



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0616328-9 A2**

(22) Data de Depósito: 25/09/2006
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/145 2006.01
A61P 31/16 2006.01

(54) Título: **VACINAS E MÉTODOS PARA TRATAR INFLUENZA CANINO**

(30) Prioridade Unionista: 07/10/2005 US 60/724.827

(73) Titular(es): PFIZER PRODUCTS INC.

(72) Inventor(es): HANS ANTHONY DRAAYER, MICHAEL JOHN HEUTHER, SHELLY LYNN SHIELDS

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006002741 de 25/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/042884 de 19/04/2007

(57) Resumo: VACINAS E MÉTODOS PARA TRATAR INFLUENZA CANINO. A presente invenção se refere ao fornecimento de novas vacinas e tratamentos para as doenças relacionadas com o vírus influenza canino. Ela revela antígenos virais de influenza e métodos de apresentação desses antígenos a caninos, especialmente cachorros. Ele se refere a vacinas atenuadas e mortas. A presente invenção se refere a vírus influenza canino e eqUino experimentalmente gerados. A invenção também inclui influenza A, incluindo H3, N8, H3N8, H7N7 e vírus os quais contêm pelo menos um segmento de genoma de um vírus influenza canino ou eqUino. A presente invenção também se refere ao uso desses vírus em composições terapêuticas para proteger caninos, cachorros em particular, de doenças causadas por vírus influenza.

"VACINAS E MÉTODOS PARA TRATAR INFLUENZA CANINO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a proporcionar novas vacinas e tratamentos para as doenças relacionadas com o vírus influenza canino. Ela revela antígenos virais de influenza e métodos de apresentação desses antígenos para caninos, especialmente cachorros. Ela se refere a vacinas atenuadas e mortas. A presente invenção se refere a vacinas e vírus influenza de canino e eqüino experimentalmente gerados;

5

10 A invenção também inclui vírus A, H3, N8, H3N8 e H7N7 os quais contêm pelo menos um segmento de genoma de um vírus influenza de canino ou eqüino. A presente invenção também se refere ao uso desses vírus nas composições terapêuticas para proteger caninos, cachorros em particular, de doenças causadas pelos vírus de influenza.

15

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Vírus de influenza eqüino foi reconhecido como um patógeno respiratório principal em cavalos desde cerca de 1956. Sintomas de doença causados por vírus de influenza eqüinos podem ser severos, e são geralmente seguidos por infecções bacterianas secundárias. Dois subtipos de vírus de influenza eqüino são reconhecidos, a saber o subtipo 1, o protótipo sendo A/Equino/Praga/1/56 (H7N7) e o subtipo 2, o protótipo sendo A/Equino/Miami/1/63 (H3N8). Presentemente, o subtipo de vírus recombinante é o subtipo 2, a variedade H3N8. Acredita-se agora que essa variedade pode estar infectando caninos e ela pode ser tão virulenta com taxas de fatalidade de caninos reportadas em alguns casos tão altas

20

25

quanto 36%. É possível que uma transferência interespécie do vírus influenza eqüino completou ou de uma porção dele para o cachorro tenha resultado num novo vírus influenza canino específico associado com a doença respiratória aguda. Ver
5 Transmission of Equine Influenza to Dogs (P.C. Crawford et al., Science 310, 482 - 485 (2005). Existe uma clara e convincente necessidade por um vacina eficaz para tratar e prevenir esse novo influenza canino.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

10 Figura 1 mostra reações do sítio de injeção médias geométricas de cachorros vacinados com Vacinas de Antígeno de Eqüino. Figura 2 mostra a consolidação do pulmão porcentual média em animais vacinados com Vacinas do Vírus Influenza de Eqüino e desafiados com o Vírus Influenza Canino.

15 RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona para antígenos de influenza canina e eqüina, vacinas e métodos de uso daquelas vacinas para tratar caninos, especialmente cachorros, de infecções, doenças e sintomas causados por influenza canina. A
20 invenção ainda proporciona composições terapêuticas para proteger um animal contra a doença causada pelo vírus influenza. Métodos para fazer as vacinas e métodos de tratamento dos animais são aqui descritos. Os antígenos dessa invenção podem ser qualquer tipo de vírus de influenza identificado,
25 de qualquer pássaro ou mamífero, incluindo mas sem se limitar a influenza com o subtipo antigênico H3N8 ou mais comumente referido como a variedade H3N8. O influenza pode ser de origem mamífera, incluindo mas sem se limitar a origem

suína, aviária, eqüina ou canina. Vírus de influenza canino e eqüino e antígenos relacionados são preferidos. Variedades com as proteínas designadas H3 ou N8 são reveladas. Variedades com ambos os H3N8 são preferidas. Variedades com as proteínas designadas H7N7 são também reveladas.

