is mixed with an adjuvant such as Freund's complete or the less toxic TiterMax available from CytRx Corp., Norcross, Ga., which is then administered to the host by methods well known in the art. Antibody production is monitored and when sufficient antibody has been produced, the serum is removed from the host and preferably the antibody is recovered from the serum.

[0083] The passive immunity vaccine can comprise one or more monoclonal antibodies against one or more epitopes of the FCV capsid protein or whole FCV virus. Methods and hybridomas for producing monoclonal antibodies are well known in the art. While monoclonal antibodies can be made using hybridoma technologies well known in the art, the monoclonal antibodies against the antigen can also be made according to phage display methods such as that disclosed in U.S. Pat. No. 5,977,322 to Marks et al., which is incorporated herein by reference in its entirety. Feline antibodies against the capsid protein or portion thereof can be made according to methods which have been used for humanizing antibodies such as those disclosed in U.S. Pat. Nos. 5,693,762 and 5,693,761 both to Queen et al., which is incorporated herein by reference in its entirety. A phage display kit that is useful for making monoclonal antibodies is the Recombinant Phage Antibody System available from Amersham Pharmacia Biotech.

ANTIBODIES, POLYCLONAL AND MONOCLONAL

[0084] This invention also comprises, describes and claims several very important monoclonal antibodies. These antibodies have been developed here in order to rapidly identify and in some cases define the viral strains described herein. Particular examples of monoclonal

antibodies and their descriptions can be found in the following examples. In particular see **EXAMPLE 1-2** and **TABLE 1-2**, and especially **EXAMPLE 1-8**, **TABLE 1-4**.

[0085] The following examples are intended to promote but not limit a further understanding of the present invention

PART 1 EXAMPLES

EXAMPLE 1-1. ISOLATION AND GROWTH OF FCV-21.

[0086] Feline calicivirus (FCV) strain 21 (FCV-21) was collected in June of 1993 from an Ann Arbor, Michigan cat show. It was diluted in 96 well micro-tubes containing 1% media and 1:10 dilutions were made. 100 ul of the diluted sample was added to 100 ul of CRFK cells in a 96 well plate.

[0087] The FCV-21 virus was purified three times by limited dilution in 96 well plates. The viral supernatant from the final purification was removed and used to infect CRFK cells grown to 75% confluence in a T25 flask. When 100% CPE was observed, the suspension was freeze/thawed three times and aliquoted into freezing vials (1ml/vial). The titer of this viral stock was determined to be 1.5×10^8 TCID₅₀/ml.

[0088] FCV-21 was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, USA, and assigned ATCC accession number PTA-

EXAMPLE 1-2. IMMUNOFLUORESCENCE AND ELISA OF FCV-21 USING VARIOUS COMMERCIAL OR PRE-EXISTING MONOCLONAL ANTIBODIES

[0089] For the immunofluorescence assay (IFA), a viral stock of FCV-21 was used to infect a 24-well plate seeded with NLFK cells grown to approximately 90% confluency. At approximately 20 hours post infection, the plate was washed twice with 1x PBS, and fixed with 80% acetone. Various monoclonal antibodies were diluted to about 2 ug/ul and added to individual wells of the plate (0.2 ml/well). After a 1 hr incubation at room temperature (RT) with agitation, each well was washed twice with 1x PBS, and secondary antibody (anti-mouse FITC, 10 ug/ml) was added. After covering the plate with aluminum foil and incubating for 30 min at RT with agitation, each well was washed twice with 1x PBS, and air dried. Each well was then observed under a fluorescence microscope for its intensity of staining with FITC.

[0090] For the ELISA assay, a 96-well ELISA plate was coated with 200 μ l of an anti-FCV rabbit polyclonal antibody (Pfizer #16), diluted 1:1500 in sodium carbonate buffer (1.59 g of Na_2CO_3 and 2.93 g of NaHCO_3 dissolved into 1 liter of water). The plate was incubated at 4°C overnight. The plate was washed three times with 1x PBS (pH 7.4) containing 0.05% of Tween-20 (PBST), then blocked with 200 μ l of 1% Casein in PBST for 1 hour at 37°C. Various monoclonal antibodies were diluted to about 0.1 μ g/ml and added to individual wells (100 μ l/well). Each sample was done in triplicate. After incubation at 37°C for 1 hr, each well was washed 3 times with PBST, and incubated with 100 μ l of 1:200 diluted peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, cat. No.715-035-150) for 1 hour at 37°C. Each well was then washed 3 times with PBST, followed by the addition of 100 μ l of ABTS peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat. No. 50-66-18) to each well. After approximately 10 min at RT, the plate was read at 405-490 nm (dual wavelength) with a ELISA reader. Specific activity was calculated based on the signal/noise ratio.

[0091] The data sets from the IFA and ELISA assays correlated well with each other (TABLE 1-2), and indicated that FCV-21 is immunologically distinct from F9, a commonly used FCV vaccine strain. Two monoclonal antibodies (FCV 1-43 and MAB791P) reacted with F9, but not with FCV-21 (TABLE 1-2).

TABLE 1-2. SUMMARY OF AFFINITIES OF VARIOUS MONOCLONAL ANTIBODIES FOR FCV STRAINS F9 AND FCV-21

	Source	Catalogue/I D No.	IFA		ELISA	
			F9	FCV-21	F9	FCV-21
1	Accurate Chemical	YVS7401	+++	++	17	16
2	Accurate Chemical	YVS7402	-	-	1	1
		MEDCLA3	++++	++++	8	3
3	Accurate Chemical	09				
4	Chemicon	MAB8962	++	++	23	24
5	Cortex Biochem	CR1260M	+	+	11	12
	Custom		+++	+++	27	24
6	Monocolonals, Int.	S1-9				
	Custom		+++	-	5	1
7	Monocolonals, Int.	FCV 1-43				
	Custom		+++	+++	5	13
8	Monocolonals, Int.	FCV8-1A				
9	Maine Biotech	MAB790P	++++	++++	26	26
10	Maine Biotech	MAB791P	+++	-	4	1
11	Novocastra Lab	NCL-1G9	+++	+++	17	5
12	In-house (Pfizer)	1-4 mAb	-	-	1	1

13	In-house (Pfizer)	1-12 mAb	++++	+++	12	1
14	In-house (Pfizer)	3-3 mAb	++++	++++	22	25
15	In-house (Pfizer)	3-5 mAb	++++	++++	21	22
16	In-house (Pfizer)	rabbit serum	++++	++++		
17	Biocor/Pfizer	S1.9A1A	++++	++++	29	33

EXAMPLE 1-3. CAPSID SEQUENCE ANALYSIS OF FCV-21

[0092] Total RNA was isolated from the supernatant of a FCV-21-infected cell culture using TRIzol reagent (Invitrogen; Carlsbad, CA). A "first strand" cDNA preparation was synthesized using random primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). The PCR reaction was performed using the XL rTth polymerase (Applied Biosystems; Foster City, CA) and oligonucleotide primers DEL-653 (SEQ ID NO. 1) and DEL-651 (SEQ ID NO. 2). The resulting PCR product was sequenced using BigDye chemistry and an ABI377 Genetic Analyzer. The complete capsid sequence is listed as SEQ ID NO. 12 for nucleotide sequence and SEQ ID NO. 13 for encoded amino acid sequence.

EXAMPLE 1-4. ISOLATION AND GROWTH OF FCV - 49

[0093] Feline calicivirus (FCV) strain 49 (FCV-49, also called PHA-49) was collected in 1993 from a Philadelphia, PA cat show. The specimen was diluted in 96 well micro-tubes containing 1% media, and 1:10 dilutions were made. 100 ul of the diluted sample was added to 100 ul of CRFK cells in a 96 well plate. The FCV-49 virus was purified three times by limited dilution in 96 well plates. The viral supernatant from the final purification was removed and used to infect CRFK cells grown to 75% confluence in a T25 flask. When 100% CPE was observed, the suspension was freeze/thawed three times and aliquoted into freezing vials (1 ml/vial). The titer of this viral stock was determined to be 6.8×10^7 TCID₅₀/ml.

[0094] FCV-49 was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, USA, and assigned ATCC accession number PTA-

EXAMPLE 1-5. CAPSID SEQUENCE ANALYSIS OF FCV-49

[0095] Total RNA was isolated from the supernatant of a FCV-49-infected cell culture using TRIzol reagent (Invitrogen; Carlsbad, CA). A "first strand" cDNA preparation was synthesized using random primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). The PCR reaction was performed using the XL rTth polymerase (Applied Biosystems; Foster City, CA) and oligonucleotide primers DEL-653 (SEQ ID NO:1) and DEL-651 (SEQ ID NO:2). The resulting PCR product was sequenced using BigDye chemistry and an ABI377 Genetic

Analyzer. The complete capsid sequence is shown as **SEQ ID NO. 14** for nucleotide sequence and **SEQ ID NO. 15** for encoded amino acid sequence.

EXAMPLE 1-6. ISOLATION AND GROWTH OF FCV -26391-4

[0096] Feline calicivirus (FCV) strain 26391-4 (FCV-26391-4) was collected in 2003 from the Humane Society of Bay County (Panama City, Florida). It was purified once by limited dilution in a 96 well plate containing DMEM medium (Invitrogen) with 2% fetal bovine serum. The purified virus was then used to infect a T150 flask containing NLFK (Norden Lab Feline Kidney) cells. Once 100% CPE was reached, the suspension was freeze/thawed once and aliquoted into freezing vials (0.85 ml/vial). The viral titer of this stock was determined to be 5.6×10^7 TCID₅₀/ml.

[0097] FCV-26391-4 was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, USA, and assigned ATCC accession number PTA-_____.

EXAMPLE 1-7. CAPSID SEQUENCE ANALYSIS OF FCV 26391-4

[0098] Total RNA was isolated from the supernatant of a FCV 26391-4 infected cell culture using a QIAamp Viral RNA Isolation Kit (Qiagen; Valencia, CA). Approximately 1 μ g of viral RNA was used in RT-PCR (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq; from Invitrogen). The reaction conditions were: 30 min at 50°C; 2 min at 94°C; followed by 40 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, and 2 min at 70°C; followed by a final incubation at 72°C for 10 min, and storage at 4°C. The primers used were FCV-N2 (**SEQ ID NO. 3**) and FCV-primer 2 (**SEQ ID NO. 9**). The PCR product was then sequenced using various oligonucleotide primers (**SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 11**). The sequence of the whole capsid for FCV 26391-4 is shown as **SEQ ID NO. 16** for nucleotide sequence and **SEQ ID NO. 17** for encoded amino acid sequence.

[0099] The amino acid sequences of the capsid genes from FCV-21, FCV-49 and FCV-26391-4 were aligned with all full-length FCV capsid sequences available in GenBank. The alignment was created using the ClustalW algorithm (Thompson et al 1994), the PAM250 weight matrix (Dayhoff et al., 1978), and default program parameters (MegAlign; DNASTAR, Inc; Madison, WI). The identity between the capsid protein sequences of FCV-21 and FCV 213-95, the highest among all entries in GenBank, is 90.7%. The FCV-49 and FCV 213-95 capsid

sequences are 92.2% identical. The FCV 26391-4 and FCV CFI-68 capsid sequences are 91.3% identical to each other.

[00100] A single capsid sequence is presented for FCV-21, FCV-49, and FCV 26391-4, and is based upon direct sequencing of the PCR products obtained. However, each of these sequences represents the average, or consensus, sequence amongst a population of viral quasispecies, which are known to exist within RNA viral populations (for a review, see Domingo et al., Virus Res. 82:39-44; 2002). Quasispecies are a direct result of errors that occur during RNA genome replication, generating progeny which have mutations within their genome. Therefore, it is expected that minor variants of the capsid sequences for these and other FCV capsid gene sequences naturally exist. However, the distribution of mutations within each is such that they have little/no effect on the overall identity between strains, including FCV-21, FCV-49, and FCV 26391-4.

EXAMPLES 1-8. GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR FCV-21

A. **Purification of FCV-21.** About 200 ml of cell culture supernatant from NLFK cells infected with FCV-21, was centrifuged at 3,000 rpm for 30 minutes at 10°C. 25 ml of the supernatant was transferred into Beckman Ultraclear centrifuge tubes, and 10 ml of a 10% sucrose solution was underlaid into the bottom of the tube. The tubes were then centrifuged at 27,000 rpm for 2 hours at 15°C. Following centrifugation, supernatants were removed and discarded, and the pellets were resuspended in 250 ul of sterile water. The protein concentration was determined to be 7 mg/ml using the Micro-BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce-Chemical Co., Rockford, IL).

IMMUNIZATION OF MICE AND GENERATION OF HYBRIDOMA CELL CLONES

[00101] About 100 ug of purified FCV-21 virus protein was injected into each mouse together with Freund's adjuvant. Eight mice were vaccinated. Two boost immunizations were carried out with 100 ug purified FCV-21 with RIBI adjuvant at 4-week interval. Immune responses for those eight mice were determined to have titer of 31250 or above in ELISA using purified FCV-21. Cell fusion was carried out to create hybridoma clones. Sixty-eight of such cell clones were grown up and supernatant tested for its reactivity with FCV-21.

[00102] For this ELISA, a 96-well ELISA plate was coated with 100 ul of purified FCV at a concentration of 5 ug/ml, diluted in 1xPBS. The plate was dried at 37°C overnight uncovered in

148

a non-humidified incubator. The virus on plate was fixed by applying 0.1 ml of methanol and incubating at room temperature for 5 minutes. The plate was then washed 8 times with distilled water, then blocked with 200 ul of 10% house serum in 1x PBS for at 4°C overnight. The plate was washed again for 8 times with distilled water. Various dilutions of mouse serum samples added to individual wells (100 ul/well). Each sample was done in triplicate. After incubation at 37°C for 1 hr, each well was washed 3 times with PBST, and incubated with 100 ul of 1:200 diluted peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, cat. No.715-035-150) for 1 hour at 37°C. Each well was then washed 3 times with PBST, followed by the addition of 100 ul of ABTS peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat. No. 50-66-18) to each well. After approximately 10 min at RT, the plate was read at 405-490 nm (dual wavelength) with a ELISA reader. Specific activity was calculated based on the signal/noise ratio.

REACTIVITY OF FCV-21 SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES

[00103] The supernatants of above hybridoma cell clones were used to test for its reactivity for FCV-21 as well as F9 in sandwich ELISA assay. Briefly, a 96-well ELISA plate was coated with 200 ul of an anti-FCV rabbit polyclonal antibody (Pfizer #16), diluted 1:1500 in sodium carbonate buffer (1.59 g of Na_2CO_3 and 2.93 g of NaHCO_3 dissolved into 1 liter of water). The plate was incubated at 4°C overnight. The plate was washed three times with 1x PBS (pH 7.4) containing 0.05% of Tween-20 (PBST), then blocked with 200 ul of 1% Casein in PBST for 1 hour at 37°C. The FCV-21 and F-9 supernatants were added to each well at dilution of 1:10. After incubation at 37°C for 1 hour, the plates were washed and various hybridoma supernatants and their various dilutions were added to individual wells (100 ul/well) in triplicate. The plates were then incubated at 37°C for 1 hr, washed 3 times with PBST, and incubated with 100 ul of 1:200 diluted peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, cat. No.715-035-150) for 1 hour at 37°C. After washing, 100 ul of ABTS peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat. No. 50-66-18) was added to each well. After approximately 10 min at RT, the plate was read at 405-490 nm (dual wavelength) with a ELISA reader. Specific activity was calculated based on the signal/noise ratio.

TABLE 1-3. ELISA SCREENING OF VARIOUS SUPERNATANTS OF HYBRIDOMA CELLS FOR THEIR SPECIFIC REACTIVITY FOR FCV-21 VS. F9.

mAb \ Virus	mAb undiluted		1:10 dilution of mAb		1:50 dilution of mAb	
	PHA-21	F9	PHA-21	F9	PHA-21	F9
1 sup	30	1	3	1	2	1
2A sup	2	1				
2B sup	3	1				
3 sup	29	3	21	1	16	1
4 sup	1	1				
5 sup	1	1				
6 sup	1	1				
7 sup	26	3	22	1	17	1
8 sup	9	8	3	1		
9A sup	1	1				
9B sup	1	1				
10 sup	15	13	10	6		
11 sup	1	1				
13 sup	27	22	19	14		
14A sup	2	2				
14B sup	5	3				
15 sup	1	1				
16 sup	21	2	5	1	2	1
17 sup	20	1	14	1	12	1
18 sup	27	22	25	11		
20 sup	1	1				
21 sup	17	9	7	2	2	1
22 sup	2	1				
23 sup	12	1	10	1	10	1
24 sup	14	14	1	1		
26 sup	1	1				
27 sup	15	7	8	3		
28 sup	1	2				
29 sup	24	8	23	1	29	1
30 sup	17	7	13	1	18	1
31 sup	19	19	16	11		
32 sup	28	16	21	12	18	10
33 sup	20	17	15	13		
34 sup	20	18	15	13		
35 sup	14	12	9	6		
36 sup	17	5	15	1	21	1
37 sup	12	4	3	1	1	1
38 sup	6	5				
39 sup	23	15	17	6		
40 sup	16	3	10	1	13	1
41 sup	19	7	14	1		
42 sup	13	1	15	1	17	1

43 sup	1	1				
44 sup	9	4	4	1		
45 sup	1	1				
46 sup	8	4	3	2		
47 sup	4	3				
48 sup	11	11	5	4		
49 sup	12	13	8	7		
50 sup	1	1				
51 sup	2	2				
52 sup	4	10				
53 sup	12	2	10	1	3	1
54 sup	1	1				
55 sup	19	18	25	15		
56 sup	8	4	6	1		
57 sup	1	1				
58 sup	2	8				
59 sup	18	1	20	1	16	1
60 sup	31	1	35	1	21	1
61 sup	18	4	33	1	29	1
62 sup	1	1				
63 sup	1	1				
64 sup	1	1				
65 sup	3	5				
66 sup	4	5				
67 sup	21	12	22	3		
69 sup	1	1				

B. Monoclonal antibodies specific for FCV-21 and not other FCV strains. Eighteen hybridoma cell clones (3, 7, 17, 23, 27, 29, 30, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 53, 56, 59, 60 and 61) were chosen to be further tested for their specificity for FCV-21. Eleven FCV viruses were used in the assay (FCV-21, 49, 26391-4, F9, CFI-68, 33585, 89391, 255, J-1, 2280 and H). Again, sandwich ELISA was used, as described above. The results are summarized in TABLE 1-4.

TABLE 1-4. REACTIVITY OF MONOCLONAL SUPERNATANTS AGAINST VARIOUS FCV STRAINS

Yr of Isolation	1993	1993	2003	1960	not known	2000	2000	1970	1984	1983	1990
<u>mAb \ Virus</u>	<u>21</u>	<u>49</u>	<u>26391-4</u>	<u>F9</u>	<u>CFI-68</u>	<u>33585</u>	<u>89391</u>	<u>255</u>	<u>J-1</u>	<u>2280</u>	<u>H</u>
3 sup	21	18	1	1	2	1	1	1	1	1	25
7 sup	22	21	1	1	5	1	1	1	2	1	24
17 sup	14	12	1	1	8	1	1	1	1	1	8
23 sup	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27 sup	8	9	3	3	10	4	4	23	4	2	2

29 sup	23	18	9	1	13	1	1	1	2	1	8
30 sup	13	13	7	1	5	1	1	1	3	2	6
36 sup	15	8	7	1	1	1	1	1	1	1	1
37 sup	3	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1
40 sup	10	10	2	1	2	1	1	2	2	1	1
41 sup	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
42 sup	15	21	1	1	1	1	1	1	1	1	2
44 sup	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
53 sup	10	20	2	1	21	1	1	1	17	1	14
56 sup	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
59 sup	20	4	1	1	1	1	1	1	1	1	2
60 sup	35	7	1	1	1	1	1	1	1	1	2
61 sup	33	21	12	1	25	1	1	1	3	1	8

[00104] As demonstrated above, hybridoma cell lines 23, 41, 44 and 56 are specific for FCV-21, and not any other FCV tested. Therefore, those monoclonal antibodies can be used as a diagnostic tool for FCV-21. Moreover, hybridoma 36 seems to react with vaccine FCV strains only (FCV-21, 49, 26391-4) and not any other FCV strains.

[00105] Hybridoma cell lines 23, 36, 41, 44 and 56 were all deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, USA, and assigned ATCC accession numbers:

PTA-7349 (23)

PTA-7350 (36)

PTA-7353 (41)

PTA-7351 (44)

PTA-7352 (56)

EXAMPLE 1-9. SERUM CROSS NEUTRALIZATION ANALYSIS OF SERA OF FCV-21 AND FCV-49 AGAINST FCV VIRUSES ISOLATED IN 1993.

A. Titration of homologous antiserum. Convalescent antiserum against twelve FCV isolates was raised in specific pathogen-free (SPF) cats, and collected after a primary and

secondary inoculation. The virus inoculum varied according to stock titers, ranging from 10^4 to 10^8 TCID₅₀/cat. The cats were initially inoculated, boosted 3 weeks later, and then bled for serum 2 weeks post-boost. The twelve isolates included F9, CFI-68, LSO12, JOK63, JOK92, and field isolates 18, 21, 49, 50, 54, 27, and 11. The field isolates were selected based on a phylogenetic analysis of the sequences of the hypervariable region of each strain's capsid protein sequence. The most divergent isolates were chosen for the study.

[00106] Sera were heat inactivated at 56°C for 30 minutes, and titered against their homologous virus using a standard constant virus - varying serum technique (Griest 1979, Mahy 1996). Briefly, media (100-150 µl) was added to each well of a 96 well tissue culture plate. Serum (100-150 µl) was added to each well of the top row (1:2 or 1:4 initial serum dilution; F9 and LSO12 at 1:4), and 100 µl were transferred down the plate after mixing (1:2 dilutions) with a multi-channel pipettor. The last 100 µl was discarded. 50 µl of titered homologous virus (diluted to 200 TCID₅₀/50 µl) was added to each well, and plates were incubated for 2 hrs at 37°C in a CO₂ incubator. After incubation, 50 µl of a 1:10 dilution of CRFK cells in suspension was added to each well. A virus titer plate was set up using the diluted virus to ensure that an appropriate inoculum was added to each well. 50 µl of virus was used in the top row containing 150 µl of media; the rest of the plate contained 180 µl /well, and 10-fold dilutions were carried out down the plate with 20 µl. Plates were incubated for 4 days, and the Kärber formula was used to calculate both the serum and viral titers (in the case of serum titers, the proportion of protected wells to unprotected was used in the equation).

[00107] When titering the sera, the TCID₅₀ was defined as the 50% neutralizing endpoint dilution (Griest 1979). One antibody unit (AU) was defined as the highest dilution of that antiserum capable of neutralizing 32-320 TCID₅₀ of the homologous virus in 50% of the test cultures. Therefore, the TCID₅₀ obtained is equal to 1 AU. Virus cross-neutralizations were carried out against serum concentrations of 2.5, 5, 10 and 20 AU.

B. Virus cross-neutralization assay. Each viral field isolate, as well as strains F9, LSO12, JOK63, JOK92, SA113 and CFI-68, was tested against each of the twelve FCV antisera in a cross-neutralization assay. Each virus required five 96 well plates. Each serum was diluted to 2.5, 5, 10 and 20 AU and plated in replicates of eight down the plate (three sera/plate for a total of four plates), and a virus titer plate (set up in the same way as for serum titrations). Antisera dilutions were prepared in DMEM by first diluting the serum to 20 AU, and then carrying out 2-fold dilutions down to 2.5 AU. An aliquot of each dilution (100 µl) was then added to each

column of wells on the plate. Viruses were quickly thawed at 37°C, placed on ice, and then diluted to 200 TCID₅₀/well (kept on ice). In order to maintain consistency, a three-step dilution process was used for most viral stocks, never going higher than a 1:100 in any step. Diluted virus stock (50 µl) was added to all wells of the serum plates and titered as previously described. Plates were incubated at 37°C in a CO₂ incubator for 2 hr, after which 50 µl of 1:10 dilution of a CRFK cell suspension previously grown to confluency was added to each well. Pipette tips and reservoir troughs were changed after each set of five plates. Plates were scored after 4 days. In some cases, pre-titered, pre-diluted virus was used.

TABLE 1-5. SERUM CROSS-NEUTRALIZATION RESULTS

serum	JOK63	JOK92	CFI68	LSO12	F9	11
virus	2.5/5/10/20*	2.5/5/10/20	2.5/5/10/20	2.5/5/10/20	2.5/5/10/20	2.5/5/10/20
LSO12	- - n n	- - - -	n n N N	n N N N	N N N	- - - -
F9	- - - -	- - - -	- - - n	- - - -	n N N	- - - -
JOK92	- - - -	- n N N	- - - -	- - - n	N N N	- - - -
CFI68	- - - -	- - - -	N N N N	n N N N	N N N	- - - -
JOK63	n n n N	- - - -	- - - -	- - - -	n N n	- - - -
SA113	- - - -	- - - -	- n N	- - - -	N N N	- - - -
3	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
4	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- n N	- - - -
6	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
7	- - - n	- - - -	- - - -	- - - n	N	- - - -
8	- - - -	- - - -	- - - -	- - - n	- - - -	- - - -
9	- - - -	- - - -	- - - n	- - - n	N	- - - -
10	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - N	- - - -
11	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- n n n
12	- - - -	- - - -	- - - -	- - - n	- - - n	- - - -
13	- - - -	- - - -	- - n n	- - - -	n N N	- - - -
14	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
15	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - N	- - - -
16	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
17	- - n n	- - - -	n n n N	- - n n	n	- - - -
18	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
19	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- N n	- - - -
20	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - n	- - - -
21	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- n n	- - - -
22	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- n n	- - - -
23	- - n N	- - - -	- - - n	- - - -	N N N	- - - -
24	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	n n N	- - - -
25	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
27	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - n
28	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	N N N	- - - -
29	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	n n N	- - - -
30	- - - -	- - - -	- - - -	- - n N	N	- - - -
34	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - n	- - - -
36	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- n n	- - - -
38	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
39	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
41	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - n	- - - -
42	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	n n n	- - - -
47	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - N	- - - -
48	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	N N N	- - - -
49	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	n N N	- - - -
50	- - n N	- - - -	- - n N	- - n N	N	- - - -
51	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
52	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
53	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	N	- - - -
54	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	N	- - - -
55	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
56	- - - -	- - - -	n - n n	- - n n	N	- - - -

* 2.5, 5, 10, 20 antibody units used in SN
 n= 4-7/8 wells protected
 blank= insufficient serum/not done

N= 8/8 wells protected
 -= 0-3/8 wells protected

TABLE 1-5 (CONTINUED)

serum	18	21	27	49	50	54
virus	2.5/5/10/20*	2.5/5/10/20	2.5/5/10/20	2.5/5/10/20	2.5/5/10/20	2.5/5/10/20
LSO12	- - - n	N N N	- - - -	N N N	- - - -	- - n N
F9	- - - -	N N N	- - - -	n N N	- - - n	- - - -
JOK92	- - - -	- - n	- - - -	n n N	- - - -	- - - -
CFI68	- - - -	N N N	- - - -	N N N	- - - -	- - - -
JOK63	- - - -	- - -	- - - -	N N N	- - n n	- - - -
SA113	N N N N	- n N	- - - -	N N N	- - - -	- n n n
3	- - - -	- - -	- - - -	N N N	- - - -	- N N N
4	- - - -	- - n	- - - -	- N N	N N N N	- - - n
6	- - - -	- - -	- - - -	- n n	- - - -	- - - -
7	- - - -	- n n	- - - -	N N N	- - - -	- - n N
8	- - - -	- n -	- - - -	- N	- - - -	- - - -
9	- - - -	- - n	- - - -	n N N	- - - -	- - - -
10	- - - -	- - -	- - - -	- - -	- - - -	- - - -
11	- - - -	- - -	- - N	- - -	- - - -	- - - -
12	- - - -	- - -	- - - -	n N N	- - - -	- - - -
13	- - - -	- n -	- - - -	N N N	- - - -	n n n n
14	- - - -	- - -	- - n n	n N N	- - - -	- n n N
15	- - - -	N N N	- - - -	n N N	- - - -	- n n n
16	- - - -	- - -	- - - -	- - n	- - - -	- - - -
17	- - n n	n n n	- - n n	N N N	- - - -	- n n N
18	n N N N	- - n	- - - -	- N N	- - - -	- - - -
19	- - - -	n - n	- - - -	- n n	- - - -	- - - -
20	- - - -	- - -	- - - -	- - N	N N N N	- - - -
21	- - - -	N N N	- - - -	- n N	- - - -	- - - -
22	- - - -	- - -	- - - -	- n n	- - - -	- - - -
23	- - - -	N N N	- - - n	N N N	- - n N	- n n N
24	- - - -	n n N	- - - -	- - -	- - - -	- - - n
25	- - - -	- - -	- - - -	- - n	- - - n	- - - -
27	- - - -	- - -	N N N N	- - n	- - - -	- - - -
28	- - - -	- n n	- - - -	N N N	- - - -	- - - -
29	- - - -	- - -	- - - -	- - -	- - - -	- - - -
30	- - - -	n n N	- - - -	N N N	- - - -	- - - -
34	- - - -	- - -	- - - -	- - N	- - - -	- - - -
36	- - - -	- - -	- - - -	- n N	- - - -	- - - -
38	- - - -	- - -	- - - -	- - -	- - - -	- - - -
39	- - - -	- - -	- - - -	- - -	- - - -	- - - -
41	- - - -	- - -	- - - -	- n N	- - - -	- - - -
42	- - - -	- - -	- - - -	n n N	- - - -	- - - -
47	- - - -	n n n	- - - -	- n N	- - - -	- - - -
48	- - - -	n n N	- - - -	N N N	- - - n	- - - -
49	- - - -	- n n	- - - -	N N N	- - - n	- - - -
50	- - - -	N N N	- - - -	N N N	N N N N	- - n N
51	- - - -	N N N	- - - -	- - n	- - - -	- - - -
52	- - - -	- - -	- - - -	N N N	- - - -	- - - -
53	- - - -	n N N	- - - -	n n N	- - - -	- - - n
54	- - - -	- - n	- - - -	- n N	- - - -	N N N N
55	- - - -	N N N	- - - -	- N N	- - - -	- - - -
56	- - n N	n n N	- - - -	N N N	- - - -	- - - n

* 2.5, 5, 10, 20 antibody units used in SN

N= 8/8 wells protected

n= 4-7/8 wells protected

- = 0-3/8 wells protected

blank= insufficient serum/not done

[00108] The cross-neutralization data is summarized in TABLE 1-5. Each data point represents eight replicate wells assayed. "N", "n", or "-" represent the proportion of protected to unprotected wells, which is an indication of the extent of cross-neutralization. The serum neutralization results corresponding to each monospecific serum tested against its homologous

virus are highlighted in the TABLE. These sera should neutralize completely; for the most part they do. The few exceptions, most notably JOK63, JOK92 and 11, show complete neutralization at higher AU values, but not at 2.5 AU. This is likely due to dilution errors. The most significant result from this data set is the high degree of cross-neutralization exhibited by sera FCV-21 and FCV-49, particularly the latter. The patterns of cross-neutralization of these sera appear to be similar to that of F9. (It should be noted that the data set for F9, and for FCV-21 and FCV-49 at 20 AU, is incomplete due to insufficient amounts of sera.) Although there are some differences in neutralization patterns between the three sera (FCV-21, FCV-49, and F9), isolates 11, 38 and 39 were consistently not neutralized by any of the three.

EXAMPLE 1-10. CROSS NEUTRALIZATION ANALYSIS OF FCV-21 AND FCV-49 ANTISERA AGAINST FCV VIRUSES ISOLATED IN 2003

[00109] FCV antisera in this study were generated by inoculating 10^5 to 10^6 TCID₅₀/ml of FCV intranasally into cats (4-5 cats/group). A booster inoculation was carried out 3 weeks later using the same amount of virus. Sera were collected 2 weeks post-boost and heat treated at 56°C for 30 minutes.

[00110] Serum samples from each of the vaccinated cats were used in the serum neutralization assay against each of 26 FCV strains (TABLE 1-6). Serum samples were diluted at 1:8 and followed by 2-fold serial dilutions out to 1:16384 (12 dilutions total) in 600 μ l volume. FCV with titer range between 50-500 TCID₅₀/ml in 600 μ l were mixed with diluted serum samples together and incubated at room temperature for 45 min. Then 200 μ l of sample was transferred into each well of 96-well plates seeded with CRFK cells in quadruplicate. The plates were incubated at 37°C, 5 % CO₂ for 6 days and end point neutralization titer was determined. Both serum neutralization (SN) titer and challenge virus back-titer were calculated by the method of Spearman-Kärber (Spearman C, 1908, Brit J Psychol 2:227-242; Karber G, 1931, Arch exp Path Pharmac 162: 480-487).

[00111] Serum neutralization data were analyzed with cut-off titers of >23 and >15 and >10. The results are shown in TABLE 1-7. The data suggest that FCV-21, FCV-49 and FCV 26391-4 have broader cross neutralization profiles, and are therefore better vaccine candidates than the current FCV vaccine strain, F9.

TABLE 1-6. 26 FCV STRAINS USED IN THE CROSS NEUTRALIZATION STUDIES

Strain	Year	Location
12217-02	2002	NY
19306	2003	FL
26391-4	2003	FL
27086-2	2003	FL
32561-1	2003	IN
32561-14	2003	IN
32561-15	2003	IN
32561-7	2003	IN
36069-2	2003	MT
84883-02	2002	NY
F9	1960	Not Known
J-1	1984	CT
H	1990	AZ
2280	1983	Not Known
255NVSL	1970	Not Known
94580	2000	NY
100869-1	2000	Ontario
33585	2000	MA
88287	2000	PA
89391	2000	PA
101920-1	2002	NY
17932-17	2003	RI
30101-2	2003	MT
41927-8	2003	CO
FCV-21	1993	MI
FCV-49	1993	PA

TABLE 1-7. CROSS-NEUTRALIZATION ANALYSIS OF FCV-21, FCV-49, AND FCV 26391-4 IN COMPARISON WITH F9

A.		Candidate over F9
	% (SN titer >23)	% Increase (IN)
FCV-21 IN	43.9	68.9
FCV-49 IN	33.9	30.4
FCV 26391-4 IN	28.9	11.2
F9 IN	26	

B.		Candidate over F9
	% (SN titer >15)	% Increase (IN)
FCV-21 IN	51.5	62.5
FCV-49 IN	37.7	18.9
FCV 26391-4 IN	39.4	24.3
F9 IN	31.7	

C.		Candidate over F9
	% (SN titer >10)	% Increase (IN)
FCV-21 IN	74.6	36.1
FCV-49 IN	63.1	15.2
FCV 26391-4 IN	63.5	15.9
F9 IN	54.8	

EXAMPLE 1-11. MORTALITY AND CLINICAL SCORES FOR CATS VACCINATED WITH FELOCELL 4 COMPONENTS WITH AND WITHOUT FCV-21.

