



ESPAÑA

10 ES	11	NUMERO	10 AI
	21	442.892	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		21-11-1975	

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:	52 FECHA	53 PAIS
51 NUMERO		
525.689	21-11-1974	Estados Unidos

9 MAR 1977

67 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	

64 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA VACUNA QUE CUANDO SE INYECTA EN GATOS ES CAPAZ DE INMUNIZARLOS CONTRA EL FELINE CALICIVIRUS.

71 SOLICITANTE (S)

PITMAN-MOORE, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Box 344, Bear Tavern Road, WASHINGTON CROSSING, New Jersey, Estados Unidos.

72 INVENTOR (ES)

James Long Bittle; Wayne J. Rubic ambos de nacionalidad estadounidense.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

EXTRACTO DE LA DESCRIPCION

La propagación y modificación de la feline calicivirus (FCV) en los cultivos de tejido de felinos y el desarrollo de una vacuna útil para la prevención de las infecciones respiratorias en los gatos por feline calicivirus, comprendiendo dicha vacuna una raza de virus modificada de FCV.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La infección por feline calicivirus es una enfermedad común y grave en los gatos, generalmente asociada al tracto respiratorio. Existen muchos serotipos registrados en la literatura como causantes desde ligeros problemas respiratorios hasta una grave neumonía en los gatos. Hay informes en la literatura que indican que esta enfermedad es responsable de aproximadamente la mitad de los casos clínicos de las infecciones respiratorias en los felinos.

El virus infecta las células epiteliales de la nariz, pulmón, faringe, tráquea y ojo, causando epiteliosis y necrosis. Los síntomas resultantes varían de una infección inaparente a una dolencia respiratoria leve, llegando a los de una grave enfermedad respiratoria con neumonía, y terminando en ocasiones con la muerte. Ulteriores lesiones ulcerosas de nariz y lengua se asocian con frecuencia a la enfermedad, como sucede con la anorexia y la pirexia. El virus es desalojado de la nariz, ojos y boca en el curso de la enfermedad clínica. Las infecciones por feline calicivirus son con frecuencia graves y complicadas después por bacterias cuando decrece la resistencia. La mortalidad puede ser importante, especialmente en los gatitos jóvenes. La transmisión del feline calicivirus a gatos susceptibles

tiene lugar generalmente por instilación intranasal, por ejemplo por gotitas expelidas al estornudar o por contacto (generalmente nariz con nariz). La resistencia que sigue a la recuperación de una infección natural o experimental es de duración moderada.

5

El grupo FCV de serotipos se denominó primeramente Picorna virus. Este nombre fue cambiado por el Comité Internacional sobre Nomenclatura Viral en 1971, designando a este grupo viral como Picorna viradae en el género calicivirus. El primer aislamiento de un serotipo de feline calicivirus fue registrado por L. B. Fastier en Amer. J. Vet. Res., 18, 382 (1957). Desde entonces, han aparecido varios informes en la literatura que confirman el aislamiento del feline calicivirus de sujetos felinos en diversas partes del mundo, que identifican el virus como un miembro felino de calicivirus, y que describen la transmisión, epidemiología y características histológicas de la enfermedad, así como las infecciones observadas en los diferentes serotipos. Por ejemplo, véase J. L. Bittle et al., Amer. J. Vet. Res., 21, 547 (1960) y 22, 374 (1961); F. Bürki, Arch. F. die Gesam. Vir., 15, 690 (1965); R.A. Crandall, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 126, 240 (1967); Kahn and Gillespie, Cornell Vet., 60, 669 (1970); Holzinger and Kahn, Amer. J. Vet. Res., 31, 1623 (1970); y E. Takahashi et al., Jap. J. Vet. Sci., 33, 81 (1971).