A concentração de antígeno e a produção de vacinas são descritas. Meio de cultura de células e o crescimento viral são descritos. A preparação de vacina de vírus atenuado, morto ou inativado, assim como adjuvante de vacina, formulações, formas e veículos, dosagens, vias de administração e ensaios são todos descritos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES E ABREVIACÕES

As definições abaixo de aplicam a essa descoberta, palavras não definidas têm o significado comumente usado por uma pessoa versada na técnica.

"Cerca de" quando usado juntamente com uma variável numérica mensurável, se refere ao valor indicado da variável e a todos os valores da variável que estejam dentro do erro experimental do valor indicado (por exemplo, dentro dos 95% de intervalo de confiança para a média) ou dentro dos 10 por cento do valor indicado, o que for maior.

"Imunidade ativa" inclui tanto a imunidade humoral e/ou a imunidade mediada por célula num cachorro.

"Anticorpo" se refere a uma molécula de imunoglobulina que pode se ligar a um antígeno específico como o resultado de uma resposta imune àquele antígeno. Imunoglobulinas são proteínas do soro compostas de cadeias de polipeptí-

deo "leve" e "pesada" com regiões "constantes" e variáveis" e são divididas em classes (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) baseando-se na composição das regiões constantes. Um anticorpo que é "específico" para um dado antígeno indica que as regiões variáveis do anticorpo reconhecem e se ligam a um antígeno específico exclusivamente. Anticorpos podem ser uma mistura policlonal ou monoclonal. Anticorpos podem ser imunoglobulinas intactas derivadas de fontes naturais ou de fontes recombinantes, ou podem ser porções imunorreativas de imunoglobulinas intactas. Anticorpos podem existir numa variedade de formas incluindo, por exemplo, como Fv, Fab', F(ab')₂, assim como em cadeias individuais.

"Antígeno" ou "imunógeno" se refere a uma molécula que contém um ou mais epítopos (linear, conformacional ou ambos) que na exposição a um indivíduo irão induzir uma resposta imune que é específica para aquele antígeno. Um epítipo é o sítio específico do antígeno o qual se liga a um receptor de células T ou anticorpo específico, e tipicamente compreende cerca de 3 resíduos de aminoácidos até cerca de 20 resíduos de aminoácidos. O termo antígeno se refere a subunidades antígeno - antígeno separadas e discretas de um organismo como um todo com as quais o antígeno está associado na natureza - assim como bactérias, vírus, fungos, parasitas ou outros micróbios mortos, atenuados ou inativados. O termo antígeno também se refere a anticorpos, tais como anticorpos antiidiotipo ou fragmentos seus, e a mimótopos de peptídeo sintético que podem mimetizar um antígeno ou determinante antigênico (epítipo). O termo antígeno também se re-

fere a um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo que expressa um antígeno ou determinante antigênico *in vivo*, tal como em aplicações de imunização de DNA.

5 "Antigenicidade" se refere à capacidade de uma proteína ou polipeptídeo de ser imunoespecificamente ligado por um anticorpo promovido contra a proteína ou polipeptídeo.

"Canino" inclui o qual é comumente chamado de cachorro, mas inclui outros membros da família *Canidae*.

10 "Resposta imune celular" - ver Resposta Imune.

"Animal de companhia", conforme aqui utilizado, se refere a qualquer animal não-humano em cativeiro considerado como sendo um animal de estimação. Esses podem incluir, mas não estão restritos, a cachorros, gatos, cavalos, ovelhas, 15 coelhos, macacos e roedores, incluindo camundongos, ratos, hâmsers, gerbos e furões.

"Equino" inclui o que é comumente chamado de cavalo, mas inclui outros membros da família *Equidae*.

20 "Excipiente" se refere a qualquer componente de uma vacina que não é um antígeno.

"Primeira vacina", "segunda vacina", "terceira vacina" e semelhantes de referem a vacinas separadamente administráveis, as quais podem ser a mesma ou diferentes, e as quais em geral podem ser administradas em qualquer ordem. 25 Dessa forma, uma terceira vacina pode ser administrada a um indivíduo antes ou depois de uma segunda vacina.

