



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 305 220**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/27 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02713437 .8**

(86) Fecha de presentación : **23.01.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1372712**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

(54) Título: **Vacuna del herpesvirus equino.**

(30) Prioridad: **20.03.2001 US 812720**

(73) Titular/es:
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, Inc.
2621 North Belt Highway
St. Joseph, Missouri 64506-2002, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

(72) Inventor/es: **Mellencamp, Mark, W.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 305 220 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna del herpesvirus equino.

5 Antecedentes

Las enfermedades respiratorias constituyen la causa principal de una pérdida económica en la industria equina. Los herpesvirus equino (EHV), el virus de la influenza equina (EIV) y la bacteria *Streptococcus equi* son patógenos la mayor parte de las veces asociados con la enfermedad respiratoria infecciosa en los caballos. En todo el mundo, 10 los herpesvirus equino son los principales patógenos asociados con la morbilidad en caballos como resultado de una infección respiratoria. Tanto los herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) como los del tipo 4 (EHV-4) pueden causar una enfermedad respiratoria. El EHV-1 está también asociado con abortos y la enfermedad neurológica. Debido al alto grado de movilidad y a la naturaleza internacional de la industria equina, se necesitan vacunas eficaces para reducir la enfermedad y controlar la propagación de estos patógenos.

15 Pueden adquirirse comercialmente un cierto número de vacunas para el EHV. Sin embargo, ninguna de ellas es capaz en general, de conferir una protección de larga duración, y la mayoría requieren frecuentes inmunizaciones de refuerzo para lograr un nivel significativo de protección contra la infección por EHV. La ruta de administración más comúnmente recomendada es la inyección por vía intramuscular, a pesar de que el sistema respiratorio es el sitio 20 primario de infección en muchos casos. Además, se ha informado de que algunas de las vacunas comerciales causan indeseables efectos secundarios. Se ha informado de un número de tentativas para desarrollar una vacuna recombinante para el EHV. Este método sin embargo, no ha dado todavía resultado en la introducción de una vacuna recombinante comercial que haya logrado una amplia aceptación.

25 La literatura informa que tiene ampliamente documentado un alto grado de variabilidad en la capacidad de las vacunas basadas en las cepas de EHV-1, para proporcionar una protección cruzada contra la infección por las cepas de EHV-4. Las patentes EP 0978286 y EP 0532833 describen composiciones de vacunas que contienen la cepa AB69 del EHV-1 citopática inactivada, y la cepa DA35 virulenta del EHV-1, respectivamente, cada uno coadyuvado con un polímero reticulado de ácido carboxílico olefínicamente no saturado. El empleo del virus EHV-1 KyA muerto por el calor, se conoce a partir del trabajo de Zhang *et al.* (Virology 2000, vol 268, página 482-492). Mientras las vacunas 30 basadas en las cepas EHV-4 han mostrado una mayor propensión a proporcionar alguna protección contra ambas cepas EHV-1 y EHV-4, la protección cruzada basada en las cepas EHV-4 se ha informado también que presenta variabilidad.

35 Por consiguiente, existe una constante necesidad de desarrollar vacunas adicionales capaces para la protección de los caballos contra las enfermedades asociadas con el EHV-1 y/o el EHV-4. Sería también ventajoso desarrollar vacunas que fueran efectivas contra el EHV-1 y/o el EHV-4 que pudieran administrarse con métodos por vía intranasal así como también por vía parental (p. ej., intramuscular, subcutánea o intravenosa).

Resumen

40 La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que incluyen el virus EHV-1 KyA químicamente inactivado y un coadyuvante que contiene un polímero reticulado de ácido carboxílico olefínicamente no saturado. En particular, la solicitud proporciona una vacuna para la protección de los caballos contra las enfermedades asociadas con los virus EHV-1 y/o EHV-4. Las vacunas puede también incluir otros componentes, tales como p. ej., conservante(s), 45 estabilizante(s) y antígenos contra otros patógenos equinos. Típicamente, los antígenos contra otros patógenos equinos están también presentes en una forma inactivada, tales como p. ej., las formas inactivadas de EHV-4 y las cepas inactivadas del virus de la influenza equina ("EIV"). Por ejemplo, la vacuna puede ser una vacuna de combinación que incluye las formas inactivadas de las cepas A1 y/o A2 del virus de la influenza equina además del EHV-1 inactivado. Ejemplos de antígenos adecuados contra el EIV incluyen la cepa del virus A1 EIV inactivada, A/EQ1/Newmarket/77, 50 la cepa del virus A2 EIV inactivada, Newmarket/2/93, y la cepa del virus A2 EIV inactivada, Kentucky/95.

55 Los términos "vacuna" y "composición inmunogénica" se definen en la presente en un amplio sentido, refiriéndose a cualquier tipo de agente biológico en una forma administrable capaz de estimular una respuesta inmunológica en un animal inoculado con la vacuna. Para los fines de esta invención, la vacuna (composición inmunogénica) incluye típicamente el agente vírico en una forma inactivada. Las vacunas en general pueden basarse sobre, o bien el virus mismo o bien sobre un componente inmunogénico (antígenico) del virus. En la presente, el término "protección", cuando se emplea con referencia a una vacuna, se refiere a una mejora (bien sea parcial o bien sea completa) de cualquiera de los síntomas asociados con la enfermedad o la condición en cuestión. Así, la protección de caballos contra el EHV mediante las presentes vacunas da generalmente por resultado una disminución de la expansión del virus y/o uno o más síntomas clínicos asociados con la infección por EHV-1 y/o EHV-4 (p. ej., pirexia, descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea, depresión, y tratamiento antibiótico requerido para una infección bacteriana secundaria).

60 Las presentes composiciones inmunogénicas incluyen el virus EHV-1 KyA químicamente inactivado. Pueden emplearse una gran variedad de agentes de inactivación química conocidos por los expertos en la técnica, para inactivar el virus. La etilenimina y derivados afines, tales como p. ej., la etilenimina binaria ("BEI") y la acetiletilenimina, son ejemplos de agentes adecuados para la inactivación química, para emplear en la inactivación del virus EHV-1. Otros agentes de inactivación química, p. ej., la beta-propiolactona o ciertos aldehídos (tales como el formaldehido y el glutaraldehido), pueden también emplearse para la inactivación del virus.

ES 2 305 220 T3

Las presentes vacunas incluyen un coadyuvante que deseablemente puede tener propiedades bioadhesivas, particularmente cuando el virus se proyecta para que sea capaz de una administración intranasal, siendo los coadyuvantes polímeros reticulados de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado, tales como p. ej., polímeros de ácido acrílico reticulado. Como se emplea en la presente, el término “polímero de ácido acrílico reticulado” se refiere a un polímero y copolímeros formados a partir de una mezcla de monómeros que incluye el ácido acrílico como el monómero predominante en la mezcla. Ejemplos de polímeros de ácido acrílico reticulado apropiados incluyen aquellos comercialmente adquiribles con el nombre registrado de Carbopol® 934P y Carbopol® 971 (disponibles en B.F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio). Un coadyuvante particularmente apropiado para emplear en las presentes vacunas es un polímero de ácido acrílico reticulado que tiene una viscosidad Brookfield de no más de aproximadamente 20.000 cPs (medida a 20 rpm como solución acuosa al 1,0% en peso, a pH 7,5). Cuando se desea un coadyuvante bioadhesivo, puede ser ventajosa la utilización de un coadyuvante que tenga una propiedad bioadhesiva de por lo menos aproximadamente 50 dinas/cm² medida entre dos trozos de tejido de estómago de conejo recién extirpado (determinado mediante el procedimiento descrito en la patente U.S. 4.615.697).

Empleo de la vacuna de la invención para la preparación de un medicamento para la protección de los caballos contra enfermedades asociadas con el EHV-1 y/o el EHV-4, en donde dicha vacuna es para ser administrada a los caballos.

La vacuna puede administrarse empleando una gran variedad de métodos incluyendo la administración intranasal y/o parenteral (p. ej., intramuscular). En una versión del empleo, el EHV-1 inactivado que contiene la vacuna se administra primero intramuscularmente una o más veces (p. ej., a intervalos de 2-4 semanas), seguido por la administración de la vacuna por lo menos una vez por vía intranasal (p. ej., 2-4 semanas después de la última administración parenteral de la vacuna). La vacuna se administra deliberadamente a caballos con una edad de 6 meses o mayores. Idealmente, todos los caballos de una manada dada se vacunan anualmente con el fin de protegerlos contra la propagación de los síntomas respiratorios de la enfermedad.

Se proporciona también, un método para producir una vacuna para el herpesvirus equino. El método incluye típicamente la inoculación de células de mono con el virus EHV-1 KyA. Se incuban las células de mono inoculadas, generalmente por lo menos hasta que se observa el CPE (normalmente después de 24 a 120 horas a 36°C) y a continuación se retira el virus EHV-1 de las células incubadas (p. ej., mediante decantación y filtrado de los fluidos del cultivo). Los fluidos que contienen el virus recogido, se tratan con un agente químico de inactivación, tal como p. ej., la etilenimina binaria, para formar virus EHV-1 inactivados, y se añade como coadyuvante, el polímero reticulado de ácido acrílico. Típicamente, el virus inactivado se procesa además p. ej., mediante la concentración y mezcla con otros componentes, para producir una formulación comercial. Por ejemplo, los fluidos que contienen el virus inactivado pueden ser concentrados y mezclados con antígeno(s) para dar uno o más distintos patógenos equinos.

La presente solicitud va también dirigida a un kit que incluye en combinación, (1) un dispensador capaz de administrar una vacuna a un caballo; y (2) una vacuna que contiene un virus EHV-1 KyA químicamente inactivado, y un polímero reticulado de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado, capaz de proteger contra las enfermedades asociadas con el EHV-1 y/o el EHV-4. El kit puede incluir un dispensador el cual es capaz de dispensar su contenido en forma de gotitas, p. ej., un aerosol, un spray atomizado y/o gotitas líquidas, y una forma de la vacuna que sea capaz de proteger contra las enfermedades asociadas con el EHV-1 y/o el EHV-4 cuando se administran por lo menos en parte, intranasalmente.

A través de esta solicitud, el texto se refiere a varias versiones de las presentes composiciones y/o métodos afines. Las varias versiones descritas tienen por objeto el proporcionar una variedad de ejemplos ilustrativos y no deberían considerarse como descripciones de especies alternativas.

50 Descripción detallada

Las presentes composiciones inmunogénicas incluyen una forma químicamente inactivada del virus EHV-1 KyA. Las vacunas están diseñadas para la protección de caballos contra las enfermedades asociadas con los EHV-1 y/o EHV-4. Pueden emplearse una gran variedad de agentes químicos de inactivación ya conocidos por los expertos en la técnica, para la inactivación del virus. La etilenimina y derivados afines, tales como p. ej., la etilenimina binaria (“BEI”) y la acetiletilenimina, son ejemplos de agentes de inactivación química apropiados para emplear en la inactivación del virus EHV-1. Otros agentes químicos de inactivación p. ej., la beta-propiolactona, ciertos aldehídos (como p. ej., el formaldehído) y/o detergentes (p. ej., el detergente Tween®, Triton® X ó sales de alquiltrimetilamonio) pueden también utilizarse para inactivar el virus. La inactivación puede realizarse empleando métodos estándar ya conocidos por los expertos en la técnica. Se toman muestras a intervalos periódicos de tiempo y se ensayan para detectar los virus vivos residuales. Para detectar la presencia de virus vivos residuales puede emplearse la monitorización del efecto citopático sobre una línea celular apropiada y/o una tintura fluorescente con un anticuerpo monoclonal apropiado específico.

La inactivación con BEI puede efectuarse mediante la combinación de una solución de BEI en stock (p. ej., una solución formada añadiendo 0,1-0,2 M de hidrobromuro de 2-bromo-etilamina a NaOH acuoso 0,1-0,2 N) con fluidos víricos a una concentración final de aproximadamente 1-2 mM de BEI. La inactivación se realiza habitualmente manteniendo la mezcla de BEI-virus a 35-40°C (p. ej., 37°C) mezclando constantemente durante 36-72 horas). La inactivación del virus puede interrumpirse mediante la adición de una solución de tiosulfato de sodio a una concentra-

ES 2 305 220 T3

ción final en exceso respecto a la concentración de BEI (p. ej., 2-3 mM de tiosulfato de sodio con 1-2 mM de solución de BEI), seguido de un mezclado durante varias horas.

Las presentes composiciones inmunogénicas incluyen un coadyuvante y, si se desea, uno o más emulsionantes tales como p. ej., el detergente Tween® incorporado al EHV-1 inactivado. Los polímeros reticulados de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado, tales como p. ej., el polímero Carbopol® 971, se emplean como coadyuvantes en las presentes composiciones inmunogénicas de EHV-1 inactivado.

Un ejemplo de dicho coadyuvante es un polímero de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado producido por reacción de una mezcla de monómeros que incluye uno o más monómeros de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado (tal como p. ej., el ácido acrílico y/o el ácido metacrílico) y un agente reticulante. Típicamente, por lo menos aproximadamente el 90% en peso de la mezcla de monómeros, está constituida por un monómero carboxílico olefínicamente no saturado. El producto polímero resultante contiene deseablemente no más de aproximadamente 0,5% en peso y, de preferencia, no más de aproximadamente el 0,2% en peso de monómero carboxílico olefínicamente no saturado, sin reaccionar. La reacción de polimerización puede efectuarse mediante la reacción de la mezcla de monómeros en presencia de un disolvente el cual incluye una cetona alifática, un éster alquílico o una mezcla de los mismos. Cetonas alifáticas adecuadas incluyen aquellas que tienen de 3 a 6 átomos de carbono, tales como p. ej., la acetona y la ciclohexanona (como se emplea en la presente, el término "cetona alifática" incluye las cetonas cicloalifáticas). Ejemplos de ésteres alquílicos adecuados incluyen aquellos que tienen de 3 a 6 átomos de carbono, como p. ej., el acetato de etilo, el formiato de etilo, el acetato de isopropilo, el acetato de n-propilo, el acetato de butilo o una mezcla de los mismos.

Los coadyuvantes del polímero de ácido carboxílico olefínicamente no saturado, tienen deseablemente una viscosidad Brookfield de no más de aproximadamente 40.000 cPs (a 20 rpm con una solución acuosa de un 0,5% en peso, a pH 7,5). Ejemplos particularmente adecuados incluyen polímeros de ácido carboxílico olefínicamente no saturado con una viscosidad de no más de, aproximadamente 15.000 cPs y deseablemente más de, aproximadamente 4.000-11.000 cPs (a 20 rpm con una solución acuosa de un 0,5% en peso, a pH 7,5).

Un ejemplo de un coadyuvante adecuado incluye un polímero reticulado de ácido acrílico formado a partir de una mezcla de monómeros la cual incluye el ácido acrílico y un agente de reticulación. El agente de reticulación puede incluir un agente de reticulación polialquenil poliéter, tal como p. ej., el divinil glicol. Ejemplos de alcoholes de divinilo adecuados incluyen la alil sacarosa, el alil pentaeritritol, el polialquilen diol dialil éter con un peso molecular no mayor de 1000, el trimetilolpropano dialil éter, y mezclas de los mismos. Ejemplos de otros agentes de reticulación útiles son el divinilbenceno, la N,N-dialilacrilamida, el 3,4-dihidroxi-1,5-hexadieno, el 2,5-dimetil-1,5-hexadieno y similares.