10

15

20

25

Existe una excelente exposición de la cuestión puesta al día, que es la aportada por Gillespie y Scott en el libro "Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine", Volumen 17, Edtda por C.A. Brandly and C.E. Cornelius, páginas 176-188, Academic Press, Inc. , Nueva

30

York, 1973. Gillespie y Scott registraron como infructuosos los anteriores intentos de inmunización con feline calicivirus (página 189). Hoy día, no se dispone de ninguna vacuna efectiva para proteger a los gatos contra el feline calicivirus.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Conforme a la presente invención, se ha hallado que el feline calicivirus (FCV) puede propagarse en cultivos de tejidos de felinos, de preferencia riñón y lengua, y modificarse y reducirse así la virulencia del virus de modo que no se observan síntomas de la enfermedad tras una inoculación parenteral.

En consecuencia, la presente invención produce una raza modificada o atenuada de calicivirus feline vivo, que cuando se inocula parenteralmente, de preferencia intramuscularmente a los gatos, los inmuniza contra la enfermedad del FCV virulento. Se aporta también una vacuna que se atenúa en un grado tal que estimulará una respuesta de anticuerpos inmunizando con efectividad a los gatos para períodos prolongados.

La vacuna es segura en cuanto a que no ocasiona enfermedad en los gatos que la reciben por vía parenteral ni pasará el feline calicivirus modificado del gato vacunado a los demás gatos que entren en contacto con él, con lo que se elimina la posibilidad de que aumente la virulencia del virus por el paso de un animal a otro. Esto constituye un importante avance en la lucha contra la enfermedad debida al feliné calicivirus.

Se pueden obtener feline calicivirus virulentos, vivos, de gatos infectados con el virus conforme a métodos

de aislamiento e identificación descritos en la literatura (por ejemplo, véase J.L. Bittle et al., Amer. J. Vet. Res. 21, 547 (1960). Los serotipos preferidos de feline calicivirus para utilización en este invento son aquellos que están relacionados serológicamente según determinan las técnicas ordinarias, por ejemplo pruebas comparadas por neutralización a base de suero. En la página 183 (Tabla I) de Gillespie y Scott (ibid.) aparece una lista de diversos serotipos de feline calicivirus. Entre los preferidos a los fines de esta invención, están los dos serotipos designados como "F-9" y "F-S". La raza F-9 ha sido depositada en la Colección de Cultivos Tipo Americano (American Type Culture Collection (ATCC) n<sup>o</sup>VR-782.

En general, los aislamientos de virus pueden hacerse frotando las membranas nasal y conjuntiva de gatos infectados con esponjas de hilas de algodón estériles, húmedas, que se sitúan después en un medio adecuado de cultivo de tejido felino, seguido de pasos standard en serie para replicar y aislar al virus. Un medio de cultivo particularmente apropiado es el derivado del tejido cortical de riñones de gatitos de 8 a 12 semanas de edad, que se tripsiniza por un método similar al descrito por J. Youngner (Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 85, 202 (1954) para las células de riñón de mono.

Al preparar las vacunas de esta invención, se ha comprobado que se puede realizar la atenuación y modificación del feline calicivirus virulento fácil y rápidamente mediante relativamente pocos pasos en serie, por lo menos 10, de preferencia por lo menos 13 y, en general, de aproximadamente 13 a 35, incluyendo purificación por

una técnica ordinaria de dilución terminal, en tejido de felino, utilizando temperaturas inferiores de incubación de aproximadamente 30<sup>+</sup>2°C, de preferencia 29-31°C. La purificación de los preparados virales se puede realizar por métodos ordinarios de tubo o plaga durante o a continuación de los pasos en serie.

El feline calicivirus es capaz de propagación en tales sistemas de cultivo de tejidos de felino como, por ejemplo de pulmón, testículo, riñón, timo, lengua y tejido fetal embriónico, y también en líneas celulares establecidas, tales como, por ejemplo, la línea celular de riñón de gato Crandall (CrFK), líneas celulares de lengua de gato, por ejemplo al nivel del tercer paso (Fc3Tg), y línea celular de feline neurofibrosarcoma (FNFS). Se prefieren sobre todo las líneas celulares de la lengua de los felinos.