"Heterólogo", quando usado aqui, significa derivado de um diferente vírus, espécie ou variedade.

"Homologia", "homólogo" e semelhantes, quando aqui utilizados, significa o grau de identidade compartilhado entre seqüências de polinucleotídeo e de polipeptídeo.

"Homólogo", quando usado em referência a um vírus,
5 espécie significa a mesma espécie ou variedade viral.

"Célula hospedeira", quando usada aqui, significa uma bactéria ou célula eucariótica, incluindo de mamífero, ave ou inseto que abrigue um plasmídeo, vírus ou outro vetor.

10 "Resposta imune humoral" - ver Resposta Imune.

"Hibridoma" - ver Anticorpo Monoclonal

"Resposta imune" num indivíduo se refere ao desenvolvimento de uma resposta imune humoral, de uma resposta imune celular ou de uma resposta imune humoral e celular para um antígeno. Uma "resposta imune humoral" se refere a uma
15 que é mediada por anticorpos. Uma "reposta imune celular" é uma mediada por linfócitos T ou outros linfócitos ou ambos, e inclui a produção de citocinas, quimiocinas e moléculas similares produzidas por células T ativadas, linfócitos ou
20 ambos. Respostas imunes podem ser determinadas usando imunoenaios padrões e ensaios de neutralização, os quais são conhecidos na técnica.

"Imunogenicidade" se refere à capacidade de uma proteína ou polipeptídeo de eliciar uma resposta imune dire-
25 cionada especificamente contra uma bactéria ou vírus que causa a doença identificada.

"Quantidade imunologicamente protetora" ou "quantidade eficaz para produzir uma resposta imune" de um anti-

geno é uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imunogênica no receptor que seja adequada para prevenir ou melhorar sinais ou sintomas da doença, incluindo efeitos de saúde adversos ou suas complicações. Seja a imunidade humoral ou a mediada por células ou ambas podem ser induzidas. A resposta imunogênica de um animal a uma composição de vacina pode ser avaliada, por exemplo, indiretamente através da medição de títulos de anticorpo, de ensaios de proliferação de linfócitos, ou diretamente através de sinais de monitoramento e sintomas depois do desafio com a variedade do tipo selvagem. A imunidade protetora conferida por uma vacina pode ser avaliada pela medição, por exemplo, redução em sinais clínicos tais como mortalidade, morbidez, número de temperatura e condição física geral e saúde geral e desempenho do indivíduo. A resposta imune pode compreender, sem limitação, a indução de imunidade celular e/ou humoral. A quantidade de uma vacina que é terapêuticamente eficaz pode variar dependendo do vírus particular usado, ou da condição do animal sendo vacinado, e pode ser determinada por um clínico veterinário.

Administração "intranasal" se refere à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através ou por meio do nariz e envolve o transporte da substância primariamente através da mucosa nasal.

"Isolado", quando usado aqui, significa removido de seu ambiente de ocorrência natural, seja sozinho ou numa célula hospedeira heteróloga, ou cromossomo ou vetor (por exemplo, plasmídeo, fago, etc.). "Bactéria isolada", "bacté-

ria anaeróbica isolada", "variedade bacteriana isolada", "vírus isolado", "variedade viral isolada" e semelhantes se refere a uma composição na qual a bactéria ou vírus são substancialmente livres de outros microrganismos, por exemplo, numa cultura, de forma que quando separado de seu ambiente de ocorrência natural. "Isolado", quando usado para descrever qualquer substância particularmente definida, tal como um polinucleotídeo ou um polipeptídeo, se refere à substância que é separada do ambiente celular original no qual a substância, tal como um polipeptídeo ou ácido nucléico, é normalmente encontrada. Conforme usada aqui então, somente a título de exemplo, uma linhagem celular recombinante construída com um polinucleotídeo da invenção faz uso do ácido nucléico "isolado". Alternativamente, se uma proteína particular ou um fragmento imunogênico específico é reivindicado ou usado como uma vacina, poderia ser considerado ser isolado porque ele foi identificado, separado e, até alguma extensão, purificado em comparação com como ele pode existir na natureza. Se a proteína ou um fragmento imunogênico específico seu é produzido num vetor de expressão eucariótico ou bacteriano recombinante que produz o antígeno, ela é considerada como existindo como uma proteína ou ácido nucléico isolado. Exemplo, uma linhagem celular recombinante construída com um polinucleotídeo faz uso de um ácido nucléico "isolado".