Cuando la vacuna debe administrarse intranasalmente, puede ser ventajoso emplear un coadyuvante que sea bioadhesivo con las membranas mucosas. Los polímeros bioadhesivos tienen generalmente la propiedad de ser capaces de adherirse a una membrana mucosa en los ojos, nariz, boca, tracto gastrointestinal, cavidad vaginal y canal anal. Un bioadhesivo puede ser definido ampliamente como un material que se adhiere a una superficie biológica viva o recién muerta, como p. ej., una membrana mucosa o un tejido cutáneo. La bioadhesión es la expresión que se emplea en la presente para definir que se ensaya un bioadhesivo útil mediante un procedimiento que mide la fuerza necesaria para separar dos capas de un tejido estomacial de conejo recién extirpado, que están adheridas entre sí mediante un adhesivo. Empleando este procedimiento, un bioadhesivo puede definirse como un material que necesita una fuerza de por lo menos aproximadamente 50 dinas/cm², para separar dos trozos adheridos de tejido de estómago de conejo recién extirpado siguiendo el procedimiento descrito en la patente U.S. 4.615.697, cuya descripción se incorpora a la presente como referencia. Los límites superiores de las fuerzas necesarias para separar el tejido de conejo recién extirpado no son conocidos con precisión, pero se cree que son por lo menos aproximadamente 2000 dinas/cm².

Ejemplos adecuados de coadyuvantes incluyen polímeros reticulados de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado con propiedades bioadhesivas (p. ej., el polímero Carbopol® 971, un polímero reticulado de ácido acrílico adquirible en B. F. Goodrich CO., Cleveland, Ohio). Los ácidos poliacrílicos de este tipo son generalmente polímeros reticulados que comprenden funciones carboxilo, que contienen cantidades específicas de funciones carboxilo y un agente reticulante. Estos polímeros pueden ser bioadhesivos, de forma que dichos polímeros presentan una adhesividad entre dos trozos de tejido de estómago de conejo recién extirpado de por lo menos 50 dinas/cm² (medida de la manera descrita en la patente U.S. 4.615.697).

Es generalmente ventajoso formular las presentes composiciones en forma de una unidad de dosificación, para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se emplea en la presente, se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los individuos mamíferos objeto de tratamiento; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico necesario. La especificación para las formas unitarias de dosificación del EHV-1 inactivado (así como también el EHV-4 inactivado o el EIV inactivado) viene dictada por, y depende de, entre otros factores: (a) las características únicas del material activo y el particular efecto terapéutico que quiere lograrse; (b) las limitaciones inherentes a la técnica de composición de dicho material activo para el tratamiento de la enfermedad; y (c) la forma de administración pretendida de la forma unitaria de dosificación.

ES 2 305 220 T3

El principal ingrediente activo está compuesto típicamente para la conveniente y efectiva administración en cantidades efectivas con un soporte adecuado farmacéuticamente aceptable en forma de unidad de dosificación como se ha descrito en la presente. Una forma de dosificación unitaria puede, por ejemplo, contener el antígeno EHV-1 en cantidades que van de 1 a aproximadamente 5 unidades de potencia relativa ("RPU"). Esta cantidad del antígeno

5 está generalmente presente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 25/ml de soporte. En el caso de las composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios (p. ej., EIV inactivado y/o EHV-4 inactivado), las dosificaciones se determinan por referencia a la dosis habitual y forma de administración de los ingrediente activos suplementarios.

10 Las presentes vacunas incluyen típicamente el EHV-1 inactivado, formulado con un soporte farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas adecuadas para empleo como inyectables, incluyen habitualmente soluciones acuosas estériles (cuando es soluble en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. La formulación debe ser deseablemente estéril y fluida para tener una fácil inyectabilidad. La forma de dosificación debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento
15 y típicamente está preservada contra la acción contaminante de micro-organismos tales como bacterias y hongos. El soporte puede ser un disolvente o un medio dispersante que contiene por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Un soporte posible es una solución salina fisiológica. La característica fluidez de la solución puede mantenerse por ejemplo, mediante el empleo de un recubrimiento tal como p. ej., la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño necesario de partículas en el caso de una dispersión, y mediante el empleo de surfactantes. La prevención de la
20 acción del microorganismo puede conseguirse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal (etilm汞ri-tiosalicílico de sodio), deomicina, gentamicina y similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Si se desea una absorción prolongada de las composiciones inyectables, puede conseguirse mediante el empleo en las
25 composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del virus inactivado en la cantidad deseada en un disolvente apropiado con varios ingredientes del resto de ingredientes enumerados más arriba, según sea necesario, seguido de una esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones pueden prepararse mediante la incorporación de varios ingredientes activos en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos a partir de los enumerados más arriba. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la técnica del secado por congelación el cual proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril de los mismos.

35 Puede ser también ventajoso añadir un estabilizador a las presentes composiciones para mejorar la estabilidad del virus inactivado. Estabilizadores adecuados incluyen, por ejemplo, la glicerina/EDTA, carbohidratos (tales como p. ej., sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa), proteínas (como p. ej., albúmina o caseína) y productos de degradación de la proteína (p. ej., gelatina parcialmente hidrolizada). Si se desea, la formulación puede
40 tamponarse mediante métodos ya conocidos en la técnica, empleando reactivos tales como p. ej., fosfatos de metal alcalino, p. ej., fosfato disódico, fosfato monosódico, fosfato dipotásico y/o fosfato monopotásico. Pueden emplearse otros disolventes tales como el etanol o propilenglicol para aumentar la solubilidad de los ingredientes en la formulación de vacunas y/o la estabilidad de la solución. Otros aditivos que pueden emplearse en la presente formulación incluyen antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales, tales como p. ej., el ácido etilendiamintetracético (EDTA).

Las composiciones y métodos de la presente invención pueden ilustrarse mediante los siguientes ejemplos, los cuales se describen para ilustrar la presente invención y para mejor ayudar a las personas expertas, de cómo utilizar los mismos.

50 Ejemplo 1

Producción de fluidos que contienen la cepa EHV-1 inactivada

55 Para producir la vacuna de la *Equine Rhinopneumonitis*, el virus muerto, se produjo en primer lugar un cultivo master de un EHV-1 para inocular. De este master para inocular, se hizo crecer un cultivo de EHV-1, y a continuación, se inactivó. El cultivo del virus inactivado se mezcló a continuación con un coadyuvante con el fin de producir la vacuna del *Equine Rhinopneumonitis*. Para producir la vacuna del *Equine Rhinopneumonitis*, se empleó el método siguiente.

60 Con el fin de producir el cultivo del virus master del EHV-1 ("EHV-1 MSV") para inocular, el herpesvirus equino tipo 1 cepa KyA (EHV-1 KyA), se subcultivó cuatro veces sobre células Vero A139 y cuatro veces sobre células EVero. El cuarto subcultivo se empleó como un virus master para inocular, al cual se llamó EHV-1 KyA, MSV lote 001-dil.

65 A partir del virus master para inocular, se preparó un cultivo de EHV-1 mediante la infección de células EVero con EHV-1 MSV en un medio esencial mínimo ("MEM") que tenía de 0 a 5% de suero. Se añadió gentamicina al medio de cultivo en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. Las células EVero se infectaron

ES 2 305 220 T3

típicamente con el EHV-1 MSV con el objetivo de lograr una multiplicidad de la infección (“MOI”) de 0,001. Estos cultivos pueden hacerse crecer en botellas de vidrio rotativas o sobre perlas microportantes. El cultivo se incubó a 36°C ± 2°C durante 24 horas a 120 horas hasta observar un efecto citopático (“CPE”). Durante la incubación, el cultivo se monitorizó para determinar la CPE inducida por EHV, para asegurar una cepa de EHV pura. Si se observa un CPE

5 atípico o existe cualquier evidencia macroscópica o microscópica de contaminación, el cultivo se descarta. El cultivo del virus puro se recogió asépticamente en recipientes (“carboys”) de vidrio estériles, carboys de plástico estériles, o depósitos de acero inoxidable estériles, y se clarificó mediante filtración a través de filtros de 8 micras o mayores. Los fluidos de la cosecha del virus en masa, se ensayaron para asegurar la ausencia de micoplasmas antes de la inactivación. Los fluidos recogidos que no fueron inactivados inmediatamente, se almacenaron a -40°C ó menos.

10 Los fluidos del cultivo tratados con BEI se almacenaron habitualmente a 2-7°C ó menos hasta que el ensayo de inactivación se hubo completado. Después de una comprobación satisfactoria de la inactivación, demostrando que no había infección vírica, se neutralizó el exceso de BEI mediante la adición de una cantidad suficiente de una solución fría (4°C ± 2°C) de tiosulfato de sodio 1,0 M para dar una concentración final de 6 mM.

15 Despues del tratamiento con BEI, el cultivo se ensayó para determinar su capacidad para inducir el CPE típico del EHV para asegurar la inactivación del virus empleando el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Esta función se consiguió mediante el subcultivo de los fluidos del virus tratados con BEI sobre células EVero y comprobando cualquier infección vírica sobre las células EVero. Los fluidos del cultivo tratados con BEI se almacenaron habitualmente a 2-7°C ó menos hasta que el ensayo de inactivación se hubo completado. Después de una comprobación satisfactoria de la inactivación, demostrando que no había infección vírica, se neutralizó el exceso de BEI mediante la adición de una cantidad suficiente de una solución fría (4°C ± 2°C) de tiosulfato de sodio 1,0 M para dar una concentración final de 6 mM.

20 25 Despues de la inactivación y comprobación del cultivo de EHV-1, se concentró el cultivo inactivado, si es necesario, mediante ultrafiltración, a una concentración que permita la formulación de una vacuna con una potencia relativa (“RP”) para EHV-1 de por lo menos 1,0, determinada mediante el ensayo de liberación de la potencia del EHV, descrito en el ejemplo 6 de la presente.

30 35 El virus inactivado se formuló como una vacuna coadyuvante mediante el mezclado total del cultivo de EHV-1 inactivado, con una solución salina y una solución del stock de 0,5% del coadyuvante Carbopol® 971 para formar una serie colectiva. Se preparó una serie típica de 60 litros, mezclando 3,5-4,0 litros de fluido de cultivo de EHV-1 inactivado, 12 litros de solución stock de Carbopol® 971 y 44-44,5 litros de solución salina. La serie colectiva se mantuvo a 2-8°C hasta que se transfirió en viales conteniendo o bien una o bien diez dosis (de 2,2 ml por dosis). Cada dosis de la vacuna inactivada contenía por lo menos un valor 1,0 de la RP del EHV-1 inactivado, 2 mg de Carbopol® 971, y una cantidad residual de gentamicina.

Ejemplo 2

Producción de fluidos que contienen el virus de la influenza equina inactivado

Virus de la influenza equina A/EQ1/Newmarket/77, subtipo A1

40 45 El MSV Rec ER1K subtipo A1 de la influenza equina, se desarrolló en la firma Wellcome Foundation Ltd., Beckenham, Kent, U. K.. La cepa equina original se subcultivó diez veces, sola o en combinación con el virus A/Puerto Rico/8/34, en un patógeno específico (SPF) exento de huevos embrionados. El ER1K reasortido (coinfectado) se subcultivó siete veces adicionales en el cultivo de tejido Vero para producir el MSV denominado A/E/Newmarket/77 (Equi) (H7NT)Rec ER1K. El virus fue recibido por Boheriner Ingelheim Vetmedica, Inc. (BIVI) procedente de Coopers Animal Health, Inc., Est. Lic. N° 107. El virus se subcultivó una vez en la línea celular EVero [línea celular Vero procedente de Coopers Animal Health ha sido denominada como EVero por la firma BIVI] en BIVI, para establecer el nuevo virus master para inocular. El virus master para inocular se denominó Lote 111795.

Virus de la Influenzas equina - Newmarket/2/93, subtipo A2S

50 55 El Newmarket/2/93 subtipo A2 de la influenza equina, se obtuvo del Dr. J. A. Mummford de Animal Health Trust, P.O. Box 5 Newmarket, Suffolk CB8 8JH, Inglaterra. El virus se aisló de un caballo con rinitis. El virus se subcultivó cinco veces en huevos de pollo embrionados libres de patógenos específicos (SPF), y a continuación, se subcultivó cinco veces en la línea celular del riñón canino Madin-Darby (MDCK). El quinto subcultivo en células MDCK fue denominado MSV. El MSV se denomina EIV NM/2/93, MSV lote 001-dil.

Influenza equina - Kentucky/95, subtipo A2

60 65 El Kentucky/95 subtipo A2 de la influenza equina, se obtuvo del Gluck Equine Research Cebter, Lexington, KY. El virus se aisló de un caballo con rinitis. El virus se subcultivó dos veces en huevos de pollo embrionados libres de patógenos específicos (SPF). A continuación, el virus se subcultivó tres veces en la línea celular del riñón canino de Madin-Darby (MDCK) y tres veces en células EVero. El tercer subcultivo en las células EVero se denominó MSV. El MSV se denominó EIV K95, MSV lote 001-dil.

ES 2 305 220 T3

Se emplearon los siguientes procedimientos para producir separadamente las tres cepas de componentes de la influenza equina, pero mediante métodos similares. Cada lote de producción del virus Newmarket/77 se identificó como virus de la influenza equina (EIV) mediante la observación de los efectos citopáticos (CPE) característicos inducidos por el EIV en células EVero. Cada lote de producción del virus Newmarket/2/93 y Kentucky/95 se identificó como

- 5 EIV observando el característico CPE inducido por el EIV en células MDCK. El Newmarket/77 y el Kentucky/95 son citocidas para los cultivos de las células de riñón de mono y produjeron típicos CPE de EIV en cultivos monocapa. El Newmarket/2/93 es citocidal para los cultivos de células MDCK y producen típicos CPE de EIV en cultivos monocapa. La virulencia en los caballos no se evaluó para ninguno de los virus. Los virus master para inocular se comprobaron para determinar su pureza de acuerdo con 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28, y 113.55. El virus master Newmarket/77 para inocular, fue analizado para detectar la enfermedad vesicular de los cerdos, la Akabane, la fiebre efemeral bovina, la lengua azul, y la enfermedad viscerotrófica velogénica de Newcastle. Los fluidos recogidos del virus en masa se comprobaron para determinar los micoplasmas antes de la inactivación, de acuerdo con el 9 C.F.R. 113.28. Los virus master para inocular se comprobaron para determinar la inmunogenicidad empleando el siguiente procedimiento.

- 10 15 Muestras en bloque o del recipiente final del producto completado de cada serie fueron comprobadas para determinar la potencia mediante un ensayo de la potencia en cobayos. Cada uno de por lo menos diez cobayos con un peso de 300-500 gramos, se inyectó intramuscularmente. Cada dosis para un cobayo fue la mitad de la dosis recomendada como dosis unitaria de la vacuna sobre la etiqueta para un caballo. Una segunda dosis se inyectó 14 a 21 días después de la primera dosis. Dos cobayos adicionales de la misma procedencia se mantuvieron como controles. Catorce a 21 20 días después de la segunda inyección, se ensayaron muestras de suero de cada vacunado y de cada control para detectar los anticuerpos del Newmarket/77, Newmarket/2/93 y Kentucky/95, mediante la inhibición de la hemaglutinación (HAI). La potencia de las fracciones de EIV en la vacuna se determinaron empleando el protocolo de análisis de los laboratorios de los servicios veterinarios nacionales, el método de ensayo suplementario para efectuar el ensayo de inhibición de la hemaglutinación para el anticuerpo de la influenza equina (MVSAM0124.01, de fecha 2 de Octubre 25 de 1998).

Si los controles no permanecieron seronegativos a 1:10 para la fracción EIV analizada, el análisis fue considerado no realizado y se repitió. Si ocho de los diez vacunados en un análisis válido no desarrollaron un título de anticuerpo HAI de 80 ó mayor, para la fracción del Newmarket/77, y un título de 40 ó mayor para las fracciones de Newmarket/2/93 y Kentucky/95, la muestra se consideró no satisfactoria. Las vacunas que contienen el EIV inactivado están deseablemente formuladas para incluir por lo menos aproximadamente 64 HAU/dosis unitaria de virus EIV subtipo A1 inactivado y/o por lo menos aproximadamente 265 HAU/dosis unitaria de virus EIV subtipo 2 inactivado.