Los intervalos de tiempo entre pasos deberán ser tales que permitan suficientemente que el virus replique entre los mismos, de preferencia de 1 a 6 días. El intervalo óptimo de tiempo entre pasos se puede determinar perfectamente mediante técnicas normales, por ejemplo por observaciones citofáticas, tales como permitiendo que se desarrolle el virus durante un paso particular anterior al punto en el que se pueda observar un gran efecto citofático (CPE) mientras se continúa la incubación.

La obtención con éxito de vacunas mediante el presente método de bajo paso-baja temperatura es realmente sorprendente, dado el hecho de que el paso en serie en el tejido de felino a temperaturas de incubación normales, de aproximadamente 35-37°C, no altera ni modifica el virus ni su patogenicidad a aproximadamente el mismo número de pasos.

De acuerdo con esta invención, por consiguiente, se aporta un procedimiento para atenuar el feline calicivirus (FCV) virulento para la producción de una vacuna capaz de inmunizar a los gatos, cuando son inyectados con la misma, contra el FCV, que comprende: la introducción de un inoculum de FCV virulento en un medio nutritivo de cultivo de tejido de felino fluido que no es tóxico para dicho virus; propagar dicho virus por medio de la incubación de dicho medio de cultivo nutritivo del tejido a una temperatura de aproximadamente  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante un período de 1 a 6 días, y a continuación separar un inoculum de dicho virus y hacer pasar en serie el virus a través de otros cultivos de tejido de felino de esta clase, por un total de por lo menos unos 10 pasos.

Los preparados virales producidos por medio de esta invención se pueden diluir para ajustar su potencia, y se les pueden añadir estabilizadores, tales como dextrosa y lactosa, u otras sustancias no tóxicas. Se pueden también desecar los preparados virales, por ejemplo mediante desecación por congelación, para fines de almacenamiento y conservación o para una subsiguiente formulación en vacunas líquidas. Se describen estabilizadores útiles en la desecación por congelación en W.A. Rightsel et al., *Cryobiology*, 1967, 3:423 y D. Greiff et al., Advances in Freeze Drying (Avances en la Desecación por Congelación), L. Rey, Ed., pp. 103-122, Hermann, París, 1966. Además, se pueden utilizar las vacunas en mezcla con otras vacunas inmunogénicas para administración a gatos.

Se describirá a continuación con mayor detalle la manera en la que se lleva a la práctica nuestra invención

en conjunción con los siguientes experimentos específicos. Quede entendido que estos experimentos específicos se dan a título ilustrativo y en modo alguno limitativo.

EJEMPLÒ I

5                   Se toma una muestra de feline calicivirus virulento vivo (serotipo F-9, ATCC nº VR-782), cultivado y aislado conforme al procedimiento descrito por J.L. Bittle et al., Amer. J. Vet. Res., 21, 547, (1960) y se añade a monocapas de una línea celular de lengua diploide de felino, en tubos  
10                   standard de cultivo o tubos "Leighton" (16 x 125 mm) preparados como sigue. La línea celular de lengua utilizada es la línea Fc3Tg a que se refieren K. M. Lee et al., Cornell Veterinarian, 59, 539 (1969). Cada tubo de línea celular, contenido de 1-2 ml de medio de desarrollo consistente en  
15                   Eagles Minimum Essential Medium (MEM) con el suplemento de un 10 % de suero de ternera fetal, 0,1 % de hidrolisato de lactalbúmina, 30 unidades de penicilina, 30 mcg de estreptomina y 2,5 mcg de anfotericina, se siembra con 1 ml de células de lengua de felino (200.000 células por ml). Si es  
20                   necesario, se ajusta el pH con bicarbonato sódico para mantener un pH de aproximadamente 7,2 - 7,8. Se dejan desarrollar las células a aproximadamente 35<sup>±</sup>2°C hasta que se logra una monocapa de células. Se vierten entonces los fluidos y se añaden 1-2 ml de un medio de mantenimiento (lo mismo que  
25                   arriba, con la excepción de que se utiliza 1-2 % de suero de ternera fetal. Se utilizan aproximadamente de 4 a 6 de tales tubos por paso viral.