[00112] Domestic shorthair cats, about 8 weeks of age, were vaccinated with FELOCELL® 4 components which contain modified-live feline rhinotracheitis virus [FHV], calicivirus [FCV-F9], panleukopenia virus [FP] and *Chlamydia psittaci*, with or without another FCV strain, FCV-21. The vaccination regimens evaluated included: an initial subcutaneous vaccination followed by subcutaneous boosts on days 21 (SQ/SQ); an initial subcutaneous vaccination followed by one oral booster immunizations on day 21 (SQ/Oral); or an initial oral vaccination followed by a second oral vaccination on day 21. Oral vaccination was achieved by administration of the vaccine into the mouth. On day 42, all cats were challenged with approximately 1 mL of virulent systemic FCV-33585 (3 log of TCID₅₀/mL). All cats were monitored for clinical signs (temperature, conjunctivitis serous discharge, conjunctivitis mucopurulent discharge, rhinitis serous discharge, rhinitis mucopurulent discharge, sneezing, audible rales, coughing open mouth breathing, anorexia, dehydration, one oral ulcer < 4 mm, multiple oral ulcers, oral ulcers > 4 mm, salivating, nonbleeding external ulcer, bleeding external

ulcers) of disease for 14 days post-challenge. Cats exhibiting severe clinical signs post-challenge that were consistent with calicivirus pathogenesis were euthanized.

[00113] As shown in TABLE 1-8, the addition of the new strain FCV-21 significantly increases the efficacy of FELOCELL 4, with or without the presence of FCV-F9. Both SQ/SQ vaccination and SQ/Oral vaccination seem to be efficacious for preventing FCV infection. Moreover, we have demonstrated efficacy against FCV infection even with Oral/Oral vaccination with addition of FCV-21 and absence of F9 in FELOCELL 4 and FELOCELL 3 (FELOCELL 3 is FELOCELL 4 without *Chlamydia psittaci*).

[00114] For TABLE 1-9, the vaccination regimens evaluated included an initial subcutaneous vaccination followed by two oral booster immunizations on day 21 and day 42 (SQ/Oral/Oral). We have demonstrated that the addition of FCV-21, with or without FCV-F9 in FELOCELL 4, significantly decreased both mortality and clinical scores.

TABLE 1-8											
Treatment	Vaccination				Challenge				Clinical Score		
	# animals	Days	Dose	Route	Days	FCV strain	# animals	Mortality	Median	Minimum	Maximum
Neg. control	10	0	1 ml	SQ	42	33585	9	78%	24	2	35
		21	1 ml	SQ							
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	33585	9	44%	12	3	18
		21	1 ml	SQ							
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	2.5	0	11
		21	1 ml	SQ							
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	1.5	0	13
		21	1 ml	SQ							
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	10%	5.5	0	30
		21	1 ml	Oral							
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	3.5	0	13
		21	1 ml	Oral							
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	10%	5	1	22
		21	1 ml	Oral							
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral	42	33585	10	0%	3	0	10
		21	1 ml	Oral							
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	2	0	8
		21	1 ml	SQ							
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	4	0	10
		21	1 ml	Oral							
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral	42	33585	10	0%	5	1	18
		21	1 ml	Oral							

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 without FCV-F9, but with FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 without FCV-F9, but with FCV-21

TABLE 1-9												
Group	Treatment	Vaccination				Challenge				Clinical Score		
		# animals	Days	Dose	Route	Days	FCV strain	# animals	Mortality	Median	Minimum	Maximum
T01	Neg. control	10	0	1 ml	SQ	63	33585	10	100%	25	21	31
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T02	Felocell 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	63	33585	10	0%	5.5	0	17
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T03	Felocell 4A*+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	63	33585	9	0%	4	0	10
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T04	Felocell 4	10	0	1 ml	SQ	63	33585	10	30%	10.5	1	30
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						

*Felocell 4A: Felocell 4 without FCV-F9

**Felocell 3A: Felocell 3 without FCV-F9

EXAMPLE 1-12. CROSS NEUTRALIZATION ANALYSIS OF SERA FROM CATS VACCINATED WITH FELOCELL 4 COMPONENTS WITH AND WITHOUT FCV-21

[00115] Serum samples from each cat in the study described in EXAMPLE 1-11, were collected following the second vaccination, but before 85 challenge. The samples were heat treated at 56°C for 30 minutes, and evaluated in the serum neutralization assay against each of 26 FCV strains as previously described in EXAMPLE 1-10 (TABLE 1-6).

[00116] Serum neutralization data were analyzed with cut-off titers of >23 and >15, and an average of the two cut-off titers was calculated (Ave). The results are shown in TABLE 1-10. The data indicate that all of the vaccine formulations containing FCV-21 had broader cross neutralization profiles than the vaccines containing the traditional FCV-F9 strain (~60% vs. 40%). This resulted in an approximate 50% increase in the number of the FCV strains neutralized.

TABLE 1-10									
Treatment	# animals	Vaccination			Serum Collection		Cross Neutralization		
		Days	Dose	Route	Days	# animals	% (>23)	% (>15)	% (Ave)
Neg. control	10	0	1 ml	SQ	42	9	10.8	13.9	12.4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	9	38.5	42.3	40.4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	10	58.9	64.6	61.8
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	56.5	62.3	59.4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	10	39.2	42.7	41.0
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	56.2	60	58.1
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	10	49.6	59.2	54.4
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral	42	10	51.2	54.6	52.9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	53.9	62.7	58.3
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	55.8	63.9	59.9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral	42	10	60.8	68.1	64.5
		21	1 ml	Oral					

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 without FCV-F9, but with FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 without FCV-F9, but with FCV-21

[00117] As also shown in TABLE 1-10, the addition of the new strain FCV-21 significantly increased the cross neutralization profile of FELOCELL 4, with or without the presence of FCV-F9. Broader cross neutralization profiles were observed with both SQ/SQ vaccination and SQ/Oral vaccination. Moreover, we have demonstrated enhanced cross neutralization profiles with Oral/Oral vaccination with the presence of FCV-21, but not F9, in FELOCELL 4 and FELOCELL 3.

[00118] In TABLE 1-11, the vaccination regimens evaluated included an initial subcutaneous vaccination followed by two oral booster immunizations on day 21 and day 42 (SQ/Oral/Oral). The results indicate that the addition of FCV-21, with or without FCV-F9 in FELOCELL 4, resulted in significantly broader cross neutralization profiles (approximate 40% increase).

TABLE 1-11										
Treatment	Vaccination					Serum Collection		Cross Neutralization		
	# Animals	Days	Date	Dose	Route	Days	# Animals	% (>23)	% (>15)	% (Ave)
Neg. control	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	5.8	10.4	8.1
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	72.5	77.1	74.8
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	9	72.5	76.7	74.6
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	49.6	57.9	53.8
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					

* FELOCELL 4A: FELOCELL 4 without FCV-F9, but with FCV-21

[00119] **Numbered description of the invention.** Additional description of the inventions and examples. 1. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein. 2. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein wherein said capsid protein comprises protein sequence (SEQ ID 13) and sequences having at least about 91.2%, 95% and 99% identity; wherein said capsid protein is provided in an effective amount to produce an immune response, and a pharmaceutically acceptable carrier. 3. A DNA vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein wherein said DNA

comprises a sequence (*SEQ. ID 12*) and sequences having at least about 78.7%, and 79.2% sequence identity and allowing for conservative substitutions. 4. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-49 capsid protein or an isolated FCV-49 capsid protein wherein said capsid protein comprises a protein sequence from strain FCV-49. 5. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising an FCV-49 capsid protein, or an isolated FCV-49 capsid protein, wherein said capsid protein comprises protein sequence (*SEQ ID 15*) and sequences having at least about 92.7%, 95% and 99% identity; wherein said capsid protein is provided in an effective amount to produce an immune response, and a pharmaceutically acceptable carrier. 6. A DNA vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-49 capsid protein or an isolated FCV-49 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (*SEQ. ID 14*) and sequences having at least about 78.9%, i.e. 79.4% (78.9 + 0.5) sequence identity and allowing for conservative substitutions. 7. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-26391-4 capsid protein, or an isolated FCV-26391-4 capsid protein, wherein said capsid protein comprises protein sequences from strain FCV-26391-4. 8. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising an FCV-26391-4 capsid protein wherein said capsid protein comprises protein sequence (*SEQ ID 17*) and sequences having at least about 91.8%, 95% and 99% identity wherein said capsid protein is provided in an effective amount to produce an immune response, and a pharmaceutically acceptable carrier. 9. A DNA vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-26391-4 capsid protein or an isolated FCV-26391-4 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (*SEQ. ID 16*) and sequences having at least about 78.4%, i.e. 78.9% (78.4 + 0.5) sequence identity. 10. The vaccine of any of claims 1-3 wherein the polynucleotide is selected from the group consisting essentially of *SEQ ID NOS. 12, 14, 16*. 11. The vaccine of any of claim 1-3, further comprising either alone or in any combination the following: where it contains an adjuvant, wherein the FCV component is live, wherein the FCV component is attenuated, wherein the FCV component is inactivated, which may include at least one other feline calicivirus strain selected from the group consisting of FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255, and FCV-2280. 12. The vaccine of claims, 1, 4, and 7, wherein the vaccine includes at least one other feline pathogen, selected from the group consisting of feline herpesvirus, feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, *Chlamydia psittaci*, and feline parvovirus, rabies virus and Bordetella bronchiseptica. 13. A vaccine to immunize cats against feline calicivirus which comprises a nucleotide sequence of a FCV capsid protein selected from the group consisting of a polypeptide having 93% or greater identity with *SEQ ID NO.13, 15, or*

17, wherein the FCV isolate is not strain 213-95, and wherein the nucleic acid sequence is operably linked to a heterologous promoter sequence, in an effective amount to produce an immune response, and a pharmaceutically acceptable carrier. 14. The vaccine of claim 13 wherein the nucleotide sequence is selected from the group consisting essentially of SEQ ID NOS. 12, 14 and 16. 15. The vaccine of claim 13, wherein the nucleotide sequence is in any of the following: a plasmid, a recombinant virus vector. 16. The vaccine of claim 13, wherein the recombinant virus vector is selected from the group consisting of feline herpesvirus, raccoon poxvirus, canary poxvirus, adenovirus, Semliki Forest virus, Sindbis virus, and vaccinia virus. 17. An immunogenic composition comprising a veterinarily acceptable vehicle of excipient and an isolated strain of FCV that binds to a monoclonal antibody selected from the monoclonal antibodies described herein as 23, 26, 41, 44 and 56. 18. An immunogenic composition comprising a veterinarily acceptable vehicle of excipient and an isolated strain of FCV that *selectively* binds to a monoclonal antibody selected from the monoclonal antibodies described herein as 23, 26, 41, 44 and 56. 19. The immunogenic compositions of claim 17 and 18 wherein the FCV strain is inactivated, where said FCV strain is a vaccine, and where the composition comprises an adjuvant. 20. A method for immunizing a cat against feline calicivirus comprising: administering to the cat an effective dose of a vaccine of any of claims 1-14, wherein the vaccine additionally comprises an adjuvant.

PART 2

THIS SECTION BELOW PROVIDES DETAILED INFORMATION ABOUT METHODS OF IMMUNIZING ANIMALS AGAINST VIRUS AND IN PARTICULAR CATS AGAINST CALICIVIRUS

[00120] Unless otherwise indicated, the disclosures below use the definitions provided above and below.

[00121] Described herein are methods and materials for treating and immunizing animals with vaccine and in particular cats against feline calicivirus (FCV). The method includes administering to the cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines that are capable of inducing an immune response, and in particular in the cat against FCV. The first vaccine is typically administered parenterally, but in some situations may be administered orally, while the second vaccine is administered orally or oronasally *N* days following administration of the first vaccine. These vaccines are typically administered parenterally first because they typically cause oral lesions if initially administered orally. Surprisingly, here we

disclose strains FCV-21, FCV-49 and FCV 26391-4 that are so safe and effective they may be administered as a first oral administration followed by a second oral administration. Here, N is an integer from 3 to 120, inclusive, but is typically an integer from 7 to 42, inclusive, or from 14 to 28, inclusive, preferred is about 3 weeks and also about 2-4 weeks. Alternatively, the second vaccine may be administered after the cat has developed an FCV serum neutralization titer of about 1:6, 1:9, 1:12, 1:15, 1:18, or greater.

[00122] The method may also include one or more additional parenteral, oral or oronasal administrations of an FCV vaccine M days following administration of the first vaccine or the second vaccine, where M is an integer from 1 to 120, inclusive. Thus, representative vaccination regimens include (1) subcutaneous administration of a first FCV vaccine, followed by oral administration of a second FCV vaccine; (2) successive subcutaneous administrations of first and third FCV vaccines, followed by oral administration of a second FCV vaccine; and (3) subcutaneous administration of a first FCV vaccine, followed by successive oral administrations of second and third FCV vaccines.

[00123] As described above, the first vaccine is administered parenterally (e.g., subcutaneously), the second vaccine is administered orally or oronasally, and an optional third vaccine may be administered parenterally, orally or oronasally. Any device may be used to administer the vaccines, including syringes, droppers, needleless injection devices, and the like. For oronasal administration, a syringe fitted with a cannula may be used to place drops of the vaccine in the cat's nose and mouth.

[00124] The method may employ any vaccine that is capable of inducing an immune response in the cat against FCV, as long as the first vaccine is adapted to be administered parenterally and the second vaccine is adapted to be administered orally or oronasally. As noted above, the optional third vaccine is adapted to be administered parenterally, perorally, or oronasally. The first, second, and optional third vaccines may be the same or different and each comprises, independently, an antigen or antigens derived from one or more strains of FCV. Useful vaccines thus include live virus vaccines, modified-live virus vaccines, and inactivated virus vaccines. Live and modified-live FCV vaccines contain FCV strains that do not cause disease in cats and have been isolated in non-virulent form or have been attenuated using well-known methods, including serial passage in a suitable cell line or exposure to ultraviolet light or a chemical mutagen. Inactivated or killed FCV vaccines contain FCV strains which have been inactivated by known methods, including treatment with formalin, betapropiolactone, binary

ethyleneimine, and the like. Exemplary vaccines include those containing non-virulent strains selected from FCV-F9, FCV-M8, FCV-255, FCV-2280, FCV-21, FCV-49, FCV 26391-4, etc., either alone or in combination.

[00125] Other useful vaccines derived from one or more strains of FCV include recombinant vaccines and DNA vaccines (i.e., subunit vaccines). Recombinant vaccines include recombinant virus vectors, each containing a nucleic acid which encodes an antigen derived from a strain of FCV. Such vectors may be prepared by inserting a cDNA that encodes an antigen derived from an FCV strain (e.g., a capsid protein) into the genome of a non-virulent virus, including strains of herpesvirus, poxvirus, adenovirus, and the like. For virus vectors, the cDNA is operably linked to a eukaryote transcription promoter at the 5' end of the antigen encoding sequence and is operably linked to a eukaryote termination signal and poly(A) signal at the 3' end of the antigen encoding sequence, so that the transcription promoter and termination sequences regulate expression of the antigen. Useful transcription promoters include Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter (RSV-LTR), Cytomegalovirus (CMV) major immediate-early promoter, simian vacuolating virus 40 (SV40) T antigen promoter, and inducible promoters, such as metallothionein promoter. For a discussion of recombinant FCV vaccines, see U.S. Patent No. 5,716,822 to Wardley et al., which is herein incorporated by reference in its entirety.

[00126] DNA vaccines include DNA molecules (e.g., plasmids) having a nucleic acid sequence that encodes an FCV antigen, such as an FCV capsid protein or a specific immunogenic fragment thereof, which elicits an immune response in the cat against FCV. The nucleic acid coding sequence is operably linked to a transcriptional promoter that enables expression of the DNA when it is inoculated into the cells of the cat. Useful promoters include the RSV-LTR promoter, the CMV major immediate-early promoter, and the SV40 T antigen promoter. Additionally, the nucleic acid may be operably linked, at or near the termination codon of the sequence encoding the FCV antigen, to a nucleic acid fragment comprising a transcription termination signal and poly(A) recognition signal. For a discussion of DNA vaccines, see U.S. Patent No. 5,580,859, U.S. Patent No. 5,589,466, and U.S. Patent No. 5,703,055, to Felgner et al.

[00127] Other useful vaccines include those containing one or more subunit antigens, such as an FCV capsid protein or an immunogenic fragment of the capsid protein, which has been isolated and purified. The subunit antigen may be produced in a recombinant expression vector that produces the antigen in vitro using methods described above. The resultant antigen is

subsequently isolated and purified. Useful expression vectors include various microorganisms, including bacteria, yeast and fungi, as well as eukaryotes, such as mammalian and insect cells. Other useful expression vectors include viruses, such as adenoviruses, poxviruses, herpesviruses, Semliki Forest viruses, baculoviruses, bacteriophages, Sindbis viruses, Sendai virus, and the like. Expression of the FCV subunit antigen in a microorganism permits production of the antigenic protein using commercial-scale fermentation technologies. Various methods may be used to isolate and purify the antigens, including gel filtration, affinity chromatography, ion exchange chromatography, centrifugation, and the like.

[00128] One or more of the vaccines may also contain antigens for immunizing cats against one or more pathogens besides FCV, including feline herpesvirus, feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, feline panleukopenia virus, and feline Chlamydia.

[00129] Other components of vaccines may include pharmaceutically acceptable excipients, including carriers, solvents, and diluents, isotonic agents, buffering agents, stabilizers, preservatives, immunomodulatory agents (e.g., interleukins, interferons, and other cytokines), vaso-constrictive agents, antibacterial agents, antifungal agents, and the like. Typical carriers, solvents, and diluents include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Representative isotonic agents include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, lactose, and the like. Useful stabilizers include gelatin, albumin, and the like.

[00130] The vaccines may also include one or more adjuvants which increase the immune response to the antigen. Representative adjuvants include oil-based adjuvants, such as Freund's Complete Adjuvant and Freund's Incomplete Adjuvant, mycolate-based adjuvants (e.g., trehalose dimycolate), bacterial lipopolysaccharides, peptidoglycans (i.e., mureins, mucopeptides, or glycoproteins such as N-Opaca, muramyl dipeptide or analogs thereof), proteoglycans (e.g., extracted from *Klebsiella pneumoniae*), streptococcal preparations (e.g., OK432), BIOSTIM® (e.g., 01K2), Iscoms (e.g., see European Patent Application Nos. EP 109942, EP 180564 and EP 231039), aluminum hydroxide, saponin, diethylaminoethyl-dextran, neutral oils (e.g., miglyol), vegetable oils (e.g., arachis oil), liposomes, PLURONIC® polyols. Other adjuvants include the RIBI adjuvant system, alum, aluminum hydroxide gel, cholesterol, oil-in-water emulsions, water-in-oil emulsions, block co-polymer (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), AMPHIGEN® adjuvant, saponin, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) or other saponin fractions, monophosphoryl lipid A, Avridine lipid-amine

adjuvant, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* (recombinant or otherwise), cholera toxin, or muramyl dipeptide, among others.

[00131] Dose sizes of the FCV vaccines typically range from about 1 mL to about 2 mL, inclusive. Each dose contains a therapeutically effective amount of the FCV antigen or antigens that may vary depending on the age and general condition of the cat, the route of administration, the nature of the FCV antigen, and other factors. For vaccines containing modified live viruses or attenuated viruses, a therapeutically effective dose generally ranges from about 10^6 TCID₅₀ to about 10^8 TCID₅₀, inclusive. For vaccines containing subunit antigens, such as FCV capsid proteins, a therapeutically effective dose generally ranges from about 10 µg to about 100 µg, inclusive. The other components of the vaccines may be adjusted to modify the physical and chemical properties of the vaccines. For example, adjuvants typically comprises from about 25 µg to about 1000 µg, inclusive, of a 1 mL dose. Similarly, antibiotics typically comprise from about 1 µg to about 60 µg, inclusive, of a 1 mL dose.

[00132] The FCV vaccines are provided in various forms depending on the route of administration, storage requirements, and the like. For example, the vaccines can be prepared as aqueous solutions or dispersions suitable for use in syringes, droppers, etc. or can be prepared as lyophilized powders, which are reconstituted in saline, HEPES buffer, and the like, prior to use.

PART 2 EXAMPLES AND TABLES

[00133] The following examples are intended to be illustrative and non-limiting, and represent a few specific embodiments of the present invention.

EXAMPLE 2-1. SUBCUTANEOUS/ORAL VACCINATION REGIMEN WITH FELOCELL® 4 AND FEL-O-VAX®

[00134] Domestic shorthair cats, 4-5 months of age, were vaccinated with FELOCELL® 4 (Pfizer Inc.; modified-live feline rhinotracheitis virus [FHV], calicivirus [FCV], panleukopenia virus [FP] and *Chlamydia psittaci*), with FEL-O-VAX® (Fort Dodge; killed FHV, FCV, FP, and *C. psittaci*), or with sterile diluent (control group). The vaccination regimens evaluated included: an initial subcutaneous vaccination followed by subcutaneous boosts on days 21 and 42 (SQ/SQ/SQ); an initial subcutaneous vaccination followed by two oral booster immunizations on days 21 and 42 (SQ/Oral/Oral); or an initial subcutaneous vaccination followed by a second subcutaneous vaccination on day 21, and an oral boost on day 42. All doses were 1 mL. Oral vaccination was achieved by administration of the vaccine into the

mouth. On day 99, all cats were challenged with approximately 3.5 mL of virulent systemic FCV-33585 (4.8 log of TCID₅₀/mL). The challenge was performed by administering approximately 3 mL of the dose in canned cat food, and 0.05 mL via nasal instillation. All cats were monitored for clinical signs of disease for 14 days post-challenge. Cats exhibiting severe clinical signs post-challenge that were consistent with calicivirus pathogenesis were euthanized.

[00135] As shown in TABLE 2-1, the group vaccinated via the SQ/Oral/Oral regimen had a mortality rate of only 10%, while the control group had a mortality rate of 90%. The group vaccinated via the SQ/SQ/SQ regimen had a mortality rate of 50%, while the group vaccinated via the SQ/SQ/Oral regimen had mortality rate of 20%. These results suggest that SQ vaccination followed by an Oral boost significantly enhances the effectiveness of FELOCELL® 4 vaccination against virulent FCV challenge. Not only did mortality rates decrease from 50% (SQ/SQ/SQ) to 10% (SQ/Oral/Oral) or 20% (SQ/SQ/Oral) when oral vaccination was a part of the regimen, but as shown in TABLE 2-2, the severity of clinical signs such as skin lesions (SL), inappetence (IA), depression (DP), oral ulcers (OU), lameness (LN), sneezing (SZ), nasal discharge (ND) and watery eyes (WE), decreased as well.

TABLE 2-1. MORTALITY OF CATS CHALLENGED WITH VIRULENT FCV-33585 FOLLOWING VACCINATION (EXAMPLE 2-1)

TABLE 2-1					
Group	Treatment	Vaccination		Challenge	
		# Animals	Route	# Animals	Mortality, %
T1	Control	10	SQ/SQ/SQ	10	90
T2	FELOCELL® 4	5	SQ/SQ/SQ	4	50
T3	FELOCELL® 4	10	SQ/SQ/Oral	10	20
T4	FELOCELL® 4	10	SQ/Oral/Oral	10	10
T5	FEL-O-VAX®	5	SQ/SQ/SQ	5	60

TABLE 2-2. CLINICAL SYMPTOMS (% OF ANIMALS) FOLLOWING VACCINATION AND SUBSEQUENT FCV-33585 CHALLENGE (EXAMPLE 2-1)

TABLE 2-2									
Group	Route	SL	IA	EP	OU	LN	SZ	ND	WE
T1	SQ/SQ/SQ	50	100	100	70	100	30	90	70
T2	SQ/SQ/SQ	100	100	100	100	100	25	100	25
T3	SQ/SQ/Oral	70	70	50	60	70	20	30	10
T4	SQ/Oral/Oral	10	40	20	40	50	10	30	0
T5	SQ/SQ/SQ	40	80	60	60	60	40	60	20

EXAMPLE 2-2. MEAN FCV SERUM NEUTRALIZATION TITERS FOLLOWING SQ/ORAL VACCINATION

[00136] Blood samples taken from the cats of **EXAMPLE 2-1** were collected on study days 0, 21, 42, 63, 98 and 113, and evaluated in a serum neutralization (SN) assay for their capacity to neutralize FCV. Serum samples were diluted 1:8, followed by 2-fold serial dilutions out to 1:16384 (12 dilutions total) in 600 μ L volumes. Feline caliciviruses with a titer of 50-500 TCID₅₀/mL in 600 μ L were mixed with the diluted serum samples and incubated at room temperature for 45 min. Then 200 μ L of each diluted sample was transferred into separate wells of 96-well plates seeded with Crandell Feline Kidney (CrFK) cells in quadruplicate. The plates were incubated at 37°C, under 5% CO₂ for 6 days at which time end point neutralization titers were determined. Both the serum neutralization (SN) titer and the challenge virus back-titer were calculated using the method of Spearman-Kärber See, C. Spearman, *Brit. J. Psychol.* 2:227-242 (1908) and G. Karber, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 162:480-487 (1931). As shown in **TABLE 2-3**, FELOCELL® 4 administered via the SQ/Oral/Oral or SQ/SQ/Oral vaccination regimens had significantly higher FCV SN titers. These data correlate with the significant reduction in mortality rates described in **EXAMPLE 2-1**

TABLE 2-3. MEAN FCV SN (SERUM NEUTRALIZATION) TITERS AT VARIOUS STUDY DAYS (EXAMPLE 2-2)

TABLE 2-3								
Group	Vaccination Route	Mean FCV SN Titers*						# Animals Day 113
		0	21	42	63	98	113	
T1	SQ/SQ/SQ	3	2	4	3	4	7340	1
T2	SQ/SQ/SQ	3	18	17	24	29	5986	2
T3	SQ/SQ/Oral	3	27	36	310	1032	5783	8
T4	SQ/Oral/Oral	3	18	431	877	1980	5787	9
T5	SQ/SQ/SQ	4	3	6	8	15	3563	2

*Measured on day 0, day 21, day 42, day 63, day 98, and day 133 post-vaccination.

EXAMPLE 2-3. EFFECTIVENESS OF SQ/ORAL ADMINISTRATION OF FELOCELL® 4 AND FEL-O-VAX® AGAINST FELINE PANLEUKOPENIA VIRUS

[00137] Serum samples from the cats of **EXAMPLE 2-1** were also assayed for their mean FP titers. As shown in **TABLE 2-4**, all of the cats were seronegative at the beginning of the study. Subsequently, the mean titers of the control group remained at 1 for the duration of the sampling intervals (days 21 and 42). However, the mean titers of the other four vaccination groups increased significantly.

TABLE 2-4. MEAN SERUM ANTIBODY TITERS TO FELINE PANLEUKOPENIA VIRUS (EXAMPLE 2-3)

TABLE 2-4				
Group	Vaccination Route	Mean Serum FP Titer*		
		0	21	42
T1	SQ/SQ/SQ	1	1	1
T2	SQ/SQ/SQ	1	5782	5782
T3	SQ/SQ/Oral	1	5595	5793
T4	SQ/Oral/Oral	1	5499	5693
T5	SQ/SQ/SQ	1	2360	4887

*Measured on day 0, day 21, and day 42 post-vaccination.

EXAMPLE 2-4. CLINICAL SYMPTOMS FOR CATS VACCINATED WITH FELOCELL® 4 BY VARIOUS ROUTES OF ADMINISTRATION

[00138] Oronasal (ON) administration of FELOCELL® 4 was achieved by instillation of drops into the nares of the animal. As indicated in TABLE 2-5, groups of 10 cats (T1, T2, T3), 6-7 months of age, were vaccinated and boosted on day 21 according to the regimens shown in TABLE 2-5: subcutaneous vaccination and boost (SQ/SQ); subcutaneous vaccination and oronasal booster (SQ/ON); or oronasal vaccination and boost (ON/ON). Vaccine was subcutaneously administered on the right side of the neck (1 mL); oronasal administration was by delivery of 0.5 mL of vaccine into each nare. Beginning on day 1, all cats were observed daily for general health conditions.

TABLE 2-5. CLINICAL SYMPTOMS FOR CATS VACCINATED WITH FELOCELL® 4 VIA DIFFERENT ROUTES OF ADMINISTRATION (EXAMPLE 2-4)

TABLE 2-5							
Group	Vaccination Route	Clinical symptoms, %					
		NU	OU	SZ	ND	WE	IA
T1	SQ/SQ	0	0	0	0	0	50
T2	SQ/ON	0	0	20	0	0	20
T3	ON/ON	10	30	90	50	60	20

[00139] As shown in TABLE 2-5, cats receiving both vaccinations oronasally had high levels of clinical symptoms, including nasal ulcers (NU), oral ulcers (OU), persistent sneezing (SZ), nasal discharge (ND), watery eyes (WE) and transient inappetence (IA). Cats vaccinated via the SQ/ON regimen, however, displayed fewer clinical symptoms than ON/ON-vaccinated cats, with no indication of nasal ulcers, oral ulcers, nasal discharge, or watery eyes. Also, subjects in the SQ/ON group exhibited less sneezing than cats in the ON/ON group. The safety profile of the SQ/ON group was similar to that of the SQ/SQ group.

EXAMPLE 2-5. THE EFFECT OF DIFFERENT VACCINATION ROUTES ON SEROLOGICAL RESPONSES TO FELOCELL® 4 ANTIGENS

[00140] Serum samples from cats enrolled in the study described in EXAMPLE 2-4 were assayed for serological reactivity to various viral antigens present in the FELOCELL® 4 vaccine. Mean serum neutralization antibody titers to FCV, FHV and FP were determined for study days 0, 21 and 42. As shown in TABLE 2-6, all three vaccination regimens resulted in a strong immune response to FP. The immune response to FHV was barely detectable due to difficulties with the assay. However, serum neutralization titers against FCV were significantly higher in the ON/ON and SQ/ON groups, as compared to the SQ/SQ group. These results suggest that cats in the ON/ON and SQ/ON groups would be protected against a virulent FCV challenge, but that the SQ/SQ group may not be.

TABLE 2-6. SEROLOGICAL RESPONSES OF CATS VACCINATED WITH FELOCELL® 4 VIA DIFFERENT ROUTES (EXAMPLE 2-5)

TABLE 2-6										
Group	Vacc'n Route	FCV Titer*			FHV Titer*			FP Titer*		
		0	21	42	0	21	42	0	21	42
T1	SQ/SQ	3	4	7	3	3	3	3	10884	10441
T2	SQ/ON	3	14	151	3	3	5	3	11113	11585
T3	ON/ON	3	75	491	3	4	16	3	5333	10960

*Measured on day 0, day 21, and day 42 post-vaccination.

EXAMPLE 2-6. SERUM NEUTRALIZATION TITERS AGAINST FCV-F9 ADMINISTERED VIA A SQ OR ON ROUTE

[00141] Six cats per group were vaccinated with the FCV-F9 antigen present in the FELOCELL® 4 vaccine, either SQ or ON. Three weeks following the initial vaccination, all cats were boosted with the same antigen via the same route as previously. All doses were 1 mL. Serum samples were collected three weeks after the booster immunization. As shown in **TABLE 2-7**, serum neutralization titers were determined for these samples against a panel of 26 FCV strains. The FCV strains chosen for the panel were selected based upon genetic diversity (as determined by the sequence of their capsid hyper-variable region), as well as geographic distribution. In addition, the virulence phenotype of each strain was also considered. Serum samples from cats vaccinated ON with F9 neutralized more FCV strains in the 26 member panel, as compared to samples from SQ-vaccinated cats. Using 23 as the cut-off value for neutralization titers, ON vaccination resulted in titers at or above the cut-off for 26% of the panel members, while SQ vaccination resulted in only 16% meeting the criteria. For a titer cut-off of 15, ON vaccination yielded 32% of panel members at or above the cut-off; SQ yielded only 17%.

TABLE 2-7. SERUM CROSS-NEUTRALIZATION TITERS FOR SERUM GENERATED SQ VS. ON FOR FCV-F9 AGAINST 26 FCV VIRAL PANEL (EXAMPLE 2-6)

TABLE 2-7		
FCV-F9	% Pos. (> 23*)	% Pos. (> 15*)
SQ Inoculation	16	17
ON Inoculation	26	32
ON over SQ (%)	163	188
SQ over ON (%)	62	53

*Neutralization titer ≥ 23 as cut-off value; or neutralization titer of ≥ 15 as cut-off value.

EXAMPLE 2-7. MORTALITY AND CLINICAL SCORES FOR CATS VACCINATED WITH TWO DOSES OF FELOCELL® 4 OR FELOCELL® 3 COMPONENTS AND MODIFIED-LIVE FCV-21.

[00142] Domestic shorthair cats, about 8 weeks of age, were administered vaccines containing modified-live feline rhinotracheitis virus (FHV), panleukopenia virus (FP), *Chlamydia psittaci*, and (1) FCV-F9 (FELOCELL® 4 or FELOCELL® 3), (2) FCV-F9 and FCV-21 (FELOCELL® 4 plus FCV-21, or FELOCELL® 3 plus FCV-21), or (3) FCV-21 (FELOCELL® 4A or FELOCELL® 3A). The vaccination regimens included: an initial subcutaneous vaccination followed by subcutaneous boosts on day 21 (SQ/SQ); an initial subcutaneous vaccination followed by one oral booster immunization on day 21 (SQ/Oral); or an initial oral vaccination followed by a second oral vaccination on day 21 (Oral/Oral). Each cat within the different dosing regimens (groups T1 to T10, 10 cats per group) received 1 mL of vaccine. Oral vaccination was achieved by administration of the vaccine into the mouth. On day 42, all cats were challenged with approximately 1 mL of virulent systemic FCV-33585 (3 log of TCID₅₀/mL). For 14 days post-challenge, all of the cats were monitored for clinical signs of disease, including elevated temperature, conjunctivitis serous discharge, conjunctivitis mucopurulent discharge, rhinitis serous discharge, rhinitis mucopurulent discharge, sneezing, audible rales, coughing, open-mouth breathing, anorexia, dehydration, one oral ulcer < 4 mm, multiple oral ulcers, oral ulcers > 4 mm, salivating, non-bleeding external ulcer, and bleeding external ulcers. Cats exhibiting severe clinical signs post-challenge that were consistent with calicivirus pathogenesis were euthanized.