"Adjuvante metabolizável" - Adjuvantes consistindo de componentes que são capazes de serem metabolizados pelas espécies alvo, tais como adjuvantes baseados em óleo. Um ad-

juvante metabolizável pode ser um óleo metabolizável. Óleos metabolizáveis são gorduras e óleos que ocorrem tipicamente em plantas e animais e geralmente consistem amplamente de misturas de triacilgliceróis, também conhecidas como triglicerídeos ou gorduras neutras. Essas substâncias não-polares insolúveis em água são triésteres do ácido graxo do glicerol. Triacilgliceróis diferem de acordo com a identidade e colocação de seus três resíduos de ácido graxo. Comparar com "adjuvante não-metabolizável".

10 "Adjuvante não-metabolizável" - Adjuvantes consistindo de componentes que não podem ser metabolizados pelo corpo do indivíduo animal ao qual a emulsão é administrada. Óleos não-metabolizáveis adequados para uso nas emulsões da presente invenção incluem alcanos, alquenos, alquinos e seus correspondentes ácidos e alcoóis, os seus éteres e ésteres e suas misturas. Preferivelmente, os compostos individuais do óleo são compostos de hidrocarboneto leves, isto é, tais componentes tem de 6 a 30 átomos de carbono. O óleo pode ser sinteticamente preparado ou purificado a partir de produtos de petróleo. Óleos não-metabolizáveis preferidos para uso nas emulsões da presente invenção incluem óleo mineral, óleo de parafina e cicloparafinas, por exemplo. O termo "óleo mineral" se refere a um óleo adjuvante não-metabolizável que é uma mistura de hidrocarbonetos líquidos obtidos de petrolato através de uma técnica de destilação. O termo é sinônimo com "parafina liquefeita", "petrolato líquido" e "óleo mineral branco". O termo é também tencionado para incluir "óleo mineral leve", isto é, óleo o qual é similarmente obtido por

destilação do petrolato, mas o qual tem uma gravidade específica levemente mais baixa do que o óleo mineral branco. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1990, nas páginas 788 e 1323). Óleo mineral pode ser obtido a partir de várias fontes comerciais, por exemplo, J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). Óleo mineral preferido é o óleo mineral leve comercialmente disponível sob o nome DRAKEOL®.

10 "Anticorpo monoclonal" se refere aos anticorpos produzidos numa linhagem individual de células de hibridoma, todas direcionadas para um epítopo ou um antígeno particular. O antígeno usado para fazer o anticorpo monoclonal pode ser fornecido como uma proteína isolada do patógeno ou o patógeno inteiro. Um "hibridoma" é uma linhagem celular clonal que consiste de células híbridas formadas pela fusão de uma célula de mieloma e de uma célula produtora de anticorpos específica. Em geral, anticorpos monoclonais são de origem de camundongo; entretanto, anticorpo monoclonal também se refere a uma população clonal de um anticorpo feito contra um epítopo particular de um antígeno produzido por uma tecnologia de exibição de fago ou método que seja equivalente com a exibição de fago ou células híbridas de origem que não seja de camundongo.

25 "N-dias" ou "M-dias" após um evento se refere, respectivamente, a qualquer tempo no N° ou M° dia depois do evento. Por exemplo, a vacinação de um indivíduo com uma segunda vacina 14 dias após a administração de uma primeira

vacina significa que a segunda vacina é administrada em qualquer momento no 14º dia depois da primeira vacina.

"ORF" indica "estrutura de leitura aberta", isto é, a região codificadora de um gene.

5 Administração "oral" ou "peroral" se refere à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através ou por meio da boca e envolve a deglutição ou transporte através da mucosa oral (por exemplo, absorção sublingual ou bucal) ou ambas. Intra-traqueal é tam-
10 bém uma administração oral ou peroral.

 Administração "oronasal" se refere à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através ou por meio do nariz e da boca, conforme poderia ocorrer, por exemplo, pela colocação de uma ou mais gotas no nariz. Administração oronasal envolve o transporte dos processos associados com a administração oral e intranasal.
15

 "Administração parenteral" se refere à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através ou por meio de uma via que não inclui o trato digestivo. Administração parenteral inclui administração subcutânea, administração intramuscular, administração transcutânea, administração intradérmica administração peritoneal, administração intra-ocular e administração intravenosa. Para os propósitos dessa descoberta, a administração parenteral exclui as vias de administração que primariamente envolvem o transporte da substância através do tecido da mucosa na boca, nariz, traquéia e pulmões.
20
25

"Farmaceuticamente aceitável" se refere às substâncias, as quais estão dentro do escopo do perfeito julgamento médico, adequadas para o uso em contato com os tecidos dos indivíduos sem toxicidade inadequada, irritação, resposta alérgica e semelhantes, comensuradas com uma proporção de benefício-para-risco razoável, e eficaz para os seus usos tencionados.