                  A cada tubo de cultivo de tejido se le añade el inoculum de feline calicivirus F-9. El tubo así sembrado se  
30                   mantiene a aproximadamente 29-31°C hasta que se observa un

efecto citopático (CPE) al examen microscópico (aproximadamente a los 2-7 días). Cuando el CPE alcanza aproximadamente un 75-90 % de la monocapa, se recoge el contenido del tubo X y se someten 0,2 ml de inoculum a idénticos pasos en serie en 6 pasos adicionales (7 pasos en total). Tras el 7º paso, se realiza una purificación normal de la dilución terminal utilizando Eagles MEM suplementado con los antedichos antibióticos como diluyente con incubación mantenida a 29-31°C. Después de 7 días, el tubo final que es positivo con 75-90% CPE es sometido a recogida y se repite el procedimiento dos veces en un total de 10 pasos. Se efectúa un 11º paso a fin de aumentar el volumen por inoculación de una muestra de 0,5 ml desde el 10º paso a frascos contentivos de monocapas de cultivos de células de lengua diploides de felino, obtenidos por propagación de las células de la lengua según se ha descrito anteriormente. Al final del 11º paso se recoge el resultado, se identifica y se hace el análisis volumétrico por métodos conocidos.

El producto así preparado constituye una vacuna en bruto que puede diluirse según la concentración o se le pueden añadir estabilizadores u otras sustancias no tóxicas. Para uso como vacuna, se puede desecar o se puede preparar en forma líquida.

Para la propagación y la atenuación del virus, se puede utilizar cualquier medio de cultivo de tejido, no tóxico, nutritivo y fluido. Además del medio Eagles MEM suplementado arriba descrito, debe quedar entendido que se pueden utilizar también otros medios de cultivo de tejidos no tóxicos, nutritivos y fluidos.

EJEMPLO II

1 Ml de una vacuna preparada según el Ejemplo 1 y titulada a una concentración de virus a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  de  $10^{4,1}$  TCID<sub>50</sub>/ml (determinado por CPE) se administra intramuscularmente a tres gatos susceptibles. Se mantienen otros dos gatos como controles no vacunados. Se ha determinado previamente que los 5 gatos son sero-negativos al feline calicivirus. Se observa en general evidencia de grave enfermedad de FCV iniciada con pirexia al segundo día y otros síntomas clínicos vistos desde aproximadamente el cuarto día en adelante tras contacto normal o exposición a feline calicivirus virulento. La concentración de anticuerpos de los 5 gatos antes de la vacuna es de menos de 1:3 y un mes después, precisamente antes de la exposición, la concentración de anticuerpos de los 3 gatos inoculados era de un promedio de 1:15 frente a menos de 1:3 en los 2 controles no vacunados. Los 5 gatos fueron expuestos intranasalmente a feline calicivirus virulento (serotipo F-9) aplicado con un nebulizador (cada gato dentro de una atmósfera cerrada; dosis total de 0,025 ml conteniendo de aproximadamente  $10^6$  TCID<sub>50</sub>. Se observó a los gatos durante tres semanas para la evidencia de la enfermedad clínica. Los tres gatos vacunados permanecieron normales, sin enfermedad clínica ni síntomas, al contrario que los dos controles no vacunados que se pusieron muy enfermos con la enfermedad de FCV, mostrando los síntomas típicos tales como respuesta febril, ojos y nariz con destilación, falta de apetito y malestar general.

EJEMPLO III

Se tomó feline calicivirus virulento vivo, cul-

tivado y aislado conforme al procedimiento descrito por J. L. Bittle et al., *ibid.*, y expuesto por dichos investigadores como un aislado de "F-9", y se hizo pasar en serie 7 veces consecutivas por cultivos primarios de tejido de riñón de felino, en intervalos de 1-6 días a aproximadamente 35°C, seguidos de 3 diluciones terminales sucesivas en cultivos de tejido similares, con un total de 10 pasos (virus virulento). Se adaptó después el virus a una línea celular de lengua de felino (Fc3Tg) a 37°C. (11º paso). Se hicieron tres pasos adicionales en células de CrFK a 37°C. Al 14º paso, se comprobó el virus en los gatos y se halló que causaba signos clínicos típicos de infección de FCV (el virus es aún virulento).