- 30 35 Del primer subcultivo hasta el cuarto subcultivo del virus master para inocular fueron utilizados para trabajar y producir el virus de la inoculación. La vacuna fue producida a partir del primer subcultivo al quinto subcultivo del virus master de inoculación. La influenza equina, cepa Newmarket/77, subtipo A1 y la influenza equina, cepa Kentucky/95, subtipo A2, se propagaron en los cultivos de la línea celular EVero.

La línea celular MDCK empleada para la propagación del Newmarket/2/93 se confinó entre los subcultivos 71 y 91. 40 El subcultivo 71 se congeló y fue denominado stock celular master. Los cultivos celulares MDCK fueron propagados en MEM que contenía el 5-10% de suero bovino fetal. El cultivo para la inoculación y producción del Newmarket/2/93, fue propagado en MEM suplementado con 10 unidades de tripsina/ml. Los cultivos celulares fueron crecidos en perlas de micro-soporte en recipientes de cultivo celular de 1, 3, 10, 30, 50, ó 140 litros, frascos rotativas de vidrio de 9 litros, o frascos rotativas de plástico. Los virus master y de trabajo para inocular fueron almacenados a -60°C ó menos.

- 45 50 Los cultivos celulares de MDCK se hicieron crecer en recipientes estériles de vidrio o plástico. Los cultivos se hicieron crecer en frascos de plástico de 75 cm² ó 150 cm² con 40 a 100 ml de medio. Los cultivos de expansión se hicieron crecer en cultivos en frascos rotativas en 100-1000 ml de medio y a continuación, se subcultivaron en cultivos también en frascos rotativas. Se escogió un área de superficie de fijación, o bien de 75 cm² ó bien de 150 cm², en base a la fijación y crecimiento de la línea celular que primero salió fuera del depósito de nitrógeno líquido. Debido a la presión del almacenamiento de nitrógeno líquido, en algunos casos fue ventajoso partir de un crecimiento celular en un área de superficie pequeña, y cuando el crecimiento hubo finalizado, subcultivar las células además, en un frasco T de 150 cm². Cuando las células salieron fuera del almacenamiento de nitrógeno líquido y produjeron una monocapa de células sanas suficiente para la expansión en un frasco T de 150 cm², entonces se omitió el paso del frasco T de 75 cm², 55 y las células se implantaron directamente en el frasco T de 150 cm².

60 Antes de la inoculación con virus, se decantó el medio de crecimiento celular del recipiente de cultivo. Se añadió medio esencial mínimo (MEM) sin suero, al recipiente de cultivo y las células se lavaron durante 30 a 45 minutos. El volumen de medio de lavado dependió del recipiente de cultivo empleado. El recipiente de cultivo se inoculó mediante decantación del medio de lavado y añadiendo MEM sin suero que contenía 10 unidades de tripsina purificada/ml de MEM y al cual se había añadido virus para inocular. Los cultivos celulares fueron infectados con una multiplicidad de dianas de infección (MOI) de 0,01 para las cepas Newmarket/77, Newmarket/2/93 y Kentucky/95.

- 65 Los cultivos celulares fueron mantenidos a 36°C ± 2°C hasta que se retiró el fluido. Después de la inoculación se observaron las monocapas para determinar los cambios característicos en la morfología celular inducidos por el EIV. El CPE incluyó células redondeadas y refráctiles que se separaban de la superficie de la monocapa. El CPE fue normalmente aparente 24-96 horas después de la inoculación. El cultivo se examinó durante el período de incubación para detectar la evidencia macroscópica y/o microscópica de contaminación o para detectar cambios atípicos en la

ES 2 305 220 T3

morfología celular. Cualquier cultivo que presentaba la evidencia de una contaminación microbiana o degeneración celular no específica fue desecharo.

Antes de la recogida, cada cultivo fue examinado macroscópicamente y microscópicamente. Cualquier cultivo que 5 presentaba la evidencia de una contaminación o un CPE atípico se descartó. El fluido del(de los) cultivo(s) se recogió uno o cuatro días después de la inoculación. El fluido del cultivo del virus en el recipiente de cultivo se recogió asépticamente en carboys o recipientes de vidrio o plástico estéril o un depósito estéril de acero inoxidable después de la clarificación mediante filtración a través de filtros de 8 micras o superiores. Los fluidos reunidos fueron o bien inactivados inmediatamente o bien se almacenaron a -40°C ó menos, para la inactivación más tarde. Se recogieron 10 muestras para determinar la esterilidad y para el ensayo del antígeno después de la inactivación.

Se determinó el volumen de fluidos del cultivo y se llevó la temperatura de los fluidos a 36°C ± 2°C. Una solución 0,2 M de hidrobromuro de 2-bromoetilenamina que había sido ciclada para dar etilenimina binaria (BEI) en NaOH 0,15 M, se añadió a los fluidos del cultivo para dar una concentración final de BEI de 2 mM. El fluido del virus 15 inactivado se almacenó o bien se congeló a <-40°C ó a 4-8°C hasta finalizar el ensayo de inactivación.

Cada lote de Newmarket/77 y Kentucky/95 se analizó para detectar la inactivación mediante subcultivo en células Vero A139. Cada lote de Newmarket/2/93 se analizó para determinar la inactivación mediante subcultivo en células 20 MDCK. Una monocapa de cultivo celular apropiada (150 ml) se inoculó con 1,0 ml de fluidos de EIV inactivado y se mantuvo a 36°C ± 2°C durante 14 días con por lo menos dos subcultivos. Al final del período de mantenimiento, las monocapas celulares se examinaron para determinar el CPE típico del EIV. Para controles positivos de virus, cada frasco de cultivo de células EVero se inoculó con virus de referencia Newmarket/77 y Kentucky/95, respectivamente, y un cultivo de células MDCK se inoculó con un virus de referencia Newmarket/2/93 (cada uno hasta alcanzar un 25 0,01 de MOI). Un frasco de células EVero y un frasco de células MDCK permanecieron sin inocular como controles negativos. Después de la inoculación y subcultivo, la ausencia de células infectadas con el virus en los fluidos víricos tratados con BEI, constituyó un ensayo satisfactorio para la inactivación. Las células de control inoculadas con el virus de referencia mostraron un CPE típico de EIV y el frasco no inoculado no mostró ninguna evidencia de CPE por EIV.

Después de un ensayo de inactivación satisfactorio, se neutralizó la BEI residual mediante la adición de una solución 30 fría (4°C ± 2°C) de tiosulfato de sodio 1,0 M para dar una concentración final de 6 mM. Los fluidos inactivados se almacenaron a 4°C ± 2°C ó menor, hasta formar la masa voluminosa del producto final. Si el ensayo de inactivación fue insatisfactorio, los fluidos podrían volverse a tratar con BEI empleando el procedimiento descrito más arriba y volverse a ensayar para determinar la inactivación.

35 Si es necesario, cada lote de fluido del virus de la masa, se concentró de 2X a 50X mediante ultrafiltración para lograr la concentración deseada. Uno o más lotes de la masa de los fluidos de virus de la masa inactivados, se juntaron normalmente para la concentración. El virus de la masa concentrado se mantuvo a 4-8°C hasta la formación de una masa voluminosa.

40 El producto resultante después de la inactivación y concentración contenía gentamicina en cantidades residuales a partir del medio empleado en la producción de los fluidos de virus recogidos. Estos niveles no excedían del nivel permitido por dosis de producto. La vacuna se formuló para contener 2 mg de Carbopol® 971 por dosis de vacuna.

45 Los componentes de la masa voluminosa fueron asépticamente añadidos a un recipiente de vidrio, plástico o acero inoxidable, mediante sifonado o mediante una presión positiva (nitrógeno filtrado estéril). La serie se mezcló completamente y a continuación se mantuvo a 2-8°C hasta que estuvo listo para ser envasado en los envases finales. A continuación se proporciona una composición ilustrativa de una vacuna de EIV inactivado:

50	Newmarket/77	3.000 ml
	Newmarket/2/93	6.000 ml
55	Kentucky/95	6.000 ml
	Carbopol® 971 (0,5% de solución en stock)	12.000 ml
60	Solución salina	33.000 ml

Si se desea, la solución salina o una porción de la misma puede substituirse por una solución que contiene EHV-1 inactivado y, opcionalmente, EHV-4 inactivado para producir una vacuna de combinación EHV/EIV.

65 Después de la obtención de la masa, la serie se trasiega en recipientes estériles de plástico o de acero inoxidable para transferirlo a un área de llenado, estéril, para el envasado en los envases finales, o la serie en masa se muestreó y se trasegó en recipientes estériles de plástico. Si la serie se trasiega en bombonas, se almacena a 4-8°C. Si dos o más bombonas de la vacuna en masa tienen que llenarse en un tiempo único, el producto se junta en un recipiente estéril

ES 2 305 220 T3

de acero inoxidable cuando es necesario para el envasado. Cada dosis de vacuna se formuló para contener suficientes fluidos de la cosecha de virus inactivado, para proporcionar por lo menos 64 unidades de hemaglutinación (HAU) de Newmarket/77 y 128 HAU de Newmarket/2/93 y 128 HAU de Kentucky/95.

5 Ejemplo 3

Método de monitorización de la inactivación de virus

Cada lote de EHV-1, EHV-4, EIV Newmarket/77 y EIV Kentucky/95 se ensayó para determinar la inactivación, mediante subcultivo en células EVero. Cada lote de EIV Newmarket/2/93 se ensayó para determinar la inactivación mediante subcultivo en células MDCK. Un cultivo monocapa de ciento cincuenta (150 cm^2) de células EVero se inocularon con 1,0 ml de fluidos de EHV ó EIV inactivados y se mantuvieron a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 14 dfas con por lo menos dos subcultivos. Al final del período de mantenimiento, las monocapas de células fueron examinadas para determinar el CPE típico de EHV ó EIV. Para controles de EHV, se inoculó un frasco de cultivo de células EVero con referencia EHV-1 ó EHV-4 (control positivo) para dar una multiplicidad de dianas (MOI) de 0,001. Para los controles de EIV, se inoculó un frasco de cultivo de células EVero con la referencia del virus EIV Newmarket/77 ó EIV Kentucky/95 (control positivo) para dar un MOI de dianas de 0,01. Para los ensayos de EIV Newmarket/2/93, se inoculó un frasco de cultivo de células MDCK con la referencia EIV Newmarket/2/93 para dar un MOI de dianas de 0,01. Como control negativo, se incubó un frasco no inoculado con células EVero o células MDCK en las mismas condiciones que el(s) cultivo(s) de ensayo. Después de la incubación y subcultivo, la ausencia de células infectadas por el virus en los fluidos víricos tratados con BEI, constituyó un satisfactorio ensayo para la inactivación. Las células de control inoculadas con el virus de referencia deberían mostrar un CPE típico de EHV ó EIV. El frasco no inoculado no debía mostrar ninguna evidencia de CPE de EHV ó EIV. Después de un ensayo satisfactorio de inactivación, la BEI residual fue neutralizada mediante la adición de una solución fría de tiosulfato de sodio y los fluidos inactivados se almacenaron a $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ó inferior antes de la mezcla en masa del producto final.

Ejemplo 4

Ensayo de liberación de la potencia del EHV

30 Revestimiento de placas de 96 pocillos con mAb de EHV-1 ó mAb de EHV-4

Las placas de 96 pocillos empleadas para el ensayo de la potencia de las fracciones del EHV-1 se revistieron con el anticuerpo monoclonal de EHV-1. Placas de 96 pocillos empleadas para el ensayo de la potencia de EHV-4, 35 conteniendo las muestras, se revistieron con el anticuerpo monoclonal de EHV-4. El anticuerpo monoclonal de EHV-1 (“EHV-1 mAb”), 16H9, fracción IgG, se diluyó 1:10.000 en tampón de revestimiento. El anticuerpo monoclonal de EHV-4 (“EHV-4 mAb”), 20F3, fracción IgG, se diluyó 1:10.000 en tampón de revestimiento. Se añadieron alícuotas (100 μl) de las soluciones de mAb a todos los pocillos de las placas NUNC MAXISORP excepto los pocillos de la columna 1 y las placas se sellaron con tapas de sellado de placas. Las placas de múltiples pocillos se incubaron a continuación durante 1 hora a 37°C y durante la noche a 4°C .

40 Cuantificación del antígeno de EHV-1 ó EHV-4 en muestras de ensayo

Se cuantificaron los antígenos de EHV-1 ó EHV-4 en muestras de ensayo empleando placas de microtitulación revestidas con el respectivo mAb. Antes del ensayo con ELISA, alícuotas de un ml de las muestras de ensayo (p. ej., vacuna en masa con coadyuvantes o vacuna del recipiente final) se congelaron a -40°C ó inferior, en tubos de microfuga cónicos, durante un mínimo de 18 horas. El día en que se realizó el ELISA, la(s) muestra(s) congelada(s) de la vacuna de ensayo en los tubos de la microfuga y el vial congelado de la referencia de la vacuna se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37°C y se agitó con el Vortex para resuspender el material sedimentado. Se añadió un alícuota de 45 2,5 μl de Triton® X-100 al tubo de la microfuga de referencia de la vacuna y cada a tubo de la microfuga de la vacuna de ensayo. Los tubos de microfuga se agitaron con el Vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Los tubos se agitaron con el Vortex cada 15 minutos. Se añadió un alícuota de 100 μl de control de la referencia externa de EHV-1 (ó control de la referencia externa de EHV-4), a 900 μl de un diluyente del antígeno. Se añadió un alícuota (2,5 μl) de Triton® X-100 a la referencia externa diluida de EHV-1. Los fluidos de la referencia externa se incubaron 50 a temperatura ambiente durante 1 hora y se agitaron con el Vortex cada 15 minutos.

Durante esta hora de incubación, las placas de EHV recubiertas de mAb se lavaron tres veces con PBS-Tween®. Los sitios reactivos que quedaban en los pocillos se bloquearon con un post recubrimiento de todos los pocillos con 60 200 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de tampón de bloqueo. Las placas se incubaron con tampón de bloqueo a 37°C durante un mínimo de 30 minutos. Después de un período de incubación de una hora, se prepararon una serie de diluciones al doble, de la referencia de la vacuna y de la vacuna de ensayo, mediante la transferencia de 500 μl de la referencia de la vacuna y de la muestra de la vacuna a un tubo de ensayo que contenía 500 μl de diluyente del antígeno.