[00143] As shown in TABLE 2-8, when compared to SQ/SQ vaccination, an SQ/Oral vaccination regimen decreased mortality from 44% to 10% and improved the median clinical score from 12 to 5.5 for cats vaccinated with FELOCELL® 4. Furthermore, adding the FCV-21 strain to FELOCELL® 3 and to FELOCELL® 4 resulted in no post-challenge mortality. Replacing the FCV-F9 strain of FELOCELL® 3 and FELOCELL® 4 with FCV-21 strain resulted in efficacy similar to vaccines containing both FCV-F9 and FCV-21, even for an Oral/Oral vaccination regime.

TABLE 2-8. MORTALITY OF CATS CHALLENGED WITH VIRULENT FCV-33585 FOLLOWING 2-DOSE VACCINATION WITH FELOCELL 3 OR 4, WITH OR WITHOUT FCV-F9 AND/OR FCV-F21 (EXAMPLE 2-7)

TABLE 2-8							
Group	Vaccination		Challenge		Clinical Score		
	Treatment	Route	# Animals	Mortality %	Median	Min.	Max
T1	Control	SQ/SQ	9	78	24	2	35
T2	FELOCELL 4	SQ/SQ	9	44	12	3	38
T3	FELOCELL 4	SQ/Oral	10	10	5.5	0	30
T4	FELOCELL 4 + FCV-21	SQ/SQ	10	0	1.5	0	13
T5	FELOCELL 4 + FCV-21	SQ/Oral	10	0	3.5	0	13
T6	FELOCELL 4A	SQ/SQ	10	0	2.5	0	11
T7	FELOCELL 4A	SQ/Oral	10	10	5	1	22
T8	FELOCELL 4A	Oral/Oral	10	0	3	0	10
T9	FELOCELL 3 + FCV-21	SQ/SQ	10	0	2	0	8
T10	FELOCELL 3 + FCV-21	SQ/Oral	10	0	4	0	10
T11	FELOCELL 3A	Oral/Oral	10	0	5	1	18

FELOCELL 4A: FELOCELL 4 without FCV-F9, but with FCV-21

FELOCELL 3A: FELOCELL 3 without FCV-F9, but with FCV-21

EXAMPLE 2-8. MORTALITY AND CLINICAL SCORES FOR CATS VACCINATED WITH THREE DOSES OF FELOCELL® 4 COMPONENTS AND MODIFIED-LIVE FCV-21

[00144] Domestic shorthair cats, about 8 weeks of age, were administered vaccines containing modified-live feline rhinotracheitis virus (FHV), panleukopenia virus (FP), *Chlamydia psittaci*, and (1) FCV-F9 (FELOCELL® 4), (2) FCV-F9 and FCV-21 (FELOCELL® 4A), or (3) FCV-21 (FELOCELL® 4B). In each case, the cats were administered an initial subcutaneous vaccination followed by successive oral administrations on day 21 and day 42 (SQ/Oral/Oral). Each cat within the different dosing regimens (groups T1 to T4, 10 cats per group) received 1 mL of vaccine. Oral vaccination was achieved by administration of the vaccine into the mouth. On day 63, all cats were challenged with approximately 1 mL of virulent systemic FCV-33585 (3 log of TCID₅₀/mL). For 14 days post-challenge, all of the cats were monitored for clinical signs of disease as in **EXAMPLE 2-7**. Cats exhibiting severe clinical signs post-challenge that were consistent with calicivirus pathogenesis were euthanized. As shown in **TABLE 2-9**, the efficacy of the triple dose regimen, as measured by post-challenge mortality and clinical scores, is comparable to the efficacy of the double dose regimen described in **EXAMPLE 2-7**.

TABLE 2-9. MORTALITY OF CATS CHALLENGED WITH VIRULENT FCV-33585 FOLLOWING 3-DOSE VACCINATION WITH FCV-F9 AND/OR FCV-F21 (EXAMPLE 2-8)

TABLE 2-9							
Group	Vaccination		Challenge		Clinical Score		
	Treatment	Route	# Animals	Mortality	Median	Min.	Max.
T1	Control	SQ/Oral/Oral	10	100%	25	21	31
T2	FELOCELL 4 + FCV-21	SQ/Oral/Oral	10	0%	5.5	0	17
T3	FELOCELL 4A	SQ/Oral/Oral	9	0%	4	0	10
T4	Felocell® 4	SQ/Oral/Oral	10	30%	10.5	1	30

FELOCELL 4A: FELOCELL 4 without FCV-F9, but with FCV-21

**EXAMPLE 2-9. CROSS NEUTRALIZATION ANALYSIS OF SERA FROM CATS
VACCINATED WITH FELOCELL 4 COMPONENTS WITH AND WITHOUT FCV-21**

[00145] Serum samples from each cat in the study described in EXAMPLE 2-7 were collected following the second vaccination, but prior to challenge. The samples were heat treated at 56°C for 30 minutes, and evaluated in the serum neutralization assay against each of 26 FCV strains as previously described in EXAMPLE 1-10 (TABLE 1-6).

[00146] Serum neutralization data were analyzed with cut-off titers of >23 and >15, and an average of the two cut-off titers was calculated (Ave). The results are shown in TABLE 2-10. The data indicate that the cross neutralization profile of FELOCELL 4 (containing FCV-F9) remains constant whether the route of administration is SQ/SQ or SQ/Oral. With the addition of FCV-21, however, the cross neutralization profile is greatly enhanced when the vaccine is administered SQ/SQ or SQ/Oral. Moreover, for FELOCELL 4A (containing FCV-21, but no FCV-F9), the cross neutralization profile is enhanced for SQ/SQ, SQ/Oral and even Oral/Oral vaccination routes.

TABLE 2-10									
Treatment	Vaccination				Serum Collection		Cross Neutralization		
	# Animals	Days	Dose	Route	Days	# Animals	% (>23)	% (>15)	% (Ave)
Neg. control	10	0	1 ml	SQ	42	9	10.8	13.9	12.4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	9	38.5	42.3	40.4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	10	39.2	42.7	41.0
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	56.5	62.3	59.4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	56.2	60	58.1
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	10	58.9	64.6	61.8
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	10	49.6	59.2	54.4
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral	42	10	51.2	54.6	52.9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	53.9	62.7	58.3
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	55.8	63.9	59.9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral	42	10	60.8	68.1	64.5
		21	1 ml	Oral					

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 without FCV-F9, but with FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 without FCV-F9, but with FCV-21

[00147] In TABLE 2-11, the vaccination regimens evaluated included an initial subcutaneous vaccination followed by two oral booster immunizations on day 21 and day 42 (SQ/Oral/Oral). The results indicate that the addition of FCV-21, with or without FCV-F9 in FELOCELL 4, resulted in significantly broader cross neutralization profiles (approximate 40% increase).

TABLE 2-11										
Treatment	# animals	Vaccination				Serum Collection		Cross Neutralization		
		Days	Date	Dose	Route	Days	# Animals	% (>23)	% (>15)	% (Ave)
Neg. control	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	5.8	10.4	8.1
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	72.5	77.1	74.8
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	9	72.5	76.7	74.6
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	49.6	57.9	53.8
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					

* FELOCELL 4A: FELOCELL 4 without FCV-F9, but with FCV-21

[00148] We also disclose our finding that with the vaccines described herein as peptides, proteins, and DNA related to FCV strains FCV-21, FCV-49 and FCV 26391-4, oral or oronasal (ON) administration may be carried out in the first instance followed by a second oral or oronasal administration without the previously disclosed side effects mentioned above in EXAMPLE 2-4 and TABLE 2-5.

[00149] It should be noted that, as used in this specification and the appended claims, singular articles such as "a," "an," and "the," may refer to one object or to a plurality of objects unless the context clearly indicates otherwise. Thus, for example, reference to a composition containing "a compound" may include a single compound or two or more compounds.

[00150] It is to be understood that the above examples and descriptions is intended to be illustrative and not restrictive. Many embodiments will be apparent to those of skill in the art upon reading the above description. The scope of the invention should, therefore, be determined with reference to the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled. The disclosures of all articles and references, including patents, patent

applications and publications, are incorporated herein by reference in their entirety and for all purposes.

[00151] In TABLES 2-1 through 2-9, Felocell® 4, Felocell 4, or FELOCELL 4 or these words followed by the number "3" are vaccines where any variation of the name Felocell is owned by Pfizer. Reference to Felocell 4 A is Felocell 4 without FCV-F9, reference to Felocell 3 A is Felocell 3 without FCV-F9. Note, actual antigens used in these studies were not from the commercial product rather the antigens were prepared in small batches for research purposes only, but in the same manner as the commercial product.

[00152] All of the compositions and/or methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the compositions and/or methods and in the steps or in the sequence of steps of the method described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically, it will be apparent that certain agents which are both chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

[00153] ~~Numbered description of the invention.~~ Additional descriptions and examples. 1. A method of immunizing cats against feline calicivirus (FCV), the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FCV, the first vaccine is administered parenterally and the second vaccine is administered orally or oronasally, and the second vaccine is administered *N* days following administration of the first vaccine, wherein *N* is an integer from 3 to 120 days, inclusive, also described is *N* of about 3 weeks and about 2-4 weeks. 2. The method of claim 1, wherein the vaccines independently comprise a live virus vaccine, a modified-live virus vaccine, an inactivated virus vaccine, a recombinant vaccine, a DNA vaccine, or a subunit antigen vaccine, either alone or in combination. 3. The method of claim 1, wherein at least one of the vaccines includes one or more strains of FCV. 4. The method of claim 3, wherein the one or more strains of FCV comprises F9 or FCV-21 or F9 and FCV-21. 5. The method of claim 1, wherein the vaccines

are the same. 6. The method of claim 1, wherein at least one of the vaccines is also adapted to induce an immune response against one or more pathogens selected from feline herpesvirus, feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus, feline panleukopenia virus, and feline Chlamydia. 7. The method of claim 1, wherein the first vaccine is administered subcutaneously. 8. The method of claim 1, wherein the second vaccine is administered perorally or oronasally. 9. The method of claim 1, wherein the second vaccine or a subsequent vaccine is administered after the cat has developed an FCV serum neutralization titer of about 1:6 or greater. 10. A method as in any of claims 1 to 9, further comprising administering to the cat a therapeutically effective amount of a third vaccine, wherein the third vaccine is adapted to induce an immune response in the cat against FCV and is administered parenterally, orally, or oronasally M days following administration of the first or the second vaccine, wherein M is an integer from 1 to 120, inclusive. 11. The method of claim 10, wherein the third vaccine is administered subcutaneously. 12. A method of immunizing cats against feline calicivirus (FCV), the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FCV, wherein the first vaccine is administered orally or oronasally and the second vaccine is administered orally or oronasally, and the second vaccine is administered N days following administration of the first vaccine, wherein N is an integer from 3 to 120, inclusive, also specified is N about 3 weeks and about 2-4 weeks. 13. The method of claim 12 wherein the FCV strain is selected from the group consisting of FCV-21, FCV-49, FCV 26391-4. 14. A method of immunizing animals comprising administering to an animal a therapeutically effective amounts of first and second vaccines, with an optional third vaccine, wherein the first and second and optional third vaccines are adapted to induce an immune response and the first vaccine is administered parenterally or orally, the second vaccine is administered orally or oronasally, and the second and optional third vaccine is administered N days following administration of the first vaccine, wherein N is an integer from 3 to 120, inclusive, also specified is N about 3 weeks and about 2-4 weeks, and the method may include optional annual booster administrations of the vaccine, including an M period of about a year.

PART 3

THIS PART PROVIDES METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZING ANIMALS AGAINST FELINE PARVOVIRUS (FPV) AND FELINE HERPES VIRUS (FHV)

[00154] Described herein are methods and materials for treating and immunizing animals with vaccine, and in particular cats against feline respiratory disease caused by feline calicivirus (FCV), feline panleukopenia caused by Feline Parvovirus (FPV), feline viral rhinotracheitis caused by feline herpesvirus (FHV), which has also been called Feline Rhinotracheitis Virus. Described below are novel combinations of vaccines, that when presented to a feline in the manner described allow for effective single oral and oral/oral and subq/oral deliveries of both FPV and or FHV vaccines.

[00155] Single oral means a single oral delivery that confers effective protection to a vaccinated animal. By oral/oral is meant an oral delivery given twice, similar to the description above in Part 2, i.e. either oral followed by some period of time and then another dose is given via the oral route, and subq/oral is a first dose given subq followed by some period of time and then another dose is given via oral route.

[00156] What is described here is the delivery of the combination of modified live FPV and/or modified live FHV in combination with modified live Chlamydia vaccine, or any components of modified live Chlamydia vaccine, e.g. growth medium, cell lysate or whole cells, any components of Chlamydia itself. Chlamydia is also referred to as Feline Chlamydia, or Feline Chlamydia psittaci or FCp.

[00157] When modified live FPV is given by itself or in combination with modified live FCV, or modified live FHV vaccines, the FPV is not effective when delivered in an oral/oral manner, and shows a decreased SN titer with SQ/oral route of administration. Similarly, when modified live FHV is given by itself or in combination with modified live FCV, or with modified live FPV vaccine, FHV is not effective when delivered in an oral/oral manner, and with shows a decreased efficacy with SQ/oral route of administration. Only when either FPV and/or FHV is given in combination with a modified live Chlamydia vaccine, an adequate protection against FPV and/or FHV is provided, when the delivery of the combination vaccines is either through a subq/oral or oral/oral route.

[00158] According to the above the following Examples are provided. The following examples are intended to be illustrative and non-limiting, and represent a few specific embodiments of the present invention.

EXAMPLE 3-1 (notional). SUBQ/ORAL VACCINATION REGIMEN WITH FPV AND CHLAMYDIA. FPV and Chlamydia (or any components of modified live Chlamydia vaccine) is provided in a combination vaccine with or without other components. The modified live vaccines may be delivered subq/oral.

EXAMPLE 3-2 (notional). ORAL/ORAL VACCINATION REGIMEN WITH FPV AND CHLAMYDIA. FPV and Chlamydia (or any components of modified live Chlamydia vaccine) is provided in a combination vaccine with or without other components. The modified live vaccines may be delivered oral/oral.

EXAMPLE 3-3 (notional). SUBQ/ORAL VACCINATION REGIMEN WITH FPV, FHV AND CHLAMYDIA. FPV, FHV and Chlamydia (or any components of modified live Chlamydia vaccine) is provided in a combination vaccine with or without other components. The modified live vaccines may be delivered subq/oral.

EXAMPLE 3-4 (notional). ORAL/ORAL VACCINATION REGIMEN WITH FPV, FHV AND CHLAMYDIA. FPV, FHV and Chlamydia (or any components of modified live Chlamydia vaccine) is provided in a combination vaccine with or without other components. The modified live vaccines may be delivered oral/oral.

EXAMPLE 3-5 (actual). SUBQ/ORAL VACCINATION REGIMEN WITH FPV, FHV, FCV AND CHLAMYDIA. FPV, FHV, FCV and Chlamydia (or any components of modified live Chlamydia vaccine) is provided in a combination vaccine with or without other components. The modified live vaccines may be delivered oral/oral (Table 3-1).

EXAMPLE 3-6 (actual). ORAL/ORAL VACCINATION REGIMEN WITH FPV, FHV, FCV AND CHLAMYDIA. FPV, FHV, FCV and Chlamydia (or any components of modified live Chlamydia vaccine) is provided in a combination vaccine with or without other components. The modified live vaccines may be delivered oral/oral. See Table 3-1.

[00159] Domestic shorthair cats, about 8 weeks of age, were vaccinated with FELOCELL 4A and 3A components which contain modified-live feline rhinotracheitis virus [FHV], calicivirus [FCV-21], panleukopenia virus [FPV] and *Chlamydia psittaci* [FCp]. The vaccination regimens evaluated included: an initial subcutaneous vaccination followed by subcutaneous boosts on days 21 (SQ/SQ); an initial subcutaneous vaccination followed by one oral booster immunization on day 21 (SQ/Oral); or an initial oral vaccination followed by a second oral vaccination on day 21. Oral vaccination was achieved by administration of the vaccine into the mouth. Serum samples from each cat were collected post second vaccination, and heat treated

at 56°C for 30 minutes. The samples were evaluated in the serum neutralization assay against FPV.

TABLE 3-1		
Vaccine	Route	FPV SN Titer
FELOCELL 4A	SQ/SQ	4096
FELOCELL 4A	SQ/Oral	7276
FELOCELL 4A	Oral/Oral	5793
FELOCELL 3A	Oral/Oral	7

FELOCELL 4A: FPV/FHV/FCV-21/ FCp

FELOCELL 3A: FPV/FHV/FCV-21

[00160] The results from TABLE 3-1 suggest that cats responded minimally to the FPV antigen, as reported previously in the literature. (Absence of an immune response after oral administration of attenuated feline panleukopenia virus. Schults RD, Scott FW, Infect Immun. 1973, Apr 7 (4): 547-9). With the presence of Chlamydia, however, or any components associated with a Chlamydia vaccine, the FPV SN titers were much higher, suggesting *in vivo* efficacy against FPV challenge. Moreover, we have observed the enhanced FPV immunogenicity not only with SQ/SQ, SQ/Oral, but also with Oral/Oral group.

EXAMPLE 3-7 (actual). ORAL/ORAL VACCINATION REGIMEN WITH FPV, FHV, FCV
 FPV, FHV and FCV are provided in a combination vaccine with or without other components. The modified live vaccines may be delivered oral/oral. See Table 3-2.

[00161] Domestic shorthair cats, about 8 weeks of age, were vaccinated with FELOCELL 3A, which contains modified-live feline rhinotracheitis virus [FHV], calicivirus [FCV-21] and panleukopenia virus [FPV]. The vaccination regimens evaluated included: an initial subcutaneous vaccination followed by subcutaneous boosts on days 21 (SQ/SQ); an initial subcutaneous vaccination followed by one oral booster immunization on day 21 (SQ/Oral); or an initial oral vaccination followed by a second oral vaccination on day 21. Oral vaccination was achieved by administration of the vaccine into the mouth. Serum samples from each cat were collected post first and second vaccination and heat treated at 56°C for 30 minutes. The samples were analyzed in the serum neutralization assay against FPV.

TABLE 3-2				
Group	Treatment	Route	FPV-FPN SN Titer	
			Post 1st vax	Post 2nd vax
T01	unvaccinated	N/A	1	1
T02	FELOCELL 3A	SQ/SQ	16618	54319

T03	FELOCELL 3A	SQ/Oral	20346	28771
T04	FELOCELL 3A	Oral/Oral	1	4

[00162] The results from TABLE 3-2 suggest that the FPV antigen present in the FELOCELL 3A vaccine induced minimal immune response when given Oral/Oral (consistent with results from TABLE 3-1). When the vaccines were given SQ/SQ or SQ/Oral, however, high FPV SN titers were observed, an indication of *in vivo* efficacy.

[00163] **Numbered description of the invention.** Additional descriptions and examples.

Note below, FCV is Feline Calicivirus, FPV is Feline Parvovirus, which has also been called Panleukopenia; or FPL and finally, FHV is Feline Herpes Virus

1. An immunogenic composition, comprising both modified live FPV and modified live Chlamydia administered in a single administrative dosage.
2. A vaccine, comprising modified live FPV and modified live Chlamydia delivered to a feline in two separate single administrative dosages, the single administrative dosages both delivered by oral or oronasal routes and separated in time by 3 to 120 days, or about 3 weeks or about 2 weeks.
3. A method of immunizing cats against FPV, the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FPV, the first vaccine is administered orally or oronasally and the second vaccine is administered orally or oronasally, the second vaccine is administered *N* days following administration of the first vaccine, wherein *N* is an integer from 3 to 120, inclusive, or where *N* is about 3 weeks or where *N* is about 2 weeks, wherein said first and second vaccine are comprised of both a modified live FPV and modified live Chlamydia.
4. An immunogenic composition, comprising both modified live FHV and modified live Chlamydia administered in a single administrative dosage.
5. A vaccine, comprising modified live FHV and modified live Chlamydia delivered to a feline in two separate single administrative dosages, the single administrative dosages both delivered by oral or oronasal routes and separated in time by 3 to 120 days, or about 3 weeks or about 2 weeks.
6. A method of immunizing cats FHV the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FHV, the first vaccine is administered orally or oronasally and the second vaccine is administered orally or oronasally, the second vaccine is administered *N* days following administration of the first vaccine, wherein *N* is an integer from 3 to 120, inclusive, or where *N* is about 3 weeks or where *N* is about 2 weeks, wherein said first and second vaccine are comprised of both a modified live FHV and modified live Chlamydia.
7. An immunogenic

composition, comprising both modified live FCV and modified live Chlamydia administered in a single administrative dosage. 8. A vaccine, comprising modified live FCV and modified live Chlamydia delivered to a feline in two separate single administrative dosages, the single administrative dosages both delivered by oral or oronasal routes and separated in time by 3 to 120 days, or about 3 weeks or about 2 weeks. 9. A method of immunizing cats against FCV the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FCV, the first vaccine is administered orally or oronasally and the second vaccine is administered orally or oronasally, the second vaccine is administered *N* days following administration of the first vaccine, wherein *N* is an integer from 3 to 120, inclusive, or where *N* is about 3 weeks or where *N* is about 2 weeks, wherein said first and second vaccine are comprised of both a modified live FCV and modified live Chlamydia. 10. An immunogenic composition, comprising modified live FPV, modified live FHV and modified live Chlamydia administered in a single administrative dosage. 11. A vaccine, comprising modified live FPV, modified live FHV and modified live Chlamydia delivered to a feline in two separate single administrative dosages, the single administrative dosages both delivered by oral or oronasal routes and separated in time by 3 to 120 days, or about 3 weeks or about 2 weeks. 12. A method of concurrently immunizing cats against FPV and FHV, the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FPV and FHV, the first vaccine is administered orally or oronasally and the second vaccine is administered orally or oronasally, the second vaccine is administered *N* days following administration of the first vaccine, wherein *N* is an integer from 3 to 120, inclusive, or where *N* is about 3 weeks or where *N* is about 2 weeks, wherein said first and second vaccine comprising modified live FPV, modified live FHV and modified live Chlamydia. 13. An immunogenic composition, comprising modified live FPV, modified live FCV and modified live Chlamydia administered in a single administrative dosage. 14. A vaccine, comprising modified live FPV, modified live FCV and modified live Chlamydia delivered to a feline in two separate single administrative dosages, the single administrative dosages both delivered by oral or oronasal routes and separated in time by 3 to 120 days, or about 3 weeks or about 2 weeks. 15. A method of concurrently immunizing cats against FPV and FCV, the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FPV and FHV, the first vaccine is administered orally or oronasally

and the second vaccine is administered orally or oronasally, the second vaccine is administered N days following administration of the first vaccine, wherein N is an integer from 3 to 120, inclusive, or where N is about 3 weeks or where N is about 2 weeks, wherein said first and second vaccine comprising modified live FPV, modified live FHV and modified live Chlamydia. 16. An immunogenic composition, comprising modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia administered in a single administrative dosage. 17. A vaccine, comprising modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia delivered to a feline in two separate single administrative dosages, the single administrative dosages both delivered by oral or oronasal routes and separated in time by 3 to 120 days, or about 3 weeks or about 2 weeks. 18. A method of concurrently immunizing cats against FHV and FCV, the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FHV and FCV, the first vaccine is administered orally or oronasally and the second vaccine is administered orally or oronasally, the second vaccine is administered N days following administration of the first vaccine, wherein N is an integer from 3 to 120, inclusive, or where N is about 3 weeks or where N is about 2 weeks, wherein said first and second vaccine comprising modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia. 19. An immunogenic composition, comprising modified live FPV, modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia administered in a single administrative dosage. 20. A vaccine, comprising modified live FPV, modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia delivered to a feline in two separate single administrative dosages, the single administrative dosages both delivered by oral or oronasal routes and separated in time by 3 to 120 days, or about 3 weeks or about 2 weeks. 21. A method of concurrently immunizing cats against FPV, FHV and FCV, the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FPV, the first vaccine is administered orally or oronasally and the second vaccine is administered orally or oronasally, the second vaccine is administered N days following administration of the first vaccine, wherein N is an integer from 1 to 120, inclusive, or where N is about 3 weeks or where N is about 2 weeks, wherein said first and second vaccine comprising modified live FPV, modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia.

CLAIMS

1. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein.
2. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein wherein said capsid protein comprises protein sequence (SEQ ID 13) and sequences having at least about 91.2%, 95% and 99% identity; wherein said capsid protein is provided in an effective amount to produce an immune response, and a pharmaceutically acceptable carrier.
3. A DNA vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (SEQ. ID 12) and sequences having at least about 78.7%, and 79.2% sequence identity and allowing for conservative substitutions.
4. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-49 capsid protein or an isolated FCV-49 capsid protein wherein said capsid protein comprises a protein sequence from strain FCV-49.
5. A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising an FCV-49 capsid protein, or an isolated FCV-49 capsid protein, wherein said capsid protein comprises protein sequence (SEQ ID 15) and sequences having at least about 92.7%, 95% and 99% identity; wherein said capsid protein is provided in an effective amount to produce an immune response, and a pharmaceutically acceptable carrier.
6. A DNA vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-49 capsid protein or an isolated FCV-49 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (SEQ. ID 14) and sequences having at least about 78.9%, i.e. 79.4% (78.9 + 0.5) sequence identity and allowing for conservative substitutions.
7. A vaccine of any of claim 1-6, further comprising either alone or in any combination the following: where it contains an adjuvant, wherein the FCV component is live, wherein the FCV component is attenuated, wherein the FCV component is inactivated, which may include at least one other feline calicivirus strain selected from the group consisting of FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255, and FCV-2280.
8. A method of immunizing cats against feline calicivirus (FCV), the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FCV, the first vaccine is administered parenterally and the second vaccine is administered orally or oronasally, and the second vaccine is administered *N* days following administration of the first vaccine, wherein *N* is an integer from 3 to 120, inclusive.
9. The method of claim 8, wherein the vaccines independently comprise a live virus vaccine, a modified-live virus vaccine, an inactivated virus vaccine, a recombinant vaccine, a DNA vaccine, or a subunit antigen vaccine, either alone or in combination.
10. The method of claim 9, wherein at least one of the vaccines includes one or more strains of FCV.

90

11. The method of claim 10, wherein the one or more strains of FCV comprises F9 or FCV-21 or F9 and FCV-21.

12. An immunogenic composition, comprising both modified live FPV and modified live Chlamydia, and or comprising both modified live FHV and modified live Chlamydia and or comprising both modified live FCV and modified live Chlamydia and or comprising modified live FPV, modified live FHV and modified live Chlamydia and or comprising modified live FPV, modified live FCV and modified live Chlamydia and or comprising modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia and or comprising modified live FPV, modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia administered in a single administrative dosage.

13. A vaccine, comprising both modified live FPV and modified live Chlamydia, and or comprising both modified live FHV and modified live Chlamydia and or comprising both modified live FCV and modified live Chlamydia and or comprising modified live FPV, modified live FHV and modified live Chlamydia and or comprising modified live FPV, modified live FCV and modified live Chlamydia and or comprising modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia and or comprising modified live FPV, modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia delivered to a feline in two separate single administrative dosages, the single administrative dosages both delivered by oral or oralnasal routes and separated in time by 3 to 120 days.

14. A method of immunizing cats against FPV, FCV and or FHV, the method comprising administering to a cat therapeutically effective amounts of first and second vaccines, wherein the first and second vaccines are adapted to induce an immune response in the cat against FPV, and or FCV and or FHV, the first vaccine is administered orally or oronasally and the second vaccine is administered orally or oronasally, the second vaccine is administered N days following administration of the first vaccine, wherein N is an integer from 3 to 120, inclusive, wherein said first and second vaccine are comprised of a composition:

- a) comprising both modified live FPV and modified live Chlamydia; and or
- b) comprising both modified live FHV and modified live Chlamydia; and or
- c) comprising both modified live FCV and modified live Chlamydia; and or
- d) comprising modified live FPV, modified live FHV and modified live Chlamydia; and or
- e) comprising modified live FPV, modified live FCV and modified live Chlamydia; and or
- f) comprising modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia; and or

g) comprising modified live FPV, modified live FHV, modified live FCV and modified live Chlamydia, or any combination thereof.

15. Any immunogenic composition, vaccine, and methods of treating animals, especially cats, as described herein.

**PROCEDIMIENTOS DE ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS, NUEVOS
CALICIVIRUS FELINOS, Y TRATAMIENTOS PARA INMUNIZAR ANIMALES
CONTRA PARAOVIRUS FELINO Y HERPES VIRUS FELINO**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a proporcionar nuevas vías para administrar diversas vacunas a diversos animales. Describe varios calicivirus felinos aislados (FCV). Describe nuevos procedimientos para presentar vacunas de FCV a gatos. La presente invención también se refiere a clones de ácidos nucleicos que codifican calicivirus felinos. Se refiere a proteínas de la cápsida de FCV, vacunas vivas o muertas, una vacuna de subunidad que comprende la proteína de la cápsida, una vacuna de ácido nucleico, y una vacuna de vector de virus recombinante que comprende ácidos nucleicos que codifican la proteína de la cápsida del calicivirus felino aislado. La presente invención también se refiere a un procedimiento para identificar un calicivirus felino útil para producir una composición de vacuna y ensayos para diagnosticar gatos infectados con calicivirus felino. La presente invención también proporciona nuevas vías para administrar vacunas de FCV nuevas y antiguas a felinos.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se informa que los calicivirus son una importante causa de enfermedades en gatos. Se observan una amplia diversidad de síntomas tales como fiebre, rinitis, estornudos, conjuntivitis leve, descarga ocular, vesículas en los orificios nasales externos, mucosa oral o en la lengua, neumonía, bronquitis traqueal, diarrea, dolores musculares, paso rígido, e hiperestesia. Las

25

infecciones bacterianas oportunistas acompañan a menudo a las infecciones por FCV, lo que complica el tratamiento y la recuperación. Las infecciones por FCV graves pueden conducir a la muerte, especialmente en crías de gato. Se debe observar que dichos síntomas, aunque considerados comunes en casos naturales, no siempre son prominentes en las infecciones experimentales. Podría parecer que diversas cepas de campo de calicivirus felino (FCV) difieren en su potencial para causar enfermedad, o que la infección concurrente con otros agentes influye en los síntomas de la enfermedad.

Las vacunas contra calicivirus felino han estado disponibles durante más de dos décadas. Aunque existen numerosos serotipos de FCV, ciertas cepas, tales como F9, se descubrieron como inductoras de anticuerpos contra una amplia variedad de cepas de FCV. Véase J. L. Bittle y W.J. Rubic, *Am. J. Vet. Res.* 37:275-78 (1976). Como resultado, las primeras vacunas contra calicivirus felino emplearon una versión modificada o atenuada de la cepa FCV-F9. Véase Patente de Estados Unidos Nº 3.937.812 de J. L. Bittle y W.J. Rubic, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

Aunque las vacunas de FCV-F9 y otras vacunas disponibles en el mercado proporcionan protección contra muchos aislados de campo, no es verdad que estas vacunas eviten la infección por todas las cepas. Es más, a medida que el FCV sigue evolucionando, la vacuna basada en FCV-F9 proporciona protección contra cada vez menos aislados de campo (Lauritzen y col., 1997, *Vet Microbiology*, 56:55-63). Además, los veterinarios han expresado su preocupación sobre la eficacia de las vacunas basadas en un único serotipo. De hecho, los estudios de campo sugieren que las vacunas obtenidas de la cepa FCV-F9 proporcionan inmunidad insuficiente contra

muchas cepas de calicivirus felino. Véase, por ejemplo, N.C. Pederson y col., *Feline Pract.* 13(1):26-35 (1983); S. Dawson y col., *Vet. Rec.* 132:346-50 (1993). Los veterinarios también han planteado su preocupación acerca de la administración de un virus vivo modificado que puede, en algunas

5 circunstancias, causar la enfermedad en animales de otra manera sanos. Los investigadores han informado que la dosificación oral inadvertida de una vacuna de FCV administrada por vía subcutánea dio como resultado una enfermedad aguda. Véase R.C. Povey, *Feline Pract.* 7(5): 12-16 (1977). Hay, por lo tanto, un interés continuo en desarrollar una vacuna, que por sí misma o

10 en combinación con otras vacunas, pudiera proporcionar la protección deseada después de la vacunación de un gato. Se describen varios aislados en este documento, que se han aislado de gatos y que proporcionan un medio para proporcionar amplia protección en gatos inmunizados.

DESCRIPCIÓN DE LA INFORMACIÓN

15 DOCUMENTOS DE PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

3937812 febrero/1976 Bittle y col., 3944469 marzo/1976 Bittle y col.

4486530 diciembre/1984 David y col., 4786589 noviembre/1988 Rounds y col.

5169789 diciembre/1992 Bernstein y col., 5229293 julio/1993 Matsuura y col.

5266313 noviembre/1993 Esposito y col., 5338683 agosto/1994 Paoletti y col.

20 5494807 febrero/1996 Paoletti y col., 5559041 septiembre/1996 Kang y col.

5561064 octubre/1996 Marquet y col., 5580859 diciembre/1996 Felgner

5585100 diciembre/1996 Mond y col., 5589384 diciembre/1996 Liscombe

5589466 diciembre/1996 Felgner, 5620845 abril/1997 Gould y col.

5656448 agosto/1997 Kang y col., 5693761 diciembre/1997 Queen y col.

25 5693762 diciembre/1997 Queen y col., 5695928 diciembre/1997 Stewart y col.

5703055 diciembre/1997 Felgner, 5716784 febrero/1998 DiCesare
5716822 febrero/1998 Wardley, 5718901 febrero/1998 Wardley
5725863 marzo/1998 Daniels y col., 5728587 marzo/1998 Kang y col.
5800821 septiembre/1998 Acheson y col., 5977322 noviembre/1999 Marks y

5 col.

6010703 enero/2000 Maes y col., 6355246 marzo/2002 Kruger y col.;

6.534.066 B 1 marzo/2003 Poulet y col.

DOCUMENTOS DE PATENTES EXTRANJERAS

0484382 marzo/1995 EP, WO2004/083390

10 OTRAS PUBLICACIONES

Burroughs, J.N y Brown, F., J. Gen. Virol., 22, pp. 281-285 (1974).

Clarke y Lambden en J. Gen. Virol. 78: 291-301 (1997).

Griest, N.R., 1979, Diagnostic methods in clinical virology (3ª ed.), páginas. 84-85, Blackwell J. L. Bittle y W. J. Rubic, *Am. J. Vet. Res.* 37:275-78 (1976).

15 Lauritzen y col., *Vet Microbiology* 56: 55-63 (1997).

Maky, Brian-W J. y Kangro, Hillar O. 1996, *Virology methods manual*, pp. 35-37, Academic Press, New York.

Motin y col., *Infect. Immun.* 64: 4313-4318 (1996).