El virus del 11º paso (designado como P-0) se hizo pasar también por tubos contentivos de una línea celular de lengua de felino (células Fc3Tg) a 29-31°C por un total de 8 pasos sucesivos (P-8) a intervalos de 1-6 días, seguidos de 3 diluciones terminales sucesivas (P-11) en cultivos de lengua similares a la misma temperatura. Se hicieron dos pasos adicionales (P-13) para dar un producto que fue objeto de otros dos pasos (P-15) que se utilizó como simiente maestra. Se realizaron otros cinco pasos (P-20) para establecer un volumen. Se identificaron el P-13, P-15 y P-20 (pasos virales) mediante pruebas de neutralización por suero con antisuero específico de cabra de F-9. La vacunación de gatos con dichos pasos virales P-13, P-15 y P-20 producen importantes cantidades de anticuerpos protectores que permiten a los animales resistir al feline calicivirus virulento.

EJEMPLO IV

Se tomó 1 Ml de la vacuna preparada en el Ejemplo III (paso P-20) que poseía una concentración de virus a 35°C de aproximadamente  $10^{5,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml determinado por CPE) y se administró intramuscularmente a cuatro gatos que previamente se determinó eran seropositivos al FCV (serotipo desconocido). Se determinó antes de la vacunación la concentración media como de 1:64 y se halló que la concentración media un mes después de la vacunación era de aproximadamente 1:292. Se expuso a dos de los gatos al feliné calicivirus virulento (serotipo FPV-255; véase Kahn and Gillespie, Cornell Vet., 60, 669 (1970) y Amer. J. Vet. Res., 32, 521 (1971); y Holzinger and Kahn, Amer. J. Vet. Res., 31, 1623 (1970); muestra recibida de Kahn) a los 3-1/2 meses y los otros dos gatos a los 5 meses. La exposición se realizó mediante un nebulizador según descrito en el Ejemplo II. Durante tres semanas después de la exposición fueron observados los gatos diariamente, pero no se apreciaron signos clínicos de enfermedad. Por el contrario, los controles no vacunados mostraron una típica y seria manifestación de enfermedad de FCV. Este ejemplo muestra que una simple dosis de vacuna aplicada a gatos ya expuestos aumenta la formación de anticuerpos unas 4-5 veces, y cuando se han expuesto al feline calicivirus virulento, los animales han quedado protegidos.

EJEMPLO V

Se añadieron 500 Ml del material de virus obtenido en el nivel de paso P-20 descrito en el Ejemplo III, a 500 ml de un estabilizador de glutamato de N-Z amino-lactosa y se pasaron a viales ordinarios de vacuna que se secaron

mediante procedimientos normales de desecado por congelación. A fines de inoculación, se reconstituyeron los viales con 1 ml de agua estéril destilada exenta de pirógenos (concentración media de aproximadamente  $10^{5,3}$  TCID<sub>50</sub>/ml).

5 . Antes de la vacuna, se halló que todos los gatos experimentales tenían una concentración de anticuerpos de menos de 1:2. Se administró 1 Ml de la vacuna así preparada, intramuscularmente, a diez gatos susceptibles con otros cinco gatos no vacunados mantenidos como controles. Un mes más tarde, se administró a los diez gatos vacunados una dosis idéntica complementaria, intramuscularmente. Las determinaciones de anticuerpos antes y dos semanas después de la inoculación de refuerzo, según se indica a continuación, dieron aproximadamente un aumento de 7 veces la formación de anticuerpos.