Las placas con el post recubrimiento se lavaron tres veces con solución PBS-Tween®. Se añadieron alícuotas 65 (50 μl) desde sin diluir hasta diluciones 1:32 de la referencia y de la vacuna de ensayo para duplicar pocillos de las placas revestidas de mAb de EHV-1 y mAb de EHV-4 como se muestra en la tabla IV-1. Se añadieron alícuotas de 50 ml del control apropiado de la referencia externa, a los pocillos de cada placa como se muestra en la tabla IV-1. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Durante esta hora de incubación se diluyó suero de caballo anti-EHV-1

ES 2 305 220 T3

(ó suero de caballo anti EHV-4), 1:1.000 en diluyente de anticuerpo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

- Después de una hora de incubación, las placas multipocillos se lavaron tres veces con solución PBS-Tween®. Se añadieron alícuotas (50 µl) de suero diluido de caballo anti-EHV-1 (ó suero diluido de caballo anti-EHV-4), a todos los pocillos de la placa apropiada excepto los pocillos de la columna 1. Las placas fueron incubadas a continuación a 37°C durante 1 hora. Durante esta hora de incubación se diluyó un conjugado de IgG anti-caballo de cordero • HRP, 1:2.500 en diluyente de anticuerpo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente.
- Después de una hora de incubación, las placas se lavaron de nuevo tres veces con solución de PBS-Tween®. Alícuotas (50 µl) del conjugado, IgG anti-caballo de cordero • HRP, se añadieron a todos los pocillos de la placa excepto los de la columna 1. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de una hora de incubación, las placas se lavaron de nuevo tres veces con solución de PBS-Tween®.
- Se preparó un substrato de TMB de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se añadieron alícuotas (100 µl) de la solución de substrato TMB con una pipeta multicanal a todos los pocillos de la fila A y, a continuación, siguiendo el orden desde las filas B hasta la H de la placa. Las placas multipocillo se incubaron a continuación a temperatura ambiente. Las densidades ópticas de los pocillos se determinaron leyendo la placa sobre un lector de microplacas a una longitud de onda de 650 nm. Los pocillos de control de la columna 1 sirvieron de testigos. Las placas empleadas para la cuantificación del antígeno de EHV-1 se leyeron 35 ± 10 minutos después de la adición del substrato de TMB. Las densidades ópticas de los pocillos que contienen la referencia externa de EHV-1 deben estar entre 0,500 y 1,200. Las placas empleadas para la cuantificación del antígeno de EHV se leyeron 45 ± 10 minutos después de la adición del substrato de TMB. Las densidades ópticas de los pocillos que contienen la referencia externa de EHV-4 deben estar entre 0,500 y 1,200. Los valores relativos de la potencia ("RPV") de las muestras de vacuna del ensayo, se determinaron a partir de las lecturas de la densidad óptica, normalizando los valores respecto al control de referencia externa de EHV-1 (ó control de referencia externa de EHV-4).

III. Criterios para un ensayo de validación

- La densidad óptica de los pocillos que contienen la referencia externa EHV-1 (ó la referencia externa EHV-4) debe estar entre 0,500 y 1,200, 30 ± 5 minutos después de la adición del substrato de TMB. La densidad óptica en los pocillos del control negativo no debe ser mayor de 0,250. Si no se satisface cualquiera de estos criterios de validación, el ensayo debe ser considerado como NINGUN ENSAYO y el ensayo puede repetirse sin prejuicio. Los resultados de la potencia relativa de un ensayo se consideraron satisfactorios si los RPV (para el EHV-1 inactivado y/o EHV-4 inactivado) de una dosis unitaria de la muestra de ensayo fue mayor o igual a 1,0.

IV. Reactivos

Anticuerpo monoclonal específico de EHV-1, fracción IgG. Se obtuvo el hibridoma 16H9 por el Dr. George Allen, Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington, KY. Se preparó comercialmente la fracción IgG a partir de los ascites del ratón. El anticuerpo purificado se identificó como EHV-1 mAb 16H9-IgG, lote 001, 11-11-98, Exp.11-11-03. La fracción IgG del anticuerpo se almacenó a 4-8°C.

Anticuerpo monoclonal específico de EHV-4, fracción IgG. El hibridoma 20F3 se obtuvo por el Dr. George Allen, Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington, KY. Se preparó comercialmente la fracción IgG a partir de los ascites del ratón. El anticuerpo purificado se identificó como EHV-4 mAb 20F3-IgG, lote 001/11-11-98, Exp.11-11-03. La fracción IgG del anticuerpo se almacenó a 4-8°C.

Suero de caballo policlonal anti-EHV-1. Se preparó un conjunto reunido de suero a partir de la sangre recogida de caballos de control no vacunados en el estudio de inmunogenicidad del EHV, 623-510-98E-015, a los 21 días después de la inoculación con EHV-1 virulento. El anticuerpo se identificó como anti-EHV-1 de caballo, lote 001/030199, exp. 030104. El suero se almacenó congelado a -40°C ó inferior.

Suero de caballo policlonal anti-EHV-4. Se preparó una cantidad reunida de suero a partir de la sangre recogida de caballos de control no vacunados en el estudio de inmunogenicidad del EHV, 623-510-98E-015, a los 21 días después de la inoculación con EHV-4 virulento. El anticuerpo se identificó como anti-EHV-4 de caballo, lote 001/030399, exp. 030304: El suero se almacenó congelado a -40°C ó inferior.

Conjugado de IgG anti-caballo de cordero • HRP, 1 mg/ml, Bethyl Laboratories, Inc. Catalog No. A70-121P. El conjugado del anticuerpo se almacenó a 4-8°C.

Fluidos de referencia externa del EHV-1. Los fluidos de EHV-1 se produjeron de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Los viales de los fluidos de referencia externa de EHV-1 fueron identificados como EHV-1 Ext. Ref. Flids., lote 001/040599. Exp. 040504. Los fluidos de los virus se almacenaron a -40°C ó menos.

Fluidos de referencia externa del EHV-4. Los fluidos de EHV-4 se produjeron de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 6. Los viales de los fluidos de referencia externa de EHV-4 fueron identificados como EHV-4 Ext. Ref. Flids., lote 001/040699. Exp. 040604. Los fluidos de los virus se almacenaron a -40°C ó menos.

ES 2 305 220 T3

Vacuna de referencia EHV-1/EHV-4. La vacuna de referencia EHV-1/EHV-4, es la misma vacuna empleada en el estudio de immunogenicidad descrito en el ejemplo 8 (623-0510-98E-015). La vacuna se identificó como EHV Imm. Vac, 623-510-98E-015, lote # 001, 11-6-98. Exp. 110603. La referencia de la vacuna se almacenó a -40°C ó inferior.

- 5 En el experimento, se emplearon los siguientes reactivos comercialmente disponibles:
Sistema de substrato. TMB (dos componentes), Kirkegaard y Perry, catálogo nº 50-76-00.
10 Triton® X-100. Sigma, catálogo nº 1043.
Suero bovino de ternera. Hyclone Laboratories, Inc., catálogo nº A-2151-L.

- 15 Se prepararon las siguientes soluciones estándar para emplear en el experimento:
Tampón de recubrimiento (recién preparado para cada ensayo y ajustado a pH 9,6)

20 g/litro de H₂O desionizada

- a. Na₂CO₃·anhidro 1,59
25 b. NaHCO₃ 2,93
PBS (ajustado a pH 7,3)

30 g/litro de H₂O desionizada

- 35 a. Na₂HPO₄·anhidro..... 1,18
b. NaH₂PO₄·anhidro..... 0,23
40 c. NaCl 8,50

Solución de PBS-Tween®

45 g/litro de H₂O desionizada

- 50 a. Na₂HPO₄·anhidro..... 1,18
b. NaH₂PO₄·anhidro..... 0,23
55 c. NaCl 8,50
d. TweenR20 0,05 ml

60 Tampón de bloqueo (recién preparado el mismo día del ensayo)

- a. PBS 75 ml
65 b. Suero bovino de ternera 25 ml

ES 2 305 220 T3

Diluyente del anticuerpo (Aame como tampón de bloqueo; recién preparado el mismo día del ensayo)

Diluyente del antígeno (recién preparado el mismo día del ensayo)

5 a. PBS 50 ml

b. Triton® X-100 0,05 ml

10

Ejemplo 5

Inoculación de caballos con EHV-1 inactivado y subsiguiente inoculación con EHV-4 virulento

15 La finalidad del estudio fue la de demostrar la inmunogenicidad de un virus EHV-1 KyA inactivado para la protección cruzada de caballos vacunados infectados con EHV-4 virulento. La vacuna empleada en el estudio incluía con el virus EHV-1 KyA inactivado para la protección cruzada de caballos, el virus coadyuvado con Carbopol® 971. Los caballos fueron vacunados mediante con dos diferentes regímenes de vacunación. Un régimen de vacunación consistió en tres vacunaciones intramusculares y el otro régimen de vacunación consistió en dos vacunaciones intramusculares y una administración intranasal. Los caballos fueron vacunados a intervalos de dos a cuatro semanas. Los caballos no vacunados se utilizaron como controles. A las tres semanas después de la última vacunación, los caballos vacunados y los caballos de control no vacunados fueron infectados con EHV-4 virulento.

25 Se observó una severa enfermedad respiratoria en los caballos de control no vacunados posteriormente a la inoculación con EHV-4. Los caballos vacunados mediante cualquiera de los regímenes intramuscular o intramuscular/intranasal con la vacuna EHV-1 KyA mostraron una reducción significativa en las señales clínicas de la enfermedad respiratoria causada con el EHV-4 comparados con los caballos de control no vacunados e infectados. Hubo una significativa reducción en la propagación del virus entre caballos vacunados por cualquiera de los regímenes de vacunación frente a caballos de control no vacunados. Los resultados del estudio demostraron la inmunogenicidad de la fracción de EHV-1 KyA inactivada de la vacuna contra la enfermedad respiratoria causada por EHV-4 virulento. Además, el estudio demostró que la fracción de EHV-1 KyA inactivada, fue inmunogénica cuando se administró tanto por vía parenteral como por vía parenteral/intranasal.

35 Caballos sanos machos y hembras con una edad comprendida de cuatro a nueve meses, fueron obtenidos de procedencias seleccionadas. Los caballos fueron identificados mediante un número en una etiqueta en el ronzal, y un número en un microchip. Todos los caballos disfrutaban de una buena salud al principio del estudio. En el momento de la primera vacunación, los caballos tenían títulos de neutralización del virus (VN) ≤ 2 para EHV-1 y EHV-4. Los caballos fueron distribuidos al azar en grupos sacando de una bolsa los números de identificación de los caballos. Durante la vacunación y los períodos de inoculación, los caballos se mantuvieron juntos en rediles al aire libre, y se alimentaron a su libre voluntad con heno de alfalfa de calidad lechera, suplemento diario de Sweet 14, Bio-mineral equino y agua *ad libum*.

45 Los caballos fueron distribuidos al azar en grupos sacando de una bolsa los números de identificación de los caballos. Durante el período de vacunación, se observaron los caballos para determinar su salud general y cualquier comportamiento anormal. No se observó ningún comportamiento anormal ni condiciones adversas de salud en ninguno de los caballos después de la vacunación y ninguna reacción adversa en el sitio de la inyección. No se observó ningún signo clínico de enfermedad respiratoria en ninguno de los caballos durante el período de vacunación.

50 Los fluidos de EHV-1 para emplear en la vacuna se produjeron de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Todos los fluidos de los virus fueron en el quinto subcultivo del virus master de infección y se produjeron en las células en el 20avo subcultivo a partir del stock master de células. La vacuna se formuló para contener el EHV-1 y el EIV Newmarket/77 subgrupo A1, EIV Kentucky 95, subgrupo A2, y Newmarket 2/93 subgrupo A2, por dosis de dos ml (producida de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 2). La vacuna se señalizó como EHV-1 Imm Vac, 623-510-99E-116, lote # 001, 19 de Diciembre de 1999.

60 La composición inmunogénica que contenía el EHV-1 inactivado se administró a caballos de acuerdo con dos regímenes de vacunación. Un régimen de vacunación estaba constituido por tres vacunaciones intramusculares a intervalos de tres semanas. El otro régimen estaba constituido por dos inoculaciones intramusculares a las dos-cuatro semanas, seguido aparte por una tercera inoculación por ruta intranasal, dos a cuatro semanas más tarde. Cada grupo de régimen de vacunación constaba de 11 ó más caballos. Un grupo de 18 caballos se utilizó como control no vacunado. A las tres semanas después de la última vacunación, los caballos fueron infectados con EHV-4 virulento. Los caballos se monitorizaron para detectar signos clínicos de la enfermedad respiratoria causada por el EHV-4, y se registró la gravedad de la enfermedad mediante un sistema de puntos descrito más adelante en la tabla V-1. Se tomaron muestras de sangre y muestras nasales para una evaluación serológica y torundas nasales para el aislamiento del virus, antes, y en determinados momentos seleccionados después de la vacunación.

ES 2 305 220 T3

TABLA V-1

Signos clínicos del sistema por puntos

5	<u>Signo clínico</u>	<u>Puntuación dada por cada día de exhibición del signo</u>
10		
	Descarga nasal	
15	Serosa, ligera cantidad	1
	Serosa, cantidad copiosa	2
20	Mucopurulenta, ligera cantidad	3
	Mucopurulenta, cantidad copiosa	4
25	Pirexia	
	102,5 - 103,9 °F	1
30	104,0 - 104,9 °F	2
	≤ 105,0 °F	3
35	Otros síntomas	
	Conjuntivitis	1
40	Tos	2
	Disnea	3
	Depresión	4
45	Tratamiento antibiótico necesario debido a una infección bacteriana secundaria	5
50		

Se efectuaron cinco titulaciones repetidas del virus EHV-4 de inoculación, cepa 405, en las células Vero. El resultado de las titulaciones fue de $4,63 \text{ TCID}_{50} \text{Log}_{10}/1 \text{ ml}$ para cada una de las cinco titulaciones. Se administraron dos ml para la inoculación para dar una dosis de $4,9 \text{ TCID}_{50} \text{Log}_{10}/\text{dosis}$. Esta dosis de virus virulento fue suficiente para causar una grave enfermedad clínica respiratoria en los caballos de control no vacunados.

La cepa EHV-4 405 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo, y se propagó en células Vero. Este virus fue aislado a partir de un caballo con rinoneumonitis y fue caracterizado por el Dr. M. Studdert, un científico de bien reconocido prestigio en EHV y enfermedades causadas por el EHV. El virus se registró en la ATCC como un importante y representativo ejemplo de EHV-4 y ha sido previamente recomendado por NVSL como una cepa EHV-4 de inoculación.

Stocks congelados de EHV-4 para ser empleados para la inoculación de la infección se descongelaron y diluyeron hasta contener una concentración diana de $5,0 \text{ TCID}_{50} \text{Log}_{10}/\text{ml}$, y se congeló a -70°C . Una muestra del virus de inoculación se descongeló y se determinó el título. En el momento de la inoculación los fluidos del virus se descongelaron y se sacaron dos ml de EHV-4 con una jeringa de tres ml y una aguja de galga 21. La aguja se eliminó y el virus de inoculación se administró intranasalmente para grupos apropiados de caballos vacunados y no vacunados.

ES 2 305 220 T3

Después de la inoculación, los caballos fueron monitorizados para detectar señales clínicas de la enfermedad respiratoria causada por el EHV-4 que incluye la pirexia, descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea, depresión y otras tales como por ejemplo el tratamiento antibiótico requerido para una infección bacteriana secundaria. Los caballos se observaron diariamente para detectar la enfermedad clínica y se registró la gravedad de la enfermedad.

5 Las torundas nasales para el aislamiento del EHV se efectuaron en días seleccionados después de la inoculación del virus y se almacenaron a -70°C. Se descongelaron muestras congeladas y la torunda se separó del medio de transporte. La muestra se sometió a centrifugación a 2500 x g durante 20 minutos a 19-22°C. Se añadió un alícuota de 0,1 ml de la muestra centrifugada a un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 48 pocillos, que contenía monocapas de 24 horas de células Vero. Las placas de cultivos se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂ durante siete días. 10 Los pocillos se observaron encima de una base regular para detectar la presencia de un efecto citopático (CPE) típico del EHV. Los pocillos que presentaban citotoxicidad se subcultivarón después de un período de incubación de siete días mediante la transferencia de 0,2 ml del pocillo a un pocillo de una placa de cultivo de tejido de 48 pocillos que contenía una monocapa de 24 horas de células Vero. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en una incubadora de 15 CO₂ durante siete días y se observaron para detectar el CPE. El título del EHV en las muestras nasales procesadas que dieron un CPE positivo, se determinó por métodos estándar de titulación sobre células en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos.