"Veículo farmaceuticamente aceitável" se refere a um meio carreador que não interfere com a eficácia da atividade biológica do ingrediente ativo e não é tóxico ao indivíduo ao qual ele é administrado.

"Anticorpo policlonal" se refere a uma população misturada de anticorpos feitos contra um patógeno ou antígeno particular. Em geral, a população contém uma variedade de grupos de anticorpo, cada grupo direcionado para um epítipo particular do patógeno ou antígeno. Para fazer anticorpos policlonais, o patógeno inteiro ou um antígeno isolado é introduzido por inoculação ou infecção num hospedeiro que inclui o hospedeiro para fazer anticorpos contra o patógeno ou antígeno.

"Prevenindo infecção" significa prevenir ou inibir a replicação da bactéria ou vírus o qual causa a doença identificada, para inibir a transmissão da bactéria ou vírus, ou para prevenir a bactéria ou vírus de se estabelecer no seu hospedeiro, ou para aliviar os sintomas da doença causada pela infecção. O tratamento é considerado terapêutico se ele for uma redução na carga bacteriana ou viral.

"Proteção", "protegendo" e semelhantes, conforme

aqui utilizado em relação a uma vacina, significa que a vacina previne ou reduz os sintomas da doença causada por um organismo a partir do qual o(s) antígeno(s) usado(s) na vacina é/são derivados. Os termos "proteção" e "protegendo" e
5 semelhantes também significam que a vacina pode ser usada para "tratar" a doença ou um ou mais sintomas da doença que já existe num indivíduo.

Administração "respiratória" se refere à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um
10 indivíduo através ou por meio da inalação de uma substância nebulizada (atomizada). Na administração respiratória, o mecanismo de transporte primário envolve a absorção da substância atomizada através da mucosa na traquéia, brônquio e pulmões e é, conseqüentemente, diferente da administração
15 intranasal ou peroral.

"Específico para", quando usado para descrever anticorpos da invenção, indica que as regiões variáveis dos anticorpos da invenção reconhecem e se ligam exclusivamente a uma variedade H3N8 específica (isto é, são capazes de distinguir uma proteína H3N8 particular de outras proteínas conhecidas em virtude de diferenças mensuráveis na afinidade de ligação, independentemente da existência de identidade de seqüência, homologia ou similaridade localizada entre as proteínas H3N8 e tais polipeptídeos). Será entendido que anticorpos específicos também podem interagir com outras proteínas (ou outros anticorpos nas técnicas de ELISA) através de interações com seqüências fora da região variável dos anticorpos e, particularmente, na região constante da molécula

la. Ensaaios de varredura para determinar a especificidade de ligação de um anticorpo da invenção são bem conhecidos e rotineiramente praticados na técnica. Para uma discussão compreensiva de tais ensaios, ver Harlow et al. (Eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), capítulo 6. Anticorpos da invenção podem ser produzidos usando qualquer método bem conhecido e rotineiramente praticado na técnica.

“Vacina de subunidade” se refere a um tipo de vacina que inclui um ou mais antígenos, mas não todos os antígenos, os quais são derivados de ou homólogos a antígenos de um patógeno de interesse, tal como um vírus, bactéria, parasita ou fungo. Tal composição é substancialmente livre de células de patógenos intactas ou partículas patogênicas, ou o lisato de tais células ou partículas. Dessa forma, uma vacina de subunidade pode ser preparada a partir de polipeptídeos imunogênicos pelo menos parcialmente purificados ou substancialmente purificados do patógeno ou de seus análogos. Métodos para obter um antígeno ou antígenos na vacina de subunidade incluem técnicas de purificação padronizadas, produção recombinante ou síntese química. Uma “vacina de subunidade” se refere, dessa forma, a uma vacina consistindo de um componente ou de componentes antigênicos definidos de um imunógeno viral, bacteriano ou outro completo.

“Fragmento imunogênico específico” se entende uma porção de uma seqüência que é reconhecível por um anticorpo que é específico para a seqüência.