	<u>Antes del refuerzo</u>	<u>2 semanas después del refuerzo</u>	
	Gato nº 1	1:3	1:93
	Gato nº 2	1:23	1:370
20	Gato nº 3	1:30	1:837
	Gato nº 4	1:8	1:40
	Gato nº 5	1:40	1:70
	Gato nº 6	1:70	1:120
	Gato nº 7	1:53	1:70
25	Gato nº 8	1:4	1:14
	Gato nº 9	1:53	1:471
	Gato nº 10	<u>1:53</u>	<u>1:160</u>
		1:34 (media)	1:225(media)

30 Además de la preparación de las vacunas instantáneas a partir del feline calicivirus virulento vivo,

esta invención se refiere a la preparación de una vacuna de FCV que utiliza el virus, de preferencia del serotipo F-9, que ha sido modificado por el método descrito anteriormente. Sería impracticable comercialmente para la preparación de una vacuna emplear como material inicial para cada nueva tanda de vacunas feline calicivirus virulento vivo obtenido de gatos infectados y, por ello, es preciso el requisito de pasos en serie para adquirir el virus modificado para uso como vacuna. Esta invención, por consiguiente, comprende el método de preparar una vacuna de FCV que comprende la utilización como virus inicial de un virus que ha sido ya modificado por pasos en serie en cultivos de tejido de felino, según descrito más arriba, es decir, un virus "semilla" procedente de una unidad maestra de virus atenuado. Por consiguiente, se aporta aquí un procedimiento para preparar una vacuna de feline calicivirus que comprende la propagación de un feline calicivirus atenuado, virus atenuado que es producido por medio del proceso que se ha descrito, mediante suficientes pasos en serie a una temperatura de incubación de aproximadamente 32-37°C en un medio de cultivo adecuado de tejidos de felino, fluido y nutritivo, que no es tóxico para dicho virus hasta que dicho medio fluido contenga de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^8$  dosis infecciosas de cultivo de tejido del indicado virus atenuado por ml, y la recogida de la vacuna fluida.

Mediante el uso de los procedimientos aquí descritos, se puede cultivar rápida y fácilmente un feline calicivirus modificado, en grandes cantidades y en elevadas concentraciones. Utilizando los cultivos de tejidos de felino,

y empleando el feline calicivirus modificado propagado a través de los mismos, por ejemplo el serotipo F-9, en concentraciones de por lo menos  $10^3$  aproximadamente, y en general de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^8$ , dosis de virus infecciosas del cultivo de tejido, por 1,0 ml de vacuna final, y mediante la administración parenteral de 1 ml de tal vacuna a los gatos, se estimula en tales gatos vacunados la producción de anticuerpos protectores contra el FCV comparables a los producidos por las infecciones naturales, sin producción de los síntomas patológicos usuales de enfermedad debidos al feline calicivirus. Los gatos vacunados son también resistentes a las exposiciones al virus productor de la enfermedad.

Se ha observado un marcado aumento en la respuesta de anticuerpos al ser administrada parenteralmente de una segunda e incluso una tercera o más dosis de refuerzo de las vacunas en cuestión. Por ejemplo, se ha observado que se consiguen resultados beneficiosos cuando se aplica una segunda inyección intramuscular aproximadamente dos semanas después de la vacuna inicial. Para obtener los mejores resultados, se recomienda no aplicar la segunda inyección antes de aproximadamente 3-4 semanas después de la primera inyección.

Otra característica de esta invención es que se ha hallado que se puede lograr una mejora de la producción de anticuerpos, además de con la mencionada administración parenteral de dosis de refuerzo de estas vacunas, mediante exposición de los gatos que han sido previamente inmunizados por administración parenteral, de preferencia I.M., de estas vacunas, al feline calicivirus, por ejemplo

el serotipo F-9, por vía intranasal, ya haya sido dicho virus modificado según la presente invención, ya se encuentre en su forma virulenta no modificada.