20 Se determinaron los títulos del anticuerpo VN del suero en caballos antes y después de la vacunación y después de la inoculación con virus virulento. Cuando las muestras de sangre se extrajeron para explorar los caballos para emplear en el estudio, todos los caballos tenían títulos del anticuerpo VN ≤ 2 para EHV-1 y EHV-4, excepto el caballo número 13 que tenía un título VN de 8 para EHV-1 y EHV-4. En el momento de la primera vacunación, el título del VN para los EHV-1 y EHV-4 había disminuido a 2 y 4 respectivamente. Un caballo adicional en el grupo intramuscular tenía un título de VN que había aumentado de 2 a 8 y dos caballos en el grupo parenteral/intranasal tenían títulos del VN que 25 habían aumentado de 2 a 16. Ninguno de los caballos mostró ninguna evidencia de una infección respiratoria. Después de la primera vacunación, el aumento del título del VN para el EHV-1 y EVH-4 fue variable pero el título del VN en todos los caballos aumentó relativamente al título de la prevacunación. Después de la segunda y tercera vacunaciones, el título de VN permaneció esencialmente el mismo que después de la post primera vacunación. El título de VN fue mayor para el EHV-1 que para el EHV-4, aunque el título del VN para el EHV-1 fue mayor de dos veces pero menor 30 de cuatro veces mayor que el título del VN del EHV-4. Los títulos del VN para el EHV-1 y el EHV-4 fueron mayores en el grupo de vacunación parenteral que el grupo parenteral/intranasal pero menores que una diferencia de dos veces. A los 21 días después de la infección con EHV-4 virulento, los títulos del anticuerpo VN para ambos EHV-1 y EHV-4 habían aumentado ligeramente o permanecido iguales en los caballos vacunados. Sin embargo, en los caballos de control no vacunados los títulos del anticuerpo VN aumentaron de 32 a 128 veces para ambos EHV-1 y EHV-4 en 35 todos los caballos de control no vacunados, menos uno. Los títulos del anticuerpo VN para el EHV-1 fueron similares a los títulos del anticuerpo VN para el EHV-4 en caballos vacunados y caballos de control después de la inoculación con EHV-4.

40 Los títulos del anticuerpo VN en las muestras nasales recogidas de los caballos antes y después de la vacunación y después de la infección con virus virulento, se determinaron con el mismo ensayo del VN empleado para determinar los títulos del anticuerpo en el suero. Similarmente a la actividad VN en el suero después de la vacunación, la actividad VN en las secreciones nasales aumentó después de la vacunación pero en una extensión menor. Después de la inoculación con EHV-4, el título del anticuerpo VN aumentó pero solo ligeramente y solo en unos pocos caballos. Los datos del título del anticuerpo VN no figuran en el informe.

45 Los caballos fueron inoculados intranasalmente con EHV-4 virulento. Después de la inoculación, se tomó diariamente la temperatura de los caballos y se registraron los signos clínicos de la enfermedad respiratoria, los cuales incluyeron la descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea y depresión.

50 Se monotorizó la pirexia en los caballos después de la inoculación con EHV-4. La pirexia fue esporádica y de corta duración en ambos grupos de vacunación y de control. En la mayor parte de los caballos que presentaron pirexia, la temperatura elevada se observó solamente durante uno o dos días. Un caballo vacunado del grupo parenteral/intranasal presentó pirexia durante cuatro días consecutivos. No hubo evidencia de diferencias importantes en la distribución de puntuación de la pirexia entre los grupos vacunados y el grupo de control durante de 5 a 8 días, 10 ó 13 después de la 55 inoculación. El análisis estadístico no se efectuó de los días 1 al 4, 9, 11, 12, y del 14 al 21, debido a que menos de dos animales tenían una puntuación de la pirexia distinta a cero. Cuando las temperaturas se analizaron separadamente durante el día, empleando un análisis de la varianza, hubo una evidencia de una reducción significativa de temperaturas entre los grupos vacunados y los de control pero solamente durante unos pocos días.

60 Se efectuaron también observaciones de la descarga nasal en caballos. La descarga nasal se dictaminó como normal, como una cantidad ligeramente serosa, como una cantidad copiosamente serosa, como una cantidad ligeramente mucopurulenta y como una cantidad copiosamente mucopurulenta, y se puntuó como 0, 1, 2, 3, y 4 respectivamente. Tres caballos en el grupo de vacunados parenteralmente presentaron una descarga nasal mucopurulenta durante solamente un día. Todas las otras puntuaciones de descarga en los grupos vacunados fueron una pequeña cantidad de descarga serosa que estuvo primariamente limitada a uno o dos días. En contraste, los caballos de control no vacunados presentaron una descarga mucopurulenta y serosa durante múltiples días consecutivos. Hubo una evidencia de diferencias significativas entre ambos grupos vacunados y controles ($\leq 0,0479$) durante los días 3 al 9 y del 11 al 15 después de la inoculación. Hubo una evidencia de diferencias significativas en la distribución de las puntuaciones de

ES 2 305 220 T3

descarga nasal entre el grupo de vacunación parenteral y el grupo de control ($p \leq 0,0398$) durante los días 4, 5, 6, 8, 9 y 11 después de la inoculación y entre los grupos de vacunación parenteral/intranasal y los grupos de control ($p \leq 0,0259$), los días 3 al 8 y 11 después de la inoculación.

- 5 La observación después de la inoculación de los signos clínicos de conjuntivitis, tos, disnea y depresión, está representada en la tabla 4. La conjuntivitis fue el signo principal observado en los vacunados y se registró durante dos a tres días. Un vacunado presentó disnea durante un día y un vacunado presentó tos durante tres días consecutivos. Todas las otras observaciones de tos fueron solamente de un día. Un caballo de cada uno de los grupos vacunados parenteral y parenteral/intranasal, 8% y 9%, presentaron respectivamente dos signos de enfermedad clínica durante solamente un día. La depresión no se observó en ningún vacunado. A diferencia de los vacunados, el 80% de los caballos de control no vacunados presentaron signos clínicos graves de enfermedad de tos y depresión durante tres o más días consecutivos después de la inoculación. Cuando los signos clínicos se analizaron como 0 = ausente, y 1 = presente, hubo una evidencia de una diferencia significativa en el número de animales que presentaban conjuntivitis entre los grupos de vacunación parenteral ($p \leq 0,0313$) y parenteral/intranasal ($p \leq 0,0391$) y el grupo de control no vacunado durante los días 3 y 6 al 13 después de la inoculación. Hubo una evidencia de una diferencia significativa en la reducción de animales que presentaban depresión ($p \leq 0,0156$) el día 6 después de la inoculación tanto para los grupos de vacunación parenteral como de vacunación parenteral/intranasal comparados con los controles no vacunados. No hubo evidencia de una diferencia significativa entre los vacunados y los controles, para la disnea.
- 10 20 Cuando se comprobó que existía cada día un cierto número de signos clínicos, hubo la evidencia de una significativa diferencia en la distribución del número de signos clínicos entre los grupos con vacunación parenteral ($p \leq 0,0242$) y los de vacunación parenteral/intranasal ($p \leq 0,0259$), y los caballos de control no vacunados, en los días 6 al 9 y el día 11 después de la inoculación. La puntuación del signo clínico de conjuntivitis, tos, disnea, y depresión se puntuaron 1, 2, 3 y 4 respectivamente, como se ha descrito en la tabla V-1. Se calculó la composición clínica compuesta mediante la suma de la descarga nasal y los puntos asignados a los signos clínicos. Las temperaturas no se incluyeron en el cálculo de la puntuación compuesta. Se calculó la puntuación clínica compuesta para cada caballo para cada día posterior a la inoculación. La puntuación clínica compuesta total es la suma de las puntuaciones clínicas para todos los días posteriores a la inoculación. Hubo la evidencia de unas diferencias significativas en la puntuación clínica compuesta entre el grupo parenteral y el grupo de control no vacunado ($p \leq 0,0331$) los días del 3 al 9 y del 11 al 15 posteriores a la inoculación y diferencias significativas para una puntuación compuesta total ($p \leq 0,0001$). Hubo la evidencia de diferencias significativas en la puntuación clínica compuesta entre el grupo parenteral/intranasal y el grupo de control no vacunado ($p \leq 0,0241$) en los días 3 al 9 y 11 al 15 posteriores a la inoculación, y diferencias significativas para la puntuación compuesta total ($p \leq 0,0001$).
- 25 30 40 35 40 La propagación del virus se monitoreó en los caballos después de la inoculación con EHV-4 virulento. Se recogieron muestras nasales de los caballos en los días 1 al 7 y cada uno de los días siguientes hasta los 18 días después de la inoculación. El virus EHV-4 de la inoculación se recuperó de las muestras nasales de todos pero no de un caballo de control no vacunado. El virus fue detectado en la mayoría de caballos de control no vacunados, a la dilución de 10^{-2} . Los días del 3 al 5 fueron los días principales en los que se detectó la propagación del virus. El virus se detectó a partir de algunos caballos de control no vacunados, el día 6 después de la inoculación, pero a bajos niveles. El virus inoculado no se recuperó de los caballos vacunados después de la inoculación.

Conclusión

- 45 La vacuna contenido el virus EHV-1 KyA inactivado, generó una respuesta sistémica inmunológica humoral, cuando se administró tanto por vía parenteral como por vía parenteral/intranasal. La vacunación de caballos con la vacuna contenido el EHV-1, generó altos niveles del anticuerpo VN de los virus EHV-1 y EHV-4. Los títulos del anticuerpo tanto para el EHV-1 como para el EHV-4, se detectaron en muestras nasales de animales vacunados pero con un título relativamente bajo. Así, la vacuna contenido EHV-1 KyA inactivado fue capaz de inmunizar caballos contra el EHV-1 y fue capaz de inmunización cruzada de caballos contra el EHV-4. No se observó ninguna respuesta anormal a la vacunación o reacción en el sitio de la inyección en ninguno de los caballos después de la vacunación.

- 55 60 La enfermedad respiratoria severa, la cual consiste en episodios prolongados de descarga nasal serosa y muco-purulenta, conjuntivitis, tos y depresión, se observó en los caballos de control no vacunados infectados con EHV-4 virulento. Por el contrario, el número de signos clínicos de la enfermedad respiratoria por causa del EHV-4, la gravedad de los signos clínicos y el número de vacunados que presentaban signos clínicos fue significativamente reducido en los caballos vacunados. Los caballos vacunados tanto por vía parenteral como por vía parenteral/intranasal mostraron una significativa reducción en los signos clínicos de la enfermedad respiratoria debido a la infección con EHV-4. La reducción de la enfermedad clínica fue apoyada por los datos que establecían que tanto los caballos vacunados parenteralmente como los vacunados por vía parenteral/intranasal no propagaban el virus después de la inoculación con EHV-4. Las muestras nasales recogidas de los caballos de control no vacunados contenían altos niveles de virus, muchos días después de la inoculación con EHV-4.

- 65 El antígeno de EHV-1 KyA inactivado contenido en la vacuna fue inmunogénico para la protección cruzada de caballos contra la enfermedad respiratoria causada por el EHV-4 cuando se administró por las vías parenteral y parenteral/intranasal. En resumen, los resultados de este estudio demostraron que una vacuna contenido el virus EHV-1 KyA inactivado, generó el anticuerpo VN no solamente para el EHV-1 sino también el anticuerpo para la neutralización cruzada para el EHV-4. La vacuna contenido el EHV-1 KyA inactivado fue capaz de la protección cruzada de

ES 2 305 220 T3

caballos contra la enfermedad respiratoria causada por el EHV-4 virulento cuando se administró empleando o bien un régimen parenteral o bien un régimen parenteral/intranasal.

Ejemplo 6

5 *Inoculación de caballos con EHV-1 inactivado y subsiguiente infección con EHV-1 virulento*

El objetivo del estudio descrito en este ejemplo fue el de demostrar la inmunogenicidad de la fracción EHV-1, cuando se administró o bien por vía intramuscular o bien por vías intramuscular/intranasal, para la protección cruzada 10 de caballos contra la enfermedad causada por el EHV-1 virulento. Un objetivo adicional fue el de demostrar la no interferencia de las fracciones de EIV presentes, en la inmunogenicidad del EHV-1.

El propósito del estudio fue el de demostrar la inmunogenicidad de la fracción de EHV-1 de la vacuna de la rino-neumonitis, el virus muerto para la protección de caballos infectados con EHV-1 virulento. La vacuna empleada en el 15 estudio se formuló con EHV-1 inactivado con Carbopol® 971 como coadyuvante. Los caballos fueron vacunados con dos diferentes regímenes de vacunación. Un régimen de vacunación consistía en tres vacunaciones intramusculares y el otro régimen de vacunación consistía en dos vacunaciones intramusculares y una administración intranasal. Los caballos fueron vacunados a intervalos de dos a cuatro semanas. Los caballos no vacunados se utilizaron como controles. A las seis semanas después de la última vacunación, los caballos vacunados y los caballos de control no vacunados se 20 inocularon con EHV-1 virulento. Se observaron los signos clínicos de la enfermedad respiratoria grave incluyendo la descarga nasal mucopurulenta, tos, disnea y depresión en caballos de control no vacunados después de la inoculación con EHV-1.

Caballos

25 Se obtuvieron caballos sanos machos y hembras de diferentes razas, de tres a cuatro meses de edad, de diferentes procedencias. Los caballos se identificaron mediante números en una etiqueta del ronzal, y números de microchip. Todos los caballos disfrutaban de buena salud al comienzo del estudio con ninguna incidencia previa conocida de enfermedad respiratoria causada por el EHV. Los caballos fueron agrupados al azar en grupos sacando los números 30 de identificación de los caballos de una bolsa. Durante los períodos de vacunación y de inoculación, los caballos se mantuvieron juntos en rediles abiertos y fueron alimentados libremente con heno de alfalfa de calidad lechera, suplemento dietético Sweet 14, equine Bio-mineral, y agua *ad libum*.

Los caballos se agruparon al azar en grupos sacando los números de identificación de los caballos de una bolsa. 35 Se observaron los caballos para confirmar su buena salud general y cualquier comportamiento anormal durante el período de vacunación. Todos los caballos disfrutaban de buena salud al comienzo del estudio. No se observó ningún comportamiento anormal o condiciones de salud adversas, en ninguno de los caballos después de la vacunación y no se observaron reacciones adversas en el sitio de la inyección en ningún caballo después de la vacunación. No se observó ninguno signo clínico de la enfermedad respiratoria causado por el EHV, en ninguno de los caballos durante el período 40 de vacunación.

Aproximadamente a las tres semanas antes de la fecha prevista de infección de los caballos con EHV-1 virulento, tuvo lugar un brote de adenitis en los caballos. Se tomaron muestras de torundas de los ganglios linfáticos y se sometieron al laboratorio de diagnósticos por la Universidad del Estado de Montana, y se aisló el *Streptococcus equi* 45 de las muestras. Se administró penicilina a los caballos y los caballos se vacunaron con la vacuna Pinnacle, de *S. equi* vivos atenuados. Se permitió a los caballos recuperarse de la adenitis durante tres semanas antes de la inoculación con EHV-1 virulento. Un caballo, un caballo de control no vacunado, se eliminó del estudio el día de la inoculación con EHV-1. Se observó una ligera depresión y disnea y se oyeron chirridos en la inspiración en un examen exploratorio. Otro caballo, del grupo vacunado intramuscular, murió el 21 de Septiembre de 2000, cinco semanas antes de la infección 50 con EHV-1. La causa de la muerte fue una neumonía. Un tercer caballo, del grupo vacunado intramuscular murió el 28 de Octubre de 2000 un día después de la infección. La causa de la muerte fue un absceso reventado del mesenterio y la subsiguiente toxemia. Se aisló el *S. equi* del absceso. Todas las inoculaciones de los caballos con EHV-1 se hicieron con caballos sanos y no mostraron ninguna evidencia de infección por *S. equi*. Los datos de los caballos eliminados del estudio no fueron incluidos en el informe.