N. C. Pederson y col., *Feline Pract.* 13(1):26-35 (1983).

20 Oglesby, A.S., y col., *Virology* 44, páginas. 329-341 (1971).

Poulet y col., *Veterinary Microbiology* 106: 17-31 (2005).

Poulet y col., *Archives of Virology* 145: 243-261 (2000).

R. C. Povey, *Feline Pract.* 7(5):12-16 (1977).

S. Dawson y col., *Vet. Rec.* 132:346-50 (1993).

Scientific Publishers, Oxford, UK.

Soergel, M.E., y col., Intervirology, 5, páginas 239-244 (1975).

Yokoyama, N., y col., Vaccine, vol. 14, No. 17/18, pp. 1657-1663 (1996).

SUMARIO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención proporciona nuevas cepas de y se refiere a, varios calicivirus felinos aislados (FCV). También describe nuevos procedimientos para presentar vacunas a animales y particularmente, vacunas de FCV a gatos. La presente invención también se refiere a clones de ácidos nucleicos que codifican calicivirus felinos. Se refiere a proteínas de la cápsida de FCV,
- 10 vacunas vivas o muertas, una vacuna de subunidad que comprende la proteína de la cápsida, una vacuna de ácido nucleico, y una vacuna de vector de virus recombinante que comprende ácidos nucleicos que codifican la proteína de la cápsida del calicivirus felino aislado. La presente invención también se refiere a un procedimiento para identificar un calicivirus felino útil para producir una
- 15 composición de vacuna y ensayos para diagnosticar gatos infectados con calicivirus felino. La presente invención también proporciona nuevas vías para administrar vacunas de FCV nuevas y antiguas a felinos. En este documento también se describen procedimientos y materiales para tratar e inmunizar animales con vacuna, y en particular gatos, contra FPV o Parvovirus Felino,
- 20 que también se han denominado Panleucopenia o FPL y contra otra enfermedad, FHV o Herpesvirus Felino, que también se denomina Virus de la Rinotraqueítis Felina. Más adelante se describen nuevas combinaciones de vacunas, que cuando se presentan a un felino de la forma descrita permiten administraciones eficaces oral/oral y subc/oral de vacunas contra FPV y/o FHV.
- 25 En particular, la presente invención describe las siguientes vacunas para

inmunizar gatos contra calicivirus felino. Una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada (**SEC ID N°: 13**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente el 91,2%, 95% y el 99% de identidad. Una vacuna de ADN que comprende secuencias de ácido nucleico que

5 codifican una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada en la que dicho ADN comprende una secuencia (**SEC ID N°: 12**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 78,7% y 79,2% de identidad de secuencia y que permiten sustituciones conservativas.

Una vacuna que comprende una proteína de la cápsida de FCV-49, o

10 una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada en la que dicha proteína de la cápsida comprende una secuencia de proteína de la cepa FCV-49 (**SEC ID N°: 15**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 92,7%, 95% y 99% de identidad; en la que dicha proteína de la cápsida se proporciona en una cantidad eficaz. Una vacuna de ADN que comprende secuencias de ácido

15 nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV-49 o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada en la que dicho ADN comprende una secuencia (**SEC ID N°: 14**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 78,9%, en concreto, 79,4% (78,9 + 0,5) de identidad de secuencia y que permiten sustituciones conservativas.

20 Una vacuna que comprende una proteína de la cápsida de FCV-26391-4, o una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende secuencias de proteínas de la cepa FCV-26391-4. Una vacuna que comprende una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 en la que dicha proteína de la cápsida comprende una secuencia de

25 proteína (**SEC ID N°: 17**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente

91,8%, 95% y 99% de identidad. Una vacuna de ADN que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 o una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 aislada en la que dicho ADN comprende una secuencia (**SEC ID N°: 16**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 78,4%, en concreto 78,9% (78,4 + 0,5) de identidad de secuencia.

Una vacuna donde el polinucleótido se selecciona entre el grupo constituido esencialmente por **SEC ID N°: 12, 14, 16**. Las vacunas pueden estar solas o en cualquier combinación de las siguientes: donde contenga un adyuvante, en la que el componente de FCV esté vivo, en la que el componente de FCV esté atenuado, en la que el componente de FCV esté inactivado, que puede incluir al menos una cepa de calicivirus felino diferente seleccionada entre el grupo constituido por FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255 y FCV-2280.

Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una secuencia de nucleótidos de una proteína de la cápsida de FCV seleccionada entre el grupo constituido por un polipéptido que tiene 93% o más identidad con **SEC ID N°: 13, 15 ó 17**, en la que el FCV aislado no es la cepa 213-95, y en la que la secuencia de ácido nucleico se une de forma operativa a una secuencia promotora heteróloga, en cantidad eficaz para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una secuencia de nucleótidos de una proteína de la cápsida de FCV seleccionada entre el grupo constituido esencialmente por **SEC ID N°: 12, 14 y 16**. Una vacuna en la que la secuencia de nucleótidos está en cualquiera de los

siguientes: un plásmido, un vector de virus recombinante, o cualquier otro vector de nucleótidos.

Una vacuna en la que el vector de virus recombinante se selecciona entre el grupo constituido por herpesvirus felino, poxvirus de mapache, poxvirus de canario, adenovirus, virus Semliki Forest, virus Sindbis y virus vaccinia.

También hay descripciones de composiciones inmunogénicas que comprenden un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable y una cepa aislada de FCV, que se une a un anticuerpo monoclonal seleccionado de los anticuerpos monoclonales descritos en este documento como 23, 26, 41, 44 y 56. En algunas versiones de la invención la composición inmunogénica que comprende un vehículo o excipiente veterinariamente aceptable y una cepa aislada de FCV, se une **de forma selectiva** a un anticuerpo monoclonal seleccionado de los anticuerpos monoclonales descritos en este documento como 23, 26, 41, 44 y 56. Estas composiciones inmunogénicas incluyen composiciones donde la cepa de FCV está inactivada, donde dicha cepa de FCV es una vacuna, y donde la composición comprende un adyuvante.

Las vacunas descritas en este documento pueden incluir al menos un patógeno felino distinto, seleccionado entre el grupo constituido por herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, *Chlamydia psittaci*, y parvovirus felino, virus de la rabia y Bordetella bronchiseptica. La vacuna puede también comprender adicionalmente o puede administrarse con un adyuvante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un régimen de vacunación que reduce de forma significativa la mortalidad asociada con calicivirus felino (FCV)

100

y potencia el perfil de seguridad de las vacunas de FCV. Además, el régimen de vacunación reivindicado induce un perfil de neutralización cruzada en suero más amplio que los protocolos de vacuna de FCV-F9 existentes, que debe proporcionar mejor inmunidad a través de diferentes cepas de calicivirus felino.

- 5 Un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para inmunizar animales con vacunas, en particular, un gato contra calicivirus felino. Otras dos enfermedades felinas, FPV y FHV, también tienen nuevos tratamientos descritos en este documento. El procedimiento comprende administrar al gato cantidades terapéuticamente eficaces de una primera
- 10 vacuna, una segunda vacuna y, opcionalmente una tercera vacuna que pueden también darse dentro de 120 días como anteriormente, o más a menudo, después de aproximadamente 1 año como un refuerzo anual. La primera vacuna se administra por vía parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intramuscular, etc.). La segunda vacuna se administra por vía oral o por vía
- 15 oronasal aproximadamente N días después de la administración de la primera vacuna, y la tercera vacuna se administra por vía parenteral, por vía oral, o por vía oronasal aproximadamente M días después de la administración de la primera o la segunda vacunas. En este documento, N y M son números enteros independientes de 3 a 120, ambos inclusive. También se prefiere cuando N es
- 20 aproximadamente 3 semanas y aproximadamente 2-4 semanas. Además, se presenta un aspecto de la invención en el que ciertas vacunas identificadas pueden administrarse en forma de dos dosis orales, sin necesidad de una primera administración parenteral. Se aconsejan también refuerzos anuales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID Nº: 1

Oligonucleótido cebador: DEL-653

SEC ID Nº: 2

Oligonucleótido cebador: DEL-651

SEC ID Nº: 3

Oligonucleótido cebador: FCV-SR N2

SEC ID Nº: 10

Oligonucleótido cebador: FCV-SR C4

SEC ID Nº: 11

Oligonucleótido cebador: FCV-SR C8

SEC ID Nº: 12Secuencia de ADN del gen de la
cápsida de FCV-21**SEC ID Nº: 4**

Oligonucleótido cebador: FCV-SR N3

SEC ID Nº: 13Secuencia de aminoácidos codificada
del gen de la cápsida de FCV-21**SEC ID Nº: 5**

Oligonucleótido cebador: FCV-SR N4

SEC ID Nº: 14Secuencia de ADN del gen de la
cápsida de FCV-49**SEC ID Nº: 6**

Oligonucleótido cebador: FCV-SR N5

SEC ID Nº: 15Secuencia de aminoácidos codificada
del gen de la cápsida de FCV-49**SEC ID Nº: 7**

Oligonucleótido cebador: FCV-SR N6

SEC ID Nº: 16Secuencia de ADN del gen de la
cápsida de FCV-26391-4**SEC ID Nº: 8**

Oligonucleótido cebador: FCV-SR N9

SEC ID Nº: 17Secuencia de aminoácidos codificada
del gen de la cápsida de FCV-26391-4**SEC ID Nº: 9**

Oligonucleótido cebador: cebador 2

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

“Aproximadamente”, cuando se usa con respecto a una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95% para la media) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, cualquiera de los dos que sea mayor, a menos que se use aproximadamente con respecto a los intervalos de tiempo en semanas donde “aproximadamente 3 semanas,” es 17-25 días, y aproximadamente 2-4 semanas es 10-40 días.

- 10 “Inmunidad activa” incluye la inmunidad humoral y/o la inmunidad mediada por células contra virus felinos inducida vacunando a un gato con la vacuna de la presente invención.

- “Anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse a un antígeno específico como resultado de una respuesta inmune a este antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas del suero compuestas de cadenas de polipéptidos “ligeras” y “pesadas” que tienen regiones “constantes” y “variables” y se dividen en clases (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) en base a la composición de las regiones constantes. Un anticuerpo que es “específico” para un antígeno dado indica que las regiones variables del anticuerpo reconocen y se unen exclusivamente a un antígeno específico – por ejemplo, el anticuerpo es capaz de distinguir una proteína particular de la cápsida de otras proteínas conocidas en virtud de diferencias medibles en la afinidad de unión, a pesar de la existencia de una identidad de secuencia localizada, homología, o similitud entre proteínas de la cápsida y otros polipéptidos. Los anticuerpos específicos pueden también interaccionar con
- 15
20
25

otras proteínas (por ejemplo, la proteína A de *Staphylococcus aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA), a través de interacciones con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos, y, en particular, en las regiones constantes de la molécula. Se conocen bien ensayos de selección para
5 determinar la especificidad de unión de un anticuerpo. Para una descripción exhaustiva de dichos ensayos, véase, Harlow y col., (ed.) *Antibodies: A Laboratory Manual* Capítulo 6 (1988). Los anticuerpos pueden también reconocer y unirse a fragmentos de proteínas de la cápsida de FCV, con la condición de que los anticuerpos sean específicos para proteínas de la cápsida
10 de FCV. Los anticuerpos pueden producirse usando procedimientos conocidos en la técnica.

"Antígeno" o "inmunógeno", se refiere a una molécula que contiene uno o más epítopes (lineal, conformacional o ambos), que después de la exposición a un sujeto inducirá una respuesta inmune que es específica para ese
15 antígeno. Un epítipo es el sitio específico del antígeno que se une al receptor de células T o al anticuerpo específico, y típicamente comprende de aproximadamente 3 restos de aminoácido a aproximadamente 20 restos de aminoácido. El término antígeno se refiere a subunidades de antígenos –
antígenos discretos y separados de un organismo completo con el que se
20 asocia el antígeno en la naturaleza - así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. El término antígeno también se refiere a anticuerpos, tales como anticuerpos anti-idiotipo o fragmentos de los mismos, y a mimótopes sintéticos de péptidos que pueden imitar a un antígeno o a un determinante antigénico (epítipo). El término
25 antígeno también se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que expresa

un antígeno o determinante antigénico in vivo, tales como en aplicaciones de inmunización con ADN.

"Excipiente" se refiere a cualquier componente de una vacuna que no es un antígeno.

5 FELOCELL 3 es FELOCELL 4 sin *Chlamydia psittaci*.

FELOCELL 4 contiene el virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-F9], virus de la panleucopenia [FPV] y *Chlamydia psittaci* [FCp]. FELOCELL 4A contiene el virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-F21], virus de la panleucopenia [FPV] y
10 *Chlamydia psittaci* [FCp]. FELOCELL 4 A es FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21. FELOCELL 3 A es FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21. Felocell® 4, Felocell 4 o FELOCELL 4 o estas palabras seguidas por los números "3" ó "4" son vacunas en las que cualquier variación del nombre Felocell es propiedad de Pfizer.

15 "Primera vacuna", "segunda vacuna", "tercera vacuna" y similares, se refieren a vacunas administrables de forma independiente, que pueden ser la misma o diferentes, y que en general pueden administrarse en cualquier orden. Por tanto, una tercera vacuna puede administrarse a un sujeto antes o después de una segunda vacuna.

20 "Identidad" con respecto al porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a polipéptidos se define en este documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los restos en las secuencias diana después de alinear ambas secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo
25 porcentaje de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia

se determina mediante procedimientos convencionales. En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar los valores de alineamiento usando el algoritmo ClustalW (Thompson y col., Nuc. Ac. Res. 22:4673-4680; 1994) y la matriz de peso PAM250 (Dayhoff y col., "Atlas of Protein Sequence and Structure.", National Biomedical Research Foundation. Washington, DC 5:345-358 (1978) y los parámetros por defecto como se proporcionan por el programa MegAlign (DNASTAR, Inc.; Madison, WI). La tabla de la matriz de peso PAM250 se presenta como **TABLA 1-1** (los aminoácidos se indican mediante los códigos convencionales de una letra).

TABLA 1-1

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W
C	12																			
S	0	2																		
T	-2	1	3																	
P	-3	1	0	6																
A	-2	1	1	1	2															
G	-3	1	0	-1	1	5														
N	-4	1	0	-1	0	0	2													
D	-5	0	0	-1	0	1	2	4												
E	-5	0	0	-1	0	0	1	3	4											
Q	-5	-1	-1	0	0	-1	1	2	2	4										
H	-3	-1	-1	0	-1	-2	2	1	1	3	6									
R	-4	0	-1	0	-2	-3	0	-1	-1	1	2	6								
K	-5	0	0	-1	-1	-2	1	0	0	1	0	3	5							
M	-5	-2	-1	-2	-1	-3	-2	-3	-2	-1	-2	0	0	6						
I	-2	-1	0	-2	-1	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	5					
L	-6	-3	-2	-3	-2	-4	-3	-4	-3	-2	-2	-3	-3	4	2	6				
V	-2	-1	0	-1	0	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	4	2	4			
F	-4	-3	-3	-5	-4	-5	-4	-6	-5	-5	-2	-4	-5	0	1	2	-1	9		
Y	0	-3	-3	-5	-3	-5	-2	-4	-4	-4	0	-4	-4	-2	-1	-1	-2	-7	10	
W	-8	-2	-5	-6	-6	-7	-4	-7	-7	-5	-3	2	-3	-4	-5	-2	-6	0	0	17

El porcentaje de identidad se calcula entonces como:

5 Número total de coincidencias idénticas _____ x 100

[longitud de la secuencia más larga + el número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias]

“Respuesta inmune” en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmune humoral, una respuesta inmune celular, o una respuesta
 10 inmune humoral y una celular a un antígeno. Una “respuesta inmune humoral”

se refiere a una que está mediada por anticuerpos. Una "respuesta inmune celular" es una mediada por linfocitos T u otros glóbulos blancos o ambos, e incluye la producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas "similares" producidas por células T activadas, glóbulos blancos, o ambos. Las respuestas
5 inmunes pueden determinarse usando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización, que se conocen en la técnica.

"Cantidad inmunológicamente protectora" o "cantidad eficaz para producir una respuesta inmune", de un antígeno es una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor que sea adecuada para
10 evitar o mejorar signos o síntomas de enfermedad, incluyendo efectos adversos para la salud o complicaciones de los mismos, causados por infección con el agente de la enfermedad y en particular con calicivirus felino. Puede inducirse inmunidad humoral o inmunidad mediada por células o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal a una composición de vacuna puede
15 evaluarse, por ejemplo, indirectamente a través de la medición de los títulos de anticuerpo, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente controlando los signos y síntomas después de la exposición con la cepa de tipo silvestre. La inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por
20 ejemplo, la reducción en los signos clínicos tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, y estado de salud general y actuación del sujeto. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del virus particular usado, o del estado del gato, y puede determinarse por el veterinario.

25 Administración "intranasal" se refiere a la introducción de una sustancia,

tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante la nariz, e implica el transporte de la sustancia principalmente a través de la mucosa nasal.

"Aislado", cuando se usa para describir cualquier sustancia definida particularmente, tal como un polinucleótido o un polipéptido, se refiere a la sustancia separada del entorno celular original en el que la sustancia tal como un polipéptido o un ácido nucleico se encuentra normalmente. Como se usa en este documento, por lo tanto, a modo de ejemplo únicamente, una línea celular recombinante construida con un polinucleótido de la invención hace uso del ácido nucleico "aislado". Como alternativa, la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico puede usarse como tal o como una vacuna y por tanto puede considerarse como aislado puesto que ha sido identificado, separado y hasta cierto punto purificado en comparación a cómo puede existir en la naturaleza. Si la proteína de la cápsida o un fragmento específico inmunogénico de la misma se produce en una bacteria recombinante o en un vector de expresión eucariota que produce el antígeno, se considera que existe como una proteína o ácido nucleico aislado. Por ejemplo, una línea celular recombinante construida con un polinucleótido hace uso de un ácido nucleico "aislado".

"Anticuerpo monoclonal" se refiere a anticuerpos producidos por una única línea de células de hibridoma, todas dirigidas hacia un epítipo de un antígeno particular. El antígeno usado para fabricar el anticuerpo monoclonal puede proporcionarse como proteína aislada del patógeno o el patógeno completo. Un hibridoma es una línea celular clonal que está constituida por células híbridas formadas mediante la fusión de una célula de mieloma y una

109
célula productora de anticuerpo específica. En general, los anticuerpos monoclonales son de origen de ratón; sin embargo, anticuerpo monoclonal también se refiere a una población clonal de un anticuerpo fabricado contra un epítoto particular de un antígeno producido por tecnología de exposición en fago o un procedimiento que sea equivalente a la exposición en fago, o células híbridas de origen no de ratón.

"N días", el intervalo o período de tiempo "N" o "M días" después de un suceso, se refiere, respectivamente, a cualquier momento en el enésimo o emésimo día después del suceso. Por ejemplo, vacunar a un sujeto con una segunda vacuna 3 días después de la administración de una primera vacuna significa que la segunda vacuna se administra en cualquier momento del tercer día después de la primera vacuna. Esta descripción suele aplicarse al intervalo entre la primera y segunda vacunación. Típicamente el intervalo N preferido es de aproximadamente 3 semanas, o 17-25 días, aunque también es común aproximadamente 2-4 semanas o 10-40 días, y las invenciones de este documento son eficaces con el período de tiempo "N" de entre 3 y 120 días.

Administración "oral" o "peroral" se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante la boca e implica ingestión o transporte a través de la mucosa oral (por ejemplo, absorción sublingual o bucal) o ambas.

Administración "oronasal" se refiere a la introducción de una sustancia, tal y como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante la nariz y la boca, como podría producirse, por ejemplo, colocando una o más gotas en la nariz. La administración oronasal implica procesos de transporte asociados con administración oral e intranasal.

"Administración parenteral" se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante una vía que no incluya el tracto digestivo. Administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intramuscular, administración transcutánea, administración intradérmica, administración intraperitoneal, administración intraocular, y administración intravenosa. Para los propósitos de esta descripción, la administración parenteral excluye vías de administración que implican principalmente el transporte de la sustancia a través del tejido de la mucosa en la boca, nariz, tráquea y pulmones.

- 10 "Inmunidad pasiva" se refiere a la protección contra calicivirus felino proporcionada a un gato como resultado de vacunar al gato con una vacuna que comprende anticuerpos contra la cepa FCV o un componente inmunogénico o fragmento de un componente de la misma.

- 15 "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a sustancias, que están dentro del alcance del juicio médico, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de sujetos sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, que se corresponden con una proporción razonable beneficio - riesgo, y eficaces para el uso pretendido.

- 20 "Anticuerpo policlonal" se refiere a una población mezclada de anticuerpos fabricada contra un patógeno o antígeno particular. En general, la población contiene una diversidad de grupos de anticuerpos, cada grupo dirigido contra un epítipo particular del patógeno o antígeno. Para fabricar anticuerpos policlonales, el patógeno completo o un antígeno aislado se introduce por inoculación o infección en un huésped, lo que induce al huésped a fabricar anticuerpos contra el patógeno o antígeno.
- 25

Administración "por vía respiratoria" se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o mediante inhalación de una sustancia nebulizada (atomizada). En administración por vía respiratoria el principal mecanismo de transporte implica la absorción de la sustancia atomizada a través de la mucosa en la tráquea, bronquios, y pulmones y es por lo tanto diferente de la administración intranasal o peroral.

"Dosificación de administración única" significa administrada el o aproximadamente el mismo día, es decir, todos los componentes administrados en aproximadamente 1 día. Los componentes pueden o no estar en un único recipiente.

"Específico para", cuando se usa para describir anticuerpos de la invención, indica que las regiones variables de los anticuerpos de la invención reconocen y se unen a una cepa específica de virus exclusivamente (es decir son capaces de distinguir una proteína de la cápsida de FCV particular de otras proteínas conocidas en virtud a diferencias medibles en la afinidad de unión, a pesar de la existencia de identidad de secuencia localizada, homología o similitud entre proteínas de la cápsida de FCV y dichos polipéptidos). Se entenderá que anticuerpos específicos pueden también interaccionar con otras proteínas (por ejemplo, proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA) a través de interacción con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos, y, en particular, en la región constante de la molécula. Ensayos de selección para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo de la invención se conocen bien y se practican de forma rutinaria en la técnica. Para una descripción exhaustiva de dichos ensayos, véase Harlow y col., (Eds.), Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring

Harbor, NY (1988), Capítulo 6. Los anticuerpos que reconocen y se unen a fragmentos de las proteínas de la cápsida de FCV de la invención también se contemplan, siempre que los anticuerpos sean específicos para proteínas de la cápsida de FCV. Los anticuerpos de la invención pueden producirse usando cualquier procedimiento bien conocido y practicado de forma rutinaria en la técnica.

"Fragmento inmunogénico específico" se entiende como una parte de una secuencia que es reconocible por un anticuerpo que es específico para la secuencia, como se define en detalle a continuación.

10 "Sujeto" se refiere a cualquier animal que tiene un sistema inmune, lo que incluye mamíferos tales como gatos.

"Vacuna de subunidad" se refiere a un tipo de vacuna que incluye uno o más antígenos, pero no todos los antígenos, que se obtienen de o son homólogos a, antígenos de un patógeno de interés, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Dicha composición está sustancialmente libre de células de patógenos intactas o partículas patogénicas, o el lisado de dichas células o partículas. Por tanto, una vacuna de subunidad puede prepararse a partir de polipéptidos inmunogénicos del patógeno o sus análogos, al menos parcialmente purificados o sustancialmente purificados. Los procedimientos para obtener un antígeno o antígenos en la vacuna de subunidad incluyen técnicas de purificación convencionales, producción de recombinantes, o síntesis química.

"TCID₅₀" se refiere a "dosis infecciosa de cultivo tisular" y se define como la dilución de un virus requerida para infectar el 50% de un lote dado de cultivos celulares inoculados. Se pueden usar diversos procedimientos para

calcular TCID₅₀, incluyendo el procedimiento de Spearman-Kärber que se utiliza a lo largo de esta memoria descriptiva. Para una descripción del procedimiento de Spearman-Kärber, véase B.W. Mahy y H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).

- 5 "Cantidad terapéuticamente eficaz", en el contexto de esta descripción, se refiere a una cantidad de un antígeno o vacuna que podría inducir una respuesta inmune en un sujeto (por ejemplo, un gato) que recibe el antígeno o la vacuna que es adecuado para evitar o mejorar signos o síntomas de enfermedad, incluyendo, efectos adversos para la salud o complicaciones de
- 10 los mismos, causados por infección con un patógeno, tal como un virus (por ejemplo FCV), bacteria, parásito u hongo. Puede inducirse inmunidad humoral o inmunidad mediada por células o inmunidad humoral y mediada por células. La respuesta inmunogénica de un animal a una vacuna puede evaluarse, por ejemplo indirectamente a través de la medición de los títulos de anticuerpo,
- 15 ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través del control de los signos y síntomas después de la exposición con la cepa de tipo silvestre. La inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción en los signos clínicos tales como la mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, y estado de salud general y
- 20 actuación del sujeto. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del virus particular usado, del estado del sujeto, y puede determinarse por un veterinario.

- "Tratar" se refiere a invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o evitar un trastorno, o afección o enfermedad al que se aplica dicho término, o para evitar
- 25 uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad.

"Tratamiento" se refiere al acto de "tratar" como se ha definido inmediatamente anteriormente.

"Vacuna" se refiere a una composición que incluye un antígeno y abarca las llamadas "vacunas de subunidad" como se definen a continuación. La administración de la vacuna a un sujeto da como resultado una respuesta inmune. La vacuna puede introducirse directamente en el sujeto por cualquier vía de administración conocida, incluyendo vía parenteral, vía peroral, y similares.

PARTE I

10 VACUNAS, CEPAS DE VIRUS, PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDA, Y ANTICUERPOS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona vacunas que se basan en cepas de FCV vivas o muertas seleccionadas entre el grupo constituido por FCV-21, FCV-49 y FCV26391-4. La invención además proporciona vacunas de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV de las cepas de FCV de la invención o fragmentos inmunogénicos específicos de la misma. La invención proporciona adicionalmente proteínas de la cápsida aisladas obtenidas de las cepas de FCV de la invención o fragmentos inmunogénicos específicos de las mismas.

20 Para cepas de FCV, se induce una buena respuesta inmune mediante un determinante antigénico que surge de la proteína de la cápsida. En este documento se describen y reivindican varias cepas de FCV que incluyen proteínas de la cápsida estrechamente relacionadas y variantes de las mismas. Específicamente, se describe la cepa FCV-21 y la secuencia de proteína (SEC
25 ID N°: 13) y secuencias que tienen 91,2%, 95% y 99% o más identidad; la cepa

FCV-49 y la secuencia de proteína (SEC ID N°: 15) y secuencias que tienen 92,7%, 95% y 99% o más identidad; la cepa FCV-26391-4 y la secuencia de proteína (SEC ID N°: 17) y secuencias que tienen 91,8%, 95% y 99% o más identidad.

5 La vacuna de la presente invención generalmente pretende ser un tratamiento profiláctico que inmunice gatos contra enfermedad causada por cepas virulentas de calicivirus felino. Sin embargo, la vacuna también pretende el tratamiento terapéutico de gatos ya infectados con una cepa virulenta de calicivirus felino. Por ejemplo, una vacuna que comprende anticuerpos
10 producidos inmunizando un huésped heterólogo con cápsida de FCV o componente inmunogénico de la misma, se usa para el tratamiento terapéutico de un gato infectado con calicivirus felino.

Sin embargo, incluso las vacunas que proporcionan inmunidad activa, es decir, vacunas que comprenden cepas de FCV seleccionadas entre el grupo
15 constituido por FCV-21, FCV-49 y FCV 26391-4, o mutantes de las mismas, o proteínas de la cápsida obtenidas de las cepas de FCV de la invención, o un fragmento inmunogénico específico de sus proteínas de la cápsida, puede esperarse que sean eficaces cuando se dan como un tratamiento terapéutico contra diversas enfermedades. Por tanto, la inmunidad que se proporciona por
20 la presente invención puede ser inmunidad activa o inmunidad pasiva, y el uso pretendido de la vacuna puede ser profiláctico o terapéutico.

La vía de administración para una cualquiera de las realizaciones de la vacuna de la presente invención incluye, aunque sin limitación, oronasal, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa,
25 intraarterial, intraocular, y oral así como transdérmica o por inhalación o

116

supositorio. Las vías preferidas de administración incluyen oronasal, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica e inyección subcutánea. La vacuna puede administrarse por cualquier medio que incluya, aunque sin limitación, jeringuillas, nebulizadores, pulverizadores, dispositivos de inyección sin aguja, 5 o pistolas génicas de bombardeo de microproyectiles (bombardeo por biobalística).

La vacuna para una cualquiera de las realizaciones de la presente invención se formula en un vehículo farmacéuticamente aceptado de acuerdo con el modo de administración a usar. Un especialista en la técnica puede 10 fácilmente formular una vacuna que comprende un FCV-21, FCV-49 o FCV 26391-4 vivo o muerto, una proteína de la cápsida obtenida de cualquiera de las cepas de FCV de la invención, o un fragmento inmunogénico de la misma, un vector de virus recombinante que codifica la proteína de la cápsida de FCV-21, FCV-49 o FCV 26391-4 o un fragmento inmunogénico específico de la 15 misma, o una molécula de ADN que codifica la proteína de la cápsida obtenida de FCV-21, FCV-49 o FCV-26391-4 o un fragmento inmunogénico específico de la misma. En casos en que se prefiere la inyección intramuscular, se prefiere una formulación isotónica. Generalmente, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En casos 20 particulares, se prefieren las soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Las formulaciones pueden proporcionar además estabilizantes tales como gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente vasoconstrictor a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se proporcionan estériles y 25 libres de pirógenos. Sin embargo, los especialistas en la técnica saben bien

que las formulaciones preferidas para el vehículo farmacéuticamente aceptado que comprenden las vacunas de la presente invención son los vehículos farmacéuticos aprobados en las normativas promulgadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, o su agencia gubernamental equivalente en un país extranjero tal como Canadá o México o una cualquiera de las naciones Europeas, para vacunas de calicivirus felino vivo, vacunas de calicivirus felino muerto, vacunas de subunidad de polipéptidos (antígeno), vacunas de vector de virus recombinante, vacunas de anticuerpos, y vacunas de ADN. Por lo tanto, el vehículo farmacéuticamente aceptado para la producción comercial de la vacuna de la presente invención es un vehículo que ya está aprobado o que será aprobado por la agencia gubernamental apropiada en los Estados Unidos de América o País Extranjero. La vacuna puede mezclarse además con un adyuvante que es farmacéuticamente aceptable. En ciertas formulaciones de la vacuna de la presente invención, la vacuna se combina con otras vacunas felinas para producir un producto de vacuna polivalente que puede proteger a los gatos contra una amplia diversidad de enfermedades causadas por otros patógenos felinos. Actualmente, los fabricantes comerciales de vacunas felinas, así como los usuarios finales, prefieren productos de vacuna polivalente. Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención proporciona una vacuna polivalente que inmuniza gatos contra calicivirus felino y al menos otro patógeno felino, preferiblemente seleccionado entre el grupo constituido por herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, Chlamydia felina, y virus de la panleucopenia felina.

La inoculación de un gato es preferiblemente mediante una única

vacunación que produce una completa, amplia respuesta inmunogénica. En otra realización de la presente invención, el gato se somete a una serie de vacunaciones para producir una completa, amplia respuesta inmune. Cuando las vacunaciones se proporcionan en una serie, las vacunaciones pueden

5 proporcionarse separadas entre aproximadamente un día hasta cuatro semanas o más. En realizaciones particulares, el gato se vacuna en diferentes sitios simultáneamente. Los detalles adicionales acerca de la vía y administración se encuentran a continuación en la sección titulada "Procedimientos para Inmunizar Gatos contra Calicivirus".

10 Las composiciones de vacuna pueden incluir opcionalmente diluyentes líquidos, semi-sólidos o sólidos farmacéuticamente aceptables (es decir, estériles y no tóxicos) compatibles con vacunas que sirven como vehículos farmacéuticos, excipientes, o medios. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y similares. Los agentes isotónicos

15 pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina entre otros. Cualquier adyuvante conocido en la técnica puede usarse en la composición de vacuna, incluyendo adyuvantes basados en aceite tales como el Adyuvante Completo de Freund y Adyuvante Incompleto de Freund, adyuvantes basados en micolato (por

20 ejemplo, dimicolato de trehalosa), lipopolisacáridos bacterianos (LPS), peptidoglicanos (es decir, mureinas, mucopéptidos, o glicoproteínas tales como N-Opaca, muramil dipéptido [MDP], o análogos de MDP), proteoglicanos (por ejemplo, extraídos de *Klebsiella pneumoniae*), preparaciones de estreptococos (por ejemplo OK432), BiostimTM (por ejemplo 01K2), los "Iscoms" de la Patente

25 Europea 109 942, Patente Europea 180 564 y Patente Europea 231 039,

hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrano, aceites neutros (tales como migliol), aceites vegetales (tales como aceite de cacahuete), liposomas, polioles de Pluronic®. Los adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), alumbre, hidróxido de aluminio en gel, colesterol, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, tales como por ejemplo, adyuvantes completo e incompleto de Freund, Copolímero en bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, adyuvante amina-lípido Avridina, enterotoxina lábil al calor de E. coli (recombinante o de otra manera), toxina del cólera, o muramil dipéptido, entre muchos otros. Las composiciones inmunogénicas pueden además incluir uno o más de otros agentes inmunomoduladores tales como interleuquinas, interferones u otras citoquinas.

Las composiciones inmunogénicas pueden incluir también gentamicina y Mertiolato. Aunque las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por el especialista en la técnica, la presente invención contempla composiciones que comprenden desde aproximadamente 50 µg hasta aproximadamente 2000 µg de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 500 µg/2 ml de dosis de la composición de vacuna. En otra realización preferida, la presente invención contempla composiciones de vacuna que comprenden de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibiótico, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibiótico.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden fabricarse en diversas formas dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas pueden fabricarse en forma de soluciones acuosas estériles o dispersiones adecuadas para uso inyectable, o
5 fabricarse en formas liofilizadas usando técnicas de liofilización. Las composiciones inmunogénicas liofilizadas se mantienen típicamente a aproximadamente 4°C, y pueden reconstituirse en una solución estabilizante, por ejemplo solución salina y/o HEPES, con o sin adyuvante.

Además, las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente
10 invención pueden incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Como se usa en este documento "un vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes
15 de la adsorción, y similares. Los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de que sean compatibles con los componentes de la invención y no perjudiciales para el sujeto a inmunizar. Típicamente, los vehículos serán estériles y libres de pirógenos.