Esta instilación intranasal que sigue a la vacuna parenteral produce niveles notablemente elevados de anticuerpos que persisten durante largos períodos de tiempo. Por ejemplo, cuando los animales así tratados son expuestos a virus virulento, la protección aportada es mucho más fuerte, según lo demuestra la falta de síntomas clínicos de enfermedad tras exposiciones a altas dosis infecciosas de cultivos de tejidos de feline calicivirus modificado, virulento, no modificado. Para obtener los mejores resultados, se recomienda que pase un tiempo suficiente para que el gato quede sensibilizado tras la vacunación parenteral inicial, a fin de desarrollar por lo menos un grado mínimo de inmunidad, reflejado por la mayor formación de anticuerpos, antes de someter al animal al siguiente contacto intranasal con FCV virulento. De preferencia, se aplica la instilación intranasal dentro de las 2-5 semanas siguientes a la vacuna parenteral inicial.

Se realiza fácil y rápidamente la instilación intranasal mediante inhalación del feline calicivirus, sea mediante fórmulas ordinarias de aerosol pulverizadas en los conductos nasales, sea por gotitas aplicadas a las narinas externas o a los conductos nasales. Una concentración apropiada de feline calicivirus, por ejemplo el serotipo F-9, tanto si se ha modificado según queda descrito, como si se encuentra en su forma viva, virulenta y no atenuada, para fines de instilación intranasal después de una vacunación inicial por administración parenteral es de aproxi-

madamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^8$  en dosis infecciosas de cultivo de tejidos, por ml.

5 Se cree que la vacuna inicial por vía parenteral seguida del contacto con FCV, modificado o no, por la vía respiratoria, constituye un nuevo método de inmunización contra el feline calicivirus. Tal método proporciona al animal una respuesta humoral de anticuerpos y una inmunidad local al tracto respiratorio que es mucho más protectora contra la enfermedad, debido al FCV. Así pues, se aporta aquí un medio para una protección efectiva y duradera contra la mayoría de los serotipos de FCV.

#### EJEMPLO VI

15 Se tomó 1 ml de la vacuna preparada en el Ejemplo III (P-20 como nivel de paso) y de una concentración de virus a  $35^{\circ}\text{C}$  de aproximadamente  $10^{5,5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  y se administró intramuscularmente a un gato susceptible (Gato A) que previamente se había determinado era sero-negativo al FCV. Se mantuvo otro gato como control no vacunado. Un mes después de la fecha de la inoculación inicial, recibió el gato vacunado una segunda inyección de 1 ml, intramuscularmente. Aproximadamente 3-1/2 meses después de la fecha de la inoculación inicial, se sometieron el gato vacunado y el control no vacunado a una instilación intranasal de  $> 10^3\text{TCID}_{50}$  de feline calicivirus virulento (FPV-255) con un nebulizador, tal como se ha realizado en el Ejemplo II. Se obtuvieron los siguientes resultados, que indican una respuesta significativa antiuerpos, notablemente elevada, y carencia de síntomas clínicos de enfermedad cuando se ha hecho seguir la administración intranasal del virus a la vacuna parenteral.

20

25

30

Respuesta de anticuerpos

	Concentración en el momento de la instilación intranasal	Concentración un mes después de la instilación intranasal	Síntomas clínicos tras la instilación intranasal	
5				
	Gato A	1:18	1:180	ninguno
	Control	< 1:2	1:120	graves

10 El anterior Ejemplo VI demuestra la característica de esta invención por la que se aporta a los gatos una inmunización efectiva y duradera contra el FCV por el procedimiento que comprende, primeramente, la administración parenteralmente a un gato de una vacuna de por lo menos aproximadamente dosis infecciosas de los cultivos de tejidos del  $10^3$ , de un calicivirus feline atenuado, de preferencia del serotipo F-9, virus que fue atenuado en por 15 lo menos 10 pasos en serie de uno a seis días, a través de cultivos de tejidos de felino, en un fluido nutritivo, a una temperatura de incubación de aproximadamente  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , seguidos de una subsiguiente administración a dicho gato por vía respiratoria, de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^8$  en dosis, infecciosas de cultivos de tejidos, de feline calicivirus en su forma viva, virulenta y no atenuada. Se obtienen también resultados similares con la administración respiratoria de dosis de  $10^3$  aproximadamente, 20 a aproximadamente  $10^8$ , infecciosas de cultivos de tejidos, de feline calicivirus atenuado conforme a los métodos de esta invención. 25