55 *Vacunas*

Los fluidos del EHV-1 para emplear en la vacuna, se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento descrito en los ejemplos 1 y 2. Todos los fluidos de los virus fueron obtenidos en el quinto subcultivo del virus master de inoculación y 60 fueron producidos en células en el 20avo subcultivo a partir del stock de células master. La vacuna se formuló para contener EHV-1 y EIV Newmarket/77, subgrupo A1, EIV Kentucky 95, subgrupo A2, y Newmarket 2/93, subgrupo A2, por dos ml de dosis. La vacuna se etiquetó como EHV-1 Imm Vac, lote # 001, 6129-0510-00E-045, 03-Agosto-00.

65 *Diseño del estudio*

La vacuna se administró a los caballos mediante dos regímenes de vacunación. Un régimen de vacunación consistió en tres vacunaciones intramusculares a intervalos de dos a cuatro semanas. El otro régimen consistió en dos vacunaciones intramusculares a las dos - cuatro semanas aparte y la tercera vacunación por ruta intranasal, dos a cuatro semanas

ES 2 305 220 T3

más tarde. Cada grupo de régimen de vacunación contenía 19-20 caballos. Un grupo de 20 caballos se utilizó como control no vacunado. A las seis semanas después de la última vacunación, los caballos fueron inoculados con EHV-1 virulento. Los caballos fueron monitorizados para detectar signos clínicos de la enfermedad respiratoria causada por el EHV-1 y se registró la gravedad de la enfermedad. Se extrajeron muestras de sangre y muestras nasales para la evaluación serológica y se tomaron torundas nasales para el aislamiento del virus, antes y en momentos determinados seleccionados después de la vacunación. La recogida de sangre, muestras nasales y torundas nasales están descritas en el protocolo del estudio de los animales.

Títulos del anticuerpo VN en suero, para EHV-1 y EHV-4

Se determinaron los títulos del anticuerpo VN en suero, en caballos antes y después de la vacunación e inoculación con EHV-1 virulento. Todos los caballos tanto los grupos vacunados intramuscularmente como los vacunados por vía intramuscular/intranasal tuvieron títulos del anticuerpo VN \leq 2 ó 4 para EHV-1 en el momento de la primera vacunación. Un caballo del grupo vacunado intramuscularmente y cinco caballos del grupo vacunado por vía intranasal tenían títulos del anticuerpo VN para el EHV-4 de 8 ó 16 en el momento de la primera vacunación. Los títulos del anticuerpo VN en los caballos de control no vacunados fueron \leq 2 a 16 con la mayor parte \leq 2 ó 4 en el momento de la primera vacunación. Ninguno de los caballos mostró alguna evidencia de una infección respiratoria y no hubo ninguna exposición previa conocida al EHV. Después de una vacunación, hubo poco o ningún aumento del título de VN para EHV-1 y EHV-4. Los títulos del anticuerpo en los caballos de control no vacunados permanecieron inalterados y, de hecho, los títulos del anticuerpo en algunos controles disminuyeron ligeramente de los títulos previos a la vacunación. Después de la segunda vacunación, los títulos del anticuerpo VN para el EHV-1 aumentaron en los grupos de vacunación intramuscular e intramuscular/intranasal. Los títulos del anticuerpo para el EHV-4 no aumentaron en ninguno de los grupos vacunados. Los títulos del anticuerpo en los controles no vacunados permanecieron inalterados o continuaron disminuyendo en el grupo de control no vacunado. Después de la tercera, los títulos del VN para el EHV-1 continuaron aumentando. Los títulos del anticuerpo para el EHV-4 aumentaron también después de la tercera vacunación. La media geométrica de los títulos del anticuerpo VN para el EHV-1 y EHV-4 en el grupo vacunado intramuscularmente fueron 86 y 19, respectivamente y fueron 69 y 20 para el EHV-1 y EHV-4 respectivamente en el grupo intramuscular/intranasal. Con la excepción de tres caballos de control no vacunados, los títulos del anticuerpo para el EHV-1 y EHV-4 permanecieron inalterados o habían disminuido al final del período de la tercera vacunación. A los 21 días después de la inoculación con EHV-1 virulento, los títulos del anticuerpo VN tanto para el EHV-1 como el EHV-4 aumentaron espectacularmente en algunos vacunados y aumentaron sólo ligeramente o permanecieron los mismos en otros vacunados. Sin embargo, en los caballos de control no vacunados, los títulos del anticuerpo VN aumentaron más de 100 veces, tanto para el EHV-1 como para el EHV-4 en todos ellos, excepto cuatro caballos de control no vacunados. En general, los títulos del anticuerpo VN fueron mayores para el EHV-1 que para el EHV-4.

Titulación del virus de inoculación EHV-1

Se efectuaron cinco titulaciones repetidas del virus de inoculación EHV-1, cepa KyD, sobre células Vero. Los resultados de las cinco titulaciones repetidas fueron 4,4, 4,4, 4,4, 4,4 y 4,5 TCID₅₀Log₁₀/ml. El título medio fue de 4,4 TCID₅₀Log₁₀/ml. Se administraron dos ml a cada caballo para la inoculación para dar una dosis de 4,7 TCID₅₀ Log₁₀/2 ml. La dosis objetivo del virus para ser administrada para la inoculación era \geq 4,0 TCID₅₀Log₁₀/2 ml de dosis.

Inoculación de los caballos con EHV-1 virulento

El EHV-1 cepa KyD se obtuvo a partir de la American Type Culture Collection (“Colección americana de cultivos tipo”) y se propagó sobre células Vero. Los stocks de EHV-1 para ser empleados para la inoculación fueron para contener una concentración objetivo de \geq 4,0 TCID₅₀Log₁₀/ml. Los stocks se congelaron a -70°C. Se descongeló una muestra del virus de inoculación y se determinó el título. En el momento de la inoculación, se descongelaron los fluidos de los virus y se sacaron dos ml del EHV-1 con una jeringa de tres ml y una aguja de galga 21. La aguja se eliminó y se administró intranasalmente el virus de la inoculación a los grupos apropiados de caballos vacunados y no vacunados. Los caballos de control vacunados y no vacunados se estabularon juntos en rediles abiertos durante 21 días después del período de inoculación.

Después de la inoculación, los caballos se monitorizaron para detectar la pirexia y los signos clínicos de la enfermedad respiratoria causada por el EHV-1 que incluían la descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea, depresión y otros tales como el tratamiento antibiótico requerido para una infección bacteriana secundaria. Los caballos fueron observados diariamente para detectar la enfermedad clínica y se registró la gravedad de la enfermedad.

Se monitorizó la pirexia en los caballos después de la inoculación del EHV-1. La pirexia fue esporádica y se prolongó durante la duración del período de inoculación. Hubieron caballos en el grupo de control no vacunado así como en ambos grupos vacunados que tuvieron temperaturas elevadas durante dos y tres días consecutivos pero no pareció que existiera una correlación de la pirexia con los signos clínicos de la enfermedad respiratoria. No hubo ninguna evidencia de diferencias significativas en la distribución de las puntuaciones de pirexia entre cada uno de los grupos vacunados y el grupo de control no vacunado.

Se efectuaron observaciones de la descarga nasal en los caballos. La descarga nasal se registró como normal, cantidad ligera serosa, cantidad copiosa serosa, cantidad ligera mucopurulenta y cantidad copiosa mucopurulenta, y se puntuó como 0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente, de acuerdo con el protocolo de los animales. Se observó una descarga nasal

ES 2 305 220 T3

serosa después de la inoculación en todos los caballos del grupo vacunado intramuscularmente con aproximadamente el mismo número de caballos presentando cantidades ligeras y copiosas de descarga serosa. Los caballos 405 y 423 tuvieron dos días consecutivos de descarga mucopurulenta y los caballos 420 y 469 tuvieron un día de descarga mucopurulenta. Los caballos de control no vacunados presentaron una descarga principalmente mucopurulenta durante

5 muchos días consecutivos. Cuando se analizaron las puntuaciones de la descarga nasal por el sistema de puntuación del protocolo animal, fue evidente una significativa diferencia de la distribución de las puntuaciones de la descarga nasal entre el grupo intramuscular y los grupos de control no vacunados en los días 5-7 y 10 después de la inoculación ($p \leq 0,0018$). Se observaron similares resultados de descarga nasal serosa en el grupo intramuscular/intranasal 10 después de la inoculación con una descarga mucopurulenta registrada para dos caballos vacunados durante uno o dos días. Fue evidente una significativa diferencia en la distribución de puntuaciones de la descarga nasal entre el grupo intramuscular/intranasal y el grupo de controles no vacunados en los días 4-7, 10 y 19 después de la inoculación ($p \leq 0,0463$).

Cuando las puntuaciones de las descargas nasales se analizaron de acuerdo con un sistema de normal = 0, serosa 15 = 1, y mucopurulenta = 2, se hizo evidente una significativa diferencia entre el grupo intramuscular y el grupo de controles no vacunados en los días 5-7, 10 y 17 después de la inoculación ($p \leq 0,0463$). Fue también evidente una significativa diferencia en la distribución de las puntuaciones de descarga nasal entre el grupo intramuscular/intranasal y el grupo de controles no vacunados en los días 4-7 y 10 después de la inoculación ($p \leq 0,0092$).

20 Se efectuaron observaciones después de la inoculación, de los signos clínicos de conjuntivitis, tos, disnea y depresión. Los días 3 hasta el día 11 después de la inoculación fueron los días en que se observaron los signos más graves de enfermedad en los caballos. Los signos clínicos de la enfermedad tuvieron lugar con mayor frecuencia los días 3 hasta el 11 después de la inoculación. Pareció también que se observaba una fase secundaria de signos clínicos 25 en los vacunados y controles. Sin embargo, esto se observó en los vacunados solamente durante días aislados y en cambio en los controles, durante múltiples días. La tos y la conjuntivitis fueron los signos primarios de la enfermedad clínica observados en los vacunados y en el grupo de régimen intramuscular. La conjuntivitis y la tos se observaron en los vacunados durante no más de tres días consecutivos. Fue evidente una significativa reducción en la proporción 30 de animales que presentaban conjuntivitis en el grupo intramuscular, comparado con los controles no vacunados en los días 6 y 7 después de la inoculación ($p \leq 0,0197$) y no fue evidente una significativa reducción en la proporción de animales que presentan tos en el grupo intramuscular comparado con los controles no vacunados en los días 4 hasta el 8 después de la incubación ($p \leq 0,0463$). La conjuntivitis y la tos fueron los signos clínicos más comunes de la enfermedad observados en el grupo de vacunados por vía intramuscular/intranasal. Fue evidente una significativa 35 reducción en la proporción de animales que presentaban conjuntivitis en el grupo intramuscular/intranasal comparado con los controles no vacunados en los días 6 y 7 después de la inoculación ($p \leq 0,0197$) y fue evidente una significativa reducción en la proporción de animales que presentaban tos en el grupo intramuscular comparado con los controles no vacunados en los días 5 y 6 después de la inoculación ($p \leq 0,0044$). No se observó depresión en ningún vacunado por vía intramuscular después de la inoculación y se observó solamente en dos vacunados por vía intramuscular/intranasal 40 después de la inoculación. La depresión se observó en muchos caballos de control no vacunados durante muchos días. En contraste con los vacunados, los caballos de control no vacunados demostraron múltiples signos de enfermedad que en general persistieron durante cuatro días consecutivos y hasta siete u ocho días más. La disnea no se observó en ninguno de los caballos vacunados pero se observó en dos caballos de control durante múltiples días. Los mismos dos caballos de control no vacunados requirieron tratamiento antibiótico por una infección bacteriana secundaria. Las puntuaciones clínicas de la enfermedad, calculadas por el protocolo animal están presentadas en las tablas 7 y 8 para los vacunados por vía intramuscular frente a los controles y vacunados por vía intramuscular/intranasal frente a los controles, 45 respectivamente.

El número de signos clínicos fueron concordantes durante cada día y se registraron como 0, 1, 2 ó 3. Cuando el número de signos clínicos exhibidos cada día concordaron, hubo una evidencia de que existe una diferencia significativa en la distribución del número de signos clínicos entre el grupo intramuscular y el grupo de control no vacunado 50 durante los días 4 al 8 ($p \leq 0,0206$). Fue evidente una diferencia significativa en la distribución del número de signos clínicos entre el grupo intramuscular/intranasal y el grupo de control no vacunado durante los días 5 al 7 ($p \leq 0,0159$).

Se calcularon las puntuaciones clínicas compuestas mediante la suma de la puntuación de la descarga nasal y la puntuación del signo clínico. El ensayo de Kruskal-Wallis, una extensión multigrupo del ensayo Wicoxin de dos 55 grupos, se empleó para ensayar la hipótesis de igualdad de las puntuaciones entre grupos. El ensayo de Wilcoxon se empleó para ensayar la hipótesis de reducción de las puntuaciones para cada grupo de vacunados comparado con el grupo de control (un ensayo unilateral) y para ensayar la hipótesis de la igualdad de las puntuaciones entre los grupos vacunados (un ensayo bilateral). Hubo evidencia de una significativa reducción de las puntuaciones clínicas compuestas entre el grupo intramuscular y el grupo de control no vacunado durante los días 4 al 7 y el día 11 después 60 de la inoculación ($p \leq 0,0372$), y durante la puntuación clínica compuesta total ($p \leq 0,0001$). Hubo una evidencia de una reducción significativa en las puntuaciones clínicas compuestas entre el grupo intramuscular/intranasal y el grupo de control no vacunado durante los días 4 al 7 y día 11 después de la inoculación ($p \leq 0,0408$) y durante la puntuación clínica compuesta total ($p \leq 0,0002$).

65 Se calculó también, una puntuación clínica compuesta modificada, la suma de la puntuación de la observación clínica y la puntuación de la descarga nasal, pero no de la pirexia. Hubo una evidencia de una significativa reducción de las puntuaciones clínicas compuestas modificadas entre el grupo intramuscular y el grupo de control no vacunado durante los días 3 al 8 y los días 10, 11 y 19 después de la inoculación ($p \leq 0,0383$) y durante la puntuación clínica compuesta

ES 2 305 220 T3

total ($p \leq 0,0001$). Hubo también la evidencia de una significativa reducción en el grupo intramuscular/intranasal y el grupo de control no vacunado durante los días 3 al 7, y los días 10, 11 y 19 después de la inoculación ($p \leq 0,0487$) y durante la puntuación clínica del compuesto total ($p \leq 0,0001$).

5 *Propagación del virus a partir de los caballos, después de la inoculación*

- Se recuperó el virus de inoculación EHV-1 del virus propagado a partir de muestras nasales de todos los caballos de control no vacunados después de la inoculación con EHV-1 y se almacenaron a -70°C. Las muestras congeladas se congelaron y la torunda se retiró del medio de transporte. La muestra se procesó por centrifugación a 2500 x g durante 10 20 minutos a 19-22°C. Se añadió un alícuota de 0,1 ml de la muestra procesada a un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 48 pocillos, conteniendo monocapas de 24-48 horas de células Vero. Las placas de cultivo se incubaron a 15 37°C en un incubador de CO₂ durante siete días. Los pocillos fueron observados sobre una base regular para detectar la presencia del efecto citopático (CPE) típico del EHV. Los pocillos que presentan citotoxicidad fueron subcultivados después de siete días de período de incubación mediante transferencia de 0,2 ml desde el pocillo a un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 48 pocillos conteniendo una monocapa de 24 horas de células Vero. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂ durante siete días y se observó el CPE. El título del EHV en las muestras nasales procesadas que dio positivo para el CPE, se determinó mediante métodos de titulación estándar sobre células en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos.
- 20 El virus EHV-1 de inoculación, se recuperó del virus propagado de muestras nasales de todos los caballos de control no vacunados después de la inoculación con EHV-1. El virus detectado en las torundas nasales se identificó como EHV-1 mediante el ensayo de inmunofluorescencia empleando el anticuerpo monoclonal específico del EHV-1. El virus se detectó a partir de caballos de control no vacunados en diluciones de 10⁻² a 10⁻³. Los días del dos al cinco, fueron los días principales en los que se detectó la propagación del virus. El virus de inoculación se recuperó después 25 de la inoculación a partir de cinco caballos en el grupo con vacunación intramuscular y de tres caballos en el grupo con vacunación intramuscular/intranasal. Fue evidente una reducción significativa en la proporción de animales que exhibieron la presencia del virus en el grupo intramuscular comparado con el grupo de control no vacunado durante 30 2 a 5 días ($p \leq 0,0001$), y fue evidente una reducción significativa en la proporción de animales que exhibieron la presencia de virus en el grupo intramuscular/intranasal comparado con el grupo de control no vacunado, durante los días 2 al 5 ($p \leq 0,0003$).