VACUNAS VIVAS

20 En una realización de la vacuna de la presente invención, la vacuna comprende una vacuna de FCV vivo, en la que el componente de FCV se selecciona entre el grupo constituido por FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4. Puesto que estas cepas se aislaron en forma no virulenta se prefieren particularmente para la preparación de una vacuna viva que estimula el sistema
25 inmune del gato sin causar enfermedad.

Se conocen bien en la técnica procedimientos para atenuar adicionalmente los virus, e incluyen procedimientos tales como paso en serie en cultivo celular sobre una línea celular adecuada, o mutagénesis por ultravioleta o química.

5

VACUNAS INACTIVADAS

En otra realización de la presente invención, la vacuna comprende una vacuna de FCV inactivado o muerto que comprende una cepa de FCV seleccionada entre el grupo constituido por FCV-21, FCV-49 y FCV 26391-4. La vacuna inactivada se fabrica mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez que el virus se propaga hasta títulos elevados, sería fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que la masa antigénica del virus pudiera obtenerse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la masa antigénica del virus puede obtenerse por dilución, concentración, o extracción. Todos estos procedimientos se han empleado para obtener masa antigénica viral apropiada para producir vacunas. El calicivirus se inactiva mediante tratamiento con formalina, betapropiolactona (BPL), o etilenimina binaria (BEI), u otros procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica.

La inactivación por formalina se realiza mezclando la suspensión de calicivirus con formaldehído al 37% para una concentración final de formaldehído del 0,05%. La mezcla calicivirus-formaldehído se mezcla mediante agitado constante durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de calicivirus inactivado se ensaya después para virus vivos residuales ensayando para crecimiento sobre una línea celular felina adecuada tal como células CRFK.

La inactivación mediante BEI se realiza mezclando la suspensión de calicivirus de la presente invención con BEI 0,1 M (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N) hasta una concentración final de BEI de 1 mM. La mezcla calicivirus-BEI se mezcla mediante agitado constante durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, seguida de la adición de tiosulfato sódico 1,0 M hasta una concentración final de 0,1 mM. El mezclado se continúa durante dos horas adicionales. La mezcla de calicivirus inactivado se ensaya para calicivirus vivo residual ensayando para el crecimiento sobre una línea celular felina adecuada tal como células NLFK.

El calicivirus inactivado de la presente invención mencionado anteriormente se mezcla con uno cualquiera de los vehículos farmacéuticos para formular vacunas de virus inactivado hasta el nivel de dosificación apropiado. La vacuna inactivada puede además incluir, además del componente de FCV seleccionado entre el grupo constituido por FCV-21, FCV-49 y FCV 26391-4 al menos una cepa de calicivirus felino diferente, preferiblemente seleccionado entre el grupo constituido por FCV-F9, FCV-M8, FCV-255, y FCV-2280. En una realización preferida, la vacuna incluye además una vacuna para inmunizar a un gato contra uno o más patógenos felinos diferentes, preferiblemente seleccionados entre el grupo constituido por herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, Chlamydia felina, y virus de la panleucopenia felina.

VACUNAS RECOMBINANTES

En una realización adicional de la presente invención, la vacuna comprende un vector de virus recombinante que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápsida de FCV descrita en este documento o

un fragmento inmunogénico específico de la misma.

En una realización particular, el vector de virus recombinante es un herpesvirus felino que inmuniza un gato contra el calicivirus felino y el herpesvirus felino. En otra realización, el vector de virus recombinante
5 comprende uno o más antígenos seleccionados preferiblemente entre el grupo constituido por herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, Chlamydia felina, y virus de la panleucopenia felina, virus de la rabia y Bordetella bronchiseptica.

Para fabricar un vector de virus recombinante que exprese una proteína
10 de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, se inserta un ADNc que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma, en el genoma de un vector de virus tal como herpesvirus, poxvirus o adenovirus. La Patente de Estados Unidos N° 5.716.822 de Wardley y col. describe un procedimiento para insertar ADN que
15 codifica la proteína de la cápsida de la cepa calicivirus felino CFI-68 FIV en el gen de timidina quinasa del herpesvirus felino. Otras vacunas de vector de virus recombinante abarcadas por la presente invención, incluyen aunque sin limitación, adenovirus, virus adeno-asociados, parvovirus, y diversos vectores de poxvirus, para expresar la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento
20 inmunogénico específico de la misma. En particular, la presente invención incluye vacunas de vector de poxvirus recombinante que expresan la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, fabricados de acuerdo con los procedimientos mostrados en una cualquiera de las Patentes de Estados Unidos N° 5.338.683 y 5.494.807 de Paoletti y col.,
25 que muestran vacunas de virus recombinante constituidas por virus vaccinia o

124

poxvirus de canario que expresan antígenos extraños; la Patente de Estados Unidos N° 5.266.313 de Esposito y col., que muestra vectores de poxvirus de mapaches recombinantes que expresan antígenos del virus de la rabia; y la Patente de Estados Unidos N° 6.010.703 de Maes y col, que muestra vectores de poxvirus de mapache recombinantes que expresan los antígenos gD o gB del herpesvirus felino.

Para cualquiera de los vectores de virus recombinante mencionados anteriormente, el ADNc que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, está unido de forma operativa a un promotor eucariota en el extremo 5' del ADNc que codifica el antígeno y una señal de terminación eucariota y una señal de poli (A) en el extremo 3' del ADNc que codifica el antígeno. Como se usa en este documento, la expresión "unido de forma operativa" significa que el polinucleótido de la presente invención (en forma de una molécula de ADNc) y un polinucleótido (ADN) que contiene una secuencia de control de expresión, por ejemplo, un promotor de la transcripción y secuencias de terminación, se sitúan en un vector o célula tal que la expresión del antígeno codificado por el ADNc se regula mediante la secuencia de control de expresión. Los procedimientos para clonar ADN tal como el ADNc que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, y para unir de forma operativa el ADN que contiene las secuencias de control de expresión al mismo se conocen bien en la técnica. Son ejemplos de promotores adecuados para expresar la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma en los vectores de virus recombinante, el promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV), el promotor de repeticiones terminales largas del

125

virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR), el promotor inmediato temprano del virus 40 de simios (SV40), y promotores inducibles tales como el promotor de la metalotioneína. Un ejemplo de un ADN que tiene una señal de terminación y una señal de poli (A) es la región tardía de poli (A) de SV 40. Otros ejemplo de un sistema de expresión viral adecuado para producir el antígeno es el sistema de expresión de Sindbis disponible de Invitrogen. El uso de estos vectores y sistemas de expresión disponibles en el mercado se conoce bien en la técnica.

VACUNA DE MOLÉCULA DE ADN O ÁCIDO NUCLEICO

En otra realización más de la presente invención, la vacuna se proporciona en forma de vacuna de molécula de ADN o ácido nucleico que provoca una respuesta inmune activa en el gato. La vacuna de molécula de ADN está constituida por ADN que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma de una proteína de la cápsida de FCV descrita en este documento.

En una realización preferida, la vacuna de molécula de ADN comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 12, 14 ó 16, o un fragmento de la misma que codifica SEC ID N°: 13, 15 ó 17, o un fragmento inmunogénico específico de SEC ID N°: 13, 15 ó 17. El ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma se une de forma operativa a o cerca de un promotor transcripcional. Esto permite la transcripción de la proteína de la cápsida, o un fragmento inmunogénico específico de la misma, a partir del ácido nucleico cuando el ácido nucleico se inocula en las células del gato. Preferiblemente la molécula de ADN es un plásmido. Los promotores que son útiles para vacunas de ADN se conocen bien en la técnica e incluyen aunque sin limitación, el promotor RSV LTR, el

promotor inmediato temprano de CMV, y el promotor del antígeno T de SV40. Se prefiere además que el ácido nucleico esté unido de forma operativa, en o cerca del codón de terminación de la secuencia que codifica la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma, a un fragmento de ácido nucleico que comprende una señal de terminación de la transcripción y una señal de reconocimiento de poli (A). La vacuna de ADN se proporciona al gato en un vehículo farmacéuticamente aceptado, o en un vehículo de liposoma o de lípido similar a los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.703.055 de Felgner. La vacuna de ADN puede proporcionarse al gato mediante una diversidad de procedimientos tales como inyección intramuscular, inyección Intrajet, o bombardeo por biobalística. La fabricación de vacunas de ADN y los procedimientos para su uso se proporcionan en las Patentes de Estados Unidos N° 5.589.466 y 5.580.859 ambas de Felgner. Finalmente, un procedimiento para producir plásmidos de ADN de calidad farmacéutica se muestra en la Patente de Estados Unidos N° 5.561.064 de Marquet y col.

Por lo tanto, usando los procedimientos mencionados anteriormente, las vacunas de ADN que expresan la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, se usan para inmunizar gatos contra calicivirus felino virulento. La ventaja de la vacuna de ADN es que la molécula de ADN se propaga convenientemente en forma de plásmido que es un medio sencillo y barato para producir una vacuna, y puesto que la vacuna no está viva, muchos de los problemas regulatorios asociados con las vacunas de vectores de virus recombinantes vivos no son problemas con las vacunas de ADN. Un especialista en la técnica podría apreciar que la vacuna de ADN de la

presente invención puede comprender ácidos nucleicos producidos de forma sintética que se fabrican mediante procedimientos de síntesis química bien conocidos en la técnica.

PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE FCV AISLADA Y PURIFICADA

5 En otra realización más de la presente invención, la vacuna está constituida por la proteína de la cápsida de FCV aislada y purificada o un fragmento inmunogénico específico de la misma. En particular, una vacuna en la que la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:

10 13, 15, 17. Preferiblemente, la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma se produce en una bacteria recombinante o un vector de expresión eucariota que produce el antígeno que puede aislarse y purificarse para fabricar la vacuna. Por ejemplo, la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma se produce en un

15 microorganismo tal como bacterias, levaduras, u hongos, en una célula eucariota tal como una célula de mamífero o de insecto, o mediante un vector de virus recombinante tal como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus Semliki Forest, baculovirus, bacteriófago, virus Sindbis, o virus Sendai. Las bacterias adecuadas para producir la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento

20 inmunogénico específico de la misma incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Tipos de levadura adecuados para expresar la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida* o cualquier

25 otra levadura capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Procedimientos para

128
usar las bacterias, células eucariotas o vectores de virus recombinantes anteriormente mencionados para producir antígenos para vacunas se conocen bien en la técnica.

Para producir la vacuna constituida por la proteína de la cápsida o un
5 fragmento inmunogénico específico de la misma, el ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, se clona en un plásmido, y el ácido nucleico se une de forma operativa a un promotor que efectúa la expresión de la proteína de la cápsida o de un fragmento inmunogénico específico de la misma en un microorganismo.
10 Promotores adecuados incluyen, aunque sin limitación, el promotor del fago T7, el promotor del fago T3, el promotor de β -galactosidasa, y el promotor del fago Sp6. La expresión de la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma en un microorganismo permite a la proteína de la cápsida producirse usando tecnologías de fermentación que se
15 usan comercialmente para producir grandes cantidades de polipéptidos antigénicos recombinantes. Los procedimientos para aislar y purificar antígeno se conocen bien en la técnica e incluyen procedimientos tales como filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, o centrifugado.

20 Para facilitar el aislamiento de la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, se fabrica un polipéptido de fusión en el que la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma se une a otro polipéptido que permite el aislamiento por cromatografía de afinidad. Preferiblemente, un polipéptido de fusión se fabrica
25 usando uno de los sistemas de expresión que se muestran a continuación. Por

ejemplo, la secuencia de ácido nucleico ADNc que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma se une en el extremo 5' o en el extremo 3' a un ácido nucleico que codifica un polipéptido. Los ácidos nucleicos se unen en el marco de lectura del codón apropiado para permitir la producción de un polipéptido de fusión en el que el extremo amino y/o carboxilo de la proteína de la cápsida o parte de la misma se fusiona a un polipéptido que permite la recuperación simplificada del antígeno en forma de polipéptido de fusión. El polipéptido de fusión puede también evitar la degradación del antígeno durante la purificación. Aunque una vacuna que comprende el polipéptido de fusión es eficaz, en algunos casos puede ser deseable retirar el segundo polipéptido después de la purificación. Por lo tanto, también se contempla que el polipéptido de fusión contenga un sitio de escisión en la unión entre el antígeno y el polipéptido. El sitio de escisión está constituido por una secuencia de aminoácidos que se escinde con una enzima específica para la secuencia de aminoácidos en el sitio. Ejemplos de dichos sitios de escisión que se contemplan, incluyen el sitio de escisión por enteroquinasa que se escinde mediante enteroquinasa, el sitio de escisión por factor Xa que se escinde mediante el factor Xa, y el sitio de escisión por GENENASE que se escinde mediante GENENASE (GENENASE es una marca comercial de New England Biolabs, Beverly, Mass). Los siguientes son procedimientos para producir la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma en forma de polipéptido de fusión o en forma de un antígeno aislado libre del polipéptido.

Un ejemplo de un sistema de expresión procariota para producir la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la

misma en forma de polipéptido de fusión para uso en vacunas, es el Sistema de Fusión de Genes de Glutation S-transferasa (GST) disponible de Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J., que usa el plásmido del vector de expresión pGEX-4T-1. El ADNc que codifica la proteína de la cápsida o un
5 fragmento inmunogénico específico de la misma, se fusiona en el marco de lectura de codón apropiado con el ADN que codifica GST. La parte de GST del polipéptido de fusión permite la purificación rápida del polipéptido de fusión usando cromatografía de afinidad a glutation Sefarosa 4B. Después de la purificación, la parte de GST del polipéptido de fusión puede retirarse mediante
10 escisión con una proteasa específica de sitio tal como trombina o factor Xa para producir un antígeno libre del polipéptido GST. La proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma, libre del polipéptido GST, se produce mediante un segundo turno de cromatografía de afinidad a glutation Sefarosa 4B.

15 Otro procedimiento para producir una vacuna que comprende la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, es un procedimiento que une en fase el ADNc que codifica el antígeno y codones de ADN que codifican polihistidina. La polihistidina preferiblemente comprende
seis restos de histidina que permiten la purificación del polipéptido de fusión por
20 cromatografía de afinidad a metal, preferiblemente cromatografía de afinidad a níquel. Para producir la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma libre de la polihistidina, se fusiona un sitio de escisión tal como un sitio de escisión por enteroquinasa en el marco de lectura apropiado entre los codones que codifican la polihistidina y los codones que
25 codifican el antígeno. El antígeno se libera de la polihistidina mediante escisión

con enteroquinasa, seguida de un segundo turno de cromatografía de afinidad a metal que une la polihistidina libre. Este procedimiento demostró ser útil para preparar el antígeno LcrV de *Y. pestis*, que se describe en Motin y col. (Infect. Immun. 64: 4313-4318 (1996)). El Sistema Xpress disponible en Invitrogen, 5 Carlsbad, California, es un ejemplo de un kit comercial que está disponible para fabricar y después aislar proteínas de fusión polipéptido-polihistidina.

Otro procedimiento más para producir una vacuna que comprende la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, usa un procedimiento descrito por Motin y col., Infect. Immun. 64: 3021- 10 3029 (1995). Motin y col., describieron un ADN que codifica un polipéptido de fusión constituido por el ADN que codifica un antígeno unido a un ADN que codifica una parte de proteína A en la que el ADN que codifica un sitio de escisión por enteroquinasa se interpone en el marco de lectura del codón apropiado entre el ADN que codifica la proteína A y el antígeno. La proteína A 15 permite al polipéptido de fusión aislarse mediante cromatografía de afinidad a IgG, y la proteína de la cápsida, libre de la proteína A se produce mediante escisión con enteroquinasa. La proteína A se retira después mediante un segundo turno de cromatografía de afinidad a IgG.

Otro procedimiento para producir una vacuna que comprende la proteína 20 de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma se basa en procedimientos descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 5.725.863 de Daniels y col., que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. El procedimiento de Daniels y col., puede usarse para fabricar la vacuna de proteína de la cápsida de FCV que está constituida 25 por una molécula de enterotoxina en la que cada molécula tiene insertada en la

misma más de 100 restos de aminoácidos de la proteína de la cápsida de FCV. Otros procedimientos para fabricar vacunas de polipéptido de fusión que pueden usarse para fabricar las vacunas de la presente invención se describen en Patente de Estados Unidos N° 5.585.100 de Mond y col., y Patente de Estados Unidos N° 5.589.384 de Liscombe. Finalmente, el Sistema de Fusión y Purificación pMAL disponible en New England Biolabs es otro ejemplo de un procedimiento para fabricar un polipéptido de fusión en el que una proteína de unión a maltosa se fusiona a la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma. La proteína de unión a maltosa facilita el aislamiento del polipéptido de fusión por cromatografía de afinidad a amilosa. La proteína de unión a maltosa puede unirse al antígeno mediante uno de los sitios de escisión mencionados anteriormente lo que permite al antígeno fabricarse libre de la proteína de unión a maltosa.

Aunque los procedimientos bacterianos se usan para producir proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma para vacunas, puede ser deseable producir la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma en un sistema de expresión eucariota. Un sistema particularmente útil es el sistema de expresión de baculovirus que se describe en Patente de Estados Unidos N° 5.229.293 de Matsuura y col., que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Vectores de expresión de baculovirus adecuados para producir la proteína de cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma son los vectores pPbac y pMbac de Stratagene; y el vector Bac-N-Blue, el vector pBlueBac4.5, pBlueBacHis2-A,B,C, y el pMelBac disponibles en Invitrogen, Carlsbad, Calif.

Otro sistema eucariota útil para expresar la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma para vacunas, es un sistema de expresión en levadura tal como el Sistema de Expresión y Purificación de Proteínas en levadura ESP disponible en Stratagene. Otro sistema de expresión en levadura es uno cualquiera de los sistemas de expresión basados en *Pichia* de Invitrogen. La presente invención también abarca sistemas de expresión en mamíferos. Ejemplos de sistemas de expresión en mamíferos son el sistema LacSwitch II, el fagémido pBK, el sistema del vector pXT1, y el sistema del vector pSG5 de Stratagene; el sistema del vector de expresión de mamíferos pTargetT, el vector de expresión de mamíferos pSI, el vector de expresión de mamíferos pCI, y los vectores pAdVantage disponibles de Promega Corporation, Madison, Wis.; y el Sistema de Expresión en Mamíferos inducible por Ecdisona, pCDM8, pcDNA1.1 y pcDNA1.1/Amp disponibles en Invitrogen.

La presente invención incluye además una realización constituida por vacunas que comprenden la proteína de la cápsida de FCV o epítopes particulares de la proteína de la cápsida como componentes de un sistema de liberación de esporas estable al calor fabricado de acuerdo con el procedimiento mostrado en la Patente de Estados Unidos Nº 5.800.821 de Acheson y col., que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula bacteriana manipulada genéticamente que contiene un ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma. Cuando la vacuna de esporas bacterianas recombinantes se administra por vía oral al gato, las esporas germinan en el tracto gastrointestinal del gato y

las bacterias expresan la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma, que se pone en contacto con el sistema inmune del gato y provoca una respuesta inmune. La vacuna tiene la ventaja de ser estable al calor; por lo tanto puede almacenarse a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo indefinido.

VACUNAS DE INMUNIDAD PASIVA

Aunque las realizaciones anteriores de la presente invención proporcionan inmunidad activa contra calicivirus felino, la presente invención comprende además, vacunas que proporcionan inmunidad pasiva para calicivirus felino. Una vacuna que provoca inmunidad pasiva contra calicivirus felino está constituida por anticuerpos policlonales o monoclonales que son contra la proteína de la cápsida de FCV, un fragmento inmunogénico específico de la misma o el virus FCV completo.

Para fabricar una vacuna de inmunidad pasiva que comprende anticuerpos policlonales, la proteína de la cápsida FCV de la misma, o un fragmento inmunogénico específico de la misma se inyecta en un huésped adecuado para preparar los anticuerpos, preferiblemente el huésped es un caballo, cerdo, conejo, oveja o cabra. Procedimientos para producir vacunas de anticuerpos policlonales a partir de estos huéspedes se conocen bien en la técnica. A modo de ejemplo, la proteína de la cápsida o un fragmento inmunogénico específico de la misma o la cápsida del calicivirus FCV completo se mezcla con un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund o el menos tóxico TiterMax disponible en CytRx Corp., Norcross, Ga., que después se administra al huésped mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. La producción de anticuerpos se controla, y cuando se ha producido

135
suficiente anticuerpo, se retira el suero del huésped y se recupera preferiblemente el anticuerpo del suero.

La vacuna de inmunidad pasiva puede comprender uno o más anticuerpos monoclonales contra 1 o más epítopes de la proteína de la cápsida de FCV o el virus FCV completo. Procedimientos e hibridomas para producir anticuerpos monoclonales se conocen bien en la técnica. Aunque los anticuerpos monoclonales pueden fabricarse usando tecnologías de hibridoma bien conocidas en la técnica, los anticuerpos monoclonales contra el antígeno pueden también fabricarse de acuerdo con los procedimientos de exposición en fago tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.977.322 de Marks y col., que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Anticuerpos felinizados contra la proteína de la cápsida o parte de la misma pueden fabricarse de acuerdo con procedimientos que se han usado para humanizar anticuerpos, tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.693.762 y 5.693.761 ambas de Queen y col., que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Un kit de exposición en fago que es útil para fabricar anticuerpos monoclonales es el Sistema de Anticuerpos en Fago Recombinante disponible de Amersham Pharmacia Biotech.

20

ANTICUERPOS, POLICLONALES Y MONOCLONALES

La invención también comprende, describe y reivindica varios anticuerpos monoclonales muy importantes. Estos anticuerpos se han desarrollado en este documento para identificar rápidamente y, en algunos casos, definir las cepas virales descritas en este documento. Ejemplos particulares de anticuerpos monoclonales y sus descripciones pueden

25

encontrarse en los siguientes ejemplos. En particular, véase **EJEMPLO 1-2 y TABLA 1-2** y especialmente **EJEMPLO 1-8, TABLA 1-4**.

Los siguientes ejemplos pretenden promover, pero no limitar una mayor comprensión de la presente invención

5

PARTE 1 EJEMPLOS

EJEMPLO 1-1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FCV-21

Calicivirus felino (FCV) de la cepa 21 (FCV-21) se recogió en junio de 1993 de una exposición de gatos en Ann Arbor, Michigan. Se diluyó en microtubos de 96 pocillos que contenían medio al 1% y se hicieron diluciones
10 1:10. Se añadieron 100 µl de la muestra diluida a 100 µl de células CRFK en una placa de 96 pocillos.

El virus FCV-21 se purificó tres veces mediante dilución limitada en placas de 96 pocillos. El sobrenadante viral de la purificación final se retiró y se usó para infectar células CRFK cultivadas hasta una confluencia del 75% en un
15 matraz T25. Cuando se observó el 100% de CPE, la suspensión se congeló/ descongeló tres veces y se trasladó en alícuotas a viales de congelación (1 ml/vial). El título de esta solución madre viral se determinó como $1,5 \times 10^8$ TCID₅₀/ml.

FCV-21 se depositó con la American Type Culture Collection (ATCC),
20 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, Estados Unidos, y se le asignó el número de acceso de la ATCC PTA-_____.

EJEMPLO 1-2. INMUNOFLUORESCENCIA Y ELISA DE FCV-21 USANDO DIVERSOS ANTICUERPOS MONOCLONALES COMERCIALES O PRE-EXISTENTES

25 Para el ensayo de inmunofluorescencia (IFA), se usó una solución

madre viral de FCV-21 para infectar una placa de 24 pocillos sembrada con células NLFK cultivadas hasta una confluencia de aproximadamente el 90%. Aproximadamente 20 horas después de la infección, se lavó la placa 2 veces con PBS x 1 y se fijó con acetona al 80%. Se diluyeron diversos anticuerpos monoclonales hasta aproximadamente 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se añadieron a pocillos individuales de la placa (0,2 ml/pocillo). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente (TA) con agitación, cada pocillo se lavó dos veces con PBS x 1, y se añadió un anticuerpo secundario (anti-ratón marcado con FITC, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Después de cubrir la placa con papel de aluminio e incubar durante 10 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación, cada pocillo se lavó dos veces con PBS 1 x y se secó al aire. Cada pocillo se observó después con un microscopio de fluorescencia para ver su intensidad de tinción con FITC.

Para el ensayo ELISA, se revistió una placa de ELISA de 96 pocillos con 200 μl de un anticuerpo policlonal anti-FCV de conejo (Pfizer nº 16), diluido a 15 1:1500 en tampón carbonato de sodio (1,59 g de Na_2CO_3 y 2,93 g de NaHCO_3 disueltos en 1 litro de agua). La placa se incubó a 4°C durante una noche. La placa se lavó tres veces con PBS x 1 (pH 7,4) que contenía un 0,05% de Tween-20 (PBST), después se bloqueó con 200 μl de caseína al 1% en PBST durante una hora a 37°C. Se diluyeron diversos anticuerpos monoclonales 20 hasta aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se añadieron a pocillos individuales (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$). Cada muestra se hizo por triplicado. Después de la incubación a 37°C durante una hora, cada pocillo se lavó 3 veces con PBST, y se incubó con 100 μl de inmunoglobulina IgG (H+L) Anti-Ratón de Cabra AffiniPure conjugada con peroxidasa diluida al 1:200 (Jackson ImmunoResearch, cat. Nº 715-035-25 150) durante 1 hora a 37°C. Cada pocillo se lavó después tres veces con

PBST, seguido de la adición de 100 µl de sustrato de peroxidasa ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat. N° 50-66-18) a cada pocillo. Después de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, la placa se leyó a 405-490 nm (longitud de onda dual) con un lector de ELISA. La actividad específica se calculó en base a la proporción señal/ruido.

Los conjuntos de datos a partir de los ensayos de IFA y ELISA correlacionaban bien entre ellos (TABLA 1-2), e indicaban que el FCV-21 es inmunológicamente distinto del F9, una cepa de vacuna de FCV usada comúnmente. Dos anticuerpos monoclonales (FCV 1-43 y MAB791P) reaccionaron con F9, pero no con FCV-21 (TABLA 1-2).

TABLA 1-2. SUMARIO DE AFINIDADES DE DIVERSOS ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA CEPAS DE FCV F9 Y FCV-21

	<u>Fuente</u>	<u>Catálogo/N° de I.D.</u>	<u>IFA</u>		<u>ELISA</u>	
			<u>F9</u>	<u>FCV-21</u>	<u>F9</u>	<u>FCV-21</u>
1	Accurate Chemical	YVS7401	+++	++	17	16
2	Accurate Chemical	YVS7402	-	-	1	1
3	Accurate Chemical	MEDCLA3 09	++++	++++	8	3
4	Chemicon	MAB8962	++	++	23	24
5	Cortex Biochem	CR1260M	+	+	11	12
6	Custom Monocolonals, Int.	S1-9	+++	+++	27	24
7	Custom Monocolonals, Int	FCV 1-43	+++	-	5	1

8	Custom Monoclonals, Int	FCV8-1A	+++	+++	5	13
9	Maine Biotech	MAB790P	++++	++++	26	26
10	Maine Biotech	MAB791P	+++	-	4	1
11	Novocastra Lab	NCL-1G9	+++	+++	17	5
12	Fabricación propia (Pfizer)	1-4 Anticuerpo monoclonal	-	-	1	1
13	Fabricación propia (Pfizer)	1-12 Anticuerpo monoclonal	++++	+++	12	1
14	Fabricación propia (Pfizer)	3-3 Anticuerpo monoclonal	++++	++++	22	25
15	Fabricación propia (Pfizer)	3-5 Anticuerpo monoclonal	++++	++++	21	22
16	Fabricación propia (Pfizer)	Suero de conejo	++++	++++		
17	Biocor/Pfizer	S1.9A1A	++++	++++	29	33

EJEMPLO 1-3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA CÁPSIDA DE FCV-21

Se aisló ARN total del sobrenadante de un cultivo celular infectado con FCV-21 usando el reactivo TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA). Una preparación de ADNc de "primera cadena" se sintetizó usando cebadores aleatorios y transcriptasa inversa-Superscript-II (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó usando la polimerasa XL rTth (Applied Biosystems; Foster City, CA) y cebadores de oligonucleótidos DEL-653 (SEC ID N°: 1) y DEL-651 (SEC ID N°: 2). El producto de PCR resultante se secuenció usando química BigDye y un

Analizador Genético ABI377. La secuencia de la cápsida completa se enumera como **SEC ID N°: 12** para secuencia de nucleótidos y **SEC ID N°: 13** para la secuencia de aminoácidos codificada.

EJEMPLO 1-4. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FCV-49

5 El calicivirus felino (FCV) cepa 49 (FCV-49, también llamado PHA-49) se recogió en 1993 de una exposición de gatos de Philadelphia, PA. La muestra se diluyó en microtubos de 96 pocillos que contenían medio al 1%, y se hicieron diluciones 1:10. Se añadieron 100 µl de la muestra diluida a 100 µl de células CRFK en una placa de 96 pocillos. El virus FCV-49 se purificó 3 veces
10 mediante dilución limitada en placas de 96 pocillos. El sobrenadante viral de la purificación final se retiró y se usó para infectar células CRFK cultivadas hasta una confluencia del 75% en un matraz T25. Cuando se observó un 100% de CPE, la suspensión se congeló/descongeló 3 veces y se trasladó en forma de alícuotas a viales de congelación (1 ml/vial). El título de esta solución madre
15 viral se determinó como $6,8 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

FCV-49 se depositó con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, Estados Unidos, y se le asignó el número de acceso de la ATCC PTA-_____.

EJEMPLO 1-5. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA CÁPSIDA DE FCV-49

20 Se aisló ARN total del sobrenadante de un cultivo celular infectado con FCV-49 usando reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Una preparación de ADNc de "primera cadena" se sintetizó usando cebadores aleatorios y la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó usando la polimerasa XL rTth (Applied Biosystems; Foster City, CA) y
25 cebadores de oligonucleótidos DEL-653 (**SEC ID N°: 1**) y DEL-651 (**SEC ID N°:**

2). El producto de PCR resultante se secuenció usando química BigDye y un Analizador Genético ABI377. La secuencia de la cápsida completa se muestra como **SEC ID N°: 14** para la secuencia de nucleótidos y **SEC ID N° 15** para la secuencia de aminoácidos codificada.

5 **EJEMPLO 1-6. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FCV-26391-4**

El calicivirus felino (FCV) cepa 26391-4 (FCV-26391-4) se recogió en 2003 de la Humane Society of Bay County (Panama City, Florida). Se purificó una vez mediante dilución limitada en una placa de 96 pocillos que contenía medio DMEM (Invitrogen) con suero fetal bovino al 2%. El virus purificado se
10 usó después para infectar un matraz T150 que contenía células NLFK (Norden Lab Feline Kidney). Una vez que se alcanzó un 100% de CPE, la suspensión se congeló/descongeló una vez y se trasladó en forma de alícuotas a viales de congelación (0,85 ml/vial). El título de esta solución madre viral se determinó como $5,6 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

15 FCV-26391-4 se depositó con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, Estados Unidos, y se le asignó el número de acceso de la ATCC PTA-_____.

EJEMPLO 1-7. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA CÁPSIDA DE FCV-26391-4

20 Se aisló ARN total del sobrenadante de un cultivo celular infectado con FCV26391-4 usando un kit QIAamp de aislamiento de ARN Viral. (Qiagen; Valencia, CA). Se usó aproximadamente 1 µg de ARN viral en RT-PCR (RT-PCR SuperScript de una etapa con Taq de Platino; de Invitrogen). Las condiciones de reacción fueron: 30 min a 50°C; 2 min a 94°C; seguido de 40
25 ciclos de 15 seg. a 94°C; 30 seg. a 55°C, y 2 min a 70°C; seguidos de una

incubación final a 72°C durante 10 min, y almacenamiento a 4°C. Los cebadores usados fueron FCV-N2 (SEC ID N°: 3) y FCV-cebador 2 (SEC ID N°: 9). El producto de PCR se secuenció después usando diversos cebadores de oligonucleótidos (SEC ID N°: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). La secuencia de la cápsida completa para FCV 26391-4 se muestra como SEC ID N°: 16 para la
5 secuencia de nucleótidos y SEC ID N°: 17 para la secuencia de aminoácidos codificada.

Las secuencias de aminoácidos de los genes de la cápsida de FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4 se alinearon con todas las secuencias de las cápsidas de FCV de longitud completa disponibles en GenBank. El alineamiento se creó
10 usando el algoritmo ClustalW (Thompson y col., 1994), la matriz de peso PAM250 (Dayhoff y col., 1978) y parámetros del programa por defecto (MegAlign; DNASTAR, Inc; Madison, WI). La identidad entre las secuencias de la proteína de la cápsida de FCV-21 y FCV-213-95, la más alta entre todas las
15 entradas en el GenBank es del 90,7%. Las secuencias de la cápsida de FCV-49 y FCV-213-95 son idénticas en un 92,2%. Las secuencias de la cápsida de FCV-26391-4 y FCV CFI-68 son idénticas entre sí en un 91,3%.

Se presenta una única secuencia de la cápsida para FCV-21, FCV-49, y FCV-26391-4, y se basa en la secuenciación directa de los productos de PCR
20 obtenidos. Sin embargo, cada una de estas secuencias representa la secuencia media, o secuencia consenso, entre una población de cuasiespecies virales, que se sabe que existen dentro de las poblaciones de ARN viral (para una revisión, véase Domingo y col., Virus Res. 82:39-44; 2002). Las cuasiespecies son un resultado directo de errores que se producen durante la
25 replicación del genoma de ARN, generando progenie que tiene mutaciones

dentro de su genoma. Por lo tanto, se espera que existan de forma natural variantes menores de las secuencias de la cápsida para estas y otras secuencias de genes de la cápsida de FCV. Sin embargo, la distribución de mutaciones dentro de cada uno es tal que tienen poco/ningún efecto en la
5 identidad general entre cepas, incluyendo FCV-21, FCV-49, y FCV-26391-4.

EJEMPLOS 1-8. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS PARA FCV-21

A. Purificación de FCV-21. Se centrifugaron aproximadamente 200 ml de sobrenadante del cultivo celular de células NLFK infectadas con FCV-21 a
10 3.000 rpm durante 30 minutos a 10°C. 25 ml del sobrenadante se transfirieron a tubos de centrifuga Beckman Ultraclear, y 10 ml de una solución de sacarosa al 10% se colocaron en el fondo del tubo. Los tubos se centrifugaron después a 27.000 rpm durante 2 horas a 15°C. Después del centrifugado, los sobrenadantes se retiraron y se descartaron, y los sedimentos se
15 resuspendieron en 250 µl de agua estéril. La concentración de proteína se determinó como 7 mg/ml usando el Kit de Ensayo de Proteínas Micro BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

INMUNIZACIÓN DE RATONES Y GENERACIÓN DE CLONES DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA

20 Se inyectaron aproximadamente 100 µg de proteína de virus FCV-21 purificada a cada ratón junto con adyuvante de Freund. Se vacunaron ocho ratones. Se realizaron dos inmunizaciones de refuerzo con 100 µg de FCV-21 purificado con adyuvante RIBI en un intervalo de 4 semanas. Se determinó que las respuestas inmunes para los ocho ratones tenían un título de 31.250 o
25 superior en ELISA usando FCV-21 purificado. La fusión de células se realizó

144
para crear clones de hibridoma. 68 de dichos clones celulares se cultivaron y el sobrenadante se ensayó para su reactividad con FCV-21.