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de una vacuna que cuando se inyecta en gatos es capaz de inmunizarlos contra el feline calicivirus caracterizado porque comprende los pasos de:

a) atenuar el feline calicivirus virulento mediante la propagación de dicho virus a través de por lo menos 10 pasos en serie de uno a seis días por cultivos de tejidos de felino en un fluido nutritivo; a una temperatura de incubación de aproximadamente  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

b) propagar opcionalmente el virus atenuado;

c) aislar opcionalmente la vacuna.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1 que comprende: la introducción de un inoculum de feline calicivirus infeccioso vivo en un medio de cultivo fluido nutritivo que no es tóxico respecto a dicho virus y que contiene células viables de lengua de felino; la propagación de dicho virus mediante incubación de dicho medio fluido inoculado a una temperatura de aproximadamente  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante un período de 1 a 6 días, y la separación a continuación de un inoculum de dicho virus, del mismo, y el paso en serie del virus a través de otros cultivos similares de lengua de felino, con un total de por lo menos unos 10 pasos.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2 en el que dicho feline calicivirus es el serotipo F-9.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1 que comprende una atenuación del feline calicivirus infeccioso vivo mediante paso en serie de dicho virus a través de por lo menos 10 cultivos de tejido de felino, nutritivos y fluidos, a una temperatura de incubación de aproximadamente  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , hasta que se -

obtiene una concentración de virus de por lo menos dosis de vi  
rus/infecciosas de los cultivos de tejidos de  $10^3$  por milili-  
tro, y la recogida de la vacuna fluida.

5           5. Un procedimiento según la reivindicación 1 que -  
comprende: la atenuación de un serotipo F-9 de feline calici-  
virus infeccioso vivo, mediante paso en serie de dicho virus  
a través de por lo menos 10 cultivos fluidos nutritivos con-  
tentivos de células viables de lengua de felino, a una tempe-  
ratura de incubación de aproximadamente  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta que se -  
10           obtiene una concentración de virus de aproximadamente dosis -  
infecciosas de los cultivos de tejidos, del virus, de aproxi-  
madamente  $10^3$  a  $10^8$ , por mililitro, y la recogida de la vacu-  
na fluida.

15           6. Un procedimiento según la reivindicación 4 para  
preparar una vacuna de feline calicivirus en forma sólida y -  
seca, caracterizado porque se seca a baja temperatura el flui  
do contentivo del virus atenuado obtenido.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6 en el  
que dicho feline calicivirus es el serotipo F-9.

20           8. Un procedimiento según la reivindicación 1 que  
comprende: la propagación de un feline calicivirus atenuado, -  
mediante suficientes pasos en serie a través de cultivos de te  
jidos de felino en un fluido nutritivo a una temperatura de -  
incubación de aproximadamente  $32-37^\circ\text{C}$ , hasta que dicho medio  
25           fluido contiene aproximadamente de  $10^3$  a  $10^8$  en dosis, de vi-  
rus atenuado, por ml, infecciosas de los cultivos de tejidos;  
y la recogida de la vacuna fluida.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el  
que dicho feline calicivirus es el serotipo F-9.

30           10. Se reivindica por último como objeto sobre el -

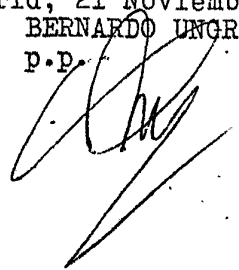
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA VACUNA QUE CUANDO  
SE INYECTA EN GATOS ES CAPAZ DE INMUNIZARLOS CONTRA EL FELI-  
NE CALICIVIRUS.

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en -  
la presente memoria descriptiva que consta de veintiuna pági-  
nas mecanografiadas.

10

Madrid, 21 Noviembre 1.975  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.



15

20

25

30