Criterios para un estudio satisfactorio

Deben satisfacerse los siguientes criterios para un estudio de inmunogenicidad al EHV-1 satisfactorio:

- 35 Los caballos de control no vacunados deben permanecer seronegativos al EHV-1 y EHV-4 durante el período de vacunación y/o no deben mostrar ningún signo clínico de la enfermedad como indicador de la exposición de los caballos del ensayo a un campo virulento del virus.
- 40 Después de la infección con EHV-1 virulento, debe haber una reducción estadísticamente significativa en los signos clínicos de la enfermedad en los animales vacunados en comparación con los signos clínicos de la enfermedad en los animales de control no vacunados.

45 *Conclusiones*

En este estudio, los grupos de potros machos y hembras de tres a cuatro meses de edad, fueron vacunados con tres dosis de vacuna administrada bien sea por vía intramuscular, bien sea por vía intramuscular/intranasal. Después de la administración de tres dosis de vacuna, todos los animales vacunados desarrollaron el anticuerpo VN. El desarrollo de 50 la respuesta sistémica humoral fue similar en los animales vacunados mediante regímenes de vacunación intramuscular e intramuscular/intranasal. La vacunación de los caballos con la vacuna conteniendo el EHV-1, generó altos niveles de anti-cuerpo VN para el EHV-1 y para el EHV-4. Así, la vacuna conteniendo EHV-1 fue capaz de inmunizar los caballos contra el EHV-1 y fue capaz de la inmunización cruzada de los caballos contra el EHV-4. No se observó ninguna respuesta anormal a la vacunación ni ninguna reacción en el sitio de la inyección, en ninguno de los caballos 55 después de la vacunación.

Para evaluar la capacidad de la vacuna que contenía el EHV-1, para la protección de los caballos contra la enfermedad respiratoria causada por el EHV-1, se compararon los signos clínicos de la enfermedad respiratoria en caballos vacunados con la enfermedad clínica en caballos de control no vacunados después de la inoculación con una cepa virulenta de EHV-1 cepa KyD. En aproximadamente seis semanas después de la tercera vacunación con la vacuna conteniendo EHV-1, los caballos vacunados y los caballos de control no vacunados, fueron inoculados intranasalmente con EHV-1 virulento. Se observó una enfermedad respiratoria grave que consistía en prolongados episodios de descarga nasal serosa y mucopurulenta, conjuntivitis, tos, depresión y disnea, en los caballos de control no vacunados inoculados con EHV-1 virulento. En contraste con los animales de control, el número de signos clínicos de la 60 enfermedad respiratoria por EHV-1, la gravedad de los signos clínicos y el número de vacunados que presentan signos clínicos se redujeron significativamente en los caballos vacunados. Tanto las rutas intramuscular como la intramuscular/intranasal de vacunación fueron similares en la reducción de los signos clínicos de la enfermedad respiratoria debida a la infección por EHV-1. La reducción de la enfermedad clínica en los vacunados se apoya en los datos de me-

ES 2 305 220 T3

nos cantidad de virus propagado en los caballos vacunados por vía intramuscular e intramuscular/intranasal, después de la infección con EHV-1, y virus propagado durante períodos más cortos de tiempo.

- Los resultados del estudio demostraron que la vacuna que contenía el anticuerpo VN generado por el EHV-1
5 inactivado, fue inmunogénica para la protección de caballos contra la enfermedad respiratoria causada por el EHV-1 cuando se administró bien sea por vía intramuscular o por vía intramuscular/intranasal.

Ejemplo 7

10 *Producción de composiciones inmunogénicas que contienen cepas de EHV-1 y EHV-4, inactivadas*

Para producir la vacuna combinada, se obtuvieron primeramente, cultivos master de inoculación de EHV-1 y EHV-4. A partir de estos cultivos master, se hicieron crecer cultivos separados de EHV-1 y EHV-4 y a continuación, se inactivaron. A continuación, los cultivos de virus inactivados se mezclan con el coadyuvante para producir la vacuna.
15 El método empleado para producir la vacuna combinada de EHV-1/EHV-4 inactivados, se describe más adelante.

Los fluidos que contienen el EHV-1 KyA inactivado, a partir del fluido del cultivo del virus master de inoculación, designados EHV-1 KyA, MSV lote 001-dil se produjeron de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

20 Para crear el virus master de inoculación del equine herpesvirus tipo 4 (EHV-4), el personal de Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., aisló virus de un caballo infectado con rinitis. El virus aislado se subcultivó cinco veces sobre células Vero A139 y tres veces sobre células EVero. El tercer subcultivo se empleó como virus master de inoculación y se designó como EHV-4, MSV lote 001-dil.

25 Los cultivos de EHV-4 se produjeron infectando células EVero con virus de inoculación contenido en un medio esencial mínimo (MEM) que contenía de 0 a 5% de suero. A continuación, se incubaron los cultivos a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 120 horas en botellas rotativas de vidrio, o sobre perlas microsopore. Durante la incubación, se comprobaron los cultivos para detectar efectos citopáticos (CPE) inducidos por EHV, para asegurar la pureza de la cepa EHV. Si estuviera presente un CPE atípico o existiera cualquier evidencia macroscópica o microscópica de contaminación,
30 el cultivo quedaría descartado. Los cultivos de virus puros se cosecharon asépticamente en bombonas de vidrio estéril, bombonas de plástico estériles, o depósitos de acero inoxidable y se clarificaron por filtración a través de filtros de 8 micras o mayores. Después de la recogida, el cultivo de los virus se inactivó con el fin de producir una vacuna muerta empleando el procedimiento descrito para EHV-1 en el ejemplo 1.

35 Despues de la inactivación los cultivos fueron ensayados para detectar el CPE típico del EHV, para asegurar la inactivación del virus empleando el procedimiento descrito en el ejemplo 5. Esta tarea se efectuó subcultivando los fluidos víricos tratados con BEI, sobre células EVero y comprobando las células EVero para detectar cualquier infección vírica. Despues de un ensayo de inactivación satisfactorio demostrando que no había ninguna infección vírica, se neutralizó el BEI añadiendo una solución fría ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) de tiosulfato de sodio 1,0 M para obtener una concentración final de 6 mM.

40 Despues de la inactivación y el ensayo de los cultivos de EHV-1 y EHV-4, los cultivos se mezclaron con un coadyuvante para formar el producto final, la vacuna de EHV-1 y EHV-4 inactivados combinados. Este producto final contenía fluidos de EHV-1, fluidos de EHV-4, solución stock de coadyuvante (0,5% de Carbopol® 971) y solución salina, en una proporción de 3,75: 3,00: 12,00: 41,19. Típicamente, una partida contenía 3.750 ml de EHV-1, 3.000 ml de EHV-4, 12.000 ml de solución de coadyuvante, y 41.190 ml de solución salina, proporcionando un volumen total de 60 litros de un serial conjunto.

Ejemplo 8

50 *Inoculación de caballos con la vacuna combinada de EHV-1 y EHV-4 y subsiguiente infección con EHV-4 virulento*

Se realizó un experimento para demostrar la inmunogenicidad de la vacuna de la combinación EHV-1/EHV-4 inactivados. Se emplearon en el experimento, seis grupos de caballos machos y hembras de edad oscilante entre cuatro y siete meses, los cuales dieron resultado neutro a los virus EHV-1 y EHV-4. Como ilustra la tabla VIII-1 más adelante, tres grupos fueron inoculados con EHV-1 virulento mientras otros tres grupos fueron infectados con EHV-4 virulento. De los caballos infectados con el EHV-1, un grupo fue vacunado con tres inyecciones intramusculares ("IM"), un grupo fue vacunado con dos inyecciones intramusculares seguidas de una administración intranasal ("IN"), y un grupo no fue vacunado. De manera similar, de los caballos inoculados con el EHV-4, un grupo se vacunó completamente con inyecciones intramusculares, un grupo se vacunó con dos inyecciones intramusculares seguidas de una administración intranasal, y un grupo no fue vacunado.

55 Los caballos fueron vacunados en intervalos de tres semanas con dosis de 2 ml de la vacuna combinada, con un RPV de 1,0 por dosis de EHV-1 inactivado, y 1,0 por dosis de EHV-4 inactivado. Durante la prueba, los caballos fueron monitorizados para detectar los signos de enfermedad respiratoria. No se observó ningún signo clínico de enfermedad respiratoria en ninguno de los caballos durante el período de vacunación.

ES 2 305 220 T3

TABLA VIII-I

Resumen del ensayo de la vacuna combinada de EHV-1 y EHV-4

5

10

15

20

25 Los animales fueron infectados a las 3 semanas después de la vacunación con, o bien el EHV-1 virulento o bien el
 30 EHV-4 virulento a una dosis diana de 5,0 TCID₅₀Log₁₀/2 ml. Específicamente, se emplearon la cepa EHV-1 Kentucky D (dosis aproximada de 4,5 TCID₅₀Log₁₀/2 ml) y la cepa EHV-4 405 (dosis aproximada de 4,0 TCID₅₀Log₁₀/2 ml), como virus de infección y fueron administrados intranasalmente en dosis de 2 ml (administradas como dosis de 1 ml por la nariz). La protección de la vacuna se midió monitorizando los caballos para detectar signos clínicos de la enfermedad respiratoria, tales como la pirexia, descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea y depresión, y midiendo la gravedad de la enfermedad. Adicionalmente, se extrajeron muestras de sangre y muestras nasales para medir la cantidad de virus propagado.

35 Despues de la infección con el virus, todos los grupos de caballos vacunados infectados con, o bien EHV-1 o bien con EHV-4, mostraron una reducción significativa de los signos de la enfermedad respiratoria, apreciándose poca diferencia entre los grupos vacunados por vía parenteral y los grupos vacunados por vía parenteral/intranasal. Específicamente, los animales vacunados experimentaron una significativa disminución de la descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea y depresión. Estos resultados demostraron que los antígenos de EHV-1 y EHV-4 contenidos en la vacuna combinada de EHV-1/EHV-4 inactivados, son inmunogénicos cuando se administran bien sea por vía parenteral, bien sea por vía parenteral/intranasal.

40 Además de los caballos vacunados que presentaban una reducción en la enfermedad respiratoria, los caballos vacunados presentan también una reducción en la propagación del virus. De los caballos vacunados inoculados con EHV-1, la propagación del virus de 1 a 2,5 log₁₀TCID₅₀/ml durante uno a tres días, fue observada solamente con sólo el 30% del grupo vacunado parenteralmente, y el 40% del grupo parenteral/intranasal. En contraste, el 90% del grupo de control no vacunado, propagó el virus en 2,5 a 3,75 log₁₀TCID₅₀/ml durante dos a siete días. De manera similar, de los caballos vacunados inoculados con la cepa EHV-4 virulenta, la propagación del virus de 1 a 2,5 log₁₀TCID₅₀/ml durante uno a tres días, fue observada solamente con el 40% del grupo vacunado parenteralmente, y el 50% del grupo parenteral/intranasal. De nuevo, los caballos no vacunados presentaron una mayor propagación del virus con el 100% del grupo de control no vacunado propagando el virus de 1 a 5,25 log₁₀TCID₅₀/ml durante dos a siete días. Estas estadísticas evidencian una significativa reducción en la cantidad y número de días en que los caballos vacunados propagaron el virus en comparación con los caballos no vacunados. Dicha evidencia establece que los antígenos de EHV-1 y EHV-4 contenidos en la vacuna combinada de EHV-1/EHV-4 inactivados, son inmunogénicos cuando se administran bien sea por vía parenteral o bien sea por vía parenteral/intranasal.

55 Ejemplo 9

Inoculación de caballos con la vacuna combinada EHV-1/EHV-4 de la influenza equina, y subsiguiente inoculación con virus virulento de la influenza equina

60 Se efectuó un experimento para evaluar la inmunogenicidad de las fracciones de la vacuna EIV mediante la evaluación de la respuesta serológica al EIV, subgrupos A1 y A2, en el animal anfitrión. El estudio se diseñó también para demostrar la no interferencia del EIV y los componentes del EHV en una vacuna de combinación rinoneumonitis-influenza, los virus muertos, mediante la evaluación serológica en el animal anfitrión. El tercer objetivo fue el de demostrar que el subgrupo EIV subgrupo A1 y los subgrupos EIV A2 en la vacuna de la influenza y en las vacunas de la combinación rinoneumonitis-influenza, son inmunogénicas cuando se administran por las vías parenteral y parenteral/intranasal.

ES 2 305 220 T3

Diseño del estudio

La vacuna A se administró a los caballos mediante dos regímenes de vacunación. Un régimen de vacunación consistió en tres vacunaciones intramusculares a intervalos de tres semanas. El otro régimen consistió en dos vacunaciones

- 5 intramusculares separadas tres semanas, y la tercera vacunación por la vía intranasal, tres semana más tarde. Cada grupo de régimen de vacunación comprendía 20 caballos. Un grupo de cinco caballos se utilizaron como controles no vacunados. Se extrajeron muestras de sangre y de lavados nasales antes y a tiempos determinados seleccionados después de la vacunación, para la evaluación de la respuesta serológica para cada una de las tres cepas de vacuna EIV. Se recogieron muestras de sangre y lavados nasales de los caballos a intervalos periódicos. Se observaron los caballos
- 10 para detectar la salud general y cualquier comportamiento anormal de las condiciones de salud durante los 63 días del período experimental.

Caballos

15 Los caballos, machos y hembras, cuya edad oscilaba de siete a nueve meses, se obtuvieron con una procedencia seleccionada. Los caballos se identificaron con números de microchip y se agruparon al azar en grupos sacando los números de identificación de los caballos, de una bolsa. Durante el período experimental, los caballos se mantuvieron en rediles al aire libre y se alimentaron diariamente con libertad de elección con heno de alfalfa de calidad lechera, suplemento dietético Sweet 14, Bio mineral equino, y agua *ad libum*. Se observaron los caballos para detectar su salud

20 general y cualquier comportamiento anormal durante el período experimental. No se observó ningún comportamiento anormal ni condiciones adversas de salud, en ninguno de los caballos, después de la vacunación, ni se observaron reacciones adversas en los sitios de inyección en ningún caballo después de la vacunación. En el momento de la primera vacunación los caballos vacunados con la vacuna A tenían unos títulos del anticuerpo de la inhibición de la hemaglutinación (HAI), ≤ 10 de los subgrupos EIV A1 y A2.