Para este ELISA, una placa de ELISA de 96 pocillos se revistió con 100 µl de FCV purificado a una concentración de 5 µg/ml, diluido en PBS x 1. La
5 placa se secó a 37°C durante una noche sin estar cubierta en una incubadora no humidificada. El virus en la placa se fijó aplicando 0,1 ml de metanol e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. La placa se lavó después 8 veces con agua destilada, después se bloqueó con 200 µl de suero de fabricación propia al 10% en PBS x 1 durante una noche a 4°C. La placa se
10 lavó de nuevo 8 veces con agua destilada. Se añadieron diversas diluciones de muestras de suero de ratón a pocillos individuales (100 µl/pocillo). Cada muestra se hizo por triplicado. Después de la incubación a 37°C durante 1 h, cada pocillo se lavó 3 veces con PBST, y se incubó con 100 µl de IgG (H+L) anti-Ratón de Cabra AffiniPure conjugada con peroxidasa, diluida a 1:200
15 (Jackson ImmunoResearch, cat. N° 715-035-150) durante 1 hora a 37°C. Cada pocillo se lavó después 3 veces con PBST, seguido de la adición de 100 µl de sustrato de peroxidasa ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat N° 50-66-18) a cada pocillo. Después de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, la placa se leyó a 405-490 nm (longitud de onda dual) con un lector
20 de ELISA. La actividad específica se calculó en base a la proporción señal/ruido.

REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS DE FCV-21

Los sobrenadantes de los clones de células de hibridoma anteriores se
25 usaron para ensayar su reactividad para FCV-21 así como para F9 en ensayo

de ELISA sandwich. En resumen, una placa de ELISA de 96 pocillos se revistió con 200 µl de un anticuerpo policlonal anti-FCV de conejo (Pfizer N° 16), diluido en tampón carbonato de sodio 1:1.500 (1,59 g de Na₂CO₃ y 2,93 g de NaHCO₃ disueltos en 1 litro de agua). La placa se incubó a 4°C durante una noche. La

5 placa se lavó 3 veces con PBS x1 (pH 7,4) que contenía un 0,05% de Tween-20 (PBST), después se bloqueó con 200 µl de caseína al 1% en PBST durante una hora a 37°C. Los sobrenadantes de FCV-21 y F-9 se añadieron a cada pocillo a una dilución de 1:10. Después de la incubación a 37°C durante 1 hora, las placas se lavaron y se añadieron diversos sobrenadantes de hibridoma y

10 sus diversas diluciones a pocillos individuales (100 µl/pocillo) por triplicado. Las placas se incubaron después a 37°C durante 1 hora, se lavaron 3 veces con PBST, y se incubaron con 100 µl de IgG (H+L) anti-Ratón de Cabra AffiniPure conjugado con peroxidasa, diluida a 1:200 (Jackson ImmunoResearch, Cat. N° 715-035-150) durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, se añadieron 100 µl de

15 sustrato de peroxidasa ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, Cat N° 50-66-18) a cada pocillo. Después de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, la placa se leyó a 405-490 nm (longitud de onda dual) con un lector de ELISA. La actividad específica se calculó en base a la proporción señal/ruido.

20 **TABLA 1-3. EXPLORACIÓN DE ELISA DE DIVERSOS SOBRENADANTES DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA PARA SU REACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA FCV-21 FRENTE A F9.**

	Anticuerpos monoclonales sin diluir		Dilución 1:10 de Anticuerpos monoclonales		Dilución 1:50 de Anticuerpos monoclonales	
Anticuerpos monoclonales/Virus	PHA-21	F9	PHA-21	F9	PHA- 21	F9
sob 1	30	1	3	1	2	1
sob 2A	2	1				
sob 2B	3	1				
sob 3	29	3	21	1	16	1
sob 4	1	1				
sob 5	1	1				
sob 6	1	1				
sob 7	26	3	22	1	17	1
sob 8	9	8	3	1		
sob 9A	1	1				
sob 9B	1	1				
sob 10	15	13	10	6		
sob 11	1	1				
sob 13	27	22	19	14		
sob 14A	2	2				
sob 14B	5	3				
sob 15	1	1				
sob 16	21	2	5	1	2	1

sob 17	20	1	14	1	12	1
sob 18	27	22	25	11		
sob 20	1	1				
sob 21	17	9	7	2	2	1
sob 22	2	1				
sob 23	12	1	10	1	10	1
sob 24	14	14	1	1		
sob 26	1	1				
sob 27	15	7	8	3		
sob 28	1	2				
sob 29	24	8	23	1	29	1
sob 30	17	7	13	1	18	1
sob 31	19	19	16	11		
sob 32	28	16	21	12	18	10
sob 33	20	17	15	13		
sob 34	20	18	15	13		
sob 35	14	12	9	6		
sob 36	17	5	15	1	21	1
sob 37	12	4	3	1	1	1
sob 38	6	5				
sob 39	23	15	17	6		
sob 40	16	3	10	1	13	1
sob 41	19	7	14	1		
sob 42	13	1	15	1	17	1

sob 43	1	1				
sob 44	9	4	4	1		
sob 45	1	1				
sob 46	8	4	3	2		
sob 47	4	3				
sob 48	11	11	5	4		
sob 49	12	13	8	7		
sob 50	1	1				
sob 51	2	2				
sob 52	4	10				
sob 53	12	2	10	1	3	1
sob 54	1	1				
sob 55	19	18	25	15		
sob 56	8	4	6	1		
sob 57	1	1				
sob 58	2	8				
sob 59	18	1	20	1	16	1
sob 60	31	1	35	1	21	1
sob 61	18	4	33	1	29	1
sob 62	1	1				
sob 63	1	1				
sob 64	1	1				
sob 65	3	5				
sob 66	4	5				

sob 67	21	12	22	3		
sob 69	1	1				

B. Anticuerpos monoclonales específicos para FCV-21 y no para otras cepas de FCV. Se eligieron dieciocho clones de células de hibridoma (3, 7, 17, 23, 27, 29, 30, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 53, 56, 59, 60 y 61) para ensayar adicionalmente su especificidad para FCV-21. Se usaron once virus FCV en el ensayo (FCV-21, 49, 26391-4, F9, CFI-68, 33585, 89391, 255, J-1, 2280 y H). De nuevo se usó ELISA sandwich, como se ha descrito anteriormente. Los resultados se resumen en la **Tabla 1-4**.

TABLA 1-4. REACTIVIDAD DE SOBRENADANTES MONOCLONES CONTRA DIVERSAS CEPAS DE FCV

Año de aislamiento	1993	1993	2003	1960	desconocido	2000	2000	1970	1984	1983	1990
Anticuerpo monoclonal	21	49	26391-4	F9	CFI-68	33585	89391	255	J-1	2280	H
Virus											
sob 3	21	18	1	1	2	1	1	1	1	1	25
sob 7	22	21	1	1	5	1	1	1	2	1	24
sob 17	14	12	1	1	8	1	1	1	1	1	8
sob 23	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 27	8	9	3	3	10	4	4	23	4	2	2
sob 29	23	18	9	1	13	1	1	1	2	1	8
sob 30	13	13	7	1	5	1	1	1	3	2	6
sob 36	15	8	7	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 37	3	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1
sob 40	10	10	2	1	2	1	1	2	2	1	1

sob 41	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 42	15	21	1	1	1	1	1	1	1	1	2
sob 44	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 53	10	20	2	1	21	1	1	1	17	1	14
sob 56	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
sob 59	20	4	1	1	1	1	1	1	1	1	2
sob 60	35	7	1	1	1	1	1	1	1	1	2
sob 61	33	21	12	1	25	1	1	1	3	1	8

Como se ha demostrado anteriormente, las líneas celulares de hibridoma 23, 41, 44, y 56 son específicas para FCV-21, y ningún otro FCV ensayado. Por lo tanto, estos anticuerpos monoclonales pueden usarse como herramienta de diagnóstico para FCV-21. Es más, el hibridoma 36 parece reaccionar solamente con cepas FCV de vacuna (FCV-21, 49, 26391-4) y con ninguna otra cepa de FCV.

Todas las líneas celulares de hibridoma 23, 36, 41, 44 y 56 se depositaron con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, Estados Unidos, y se les asignó los números de acceso de la ATCC:

PTA-7349 (23)

PTA-7350 (36)

PTA-7353 (41)

PTA-7351 (44)

PTA-7352 (56)

EJEMPLO 1-9. ANÁLISIS DE NEUTRALIZACIÓN CRUZADA DE SUERO DE SUEROS DE FCV-21 Y FCV-49 CONTRA VIRUS DE FCV AISLADOS EN 1993.

A. Titulación de antisuero homólogo. Se provocó antisuero de fase
5 convaleciente contra doce FCV aislados en gatos específicos libres de
patógeno (SPF), y se recogieron después de una inoculación primaria y
secundaria. El inóculo del virus variaba de acuerdo con los títulos de solución
madre, en un intervalo de 10^4 a 10^8 TCID₅₀/gato. Los gatos se inocularon
inicialmente, se les reforzó tres semanas después, y después se les extrajo
10 sangre para el suero 2 semanas después del refuerzo. Los doce aislados
incluían F9, CFI-68, LSO-12, JOK63, JOK92 y aislados de campo 18, 21, 49,
50, 54, 27, y 11. Los aislados de campo se seleccionaron en base a análisis
filogenéticos de las secuencias de la región hipervariable de la secuencia de
proteína de la cápsida de cada cepa. Se eligieron para el estudio los aislados
15 más divergentes.

Los sueros se inactivaron por calor a 56°C durante 30 minutos, y se
titularon contra sus virus homólogos usando una técnica convencional de virus
constante-suero variable (Griest 1979, Mahy 1996). En resumen, se añadió
medio (100-150 µl) a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos.
20 Se añadió suero (100-150 µl) a cada pocillo de la fila superior (dilución inicial de
suero 1:2 o 1:4; F9 y LSO12 a 1:4), y se transfirieron 100 µl hacia abajo en la
placa después de mezclar (diluciones 1:2) con un pipeteador multicanal. Los
últimos 100 µl se descartaron. Se añadieron 50 µl de virus homólogo titulado
(diluido a 200 TCID₅₀/50 µl) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2
25 h a 37°C en una incubadora de CO₂. Después de la incubación, se añadieron

50 µl de una dilución 1:10 de células CRFK en suspensión a cada pocillo. Se preparó una placa de título de virus usando el virus diluido para asegurar que se añadía un inóculo apropiado a cada pocillo. Se usaron 50 µl de virus en la fila superior que contenía 150 µl de medio; el resto de la placa contenía 180 µl/pocillo, y se realizaron diluciones de 10 veces hacia abajo en la placa con 20 µl. Las placas se incubaron durante 4 días, y se usó la fórmula de Kärber para calcular tanto los títulos del suero como los virales (en el caso de los títulos del suero, la proporción de pocillos protegidos frente a los no protegidos se usó en la ecuación).

10 Cuando se titulaba el suero, se definió el TCID₅₀ como la dilución punto final de neutralización al 50% (Griest 1979). Una unidad de anticuerpo (AU) se definió como la dilución más alta de ese antisuero capaz de neutralizar 32-320 TCID₅₀ del virus homólogo en el 50% de los cultivos de ensayo. Por lo tanto, el TCID₅₀ obtenido es igual a 1 AU. Las neutralizaciones cruzadas de virus se
15 realizaron contra concentraciones de suero de 2,5, 5, 10 y 20 AU.

B. Ensayo de neutralización cruzada de virus. Cada aislado de campo viral, así como las cepas F9, LSO12, JOK63, JOK92, SA113 y CFI-68, se ensayó contra cada uno de los doce antisueros de FCV en un ensayo de neutralización cruzada. Cada virus requirió 5 placas de 96 pocillos. Cada suero se diluyó a 2,5, 5, 10 y 20 AU y se colocó en las placas en réplicas de ocho hacia abajo en las placas (tres sueros/placa para un total de cuatro placas) y una placa de título de virus (preparada de la misma manera que para las titulaciones de suero). Las diluciones antisueros se prepararon en DMEM diluyendo primero el suero a 20 AU, y después realizando diluciones de 2
20 veces hacia abajo hasta 2,5 AU. Se añadió después una alícuota de cada
25

153

dilución (100 µl) a cada columna de pocillos en la placa. Los virus se descongelaron rápidamente a 37°C, se colocaron en hielo, y se diluyeron a 200 TCID₅₀/pocillo (se mantuvieron en hielo). Para mantener la consistencia, se usó un procedimiento de dilución de tres etapas para la mayoría de las soluciones madre virales, nunca llegando más arriba de 1:100 en cada etapa. La solución madre de virus diluida (50 µl) se añadió a todos los pocillos de las placas de suero y se titularon como se ha descrito previamente. Las placas se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 2 horas, después de lo que se añadieron 50 µl de una dilución 1:10 de suspensión de células CRFK previamente cultivada hasta confluencia, a cada pocillo. Se cambiaron las puntas de pipeta y las cubetas de reserva después de cada serie de 5 placas. Las placas se valoraron después de 4 días. En algunos casos se usó virus pre-titulado, y pre-diluido.

TABLA 1-5. RESULTADOS DE LA NEUTRALIZACIÓN CRUZADA DE SUERO

Suero	JOK63	JOK92	CFI68	LSO12	F9	11
Virus	2,5/5/10/20*	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20
LSO12	-- n n	----	n N N N	n N N N	N N N	----
F9	----	----	--- n	----	n N N	----
JOK92	----	- n N N	----	--- n	N N N	----
CFI68	----	----	N N N N	n N N N	N N N	----
JOK63	n n n N	----	----	----	n N n	----
SA113	----	----	-- n N	----	N N N	----
3	----	----	----	----	-	----
4	----	----	----	----	- n N	----
6	----	----	----	----	-	----
7	--- n	----	----	--- n	N	----
8	----	----	----	--- n	-	----

9	----	----	---n	--n-	N	----
10	----	----	----	----	--N	----
11	----	----	----	----	---	---nnn
12	----	----	----	---n	--n	----
13	----	----	--nn	----	nNN	----
14	----	----	----	----	-	----
15	----	----	----	----	--N	----
16	----	----	----	----	-	----
17	--nn	----	nnnN	--nn	n	----
18	----	----	----	----	-	----
19	----	----	----	----	-Nn	----
20	----	----	----	----	--n	----
21	----	----	----	----	-nn	----
22	----	----	----	----	-nn	----
23	--nN	----	---n	----	NNN	----
24	----	----	----	----	nnN	----
25	----	----	----	----	---	----
27	----	----	----	----	---	---n
28	----	----	----	----	NNN	----
29	----	----	----	----	nnN	----
30	----	----	----	--nN	N	----
34	----	----	----	----	--n	----
36	----	----	----	----	-nn	----
38	----	----	----	----	-	----
39	----	----	----	----	---	----
41	----	----	----	----	--n	----
42	----	----	----	----	nnn	----
47	----	----	----	----	--N	----
48	----	----	----	----	NNN	----
49	----	----	----	----	nNN	----

155

50	-- n N	----	-- n N	-- n N	N	----
51	----	----	----	----	-	----
52	----	----	----	----	-	----
53	----	----	----	----	N	----
54	----	----	----	----	N	----
55	----	----	----	----	-	----
56	----	----	n - n n	-- n n	N	----

*2,5, 5, 10, 20 unidades de anticuerpo usadas en la neutralización de suero

n = 4-7/8 pocillos protegidos

blanco = suero insuficiente/no hecho

N = 8/8 pocillos protegidos

5 - = 0-3/8 pocillos protegidos

TABLA 1-5 (CONTINUACIÓN)

Suero	18	21	27	49	50	54
Virus	2,5/5/10/20*	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20	2,5/5/10/20
LSO12	--- n	N N N	----	N N N	----	-- n N
F9	----	N N N	----	n N N	--- n	----
JOK92	----	-- n	----	n n N	----	----
CFI68	----	N N N	----	N N N	----	----
JOK63	----	---	----	N N N	-- n n	----
SA113	N N N N	- n N	----	N N N	----	- n n n
3	----	---	----	N N N	----	- N N N
4	----	-- n	----	- N N	N N N N	--- n
6	----	---	----	- n n	----	----
7	----	- n n	----	N N N	----	-- n N
8	----	- n -	----	-- N	----	----
9	----	-- n	----	n N N	----	----
10	----	---	----	---	----	----
11	----	---	--- N	---	----	----

12	----	---	----	nNN	----	----
13	----	-n-		NNN	----	nnnn
14	----	---	--nn	nNN	----	-nnN
15	----	NNN	----	nNN	----	-nnn
16	----	---	----	--n	----	----
17	--nn	nnn	--nn	NNN	----	-nnN
18	nNNN	--n	----	-NN	----	----
19	----	n-n	----	-nn	----	----
20	----	---	----	--N	NNNN	----
21	----	NNN	----	-nN	----	----
22	----	---	----	-nn	----	----
23	----	NNN	---n	NNN	--nN	-nnN
24	----	nnN	----	---	----	---n
25	----	---	----	--n	---n	----
27	----	---	NNNN	--n	----	----
28	----	-nn		NNN	----	----
29	----	---	----	---	----	----
30	----	nnN	----	NNN	----	----
34	----	---	----	--N	----	----
36	----	---	----	-nN	----	----
38	----	---	----	---	----	----
39	----	---	----	---	----	----
41	----	---	----	-nN	----	----
42	----	---	----	nnN	----	----
47	----	nnn	----	-nN	----	----
48	----	nnN		NNN	---n	----
49	----	-nn	----	NNN	---n	----
50	----	NNN	----	NNN	NNNN	--nN
51	----	NNN	----	--n	----	----
52	----	---	----	NNN	----	----

53	----	n N N	----	n n N	----	--- n
54	----	-- n	----	- n N	----	n N N N
55	----	N N N	----	- N N	----	----
56	-- n N	n n N	----	N N N	----	--- n

*2,5, 5, 10, 20 unidades de anticuerpo usadas en la neutralización de suero

n = 4-7/8 pocillos protegidos

blanco = suero insuficiente/no hecho

N = 8/8 pocillos protegidos

5 - = 0-3/8 pocillos protegidos

Los datos de neutralización cruzada se resumen en la **TABLA 1-5**. Cada punto de los datos representa ocho réplicas de pocillos ensayadas. "N", "n", o "-" representan la proporción de pocillos protegidos frente a no protegidos, que es una indicación del alcance de la neutralización cruzada. Los resultados de neutralización de suero correspondientes a cada suero monoespecífico ensayado contra su virus homólogo se destacan en la TABLA. Estos sueros deberían neutralizar completamente; en su mayor parte así lo hacen. Las pocas excepciones, más notablemente JOK63, JOK92 y 11, muestran neutralización completa a valores de AU más altos, pero no a 2,5 AU. Esto probablemente sea debido a errores de dilución. El resultado más significativo de esta serie de datos es el alto grado de neutralización cruzada exhibido por los sueros de FCV-21 y FCV-49, particularmente éste último. Los patrones de neutralización cruzada de estos sueros parecen ser similares a los de F9 (nótese que la serie de datos para F9, y para FCV-21 y FCV-49 a 20 AU es incompleta debida a cantidades insuficientes de sueros). Aunque hay algunas diferencias en los patrones de neutralización entre estos tres sueros (FCV-21, FCV-49, y F9), los aislados 11, 38 y 39 no se neutralizaron consistentemente por ninguno de los

tres.

EJEMPLO 1-10. ANÁLISIS DE NEUTRALIZACIÓN CRUZADA DE ANTISUEROS DE FCV-21 y FCV-49 CONTRA VIRUS FCV AISLADOS EN 2003.

5 Los antisueros de FCV en este estudio se generaron inoculando de 10^5 a 10^6 de TCID₅₀/ml de FCV por vía intranasal a gatos (4-5 gatos/grupo). Se realizó una inoculación de refuerzo 3 semanas después usando la misma cantidad de virus. Los sueros se recogieron dos semanas después del refuerzo y se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos.

10 Se usaron muestras de suero de cada uno de los gatos vacunados en el ensayo de neutralización de suero contra cada una de las 26 cepas de FCV (TABLA 1-6). Las muestras de suero se diluyeron a 1:8 y seguidas de diluciones seriadas de 2 veces hasta 1:16384 (12 diluciones en total) en un volumen de 600 µl. Se mezclaron FCV con un intervalo de título entre 50-500
15 TCID₅₀/ml en 600 µl, con muestras de suero diluido conjuntamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después se transfirieron 200 µl de muestra a cada pocillo de placas de 96 pocillos sembradas con células CRFK por cuadruplicado. Las placas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 6 días y se determinó el título de punto final de
20 neutralización. Tanto el título de neutralización del suero (SN) como el retro-título de exposición al virus se calcularon por el procedimiento de Spearman-Karber (Spearman C, 1908, Brit J Psychol 2:227-242; Karber G, 1931, Arch exp Path Pharmac 162: 480-487).

Los datos de neutralización de suero se analizaron con títulos de punto
25 de corte de >23 y >15 y >10. Los resultados se muestran en la TABLA 1-7. Los

datos sugieren que FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4 tienen perfiles de neutralización cruzada más amplios, y son por lo tanto mejores candidatos a vacuna que la cepa de vacuna de FCV actual, F9.

TABLA 1-6. 26 CEPAS DE FCV USADAS EN LOS ESTUDIOS DE
5 NEUTRALIZACIÓN CRUZADA

Cepa	Año	Situación
12217-02	2002	NY
19306	2003	FL
26391-4	2003	FL
27086-2	2003	FL
32561-1	2003	IN
32561-14	2003	IN
32561-15	2003	IN
32561-7	2003	IN
36069-2	2003	MT
84883-02	2002	NY
F9	1960	Desconocido
J-1	1984	CT
H	1990	AZ
2280	1983	Desconocido
255NVSL	1970	Desconocido
94580	2000	NY
100869-1	2000	Ontario
33585	2000	MA

88287	2000	PA
89391	2000	PA
101920-1	2002	NY
17932-17	2003	RI
30101-2	2003	MT
41927-8	2003	CO
FCV-21	1993	MI
FCV-49	1993	PA

TABLA 1-7. ANÁLISIS DE NEUTRALIZACIÓN CRUZADA DE FCV-21, FCV-49 Y FCV-26391-4 EN COMPARACIÓN CON F9

A.		<u>Candidato</u> <u>sobre F9</u>
	<u>% (título de SN >23)</u>	<u>% Aumento</u> <u>(IN)</u>
FCV-21 IN	43,9	68,9
FCV-49 IN	33,9	30,4
FCV 26391-4 IN	28,9	11,2
F9 IN	26	

B.		<u>Candidato</u> <u>sobre F9</u>
	<u>% (título de SN >15)</u>	<u>% Aumento (IN)</u>
FCV-21 IN	51,5	62,5

FCV-49 IN	37,7	18,9
FCV 26391-4 IN	39,4	24,3
F9 IN	31,7	

C.		<u>Candidato</u> <u>sobre F9</u>
	<u>% (título de SN >10)</u>	<u>% Aumento (IN)</u>
FCV-21 IN	74,6	36,1
FCV-49 IN	63,1	15,2
FCV 26391-4 IN	63,5	15,9
F9 IN	54,8	

EJEMPLO 1-11. MORTALIDAD Y VALORES CLÍNICOS PARA GATOS VACUNADOS CON COMPONENTES DE FELOCELL 4 CON Y SIN FCV-21

- 5 Se vacunaron gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, con componentes de FELOCELL® 4 que contienen virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-F9], virus de la panleucopenia [FP] y *Chlamydia psittaci*, con o sin otra cepa de FCV, FCV-21. Los regímenes de vacunación evaluados incluían: una vacunación subcutánea
- 10 inicial seguida de refuerzos subcutáneos en los días 21 (SC/SC); una vacunación subcutánea inicial seguida de una inmunización de refuerzo oral en el día 21 (SC/Oral); o una vacunación inicial oral seguida de una segunda vacunación oral en el día 21. Las vacunaciones orales se consiguieron mediante administración de la vacuna dentro de la boca. En el día 42, todos los
- 15 gatos se expusieron con aproximadamente 1 ml de FCV-33585 sistémico

virulento (3 log de TCID₅₀/ml). Todos los gatos se controlaron para los síntomas clínicos (temperatura, conjuntivitis con descarga de suero, conjuntivitis con descarga mucopurulenta, rinitis con descarga serosa, rinitis con descarga mucopurulenta, estornudos, respiración sibilante, toses, respiración por la boca abierta, anorexia, deshidratación, una úlcera oral < 4 mm, múltiples úlceras orales, úlceras orales > 4 mm, salivación, úlcera externa no sangrante, úlceras externas sangrantes) de enfermedad durante 14 días después de la exposición. Los gatos que exhibían síntomas clínicos graves después de la exposición que eran consecuentes con patogénesis por calicivirus se sacrificaron.

10 Como se muestra en la **TABLA 1-8**, la adición de la nueva cepa FCV-21 aumenta significativamente la eficacia de FELOCELL 4, con o sin la presencia de FCV-F9. Tanto la vacunación SC/SC como la vacunación SC/Oral parecen ser eficaces para evitar la infección por FCV. Es más, se ha demostrado eficacia contra la infección por FCV incluso con vacunación oral/oral con
15 adición de FCV-21 y ausencia de F9 en FELOCELL 4 y FELOCELL 3. (FELOCELL 3 es FELOCELL 4 sin *Chlamydia psittaci*).

Para la **TABLA 1-9**, los regímenes de vacunación evaluados incluían una vacunación subcutánea inicial seguida de dos inmunizaciones de refuerzo orales, en el día 21 y en el día 42 (SC/Oral/Oral). Se ha demostrado que la
20 adición de FCV-21, con o sin FCV-F9 en FELOCELL 4, disminuye significativamente tanto la mortalidad como los valores clínicos.

TABLA 1-8											
Tratamiento	Vacunación				Exposición				Valor clínico		
	Nº animales	Días	Dosis	Vía	Días	cepa FCV	Nº animales	Mortalidad	Mediano	Mínimo	Máximo
Control negativo	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	9	78%	24	2	35
FELOCELL 4	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	9	44%	12	3	18
FELOCELL 4A*	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	10	0%	2,5	0	11
FELOCELL 4+FCV-21	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	10	0%	1,5	0	13
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FELOCELL 4	10	0 21	1 ml 1 ml	SC Oral	42	33585	10	10%	5,5	0	30
FELOCELL 4+FCV-21	10	0 21	1 ml 1 ml	SC Oral	42	33585	10	0%	3,5	0	13
FELOCELL 4A*	10	0 21	1 ml 1 ml	SC Oral	42	33585	10	10%	5	1	22
FELOCELL 4A*	10	0 21	1 ml 1 ml	Oral Oral	42	33585	10	0%	3	0	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FELOCELL 3+FCV-21	10	0 21	1 ml 1 ml	SC SC	42	33585	10	0%	2	0	8
FELOCELL 3+FCV-21	10	0 21	1 ml 1 ml	SC Oral	42	33585	10	0%	4	0	10
FELOCELL 3A**	10	0 21	1 ml 1 ml	Oral Oral	42	33585	10	0%	5	1	18

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21

TABLA 1-9												
Grupo	Tratamiento	Vacunación				Exposición			Valor clínico			
		Nº animales	Días	Dosis	Vía	Días	cepa FCV	Nº animales	Mortalidad	Mediano	Mínimo	Máximo
T01	Control neg.	10	0	1 ml	SC	63	33585	10	100%	25	21	31
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T02	Felocell 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	63	33585	10	0%	5,5	0	17
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T03	Felocell 4A*+FCV-21	10	0	1 ml	SC	63	33585	9	0%	4	0	10
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T04	Felocell 4	10	0	1 ml	SC	63	33585	10	30%	10,5	1	30
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						

*Felocell 4A: Felocell 4 sin FCV-F9

**Felocell 3A: Felocell 3 sin FCV-F9

164

EJEMPLO 1-12. ANÁLISIS DE NEUTRALIZACIÓN CRUZADA DE SUEROS DE GATOS VACUNADOS CON COMPONENTES DE FELOCELL 4 CON Y SIN FCV-21

Se recogieron muestras de suero de cada gato en el estudio descrito en el EJEMPLO 1-11 después de la segunda vacunación, pero antes de la exposición 85. Las muestras se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos, y se evaluaron en el ensayo de neutralización de suero contra cada una de las 26 cepas de FCV como se ha descrito previamente en el EJEMPLO 1-10 (TABLA 1-6).

Los datos de neutralización de suero se analizaron con títulos de puntos de corte de >23 y >15 , y se calculó una media de los dos títulos de puntos de corte (Med.). Los resultados se muestran en la TABLA 1-10. Los datos indican que todas las formulaciones de vacuna que contenían FCV-21 tenían perfiles de neutralización cruzada más amplios que las vacunas que contenían la cepa FCV-F9 tradicional (~ 60% frente al 40%). Esto dio como resultado un aumento aproximado del 50% en el número de las cepas de FCV neutralizadas.

TABLA 1-10

TABLA 1-10									
Tratamiento	Vacunación				Recogida de Suero		Neutralización cruzada		
	Nº de animales	Días	Dosis	Vía	Días	Nº de animales	% (>23)	% (>15)	% (Med.)
control negativo	10	0	1 ml	SC	42	9	10,8	13,9	12,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SC	42	9	38,5	42,3	40,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SC	42	10	58,9	64,6	61,8
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	56,5	62,3	59,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SC	42	10	39,2	42,7	41,0
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	56,2	60	58,1
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SC	42	10	49,6	59,2	54,4
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral	42	10	51,2	54,6	52,9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	53,9	62,7	58,3
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	55,8	63,9	59,9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral	42	10	60,8	68,1	64,5
		21	1 ml	Oral					

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21

Como también se muestra en la **TABLA 1-10**, la adición de la nueva cepa de FCV-21 aumentó significativamente el perfil de neutralización cruzada de FELOCELL 4, con o sin la presencia de FCV-F9. Se observaron perfiles de neutralización cruzada más amplios tanto con vacunación SC/SC como con vacunación SC/Oral. Además, se han demostrado perfiles de neutralización cruzada potenciados con vacunación Oral/Oral con la presencia de FCV-21, pero no F9, en FELOCELL 4 y FELLOCEL 3.

En la **TABLA 1-11**, las regímenes de vacunación evaluados incluyeron una vacunación subcutánea inicial seguida de dos inmunizaciones de refuerzo orales el día 21 y el día 42 (SC/Oral/Oral). Los resultados indican que la adición de FCV-21, con o sin FCV-F9 en FELOCELL 4, dio como resultado perfiles de neutralización cruzada significativamente más anchos. (un aumento de aproximadamente el 40%).

Tabla 1-11										
Tratamiento	Vacunación					Recogida de suero		Neutralización cruzada		
	Nº de Animales	Días	Fecha	Dosis	Vía	Días	Nº de Animales	% (>23)	% (>15)	% (Med.)
Control negativo	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	5,8	10,4	8,1
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	72,5	77,1	74,8
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	9	72,5	76,7	74,6
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					

FELOCELL	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	49,6	57,9	53,8
4		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					

* FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

- Descripción Numerada de la Invención.** Descripción adicional de las invenciones y ejemplos. 1. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada. 2. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de cápsida de FCV-21 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende la secuencia de proteínas (**SEC ID 13**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente el 91,2%, 95% y el 99% de identidad; en la que dicha proteína de la cápsida se proporciona en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. 3. Una vacuna de ADN para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada, en la que dicho ADN comprende una secuencia (**SEC ID 12**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente el 78,7%, y el 79,2% de identidad de secuencia y que permiten sustituciones conservativas. 4. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-49 o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada en la que dicha proteína de la cápsida comprende una secuencia de proteínas de la cepa FCV-49. 5. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-49, o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada en la que dicha proteína de la cápsida comprende la secuencia de

proteínas (**SEC ID 15**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente el 92,7%, el 95% y el 99% de identidad; en la que dicha proteína de la cápsida se proporciona en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. 6. Una vacuna de ADN para inmunizar

5 gatos contra calicivirus felino que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV-49 o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada en la que dicho ADN comprende una secuencia (**SEC. ID 14**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente el 78,9%, en concreto 79,4% ($78,9 + 0,5$) de identidad de secuencia y que permiten sustituciones

10 conservativas. 7. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-26391-4, o una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende secuencias de proteínas de la cepa FCV-26391-4. 8. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la

15 cápsida de FCV-26391-4, en la que dicha proteína de la cápsida comprende la secuencia de proteínas (**SEC ID 17**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente el 91,8%, el 95% y el 99% de identidad, en la que dicha proteína de la cápsida se proporciona en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune y un vehículo farmacéuticamente aceptable. 9. Una vacuna

20 de ADN para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 o una proteína de la cápsida de FCV-26391-4 aislada en la que dicho ADN comprende una secuencia (**SEC. ID 16**) y secuencias que tienen al menos aproximadamente el 78,4%, en concreto 78,9% ($78,4 + 0,5$) de identidad de

25 secuencia. 10. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el

polinucleótido se selecciona entre el grupo constituido esencialmente por las **SEC ID Nº 12, 14, 16**. 11. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además sólo o en cualquier combinación lo siguiente: donde contiene un adyuvante, en la que el componente de FCV está vivo, en la que el

5 componente de FCV está atenuado, en la que el componente de FCV está inactivado, que puede incluir al menos una cepa diferente de calicivirus felino seleccionada entre el grupo constituido por FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255, y FCV-2280. 12. La vacuna de las reivindicaciones 1, 4, y 7, en la que la vacuna incluye al menos un patógeno felino diferente, seleccionado entre el

10 grupo constituido por herpesvirus felino, virus de leucemia felina, virus de inmunodeficiencia felina, *Chlamydia psittaci*, y parvovirus felino, virus de la rabia y Bordetella bronchiseptica. 13. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una secuencia de nucleótidos de una proteína de la cápsida de FCV seleccionada entre el grupo constituido por un polipéptido

15 que tiene el 93% o más de identidad con **SEC ID Nº 13, 15, ó 17**, en la que el FCV aislado no es la cepa 213-95, y en la que la secuencia de ácido nucleico se une de forma operativa a una secuencia promotora heteróloga, en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. 14. La vacuna de la reivindicación 13, en la que

20 la secuencia de nucleótidos se selecciona entre el grupo constituido esencialmente por las **SEC ID Nº 12, 14 y 16**. 15. La vacuna de la reivindicación 13, en la que la secuencia de nucleótidos está en cualquiera de los siguientes: un plásmido, un vector de virus recombinante. 16. La vacuna de la reivindicación 13, en la que el vector de virus recombinante se selecciona

25 entre el grupo constituido por herpesvirus felino, poxvirus de mapache, poxvirus

de canario, adenovirus, virus Semliki Forest, virus de Sindbis y virus vaccinia.

17. Una composición inmunogénica que comprende un vehículo de excipiente veterinariamente aceptable y una cepa aislada de FCV que se une a un anticuerpo monoclonal seleccionado entre los anticuerpos monoclonales descritos en este documento como 23, 26, 41, 44 y 56.

18. Una composición inmunogénica que comprende un vehículo de excipiente veterinariamente aceptable y una cepa aislada de FCV que se une de forma **selectiva** a un anticuerpo monoclonal seleccionado entre los anticuerpos monoclonales descritos en este documento como 23, 26, 41, 44 y 56.

19. Las composiciones inmunogénicas de las reivindicaciones 17 y 18 en las que la cepa de FCV está inactivada, donde dicha cepa de FCV es una vacuna y donde la composición comprende un adyuvante.

20. Un procedimiento para inmunizar un gato contra calicivirus felino que comprende: administrar al gato una dosis eficaz de una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la vacuna comprende adicionalmente un adyuvante.

PARTE 2

ESTA SECCIÓN A CONTINUACIÓN PROPORCIONA INFORMACIÓN DETALLADA SOBRE LOS PROCEDIMIENTOS PARA INMUNIZAR ANIMALES CONTRA VIRUS Y EN PARTICULAR GATOS CONTRA CALICIVIRUS.

A no ser que se indique otra cosa, las descripciones a continuación usan las definiciones proporcionadas anteriormente y a continuación.

Se describen en este documento procedimientos y materiales para tratar e inmunizar animales con vacuna y en particular gatos contra calicivirus felino (FCV). Los procedimientos incluyen administrar al gato cantidades

172

terapéuticamente eficaces de primeras y segundas vacunas que son capaces de inducir una respuesta inmune, y en particular en el gato contra FCV. La primera vacuna se administra típicamente por vía parenteral, pero en algunas situaciones puede administrarse por vía oral, mientras que la segunda vacuna se administra por vía oral u oronasal N días después de la administración de la primera vacuna. Estas vacunas se administran típicamente por vía parenteral primero porque típicamente causan lesiones orales si se administran inicialmente por vía oral. Curiosamente, en este documento se describen cepas FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4, que son tan seguras y eficaces que pueden administrarse en forma de una primera administración oral seguida de una segunda administración oral. En este documento, N es un número entero de 3 a 120, ambos inclusive, pero es típicamente un número entero de 7 a 42, ambos inclusive, o de 14 a 28, ambos inclusive, se prefieren aproximadamente 3 semanas y también aproximadamente 2-4 semanas. Como alternativa, la segunda vacuna puede administrarse después de que el gato ha desarrollado un título de neutralización de suero de FCV de aproximadamente 1:6, 1:9, 1:12, 1:15, 1:18 o mayor.

El procedimiento puede también incluir una o más administraciones parenterales, orales u oronasales adicionales de una vacuna de FCV M días después de la administración de la primera vacuna o de la segunda vacuna, donde M es un número entero de 1 a 120, ambos inclusive. Por tanto, los regímenes de vacunación representativos incluyen (1) administración subcutánea de una primera vacuna de FCV, seguida de administración oral de una segunda vacuna de FCV; (2) administraciones subcutáneas sucesivas de primera y tercera vacunas de FCV, seguidas por la administración oral de una

segunda vacuna de FCV; y (3) administración subcutánea de una primera vacuna de FCV, seguida de administraciones orales sucesivas de una segunda y tercera vacunas de FCV.

Como se ha descrito anteriormente, la primera vacuna se administra por
5 vía parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea). La segunda vacuna se
administra por vía oral u oronasal, y una tercera vacuna opcional puede
administrarse por vía parenteral, oral u oronasal. Cualquier dispositivo puede
usarse para administrar las vacunas, incluyendo jeringuillas, dispensadores de
gotas, dispositivos de inyección sin aguja, y similares. Para la administración
10 oronasal, puede usarse una jeringa dotada con una cánula para colocar gotas
de la vacuna en la nariz y boca del gato.

El procedimiento puede emplear cualquier vacuna que sea capaz de
inducir una respuesta inmune en el gato contra FCV, siempre que la primera
vacuna esté adaptada para administrarse por vía parenteral y la segunda
15 vacuna esté adaptada para administrarse por vía oral u oronasal. Como se ha
indicado anteriormente, la tercera vacuna opcional está adaptada para
administrarse por vía parenteral, por vía peroral o por vía oronasal. Las
vacunas primera, segunda, y tercera opcional, pueden ser las mismas o
diferentes y cada una comprende, por separado, un antígeno o antígenos
20 obtenidos de una o más cepas de FCV. Las vacunas útiles por tanto incluyen
vacunas de virus vivo, vacunas de virus vivo modificado y vacunas de virus
inactivado. Vacunas de virus de FCV vivo modificado y vivo contienen cepas de
FCV que no causan la enfermedad en gatos y que se han aislado en forma no
virulenta o se han atenuado usando procedimientos bien conocidos, incluyendo
25 paso en serie en una línea celular adecuada o exposición a luz ultravioleta o a

un mutágeno químico. Vacunas de FCV muerto o inactivado contienen cepas de FCV que han sido inactivadas mediante procedimientos conocidos, incluyendo tratamientos con formalina, betapropriolactona, etileniminá binaria y similares. Vacunas ejemplares incluyen las que contienen cepas no virulentas seleccionadas de FCV-F9, FCV-M8, FCV-255, FCV-2280, FCV-21, FCV-49, FCV 26391-4, etc., solas o en combinación.

Otras vacunas útiles obtenidas de una o más cepas de FCV incluyen vacunas recombinantes y vacunas de ADN (es decir, vacunas de subunidad). Las vacunas recombinantes incluyen vectores de virus recombinante, cada una conteniendo un ácido nucleico que codifica un antígeno obtenido de una cepa de FCV. Dichos vectores pueden prepararse insertando un ADNc que codifica un antígeno obtenido de una cepa de FCV (por ejemplo, una proteína de la cápsida) en el genoma de un virus no virulento, incluyendo cepas de herpesvirus, poxvirus, adenovirus y similares. Para vectores de virus, el ADNc está unido de forma operativa a un promotor de transcripción eucariota en el extremo 5' de la secuencia que codifica el antígeno y está unido de forma operativa a una señal de terminación eucariota y una señal poli(A) en el extremo 3' de la secuencia que codifica al antígeno, de modo que el promotor de la transcripción y las secuencias de terminación regulan la expresión del antígeno. Los promotores de transcripción útiles incluyen el promotor de repeticiones terminales largas del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR), el promotor inmediato temprano principal de Citomegalovirus (CMV), el promotor del antígeno T de virus vacuolizante de simio 40 (SV40) y promotores inducibles, tales como el promotor de metalotioneína. Para una descripción de vacunas de FCV recombinantes, véase Patente de Estados Unidos Nº

5.716.822 de Wardley y col., que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

Las vacunas de ADN incluyen moléculas de ADN (por ejemplo plásmidos) que tienen una secuencia de ácido nucleico que codifica un
5 antígeno de FCV, tal como una proteína de la cápsida de FCV o un fragmento inmunogénico específico de la misma, que provoca una respuesta inmune en el gato contra FCV. La secuencia que codifica el ácido nucleico se une de forma operativa a un promotor transcripcional que permite la expresión del ADN cuando está inoculado en las células del gato. Promotores útiles incluyen el
10 promotor RSV-LTR, el promotor inmediato temprano principal de CMV, y el promotor de antígeno T de SV40. Adicionalmente, el ácido nucleico puede unirse de forma operativa, en o cerca del codón de terminación de la secuencia que codifica el antígeno de FCV, a un fragmento de ácido nucleico que comprende una señal de terminación de la transcripción y una señal de
15 reconocimiento de poli(A). Para una descripción de vacunas de ADN véase Patente de Estados Unidos Nº 5.580.859, Patente de Estados Unidos Nº 5.589.466, y Patente de Estados Unidos Nº 5.703.055 de Felgner y col.

Otras vacunas útiles incluyen las que contienen uno o más antígenos de subunidad, tales como una proteína de la cápsida de FCV o un fragmento
20 inmunogénico de la proteína de la cápsida, que se ha aislado y purificado. El antígeno de subunidad puede producirse en un vector de expresión recombinante que produce el antígeno in vitro usando procedimientos descritos anteriormente. El antígeno resultante se aísla y purifica posteriormente. Los vectores de expresión útiles incluyen diversos microorganismos, incluyendo
25 bacterias, levaduras y hongos, así como eucariotas, tales como células de

176
mamíferos y de insectos. Otros vectores de expresión útiles incluyen virus, tales como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus Semliki Forest, baculovirus, bacteriófagos, virus Sindbis, virus Sendai, y similares. La expresión del antígeno de subunidad de FCV en un microorganismo permite la producción de
5 la proteína antigénica usando tecnologías de fermentación a escala comercial. Diversos procedimientos pueden usarse para aislar y purificar los antígenos, incluyendo filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, centrifugado, y similares.

Una o más de las vacunas pueden también contener antígenos para
10 inmunizar gatos contra uno o más patógenos además de FCV, incluyendo herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la panleucopenia felina, y Chlamydia felina.

Otros componentes de vacunas pueden incluir excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo vehículos, disolventes, diluyentes,
15 agentes isotónicos, agentes tamponantes, estabilizantes, conservantes, agentes inmunomoduladores (por ejemplo, interleuquinas, interferones y otras citoquinas), ~~agentes vasoconstrictores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, y similares.~~ Vehículos, disolventes y diluyentes típicos incluyen agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y similares.

20 Agentes isotónicos representativos incluyen cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, lactosa y similares. Estabilizantes útiles incluyen gelatina, albúmina y similares.

Las vacunas pueden también incluir uno o más adyuvantes que aumentan la respuesta inmune al antígeno. Adyuvantes representativos
25 incluyen adyuvante basados en aceite, tales como el Adyuvante Completo de

Freund, y el Adyuvante Incompleto de Freund, adyuvantes basados en micolato (por ejemplo, dimicolato de trehalosa), lipopolisacáridos bacterianos, peptidoglicanos (es decir, mureinas, mucopéptidos, o glicoproteínas tales como N-Opaca, muramil dipéptido o análogos de los mismos), proteoglicanos (por ejemplo, extractos de *Klebsiella pneumoniae*), preparaciones de estreptococos (por ejemplo, OK432), BLOSTIM® (por ejemplo, 01K2), Iscoms (por ejemplo, véase solicitudes de Patente Europea N° Patente Europea 109942, Patente Europea 180564 y Patente Europea 231039), hidróxido de aluminio, saponina, dietilaminoetil dextrano, aceites neutros (por ejemplo, migliol), aceites vegetales (por ejemplo, aceite de cacahuètes), liposomas, polioles PLURONIC®. Otros adyuvantes incluyen el sistema de adyuvante RIBI, alumbre, gel de hidróxido de aluminio, colesterol, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, copolímeros de bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, adyuvante amina-lípido-Avridina, enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* (recombinante o de otra manera), toxina del cólera, o muramil dipéptido, entre otros.

Los tamaños de dosis de las vacunas de FCV típicamente varían desde aproximadamente 1 ml a aproximadamente 2 ml, ambos inclusive. Cada dosis contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno de FCV o antígenos que pueden variar dependiendo de la edad y estado general del gato, la vía de administración, la naturaleza del antígeno de FCV, y otros factores. Para las vacunas que contienen virus vivos modificados o virus atenuados, una dosis terapéuticamente eficaz generalmente varía de

aproximadamente 10^6 TCID₅₀ a aproximadamente 10^8 TCID₅₀, ambas inclusive. Para vacunas que contienen antígenos de subunidad, tales como proteínas de la cápsida de FCV, una dosis terapéuticamente eficaz generalmente varía de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg, ambos inclusive. Los
5 otros componentes de las vacunas pueden ajustarse para modificar las propiedades físicas y químicas de las vacunas. Por ejemplo, los adyuvantes comprenden típicamente de aproximadamente 25 µg a aproximadamente 1000 µg, ambos inclusive, de una dosis de 1 ml. De forma similar, los antibióticos comprenden típicamente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 60 µg,
10 ambos inclusive, de una dosis de 1 ml.

Las vacunas de FCV se proporcionan en diversas formas dependiendo de la vía de administración, requisitos de almacenamiento, y similares. Por ejemplo, las vacunas se pueden preparar en forma de soluciones acuosas, o dispersiones adecuadas para su uso en jeringas, dispensadores de gotas, etc.
15 o pueden prepararse en forma de polvos liofilizados, que se reconstituyen en solución salina, tampón HEPES, y similares, antes de usar.

PARTE 2 EJEMPLOS Y TABLAS

Los siguientes ejemplos pretenden ser ilustrativos y no limitantes, y representan varias realizaciones específicas de la presente invención.

20 EJEMPLO 2-1. RÉGIMEN DE VACUNACIÓN SUBCUTÁNEO/ORAL CON FELOCELL® 4 Y FEL-O-VAX®

Se vacunaron gatos domésticos de pelo corto, de 4-5 meses de edad, con FELOCELL® 4 (Pfizer Inc.; virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV], virus de la panleucopenia [FP] y *Chlamydia psittaci*),
25 con FEL-O-VAX® (Fort Dodge; FHV, FCV, FP, y *C. psittaci* muertos), o con

179

diluyente estéril (grupo de control). Los regímenes de vacunación evaluados incluían: una vacunación subcutánea inicial seguida de refuerzos subcutáneos en los días 21 y 42 (SC/SC/SC); una vacunación subcutánea inicial seguida por dos inmunizaciones de refuerzo orales en los días 21 y 42 (SC/Oral/Oral); o

5 una vacunación subcutánea inicial seguida por una segunda vacunación subcutánea en el día 21, y un refuerzo oral en el día 42. Todas las dosis fueron de 1 ml. La vacunación oral se consiguió por administración de la vacuna dentro de la boca. En el día 99, todos los gatos se expusieron con aproximadamente 3,5 ml de FCV-33585 sistémico virulento (4,8 log de

10 TCID₅₀/ml). La exposición se realizó administrando aproximadamente 3 ml de la dosis en comida enlatada para gatos, y 0,05 ml mediante instilación nasal. Todos los gatos se controlaron para los síntomas clínicos de enfermedad durante 14 días después de la exposición. Los gatos que exhibían síntomas clínicos graves después de la exposición que eran consecuentes con

15 patógenesis por calicivirus se sacrificaron.

Como se muestra en la **TABLA 2-1**, el grupo vacunado mediante el régimen SC/Oral/Oral tenía una tasa de mortalidad de solamente el 10%, mientras que el grupo de control tenía una tasa de mortalidad del 90%. El grupo vacunado mediante el régimen SC/SC/SC tenía una tasa de mortalidad

20 del 50%, mientras que el grupo vacunado mediante el régimen SC/SC/Oral tenía una tasa de mortalidad del 20%. Estos resultados sugieren que la vacunación SC seguida por un refuerzo oral potencia significativamente la eficacia de la vacunación con FELOCELL® 4 contra exposición a FCV virulento. No sólo disminuyeron las tasas de mortalidad del 50% (SC/SC/SC) al

25 10% (SC/Oral/Oral) o 20% (SC/SC/Oral) cuando la vacunación oral formaba

parte del régimen, sino que, como se muestra en la **TABLA 2-2**, la gravedad de los síntomas clínicos tales como lesiones cutáneas (SL), inapetencia (IA), depresión (DP), úlceras orales (OU), cojera (LN), estornudos (SZ), descarga nasal (ND) y ojos acuosos (WE), también disminuyeron.

5 **TABLA 2-1. MORTALIDAD DE GATOS EXPUESTOS CON FCV-33585 VIRULENTO DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN (EJEMPLO 2-1)**

TABLA 2-1					
Grupo	Vacunación			Exposición	
	Tratamiento	Nº Animales	Vía	Nº Animales	Mortalidad %
T1	Control	10	SC/SC/SC	10	90
T2	FELOCELL®	4	SC/SC/SC	4	50
T3	FELOCELL®	10	SC/SC/Oral	10	20
T4	FELOCELL®	10	SC/Oral/Oral	10	10
T5	FEL-O-VAX®	5	SC/SC/SC	5	60

TABLA 2-2. SÍNTOMAS CLÍNICOS (% DE ANIMALES) DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN Y LA POSTERIOR EXPOSICIÓN A FCV-33585 (EJEMPLO 2-1)

TABLA 2-2									
Grupo	Vía	SL	IA	EP	OU	LN	SZ	ND	WE
T1	SC/SC/SC	50	100	100	70	100	30	90	70
T2	SC/SC/SC	100	100	100	100	100	25	100	25
T3	SC/SC/Oral	70	70	50	60	70	20	30	10
T4	SC/Oral/Oral	10	40	20	40	50	10	30	0
T5	SC/SC/SC	40	80	60	60	60	40	60	20

5 EJEMPLO 2-2. TÍTULOS MEDIOS DE NEUTRALIZACIÓN DE SUERO DE FCV DESPUÉS DE VACUNACIÓN SC/ORAL

Las muestras de sangre tomadas de los gatos del **EJEMPLO 2-1** se recogieron en los días de estudio 0, 21, 42, 63, 98 y 113, y se evaluaron en un ensayo de neutralización de suero (SN) para su capacidad para neutralizar FCV. Las muestras de suero se diluyeron a 1:8, seguido de diluciones seriadas de 2 veces hasta 1:16384 (12 diluciones en total) en volúmenes de 600 µl. Los calicivirus felinos con un título de 50-500 TCID₅₀/ml en 600 µl se mezclaron con las muestras de suero diluidas y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min. Después, 200 µl de cada muestra diluida se transfirieron a pocillos diferentes de placas de 96 pocillos sembradas con células Renales Felinas Crandel (CrFK) por cuadruplicado. Las placas se incubaron a 37°C, en CO₂ al 5% durante 6 días, momento en que se determinaron los títulos de neutralización de punto final. Tanto el título de neutralización de suero (SN)

como el retro-título de exposición al virus se calcularon usando el procedimiento de Spearman-Kärber Véase, C. Spearman, *Brit. J. Psychol.* 2:227-242 (1908) y G. Karber, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 162:480-487 (1931).

Como se muestra en la **TABLA 2-3**, FELOCELL® 4 administrado mediante los regímenes de vacunación SC/Oral/Oral o SC/SC/Oral tuvo títulos de SN de FCV significativamente más altos. Estos datos están en relación con la reducción significativa de las tasas de mortalidad descritas en el **EJEMPLO 2-1**.

TABLA 2-3. TÍTULOS MEDIOS DE SN (NEUTRALIZACIÓN DE SUERO) DE FCV EN DIVERSOS DÍAS DE ESTUDIO (EJEMPLO 2-2)

TABLA 2-3								
Grupo	Vía de Vacunación	Títulos medios de SN de FCV*						Nº Animales día 113
		0	21	42	63	98	113	
T1	SC/SC/SC	3	2	4	3	4	7340	1
T2	SC/SC/SC	3	18	17	24	29	5986	2
T3	SC/SC/Oral	3	27	36	310	1032	5783	8
T4	SC/Oral/Oral	3	18	431	877	1980	5787	9
T5	SC/SC/SC	4	3	6	8	15	3563	2

* Medidos en el día 0, día 21, día 42, día 63, día 98 y día 113 después de la vacunación.

EJEMPLO 2-3. EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN SC/ORAL DE FELOCELL® 4 Y FEL-O-VAX® CONTRA VIRUS DE LA PANLEUCOPENIA FELINA

Las muestras de suero de los gatos del **EJEMPLO 2-1** se ensayaron

también para sus títulos de FP medios. Como se muestra en la **TABLA 2-4**, todos los gatos eran seronegativos al comienzo del estudio. Posteriormente, los títulos medios del grupo de control permanecieron en 1 a lo largo de la duración de los intervalos de muestreo (días 21 y 42). Sin embargo, los títulos medios de los otros cuatro grupos de vacunación aumentaron de forma significativa.

TABLA 2-4. TÍTULOS MEDIOS DE ANTICUERPOS DE SUERO PARA EL VIRUS DE LA PANLEUCOPENIA FELINA (EJEMPLO 2-3)

TABLA 2-4				
Grupo	Vía de Vacunación	Título medio de suero de FP*		
		0	21	42
T1	SC/SC/SC	1	1	1
T2	SC/SC/SC	1	5782	5782
T3	SC/SC/Oral	1	5595	5793
T4	SC/Oral/Oral	1	5499	5693
T5	SC/SC/SC	1	2360	4887

* Medidos en el día 0, día 21, y día 42 después de la vacunación.

EJEMPLO 2-4. SÍNTOMAS CLÍNICOS PARA GATOS VACUNADOS CON FELOCELL® 4 MEDIANTE DIVERSAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

La administración oronasal (ON) de FELOCELL® 4 se consiguió mediante instilación de gotas en los orificios nasales del animal. Como se indica en la **TABLA 2-5**, grupos de 10 gatos (T1, T2, T3), de 6-7 meses de edad, se vacunaron y se reforzaron en el día 21 de acuerdo con los regímenes mostrados en la **TABLA 2-5**: Vacunación y refuerzo subcutáneos (SC/SC); vacunación subcutánea y refuerzo oronasal (SC/ON); o vacunación y refuerzo oronasal (ON/ON). La vacuna se administró por vía subcutánea en la parte

derecha del cuello (1 ml); la administración oronasal fue mediante el suministro de 0,5 ml de vacuna en cada orificio nasal. Comenzando el día 1, todos los gatos se observaron diariamente para el estado de salud general.

TABLA 2-5. SÍNTOMAS CLÍNICOS PARA GATOS VACUNADOS CON FELOCELL® 4 MEDIANTE DIFERENTES VÍAS DE ADMINISTRACIÓN (EJEMPLO 2-4)

TABLA 2-5							
Grupo	Vía de vacunación	Síntomas clínicos, %					
		NU	OU	SZ	ND	WE	IA
T1	SC/SC	0	0	0	0	0	50
T2	SC/ON	0	0	20	0	0	20
T3	ON/ON	10	30	90	50	60	20

Como se muestra en la **TABLA 2-5**, los gatos que recibían ambas vacunaciones por vía oronasal tenían niveles altos de síntomas clínicos, incluyendo úlceras nasales (NU), úlceras orales (OU), estornudos persistentes (SZ), descarga nasal (ND), ojos acuosos (WE), e inapetencia transitoria (IA). Los gatos vacunados mediante el régimen SC/ON, sin embargo, mostraron menos síntomas clínicos que los gatos vacunados con ON/ON, sin indicios de úlceras nasales, úlceras orales, descarga nasal u ojos acuosos. Además, los sujetos en el grupo SC/ON, exhibieron menos estornudos que los gatos en el grupo ON/ON. El perfil de seguridad del grupo SC/ON era similar al del grupo SC/SC.

EJEMPLO 2-5. EL EFECTO DE DIFERENTES VÍAS DE VACUNACIÓN SOBRE RESPUESTAS SEROLÓGICAS A ANTÍGENOS DE FELOCELL® 4

Muestras de suero de gatos inscritos en el estudio descrito en el **EJEMPLO 2-4** se ensayaron para reactividad serológica a diversos antígenos virales presentes en la vacuna FELOCELL® 4. Los títulos medios de anticuerpos de neutralización de suero para FCV, FHV y FP se determinaron para los días de estudio 0, 21 y 42. Como se muestra en la **TABLA 2-6**, los tres regímenes de vacunación dieron como resultado una fuerte respuesta inmune a FP. La respuesta inmune a FHV, era apenas detectable debido a dificultades con el ensayo. Sin embargo, los títulos de neutralización de suero contra FCV fueron significativamente más altos en los grupos ON/ON y SC/ON, en comparación con el grupo SC/SC. Estos resultados sugieren que los gatos en los grupos ON/ON y SC/ON estarían protegidos contra la exposición a un FCV virulento, pero que el grupo SC/SC puede no estarlo.

TABLA 2-6. RESPUESTAS SEROLÓGICAS DE GATOS VACUNADOS CON FELOCELL® 4 MEDIANTE DIFERENTES VÍAS (EJEMPLO 2-5)

TABLA 2-6										
Grupo	Vía de vacunación	Título de FCV*			Título de FHV*		Título de FP*			
		0	21	42	0	21	42	0	21	42
T1	SC/SC	3	4	7	3	3	3	3	10884	10441
T2	SC/ON	3	14	151	3	3	5	3	11113	11585
T3	ON/ON	3	75	491	3	4	16	3	5333	10960

*Medido en el día 0, día 21 y día 42 después de la vacunación.

EJEMPLO 2-6. TÍTULOS DE NEUTRALIZACIÓN DE SUERO CONTRA FCV-F9 ADMINISTRADO MEDIANTE UNA VÍA SC U ON

Se vacunaron seis gatos por grupo con el antígeno de FCV-F9 presente

186

en la vacuna FELOCELL® 4, por vía subcutánea u oronasal. Tres semanas después de la vacunación inicial, se reforzaron todos los gatos con el mismo antígeno mediante la misma vía que previamente. Todas las dosis fueron de 1 ml. Las muestras de suero se recogieron tres semanas después de la

5 inmunización de refuerzo. Como se muestra en la **TABLA 2-7**, los títulos de neutralización de suero se determinaron para estas muestras contra un panel de 26 cepas de FCV. Las cepas de FCV elegidas para el panel se seleccionaron en base a su diversidad genética (como se determina por la secuencia de la región hipervariable de su cápsida), así como por su

10 distribución geográfica. Además, el fenotipo de virulencia de cada cepa se consideró también. Las muestras de suero de gatos vacunados por vía oronasal con F9 neutralizaron más cepas de FCV en el panel de 26 miembros, en comparación con las muestras de gatos vacunados por vía subcutánea. Usando 23 como el valor de corte para los títulos de neutralización, la

15 vacunación por vía oronasal dio como resultado títulos en o por encima del valor de corte en el 26% de los miembros del panel, mientras que la vacunación por vía subcutánea dio como resultado solamente un 16% satisfaciendo los criterios. Para un valor de corte de título de 15, la vacunación oronasal proporcionó un 32% de miembros del panel en o por encima del valor

20 de corte; la subcutánea produjo solamente el 17%.

TABLA 2-7. TÍTULOS DE NEUTRALIZACIÓN CRUZADA DE SUERO PARA SUERO GENERADO POR VÍA SUBCUTÁNEA FRENTE A VÍA ORONASAL PARA FCV-F9 FRENTE A UN PANEL VIRAL DE 26 FCV (EJEMPLO 2-6)

TABLA 2-7		
FCV-F9	% Pos. (>23*)	% Pos. (>15*)

Inoculación SC	16	17
Inoculación ON	26	32
ON sobre SC (%)	163	188
SC sobre ON (%)	62	53

*Título de neutralización ≥ 23 como valor de corte; o título de neutralización ≥ 15 como valor de corte.

EJEMPLO 2-7. MORTALIDAD Y VALORES CLÍNICOS PARA GATOS VACUNADOS CON DOS DOSIS DE COMPONENTES FELOCELL® 4 O FELOCELL® 3 Y UN FCV-21 VIVO MODIFICADO

A gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, se administraron vacunas que contenían virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado (FHV), virus de la panleucopenia (FP), *Chlamydia psittaci*, y (1) FCV-F9 (FELOCELL® 4 o FELOCELL® 3), (2) FCV-F9 y FCV-21 (FELOCELL® 4 más FCV-21 o FELOCELL® 3 más FCV-21) o (3) FCV-21 (FELOCELL® 4A o FELOCELL® 3A). Los regímenes de vacunación incluían: una vacunación subcutánea inicial seguida de refuerzos subcutáneos en el día 21 (SC/SC); una vacunación subcutánea inicial seguida de una inmunización de refuerzo oral en el día 21 (SC/Oral); o una vacunación oral inicial seguida de una segunda vacunación oral en el día 21 (Oral/Oral). Cada gato en los diferentes regímenes de dosificación (grupos T1 a T10, 10 gatos por grupo) recibió 1 ml de vacuna. La vacunación oral se consiguió mediante la administración de la vacuna dentro de la boca. En el día 42, todos los gatos se expusieron con aproximadamente 1 ml de FCV-33585 sistémico virulento (3 log de TCID₅₀/ml). Durante 14 días después de la exposición, todos los gatos se controlaron para los síntomas clínicos de enfermedad, incluyendo temperatura

elevada, conjuntivitis con descarga serosa, conjuntivitis con descarga mucopurulenta, rinitis con descarga serosa, rinitis con descarga mucopurulenta, estornudos, respiración sibilante, toses, respiración por la boca abierta, anorexia, deshidratación, una úlcera oral < 4 mm, múltiples úlceras orales, 5 úlceras orales > 4 mm, salivación, úlcera externa no sangrante y úlceras externas sangrantes. Los gatos que mostraban síntomas clínicos graves después de la exposición que eran consecuentes con la patogénesis por calicivirus se sacrificaron.

Como se muestra en la **TABLA 2-8**, cuando se compara con la 10 vacunación SC/SC, un régimen de vacunación SC/Oral disminuyó la mortalidad del 44% al 10%, y mejoró el valor clínico mediano de 12 a 5,5 para gatos vacunados con FELOCELL® 4. Además, añadir la cepa FCV-21 a FELOCELL® 3 y a FELOCELL® 4 dio como resultado la ausencia de mortalidad después de la exposición. Reemplazar la cepa FCV-F9 de 15 FELOCELL® 3 y FELOCELL® 4 con cepa FCV-21 dio como resultado una eficacia similar a las vacunas que contienen tanto FCV-F9 como FCV-21, incluso para un régimen de vacunación Oral/Oral.

TABLA 2-8. MORTALIDAD DE GATOS EXPUESTOS A FCV-33585 VIRULENTO DESPUÉS DE VACUNACIÓN DE DOS DOSIS CON 20 FELOCELL® 3 O 4 Y CON O SIN FCV-F9 Y/O FCV-F21 (EJEMPLO 2-7)

TABLA 2-8							
Grupo	Vacunación		Exposición		Valor clínico		
	Tratamiento	Vía	Nº Animales	Mortalidad %	Mediano	Min.	Máx.
T1	Control	SC/SC	9	78	24	2	35
T2	FELOCELL 4	SC/SC	9	44	12	3	38

T3	FELOCELL 4	SC/Oral	10	10	5,5	0	30
T4	FELOCELL 4 + FCV-21	SC/SC	10	0	1,5	0	13
T5	FELOCELL 4 + FCV-21	SC/Oral	10	0	3,5	0	13
T6	FELOCELL 4A	SC/SC	10	0	2,5	0	11
T7	FELOCELL 4A	SC/Oral	10	10	5	1	22
T8	FELOCELL 4A	Oral/Oral	10	0	3	0	10
T9	FELOCELL 3 + FCV-21	SC/SC	10	0	2	0	8
T10	FELOCELL 3 + FCV-21	SC/Oral	10	0	4	0	10
T11	FELOCELL 3A	Oral/Oral	10	0	5	1	18

FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21

5 EJEMPLO 2-8. MORTALIDAD Y VALORES CLÍNICOS PARA GATOS VACUNADOS CON TRES DOSIS DE COMPONENTES DE FELOCELL® 4 Y FCV-21 VIVO MODIFICADO

A gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, se les administraron vacunas que contenían virus de la rinotraqueítis felina vivo modificado (FHV), virus de la panleucopenia (FP), *Chlamydia psittaci* y (1) FCV-F9 (FELOCELL® 4), (2) FCV-F9 y FCV-21 (FELOCELL® 4A) o (3)

FCV-21 (FELOCELL® 4B). En cada caso, a los gatos se les administró una vacunación subcutánea inicial seguida de administraciones orales sucesivas en los días 21 y 42 (SC/Oral/Oral). Cada gato en los diferentes regímenes de dosificación (grupos T1 a T4, 10 gatos por grupo) recibió 1 ml de vacuna. La vacunación oral se consiguió mediante la administración de la vacuna dentro de la boca. En el día 63, todos los gatos se expusieron con aproximadamente 1 ml de FCV-33585 sistémico virulento (3 log de TCID₅₀/ml). Durante 14 días después de la exposición, todos los gatos se controlaron para síntomas clínicos de enfermedad como en el **EJEMPLO 2-7**. Los gatos que mostraron síntomas clínicos graves después de la exposición que eran consecuentes con patogénesis por calicivirus se sacrificaron. Como se muestra en la **TABLA 2-9**, la eficacia del régimen de dosis triple, según lo medido mediante mortalidad y valores clínicos después de la exposición, es comparable a la eficacia del régimen de dosis doble descrito en el **EJEMPLO 2-7**.

15 TABLA 2-9. MORTALIDAD DE GATOS EXPUESTOS CON FCV-33585 VIRULENTO DESPUÉS DE VACUNACIÓN DE TRES DOSIS CON FCV-F9 Y/O FCV-F21 (EJEMPLO 2-8).

TABLA 2-9							
Grupo	Vacunación		Exposición		Valor clínico		
	Tratamiento	Vía	Nº Animales	Mortalidad	Mediano	Min.	Máx.
T1	Control	SC/Oral/Oral	10	100%	25	21	31
T2	Felocell 4 + FCV-21	SC/Oral/Oral	10	0%	5,5	0	17
T3	Felocell 4A	SC/Oral/Oral	9	0%	4	0	10

T4	Felocell 4	SC/Oral/Oral	10	30%	10,5	1	30
----	------------	--------------	----	-----	------	---	----

FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

EJEMPLO 2-9. ANÁLISIS DE NEUTRALIZACIÓN CRUZADA DE SUEROS DE GATOS VACUNADOS CON COMPONENTES DE FELOCELL 4 CON Y SIN FCV-21

Se recogieron muestras de suero de cada gato en el estudio descrito en el EJEMPLO 2-7 después de la segunda vacunación, pero antes de la exposición. Las muestras se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos, y se evaluaron en el ensayo de neutralización de suero contra cada una de las 26 cepas de FCV como se ha descrito previamente en el EJEMPLO 1-10 (TABLA 1-6).

Los datos de neutralización de suero se analizaron con títulos de puntos de corte de >23 y >15, y se calculó una media de los dos títulos de puntos de corte (Med.). Los resultados se muestran en la TABLA 2-10. Los datos indican que el perfil de neutralización cruzada de FELOCELL 4 (que contiene FCV-F9) permanece constante independientemente de si la vía de administración es SC/SC o SC/Oral. Sin embargo, con la adición de FCV-21, el perfil de neutralización cruzada se potencia mucho cuando la vacuna se administra por SC/SC o SC/Oral. Además, para FELOCELL 4A (que contiene FCV-21, pero no FCV-F9), el perfil de neutralización cruzada se potencia para las vías de vacunación SC/SC, SC/Oral e incluso Oral/Oral.