25

Vacuna

La vacuna incluía el virus muerto del EIV que contenía las cepas EIV subgrupo A1 y el subgrupo antigenicamente importante EIV A2. Debido a que los subgrupos A2 en Norteamérica difieren de los subgrupos A2 en Europa, la vacuna contenía las cepas denominadas Kentucky/95 y Newmarket/2/93, que son representativas de los subgrupos A2 en Norteamérica y Europa, respectivamente. Los fluidos de los virus EIV y EHV para emplear en la vacuna fueron producidos de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo 7. Los fluidos de los virus fueron los del quinto subcultivo del virus master de inoculación y fueron producidos sobre células en el 20avo subcultivo a partir del stock de células master. La vacuna A se formuló contenido 64 unidades HA de EIV subgrupo A1, 128 unidades HA cada uno de los dos subgrupos EIV A2, y ≥ 3,0 unidades de potencia relativa (RP) de EHV-1, y ≥ 3,0 unidades de potencia relativa (RP) de EHV-4, por dosis de dos ml. La vacuna se etiquetó como EIV/EHV Imm/Intfr, 623-0856-98E-107, vacuna A lote 001, 12-15-98.

Determinación de la potencia de las fracciones de EIV y EHV de la vacuna A

40

La potencia de las fracciones de EIV en la vacuna fueron determinadas por el protocolo de ensayo de los laboratorios de los servicios veterinarios nacionales, método de ensayo suplementario para efectuar el ensayo de inhibición de la hemaglutinación para el anticuerpo de la influenza equina (MVSAM0124.01, de fecha 2 de Octubre de 1998). Los valores relativos de la potencia de las fracciones EHV-1 y EHV-4 en la vacuna A fueron determinados mediante el ensayo ELISA de liberación de la potencia de EHV descrito en el ejemplo 4. La potencia de la vacuna A fue satisfactoria para las fracciones de EIV. Diez de diez cobayos tenían títulos del anticuerpo HAI de 80 ó mayores para el subgrupo A1, y 10 de 10 cobayos tuvieron títulos de anticuerpo HAI, de 40 ó mayores para cada subgrupo A2 en la vacuna. El valor de la potencia relativa fue de 4,73 y 3,31 para las fracciones de EHV-1 y EHV-4, respectivamente.

50

Títulos del anticuerpo HAI en suero para los subgrupos A1 y A2 después de la vacunación

Se determinaron los títulos del anticuerpo HAI en caballos, después de la vacunación con vacuna A. Todos los vacunados fueron seronegativos para todas las tres cepas de EIV en el momento de la primera vacunación. En el período de tiempo de la prevacunación, dos de los caballos de control no vacunados tenían unos títulos de anticuerpo HAI de 20 para el EIV A1 y los otros tres caballos de control fueron seronegativos para el EIV A1. Todos los cinco caballos de control no vacunados fueron seronegativos para los dos EIV A2. Durante el período experimental, los caballos de control no vacunados permanecieron seronegativos a los dos EIV subgrupo A2 y no mostraron una variación de más de dos veces en el título del anticuerpo HAI para el EIV subgrupo A1. No hubo ninguna indicación de exposición al campo del EIV durante el período experimental. A las tres semanas después de la primera vacunación, la mayor parte de los caballos mostraron una respuesta serológica al EIV subgrupo A1 y el EIV subgrupo A2 NM. Después de una vacunación, solamente cuatro caballos tuvieron una respuesta serológica al EIV subgrupo A2 K. El número de caballos con una respuesta serológica al EIV subgrupo A2 K, aumentó después de la segunda vacunación. Después de la tercera vacunación, 19 de 20 caballos (95%) que recibieron tres vacunaciones intramusculares, tuvieron títulos de anticuerpo HAI de 40 ó mayores que el EIV subgrupo A1. Despues de tres inyecciones intramusculares, 18 de 20 (90%) y 20 de 20 (100%) de los caballos tuvieron títulos del anticuerpo HAI de 20 ó mayores a los subgrupos EIV A2 K y EIV A2 NM, respectivamente. De manera similar, 17 de 20 caballos (85%) que recibieron dos vacunaciones intramuscularmente y una vacunación intranasal tuvieron títulos del anticuerpo HAI de 40 ó mayores al EIV subgrupo A1. Dieciocho de 20 (90%) y 20 de 20 (100%) caballos, tuvieron unos títulos del anticuerpo HAI de 20 ó mayores a los

ES 2 305 220 T3

subgrupos EIV A2 K y EIV A2 NM, respectivamente, después de dos vacunaciones intramusculares y una vacunación intranasal. La media geométrica de los títulos de los anticuerpos después de la tercera vacunación fue de 45, 35 y 61 para los subgrupos EIV A1, A2 K y A2 NM respectivamente, en caballos que recibieron tres inyecciones intramusculares. La media geométrica de los títulos del anticuerpo en caballos que recibieron dos vacunaciones intramusculares y una vacunación intranasal fue de 39, 24 y 51 para los subgrupos EIV A1, A2 K y A2 NM, respectivamente.

Títulos del anticuerpo HAI mucósico al EIV, subgrupos A1 y A2, después de la vacunación

Se determinaron los títulos del anticuerpo HAI en muestras nasales de caballos después de la vacunación con la vacuna A. En el momento de la primera vacunación, el anticuerpo AHI a los dos subgrupos EIV A2 no fueron detectados en ninguna muestra nasal de los caballos. Se detectaron los títulos de inhibición de la hemaglutinación para el EIV subgrupo A1 en algunos de los caballos vacunados y caballos de control no vacunados en la primera vacunación. Después de la primera y segunda vacunación, los niveles del anticuerpo AHI en las secreciones nasales fueron variables. Después del final de la vacunación intramuscular o intranasal, los niveles del anticuerpo HAI fueron los más altos para el EIV subgrupo A1 en comparación con los dos subgrupos A2. Hubo poco o ningún anticuerpo HAI para el EIV subgrupo A2 K en las muestras nasales de caballos después de la tercera vacunación o bien por vía intramuscular o bien por vía intranasal. Fue interesante que los niveles del anticuerpo HAI para el EIV subgrupo A1 y subgrupo A2 NM fueron más pequeños en los caballos que recibieron la tercera vacunación por vía intranasal.

Discusión

Un objetivo de este estudio fue el de demostrar la inmunogenicidad de las fracciones EIV A1 y A2 en la vacuna, cuando se administró mediante cualquier régimen de administración. La inmunogenicidad fue dictaminada mediante la determinación de la respuesta de anticuerpos HAI en suero a las tres cepas EIV después de la vacunación final. Los resultados demostraron que más del 80% de los caballos en ambos grupos del régimen de vacunación tenían títulos del anticuerpo HAI en suero, del 40% o más, para el EIV subgrupo A1, después de la vacunación final y más del 80% de los caballos, en ambos grupos de régimen de vacunación, tenían títulos del anticuerpo HAI en suero de 20 ó mayores, para ambos subgrupos EIV A2 después de la vacunación final. Los niveles de anticuerpo HAI para los subgrupos EIV A1 y A2 se determinaron también en muestras nasales en momentos seleccionados después de la vacunación. Los títulos del anticuerpo HAI de la mucosa fueron más pequeños que los títulos del anticuerpo HAI en suero, en muestras nasales de caballos en ambos regímenes de vacunación y, en contraste con los títulos de HAI en suero, los títulos de HAI en la mucosa aumentaron muy poco después de cada vacunación. Es posible que el ensayo de inhibición de la hemaglutinación no detecte el isotipo del anticuerpo que es el más prevalente en las muestras nasales. Los experimentos demuestran que el EIV subgrupo A1 y subgrupos A2 en la vacuna de la influenza, los virus muertos y la vacuna de la rinoneumonitis-influenza, virus muertos, fueron inmunogénicos cuando se administraron tanto por vía parenteral como por vía parenteral/intranasal. En particular, el estudio demostró que el EIV subgrupo NM/77 A1 y el subgrupo K95 A2 y los subgrupos NM/2/93 A2, fueron inmunogénicos.

Otro objetivo del estudio fue el de demostrar la no interferencia de las fracciones de vacuna EIV y EHV entre sí. La vacuna A empleada en el estudio se formuló con la dosis mínima de liberación de 64 y 128 unidades HA de las fracciones EIV A1 y A2, respectivamente, y se formuló con un valor de la potencia relativa de tres veces o mayor, para las fracciones EHV-1 y EHV-4. Los resultados del estudio demostraron que una vacuna conteniendo la mínima dosis de antígeno de las fracciones EIV y más de la dosis mínima del antígeno de EHV, es capaz de generar una respuesta serológica satisfactoria al EIV subgrupos A1 y A2 en el animal anfitrión. Así, las fracciones EHV-1 y EHV-4 no interfieren con la inmunogenicidad de las fracciones de vacuna EIV. Asimismo, las fracciones de EHV no dieron por resultado un ensayo insatisfactorio de la potencia en el modelo de cobayo.

La invención ha sido descrita con referencia a las varias versiones y técnicas específicas e ilustrativas. Sin embargo, debe comprenderse que pueden hacerse muchas variaciones y modificaciones mientras éstas permanecen dentro del espíritu y el ámbito de la invención. Mientras que en la presente se discuten varias versiones con algún detalle, debe apreciarse que la presente invención proporciona conceptos inventivos que pueden ser incorporados a una amplia variedad de contextos específicos. Las versiones específicas discutidas en la presente son meramente ilustrativas de caminos específicos para hacer y emplear las presentes composiciones inmunogénicas y no se mencionan para limitar el ámbito de la invención. Varias modificaciones y combinaciones de las versiones ilustrativas, así como también otras versiones de la invención, serán evidentes a las personas expertas en la técnica con referencia a la presente descripción.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla IV-1
PLANTILLA DE LA PLACA PARA ELISA DE EHV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ref	Ref	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 3	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 4			
	Vacuna	Vacuna	Vacuna	Vacuna	Vacuna	Vacuna	Vacuna	Vacuna	Vacuna			
B	Testigo	Sin diluir										
C	Testigo	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	Referencia externa
D	Testigo	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	Referencia externa
E	Testigo	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	Control negativo
F		1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	Control negativo
G		1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	Control negativo
H												

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna para la protección de un caballo contra enfermedades asociadas con el virus del Herpes Equine (EHV-1), EHV-4 ó una combinación de las mismas, que comprende:
 - El virus EHV-1 Kentucky A (KyA) químicamente inactivado; y
 - un coadyuvante que incluye un polímero reticulado de un ácido carboxílico olefínicamente insaturado.
2. La vacuna de la reivindicación 1, en donde el virus EHV-1 KyA está químicamente inactivado mediante un tratamiento con un agente de inactivación química el cual incluye un compuesto seleccionado del grupo formado por la etilenimina, derivados de la etilenimina y mezclas de los mismos.
3. La vacuna de la reivindicación 2, en donde el virus EHV-1 KyA está químicamente inactivado mediante un tratamiento con etilenimina binaria.
4. La vacuna de la reivindicación 1, la cual comprende además el EHV-4 inactivado.
5. La vacuna de la reivindicación 1, la cual comprende además, el virus de la influenza equina (EIV), inactivado.
6. La vacuna de la reivindicación 5, en donde el virus de la influenza equina inactivado incluye el virus EIV, subtipo A1, inactivado.
7. La vacuna de la reivindicación 6, en donde el virus EIV subtipo A1 inactivado incluye el virus EIV A1 cepa A/EQ1/Newmarket/77, inactivado.
8. La vacuna de la reivindicación 5, en donde el virus de la influenza equina inactivado incluye el virus EIV subtipo A2 inactivado.
9. La vacuna de la reivindicación 8, en donde el virus EIV subtipo A2 inactivado, incluye el virus EIV A2 cepa Newmarket/2/93 inactivado, el virus EIV A2 cepa Kentucky/95 inactivado, ó una mezcla de los mismos.
10. La vacuna de la reivindicación 5, que comprende el virus EIV subtipo A1 inactivado y el virus EIV subtipo A2 inactivado.
11. La vacuna de la reivindicación 10, que comprende el virus EIV A1 cepa A/EQ1/Newmarket/77 inactivado, el virus EIV A2 cepa Newmarket/2/93 inactivado, y el virus EIV A2 cepa Kentucky/95 inactivado.
12. La vacuna de la reivindicación 1, en donde dicha vacuna es capaz de proteger los caballos contra el EHV-1 y el EHV-4.
13. La vacuna de la reivindicación 1, en donde el polímero de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado, reticulado, incluye el polímero del ácido acrílico reticulado.
14. Una vacuna para la protección de un caballo contra enfermedades asociadas con el EHV-1, EHV-4 ó una combinación de los mismos, que comprende:

El virus EHV-1 KyA inactivado mediante tratamiento con un agente químico de inactivación el cual incluye la etilenimina, un derivado de la etilenimina o una mezcla de los mismos; y un coadyuvante bioadhesivo el cual incluye un polímero de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado, reticulado.
15. La vacuna de la reivindicación 14, en donde el agente químico de inactivación incluye la etilenimina binaria.
16. Empleo de un virus EHV-1 KyA inactivado mediante tratamiento con un agente químico de inactivación el cual incluye etilenimina, un derivado de la etilenimina o una mezcla de los mismos, y un coadyuvante bioadhesivo el cual incluye un polímero de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado, reticulado, para la elaboración de un medicamento para la inmunización de caballos contra el herpesvirus equino.
17. El empleo de un virus EHV-1 KyA químicamente inactivado, y un coadyuvante el cual incluye un polímero de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado, reticulado, para la elaboración de una vacuna para la protección de un caballo contra enfermedades asociadas con el EHV-1, EHV-4 ó una combinación, en donde dicha vacuna se administra a dicho caballo.
18. El empleo de la reivindicación 17, en donde la administración de la vacuna a dicho caballo comprende:
 - administración parenteral de la vacuna; y
 - administración intranasal de la vacuna.

ES 2 305 220 T3

19. El empleo de la reivindicación 18, en donde la administración de la vacuna a dicho caballo comprende:
5 administración parenteral de la vacuna por lo menos una vez en un primer paso; y
 administración intranasal de la vacuna en un paso subsiguiente.

20. El empleo de la reivindicación 17, en donde la vacuna comprende además, EHV-4 inactivado.

10 21. El empleo de la reivindicación 17, en donde la vacuna comprende además el virus de la influenza equina
 inactivado.

15 22. El empleo de la reivindicación 21, en donde la vacuna comprende el virus EIV subtipo A1 inactivado y el virus
 EIV subtipo A2 inactivado.

20 23. Un método para la producción de una vacuna herpesvirus equino, el cual comprende:
 (a) inoculación de células de monos con un virus EHV-1 KyA;
 (b) incubación de las células de mono inoculadas;
 (c) recogida del virus EHV-1 KyA de las células incubadas;
 (d) tratamiento de los fluidos recogidos que contienen el virus con un agente de inactivación química el cual
 incluye la etilenimina, un derivado de etilenimina o una mezcla de los mismos para formar el virus EHV-1
 KyA inactivado; y
 (e) adición de un coadyuvante al virus EHV-1 KyA inactivado, en donde el coadyuvante incluye un polímero
 de ácido acrílico reticulado.

25 24. El método de la reivindicación 23, en donde las células de mono son células Vero.

30 25. El método de la reivindicación 23, en donde el agente químico de inactivación incluye la etilenimina binaria.

35 26. Un kit que comprende en combinación, (1) un dispensador capaz de administrar una vacuna a un caballo; y (2)
 una composición para proteger contra las enfermedades asociadas con el EHV-1, EHV-4 ó una combinación de los
 mismos, en donde la composición comprende:
 el virus EHV-1 KyA químicamente inactivado; y
 un coadyuvante el cual incluye un polímero de un ácido carboxílico olefínicamente no saturado, reticulado.

40 27. El kit de la reivindicación 26, en donde el dispensador es capaz de dispensar su contenido en forma de gotitas;
 y la composición es capaz de proteger contra enfermedades asociadas con el EHV-1, EHV-4 ó una combinación de
 los mismos cuando se administra intranasalmente.

45 28. La vacuna de la reivindicación 14, en donde dicha vacuna comprende:
 el virus EHV-4 inactivado;
 el virus EIV subtipo A1, inactivado; y
 el virus EIV subtipo A2, inactivado.