TABLA 2-10									
<u>Tratamiento</u>	<u>Vacunación</u>				<u>Recogida de Suero</u>		<u>Neutralización cruzada</u>		
	<u>Nº de animales</u>	<u>Días</u>	<u>Dosis</u>	<u>Vía</u>	<u>Días</u>	<u>Nº de animales</u>	<u>% (>23)</u>	<u>% (>15)</u>	<u>% (Med.)</u>
Control negativo	10	0	1 ml	SC	42	9	10,8	13,9	12,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SC	42	9	38,5	42,3	40,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SC	42	10	39,2	42,7	41,0
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	56,5	62,3	59,4
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	56,2	60	58,1
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SC	42	10	58,9	64,6	61,8
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SC	42	10	49,6	59,2	54,4
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral	42	10	51,2	54,6	52,9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	53,9	62,7	58,3
		21	1 ml	SC					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SC	42	10	55,8	63,9	59,9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral	42	10	60,8	68,1	64,5
		21	1 ml	Oral					

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sin FCV-F9, pero con FCV-21

En la TABLA 2-11, los regímenes de vacunación evaluados incluyeron
5 una vacunación inicial subcutánea seguida de dos inmunizaciones de refuerzo

orales en el día 21 y en el día 42 (SC/Oral/Oral). Los resultados indican que la adición de FCV-21, con o sin FCV-F9 en FELOCELL 4, dieron como resultado perfiles de neutralización cruzada significativamente más amplios (un aumento de aproximadamente el 40%).

TABLA 2-11

<u>Tratamiento</u>	<u>Vacunación</u>					<u>Recogida de suero</u>		<u>Neutralización cruzada</u>		
	<u>Nº de Animales</u>	<u>Días</u>	<u>Fecha</u>	<u>Dosis</u>	<u>Vía</u>	<u>Días</u>	<u>Nº de Animales</u>	<u>% (>23)</u>	<u>% (>15)</u>	<u>% (Med.)</u>
Control negativo	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	5,8	10,4	8,1
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	72,5	77,1	74,8
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	9	72,5	76,7	74,6
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4	10	0	15/2/2005	1 ml	SC	63	10	49,6	57,9	53,8
		21	8/3/2005	1 ml	Oral					
		42	29/3/2005	1 ml	Oral					

5 *FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sin FCV-F9, pero con FCV-21

También se describe el descubrimiento de que con las vacunas descritas en este documento como péptidos, proteínas y ADN relacionadas con cepas de FCV FCV-21, FCV-49 y FCV-26391-4, la administración oral u oronasal (ON) puede realizarse en el primer momento seguido de una segunda administración oral u oronasal sin los efectos secundarios previamente descritos mencionados anteriormente en el EJEMPLO 2-4 y en la TABLA 2-5.

10

194

Se debe observar que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, los artículos singulares tales como "un", "uno", y "el", pueden referirse a un objeto o a una pluralidad de objetos a menos que el contexto indique claramente otra cosa. De esta forma, por ejemplo, la
5 referencia a una composición que contiene "un compuesto" puede incluir un único compuesto o dos o más compuestos.

Se entenderá que los ejemplos y descripciones anteriores pretenden ser ilustrativos y no restrictivos. Muchas realizaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica después de leer la descripción anterior. El alcance
10 de la invención debe determinarse, por lo tanto, con respecto a las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes a los que tales reivindicaciones hacen referencia. Las descripciones de todos los artículos y referencias, incluyendo patentes, solicitudes de patente y publicaciones, se incorporan en este documento como referencia en su
15 totalidad y para todos los propósitos.

En las **TABLAS 2-1 hasta la 2-9**, Felocell® 4, Felocell 4, o FELOCELL 4, o estas palabras seguidas por el número "3" son vacunas donde cualquier variación del nombre Felocell es propiedad de Pfizer. La referencia a Felocell 4 A es Felocell 4 sin FCV-F9, la referencia a Felocell 3 A es Felocell 3 sin FCV-
20 F9. Nota, los verdaderos antígenos usados en este estudio no procedieron del producto comercial sino que los antígenos se prepararon en pequeños lotes sólo para fines de investigación, pero de la misma manera que el producto comercial.

Todas las composiciones y/o procedimientos descritos y reivindicados en
25 este documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a

la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y procedimientos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, será evidente para los especialistas en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas del procedimiento descrito en este documento sin alejarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que los agentes descritos en este documento pueden sustituirse por ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados mientras se consigan los mismos o similares resultados. Dichos sustitutos similares y modificaciones evidentes para los especialistas en la técnica se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Descripción Numerada de la Invención. Descripciones y ejemplos adicionales. 1. Un procedimiento para inmunizar gatos contra calicivirus felino (FCV), comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas, en el que la primera y segunda vacuna se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FCV, la primera vacuna se administra por vía parenteral, y la segunda vacuna se administra por vía oral u oronasal, y la segunda vacuna se administra N días después de la administración de la primera vacuna, en la que N es un número entero de 3 a 120 días, ambos inclusive, también se describe N de aproximadamente 3 semanas y aproximadamente 2-4 semanas. 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las vacunas comprenden independientemente una vacuna de virus vivo, una vacuna de virus vivo modificado, una vacuna de virus inactivado, una vacuna recombinante, una

- vacuna de ADN, o una vacuna de antígeno de subunidad, sola o en combinación. 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos una de las vacunas incluye una o más cepas de FCV. 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dichas una o más cepas de FCV comprenden F9 o
- 5 FCV-21 o F9 y FCV-21. 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las vacunas son iguales. 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos una de las vacunas también se adapta para inducir una respuesta inmune contra uno o más patógenos seleccionados entre herpesvirus felino, virus de la leucemia felina, virus de inmunodeficiencia felina, virus de
- 10 panleucopenia felina y Chlamydia felina. 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera vacuna se administra por vía subcutánea. 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la segunda vacuna se administra por vía peroral o por vía oronasal. 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la segunda vacuna o una vacuna posterior se
- 15 administra después de que el gato haya desarrollado un título de neutralización de suero de FCV de aproximadamente 1:6 o mayor. 10. Un procedimiento como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además
- ~~administrar al gato una cantidad terapéuticamente eficaz de una tercera~~
vacuna, en el que la tercera vacuna se adapta para inducir una respuesta
- 20 inmune en el gato contra FCV y se administra por vía parenteral, por vía oral, o por vía oronasal M días después de la administración de la primera o segunda vacuna, donde M es un número entero de 1 a 120 días, ambos inclusive. 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la tercera vacuna se administra por vía subcutánea. 12. Un procedimiento para inmunizar gatos contra
- 25 calicivirus felino (FCV), comprendiendo el procedimiento administrar a un gato

cantidades terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas, en el que la primera y segunda vacunas se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FCV, en el que la primera vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, y la segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, y la segunda vacuna se administra N días después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número entero de 3 a 120 días, ambos inclusive, también se especifica N de aproximadamente 3 semanas y aproximadamente 2-4 semanas. 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la cepa de FCV se selecciona entre el grupo constituido por FCV-21, FCV-49, FCV 26391-4. 14. Un procedimiento para inmunizar animales que comprende administrar a un animal una cantidad terapéuticamente eficaz de una primera y segunda vacunas, con una tercera vacuna opcional, en el que la primera, la segunda y la tercera vacuna opcional se adaptan para inducir una respuesta inmune y la primera vacuna se administra por vía parenteral o por vía oral, la segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, y la segunda y tercera vacuna opcional se administran N días después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número entero de 3 a 120 días, ambos inclusive, también se especifica N de aproximadamente 3 semanas y aproximadamente 2-4 semanas y el procedimiento puede incluir administraciones de refuerzo anuales opcionales de la vacuna, incluyendo un periodo M de aproximadamente un año.

PARTE 3

ESTA PARTE PROPORCIONA PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNIZAR ANIMALES CONTRA PARVOVIRUS FELINO (FPV) Y HERPESVIRUS FELINO (FHV).

En este documento se describen procedimientos y materiales para tratar e inmunizar animales con vacuna, y en particular gatos contra enfermedades respiratorias felinas causadas por calicivirus felino (FCV), panleucopenia felina causada por Parvovirus Felino (FPV), rinotraqueítis viral felina causada por herpesvirus felino (FHV), que también se ha denominado virus de la rinotraqueítis felina. A continuación se describen nuevas combinaciones de vacunas, que cuando se presentan a un felino de la manera descrita permiten suministros eficaces orales únicos y orales/orales y subcutáneos/orales de vacunas tanto contra FPV como contra FHV.

- 10 Oral único significa un único suministro oral que confiere protección eficaz a un animal vacunado. Por oral/oral se entiende un suministro oral dado dos veces; similar a la descripción anterior en la Parte 2, es decir, oral seguido por algún periodo de tiempo y después se da otra dosis mediante la vía oral, y subc/oral es una primera dosis dada por vía subcutánea seguida por un periodo
- 15 de tiempo y después se da otra dosis mediante la vía oral.

Lo que se describe en este documento es el suministro de la combinación de FPV vivo modificado y/o FHV vivo modificado en combinación con una vacuna de Chlamydia vivo modificado, o cualquier componente de la vacuna de Chlamydia vivo modificado, por ejemplo, medio de cultivo, lisado de

20 células o células enteras, o cualquier componente del propio Chlamydia. Chlamydia también se denomina como Chlamydia Felino, o Chlamydia psittaci Felino o FCp.

Cuando se da FPV vivo modificado solo o en combinación con FCV vivo modificado, o vacunas de FHV vivo modificado, el FPV no es eficaz cuando se

25 suministra de manera oral/oral, y muestra un título de neutralización de suero

disminuido con la vía de administración SC/oral. De forma similar, cuando FHV vivo modificado se da solo o en combinación con FCV vivo modificado, o con vacuna de FPV vivo modificado, el FHV no es eficaz cuando se suministra de manera oral/oral, y muestra una eficacia disminuida con la vía de administración SC/oral. Sólo cuando FPV y/o FHV se dan en combinación con una vacuna de Chlamydia vivo modificado, se proporciona una protección adecuada contra FPV y/o FHV, cuando el suministro de las vacunas de combinación es a través de una vía subc/oral u oral/oral.

De acuerdo con lo anterior, se proporcionan los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos pretender ser ilustrativos y no limitantes, y representan algunas realizaciones específicas de la presente invención.

EJEMPLO 3-1 (teórico). RÉGIMEN DE VACUNACIÓN SUBC/ORAL CON FPV Y CHLAMYDIA. FPV y Chlamydia (o cualquier componente de vacuna de Chlamydia vivo modificado) se proporciona en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía subcutánea/oral.

EJEMPLO 3-2 (teórico). RÉGIMEN DE VACUNACIÓN ORAL/ORAL CON FPV Y CHLAMYDIA. FPV y Chlamydia (o cualquier componente de vacuna de Chlamydia vivo modificado) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral.

EJEMPLO 3-3 (teórico). RÉGIMEN DE VACUNACIÓN SUBC/ORAL CON FPV, FHV Y CHLAMYDIA. FPV, FHV y Chlamydia (o cualquier componente de vacuna de Chlamydia vivo modificado) se proporcionan en una vacuna de

combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía subcutánea/oral.

EJEMPLO 3-4 (teórico). RÉGIMEN DE VACUNACIÓN ORAL/ORAL CON FPV, FHV Y CHLAMYDIA. FPV, FHV y Chlamydia (o cualquier componente de
5 vacuna de Chlamydia vivo modificado) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral.

EJEMPLO 3-5 (real). RÉGIMEN DE VACUNACIÓN SUBC/ORAL CON FPV, FHV, FCV Y CHLAMYDIA. FPV, FHV, FCV y Chlamydia (o cualquier
10 componente de vacuna de Chlamydia vivo modificado) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral (Tabla 3-1).

EJEMPLO 3-6 (real). RÉGIMEN DE VACUNACIÓN ORAL/ORAL CON FPV, FHV, FCV Y CHLAMYDIA. FPV, FHV, FCV y Chlamydia (o cualquier
15 componente de vacuna de Chlamydia vivo modificado) se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral. Véase la Tabla 3-1.

~~Se vacunaron gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8~~
semanas de edad, con componentes de FELOCELL 4A y 3A que contienen
20 virus de rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-21], virus de panleucopenia [FPV] y *Chlamydia psittaci* [FCp]. Los regímenes de vacunación evaluados incluían: una vacunación inicial subcutánea seguida de refuerzos subcutáneos en los días 21, (SC/SC); una vacunación inicial subcutánea seguida de una inmunización de refuerzo oral en el día 21
25 (SC/Oral); o una vacunación inicial oral seguida de una segunda vacunación

- oral en el día 21. La vacunación oral se consiguió mediante la administración de la vacuna en la boca. Las muestras de suero de cada gato se recogieron después de la segunda vacunación, y se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos. Las muestras se evaluaron en el ensayo de neutralización de suero
- 5 contra FPV.

TABLA 3-1		
Vacuna	Vía	Título de neutralización de suero de FPV
FELOCELL 4A	SC/SC	4096
FELOCELL 4A	SC/Oral	7276
FELOCELL 4A	Oral/Oral	5793
FELOCELL 3A	Oral/Oral	7

FELOCELL 4A: FPV/FHV/FCV-21/FCp

FELOCELL 3A: FPV/FHV/FCV-21

- Los resultados de la TABLA 3-1 sugieren que los gatos respondieron mínimamente al antígeno FPV, como se había indicado previamente en la
- 10 bibliografía: (Absence of an immune response after oral administration of attenuated feline panleukopenia virus. Schults RD, Scott FW, Infect Immun. 1973, 7 de abril (4): 547-9). Con la presencia de Chlamydia, sin embargo, o cualquier componente asociado con una vacuna de Chlamydia, los títulos de neutralización de suero de FPV fueron mucho más altos, sugiriendo eficacia *in*
- 15 vivo contra la exposición a FPV. Además, se ha observado inmunogenicidad contra FPV potenciada no solamente con SC/SC, SC/Oral, sino también con un grupo Oral/Oral.

EJEMPLO 3-7 (real). RÉGIMEN DE VACUNACIÓN ORAL/ORAL CON FPV, FHV, FCV.

FPV, FHV, y FCV se proporcionan en una vacuna de combinación con o sin otros componentes. Las vacunas vivas modificadas pueden suministrarse por vía oral/oral. Véase la Tabla 3-2.

Se vacunaron gatos domésticos de pelo corto, de aproximadamente 8 semanas de edad, con FELOCELL 3A que contiene virus de rinotraqueítis felina vivo modificado [FHV], calicivirus [FCV-21], y virus de panleucopenia [FPV]. Los regímenes de vacunación evaluados incluían: una vacunación inicial subcutánea seguida de refuerzos subcutáneos en los días 21, (SC/SC); una vacunación inicial subcutánea seguida de una inmunización de refuerzo oral en el día 21 (SC/Oral); o una vacunación inicial oral seguida de una segunda vacunación oral en el día 21. La vacunación oral se consiguió mediante la administración de la vacuna en la boca. Se recogieron muestras de suero de cada gato después de la primera y segunda vacunación, y se trataron con calor a 56°C durante 30 minutos. Las muestras se analizaron en el ensayo de neutralización de suero contra FPV.

TABLA 3-2				
		Título de neutralización de suero de FPV-FPN		
Grupo	Tratamiento	Vía	<u>Después de la primera vacunación</u>	<u>Después de la segunda vacunación</u>
T01	Sin vacunar	N/A	1	1
T02	FELOCELL 3A	SC/SC	16618	54319
T03	FELOCELL 3A	SC/Oral	20346	28771
T04	FELOCELL	Oral/Oral	1	4

	3A			
--	----	--	--	--

Los resultados de la TABLA 3-2 sugieren que el antígeno FPV presente en la vacuna FELOCELL 3A indujo una respuesta inmune mínima cuando se dio por vía Ora/Oral (coherente con los resultados de la TABLA 3-1). Sin embargo, cuando las vacunas se dieron por vía SC/SC o SC/Oral, se observaron títulos de neutralización de suero de FPV altos, un indicio de eficacia *in vivo*.

Descripción Numerada de la Invención. Descripciones y ejemplos adicionales. Obsérvese a continuación, FCV es Calicivirus Felino, FPV es Parvovirus Felino, que también se ha llamado Panleucopenia o FPL y finalmente, FHV es Herpesvirus Felino.

1. Una composición inmunogénica que comprende tanto FPV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado administrados en una única dosificación de administración.
2. Una vacuna, que comprende FPV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado suministrada a un felino en dos dosificaciones de administración única separadas, las dosificaciones de administración única se suministran ambas por vías oral u oronasal, y están separadas en el tiempo por un periodo de 3 a 120 días, o aproximadamente 3 semanas, o aproximadamente 2 semanas.
3. Un procedimiento para inmunizar gatos contra FPV, comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas, en el que la primera y segunda vacuna se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FPV, la primera vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal y la segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, la segunda vacuna se administra *N* días

- después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número entero de 3 a 120, ambos incluidos, o donde N es aproximadamente 3 semanas o donde N es aproximadamente 2 semanas, en el que dicha primera y segunda vacuna comprenden tanto FPV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado.
- 5 4. Una composición inmunogénica, que comprende tanto FHV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado administrada en una dosificación de administración única.
5. Una vacuna, que comprende FHV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado, suministrada a un felino en dos dosificaciones de administración única separadas, las dosificaciones de
- 10 administración única se suministran ambas por las vías oral u oronasal y están separadas en el tiempo por un periodo de 3 a 120 días, o aproximadamente 3 semanas o aproximadamente 2 semanas.
6. Un procedimiento para inmunizar gatos contra FHV, comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas, en el que
- 15 la primera y segunda vacuna se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FHV, la primera vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal y la segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, la segunda vacuna se administra N días después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número entero de 3 a 120, ambos incluidos, o
- 20 donde N es aproximadamente 3 semanas o donde N es aproximadamente 2 semanas, en el que dicha primera y segunda vacuna comprenden tanto FHV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado.
7. Una composición inmunogénica, que comprende tanto FCV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado administrada en una única dosificación de administración.
- 8.
- 25 Una vacuna, que comprende FCV vivo modificado y Chlamydia vivo

modificado, suministrada a un felino en dos dosificaciones de administración única separadas, las dosificaciones de administración única se suministran ambas por las vías oral u oronasal y están separadas en el tiempo por un período de 3 a 120 días, o aproximadamente 3 semanas o aproximadamente 2 semanas.

5 9. Un procedimiento para inmunizar gatos contra FCV, comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas, en el que la primera y segunda vacunas se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FCV, la primera vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal y la

10 segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, la segunda vacuna se administra N días después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número entero de 3 a 120, ambos incluidos, o donde N es aproximadamente 3 semanas o donde N es aproximadamente 2 semanas, en el que dicha primera y segunda vacuna comprenden tanto FCV vivo

15 modificado como Chlamydia vivo modificado. 10. Una composición inmunogénica, que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado administrada en una dosificación de administración única. 11. Una vacuna, que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado, suministrada a un felino en dos

20 dosificaciones de administración única separadas, las dosificaciones de administración única se suministran ambas por las vías oral u oronasal y están separadas en el tiempo por un periodo de 3 a 120 días, o aproximadamente 3 semanas o aproximadamente 2 semanas. 12. Un procedimiento para inmunizar simultáneamente gatos contra FPV y FHV, comprendiendo el procedimiento

25 administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y

- segunda vacunas, en el que la primera y segunda vacuna se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FPV y FHV, la primera vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal y la segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, la segunda vacuna se administra N días
- 5 después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número entero de 3 a 120, ambos incluidos, o donde N es aproximadamente 3 semanas o donde N es aproximadamente 2 semanas, en el que dicha primera y segunda vacuna están comprendidas por FPV vivo modificado, FHV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado. 13. Una composición inmunogénica,
- 10 que comprende FPV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado administrada en una dosificación de administración única. 14. Una vacuna, que comprende FPV vivo modificado, FCV vivo modificado, y Chlamydia vivo modificado, suministrada a un felino en dos dosificaciones de administración única separadas, las dosificaciones de administración única se
- 15 suministran ambas por las vías oral u oronasal y están separadas en el tiempo por un periodo de 3 a 120 días, o aproximadamente 3 semanas o aproximadamente 2 semanas. 15. Un procedimiento para inmunizar
- ~~simultáneamente gatos contra FPV y FGV, comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y~~
- 20 segunda vacunas, en el que la primera y segunda vacunas se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FPV y FHV, la primera vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal y la segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, la segunda vacuna se administra N días después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número
- 25 entero de 3 a 120, ambos inclusive o donde N es aproximadamente 3 semanas

- o donde N es aproximadamente 2 semanas, en el que dicha primera y segunda vacunas comprenden FPV vivo modificado, FHV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado. 16. Una composición inmunogénica, que comprende FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado administrada en
- 5 una dosificación de administración única. 17. Una vacuna, que comprende FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado, suministrada a un felino en dos dosificaciones de administración única separadas, las dosificaciones de administración única se suministran ambas por las vías oral u oronasal y están separadas en el tiempo por un periodo de 3
- 10 a 120 días, o aproximadamente 3 semanas o aproximadamente 2 semanas. 18. Un procedimiento para inmunizar simultáneamente gatos contra FHV y FCV, comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas, en el que la primera y segunda vacuna se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato
- 15 contra FHV y FCV, la primera vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal y la segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, la segunda vacuna se administra N días después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número entero de 3 a 120, ambos incluidos, o donde N es aproximadamente 3 semanas o donde N es aproximadamente 2
- 20 semanas, en el que dicha primera y segunda vacuna comprenden FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado. 19. Una composición inmunogénica, que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado administrada en una dosificación de administración única. 20. Una vacuna, que comprende FPV
- 25 vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo

modificado, suministrada a un felino en dos dosificaciones de administración única separadas, las dosificaciones de administración única se suministran ambas por las vías oral u oronasal y están separadas en el tiempo por un periodo de 3 a 120 días, o aproximadamente 3 semanas o aproximadamente 2
5 semanas. 21. Un procedimiento para inmunizar simultáneamente gatos contra FPV, FHV y FCV, comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas, en el que la primera y segunda vacunas se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FPV, la primera vacuna se administra por vía oral o por vía
10 oronasal y la segunda vacuna se administra por vía oral o por vía oronasal, la segunda vacuna se administra N días después de la administración de la primera vacuna, donde N es un número entero de 1 a 120, ambos incluidos, o donde N es aproximadamente 3 semanas o donde N es aproximadamente 2 semanas, en el que dicha primera y segunda vacuna comprende FPV vivo
15 modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada.

10 2. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende la secuencia de proteína (SEC ID N°: 13) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 91,2%, 95% y 99% de identidad; en la que dicha proteína de
15 la cápsida se proporciona en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

~~3. Una vacuna de ADN para inmunizar gatos contra calicivirus felino que~~
comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la
20 cápsida de FCV-21 o una proteína de la cápsida de FCV-21 aislada, en la que dicho ADN comprende una secuencia (SEC ID N°: 12) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 78,7%, y 79,2% de identidad de secuencia y que permiten sustituciones conservativas.

25 4. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que

comprende una proteína de la cápsida de FCV-49 o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende una secuencia de proteína de la cepa FCV-49.

- 5 5. Una vacuna para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende una proteína de la cápsida de FCV-49 o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada, en la que dicha proteína de la cápsida comprende la secuencia de proteína (SEC ID N°: 15) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 92,7%, 95% y 99% de identidad; en la que dicha proteína de
10 la cápsida se proporciona en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Una vacuna de ADN para inmunizar gatos contra calicivirus felino que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de la
15 cápsida de FCV-49 o una proteína de la cápsida de FCV-49 aislada, en la que dicho ADN comprende una secuencia (SEC ID N°: 14) y secuencias que tienen al menos aproximadamente 78,9%, en concreto 79,4% (78,9 + 0,5) de identidad de secuencia y que permiten sustituciones conservativas.

- 20 7. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además solo o en cualquier combinación lo siguiente: cuando contiene un adyuvante, en el que el componente de FCV está vivo, en el que el componente de FCV está atenuado, en el que el componente de FCV está inactivado, que puede incluir al menos una cepa de calicivirus felino diferente
25 seleccionada entre el grupo constituido por FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-

255, y FCV-2280.

8. Un procedimiento para inmunizar gatos contra calicivirus felino (FCV), comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades
5 terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas, en el que las primera y segunda vacunas están adaptadas para inducir una respuesta inmune en el gato contra FCV, la primera vacuna se administra por vía parenteral, y la segunda vacuna se administra por vía oral u oronasal, y la segunda vacuna se administra N días después de la administración de la
10 primera vacuna, en el que N es un número entero de 3 a 120, ambos inclusive.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que las vacunas comprenden independientemente una vacuna de virus vivo, una vacuna de virus vivo modificado, una vacuna de virus inactivado, una vacuna
15 recombinante, una vacuna de ADN, o una vacuna de antígeno de subunidad, sola o en combinación.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que al menos una de las vacunas incluye una o más cepas de FCV.
- 20 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que esas una o más cepas de FCV comprenden F9 o FCV-21 o F9 y FCV-21.
12. Una composición inmunogénica, que comprende tanto FPV vivo
25 modificado como Chlamydia vivo modificado, y o que comprende tanto FHV

vivo modificado como Chlamydia vivo modificado y o que comprende tanto FCV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado y o que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado y o que comprende FPV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado y o que comprende FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado y o que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado administrada en una única dosis de administración.

- 10 13. Una vacuna que comprende tanto FPV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado, y o que comprende tanto FHV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado y o que comprende tanto FCV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado y o que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado y o que comprende FPV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado y o que comprende FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado y o que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado administrada a un felino en dos dosificaciones administrativas únicas por separado, las dosificaciones administrativas únicas administradas ambas por las vías oral u oral-nasal y separadas en el tiempo por un periodo de 3 a 120 días.

14. Un procedimiento para inmunizar gatos contra FPV, FCV y o FHV, comprendiendo el procedimiento administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de las primera y segunda vacunas, en el que las

primera y segunda vacunas se adaptan para inducir una respuesta inmune en el gato contra FPV, y o FCV y o FHV, la primera vacuna se administra por vía oral u oronasal y la segunda vacuna se administra por vía oral u oronasal, la segunda vacuna se administra N días tras la administración de la primera

5 vacuna, donde N es un número entero de 3 a 120, ambos inclusive, donde dicha primera y segunda vacuna están comprendidas por una composición:

- a) que comprende tanto FPV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado; y o
- b) que comprende tanto FHV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado;
- 10 y o
- c) que comprende tanto FCV vivo modificado como Chlamydia vivo modificado; y o
- d) que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado; y o
- 15 e) que comprende FPV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado; y o
- f) que comprende FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado; y o
- g) que comprende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado y Chlamydia vivo modificado, o cualquier combinación de los
- 20 mismos.

15. Cualquier composición inmunogénica, vacuna y procedimientos para tratar a animales, especialmente gatos, como se describe en este documento.

RESUMEN

La presente invención se refiere a una vacuna para inmunizar un gato contra virus felinos. La presente invención también se refiere a un clon de ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida del calicivirus felino aislado. La presente invención además se refiere a una vacuna viva o muerta, que comprende el calicivirus felino aislado, una vacuna de subunidad que comprende la proteína de la cápsida del calicivirus felino aislado, una vacuna de ácido nucleico que comprende un clon de ácido nucleico del calicivirus felino aislado, y una vacuna de vector de virus recombinante que comprende ácido nucleico que codifica la proteína de la cápsida del calicivirus felino aislado. La presente invención también se refiere a un procedimiento para identificar un calicivirus felino útil para producir una composición de vacuna y para ensayos para diagnosticar gatos infectados con calicivirus felino. También se describe un procedimiento para inmunizar animales, especialmente gatos, contra una enfermedad, en particular contra calicivirus felino (FCV). El procedimiento incluye administrar a un gato cantidades terapéuticamente eficaces de primera y segunda vacunas de FCV. La primera vacuna se administra por vía oral o parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intramuscular, y similares).

La segunda vacuna se administra por vía oral u oronasal N días después de la administración de la primera vacuna, en el que N es un número entero de 3 a 120, ambos inclusive. También puede darse una tercera administración de vacuna. La presente invención también describe procedimientos y materiales para tratar e inmunizar animales con vacuna, y en particular gatos contra FPV o Parvovirus Felino, que también se denomina Panleucopenia o FPL y contra

otra enfermedad, FHV o Herpesvirus Felino, que también se denomina Virus de la Rinotraqueítis Felina.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/002018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/16 A61K39/12 A61K48/00 C07K14/08 C07K16/10
C12N15/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91/01332 A (UPJOHN CO [US]) 7 February 1991 (1991-02-07) the whole document	1-3,7,15
X	US 6 241 989 B1 (SCOTT FRED W [US] ET AL) 5 June 2001 (2001-06-05) the whole document	1-3,7,15
X	DATABASE EMBL Feline calicivirus: capsid protein. 1 October 2003 (2003-10-01), CARTER, M.J. ET AL.: "Q7TER8" XP002410483 abstract	1-3,7,15
X	& DATABASE EMBL Feline calicivirus capsid protein precursor & or 18 June 2003 (2003-06-18), CARTER ET AL.: "AY299541" abstract	3,7
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents; such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 2006

Date of mailing of the international search report

21 02 2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer:

Schulz, Regine

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/002018

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NEILL J D ET AL: "Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus." JOURNAL OF VIROLOGY. OCT 1991, vol. 65, no. 10, October 1991 (1991-10), pages 5440-5447, XP002408054 ISSN: 0022-538X abstract	3,7
X	& DATABASE EMBL Feline calicivirus capsid protein gene (put.) 26 May 1990 (1990-05-26), NEILL, J.D. ET AL.: "M32819" abstract	3,6
X	& DATABASE EMBL Feline calicivirus CFI/68 16 September 1994 (1994-09-16), NEILL, J.D.: "U13992" abstract	3,6
A	----- US 6 534 066 B1 (POULET HERVE [FR] ET AL) 18 March 2003 (2003-03-18) the whole document	1-3,7,15
A	& POULET H ET AL: "Immunisation with a combination of two complementary feline calicivirus strains induces a broad cross-protection against heterologous challenges" VETERINARY MICROBIOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 106, no. 1-2, 20 March 2005 (2005-03-20), pages 17-31, XP004765309 ISSN: 0378-1135	1-3,7,15
A	----- SYKES J E: "Feline Chlamydiosis" CLINICAL TECHNIQUES IN SMALL ANIMAL PRACTICE, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 20, no. 2, May 2005 (2005-05), pages 129-134, XP004878915 ISSN: 1096-2867 page 133, last paragraph	1-3,7,15
A	----- SCHWANTES ASTRID ET AL: "Application of chimeric feline foamy virus-based retroviral vectors for the induction of antiviral immunity in cats." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77, no. 14, July 2003 (2003-07), pages 7830-7842, XP002410480 ISSN: 0022-538X abstract	1-3,7,15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/002018

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SOMMERVILLE L M ET AL: "DNA vaccination against feline calicivirus infection using a plasmid encoding the mature capsid protein" VACCINE, vol. 20, no. 13-14, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 1787-1796, XP004366016 ISSN: 0264-410X abstract	1-3,7,15
A	MCCABE V J ET AL: "Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 19-20, 7 June 2002 (2002-06-07), pages 2454-2462, XP004359675 ISSN: 0264-410X abstract	1-3,7,15
A	WO 98/56929 A (DIMMINACO AG S A LTD [CH]) 17 December 1998 (1998-12-17) page 14, line 8 - page 24	1-3,7,15
P,X	WO 2005/080416 A (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC [US]; RONG SING [US]; SLADE DAVID EWELL) 1 September 2005 (2005-09-01) the whole document	1-4,6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2006/002018

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1 - 3 (completely); 7, 5 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 - 3 (completely); 7, 15 (in part)

A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-21 capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein wherein said capsid protein comprises protein sequence (SEQ ID 13) and sequences having at least 91.2%, 95% and 99% percent identity; comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-capsid protein or an isolated FCV-21 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (SEQ ID 12) and sequences having at least about 78.7%, and 79.2% sequence identity and allowing for conservative substitutions.

2. claims: 4 - 6 (completely), 7, 15 (in part)

A vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising a FCV-49 capsid protein or an isolated FCV-49 capsid protein wherein said capsid protein comprises protein sequence (SEQ ID 15) and sequences having at least 92.7%, 95% and 99% percent identity; a DNA vaccine for immunizing cats against feline calicivirus comprising nucleic acid sequences that code for a FCV-capsid protein or an isolated FCV-49 capsid protein wherein said DNA comprises a sequence (SEQ ID 14) and sequences having at least about 78.9%, i.e. 79.4% (78.9 + 0.5) sequence identity and allowing for conservative substitutions.

3. claims: 12 (completely), 15 (in part)

An immunogenic composition comprising various combinations of e.g. modified live FHV, Chlamydia, FCV and / or FPV being administered in a single administrative dosage.

4. claims: 8 - 11, 13, 14 (completely), 15 (in part)

A method of immunizing cats against feline calicivirus (FCV), delivered in two separate single administrative dosages, both delivered by oral or oralnasal routes separated in time.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2006/002018

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9101332 A	07-02-1991	AT 119545 T AU 629381 B2 AU 6037990 A DE 69017687 D1 DE 69017687 T2 DK 484382 T3 EP 0484382 A1 ES 2069742 T3 JP 4506900 T	15-03-1995 01-10-1992 22-02-1991 13-04-1995 19-10-1995 24-07-1995 13-05-1992 16-05-1995 03-12-1992
US 6241989 B1	05-06-2001	NONE	
US 6534066 B1	18-03-2003	US 2004076644 A1	22-04-2004
WO 9856929 A	17-12-1998	AU 731624 B2 AU 8212698 A BR 9811096 A EP 0975773 A1 JP 2002510202 T NZ 501579 A US 2002009458 A1 US 6231863 B1	05-04-2001 30-12-1998 18-07-2000 02-02-2000 02-04-2002 30-11-2001 24-01-2002 15-05-2001
WO 2005080416 A	01-09-2005	AR 047581 A1	25-01-2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-007307- -00000-0000

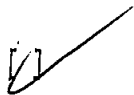
Fecha: 2008-01-25 16:04:07 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 221



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- ◆ Descripción de la invención [X]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [X]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha 25. ENE. 2008

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

2

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS INC

REFERENCIA	Radicación No.	8 7307
	Solicitud internacional	PCT/IB2006/002018
	Fecha inicio fase nacional	28/02/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3943

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe allegar el listado de secuencias correspondiente.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 14 MAR 2008
jfernand