“Indivíduo” se refere a qualquer animal com um

sistema imune, o qual inclui mamíferos tais como cachorros.

"TCID₅₀" se refere a "dose infecciosa de cultura de tecido" e é definida como aquela diluição de um vírus requeira para infectar 50% de um dado lote de culturas de células inoculadas. Vários métodos podem ser usados para calcular TCID₅₀, incluindo o método de Spearman-Kärber o qual é utilizado por toda essa especificação. Para uma descrição do método de Spearman-Kärber, ver B. W. Mahy & H. O. Kangro, Virology Methods Manual 25-46 (1996).

10 "Agente terapêutico" se refere a qualquer molécula, composto, vírus ou tratamento, preferivelmente um vírus atenuado ou morto, ou subunidade ou composto que ajuda no tratamento de uma infecção viral ou de uma doença ou condição causada por meio disso.

15 "Quantidade terapêuticamente eficaz", no contexto dessa descoberta, se refere a uma quantidade de um antígeno ou vacina que poderia induzir uma resposta imune num indivíduo (por exemplo, cachorro) recebendo o antígeno ou vacina o qual é adequado para prevenir ou melhorar os sinais ou sintomas da doença, incluindo efeitos de saúde adversos ou suas complicações, causadas por infecção com um patógeno, tal como um vírus (por exemplo, H3N8), bactéria, parasita ou fungo. Imunidade humoral ou imunidade mediada por célula ou tanto a imunidade humoral quanto a imunidade mediada por célula
20
25
lula pode ser induzida. A resposta imunogênica de um animal em relação a uma vacina pode ser avaliada, por exemplo, indiretamente através da medição de títulos de anticorpo, de ensaios de proliferação de linfócitos ou diretamente através

do monitoramento de sinais e sintomas depois do desafio com a variedade de tipo selvagem. A imunidade protetora conferida por uma vacina pode ser avaliada pela medição, por exemplo, redução nos sinais clínicos tais como mortalidade, morbidez , número de temperatura e condição física global e saúde global e desempenho do indivíduo. A quantidade de uma vacina que é terapêuticamente eficaz pode variar dependendo do vírus particular usado, ou da condição do indivíduo, e pode ser determinada por uma pessoa versada na técnica.

10 "Transmitido" significa um vírus que é capaz de ser passado de um primeiro animal (cachorro) para um segundo animal (cachorro) onde o segundo cachorro demonstra a soro conversão do vírus transmitido.

15 "Tratar" se refere à reversão, alívio, inibição do progresso de ou prevenção de um distúrbio, condição ou doença para o qual tal termo se aplica, ou à prevenção de um ou mais sintomas de tal distúrbio, condição ou doença.

 "Tratamento" se refere ao ato de "tratar" conforme definido imediatamente acima.

20 "Vacina" se refere a uma composição imunogênica selecionada de um vírus, seja vivo modificado, atenuado ou morto, ou a uma vacina de subunidade, ou a qualquer combinação do anteriormente mencionado. Administração da vacina para o indivíduo resulta numa resposta imune. A vacina pode
25 ser introduzida diretamente no indivíduo por qualquer via conhecida de administração, incluindo parentalmente, peroralmente ou semelhante.

PARTE 1. ANTÍGENOS E VARIEDADES DE VÍRUS, SUAS

PRODUÇÕES, MANUFATURAS, FORMULAÇÕES EM E ADMINISTRAÇÃO DE
VACINAS

Um aspecto da presente invenção proporciona vacinas que usam os seguintes antígenos para provocar uma res-
5 posta imune.

Antígeno(s) útil/úteis da invenção. Os antígenos dessa invenção pode ser qualquer variedade de vírus influenza identificada, de qualquer pássaro ou mamífero, incluindo mas sem se limitar a vírus influenza com o subtipo de hema-
10 glutinina H3 e o subtipo de neuraminidase N8, ou o subtipo H3N8 ou mais comumente referido como um vírus H3N8. O influenza pode ser de qualquer origem de mamífero ou de ave incluindo, mas sem se limitar, a origem suína, eqüina ou canina. Antígenos de influenza eqüino e canino são preferidos.
15 Variedades com as glicoproteínas de subtipo designadas H3 ou H8 e, mais preferivelmente, variedades tanto com H3 quanto com H8.

As variedades e variantes e mutantes e variantes suas também são preferidas conforme descrito em Transmission
20 of Equine Influenza to Dogs (P.C. Crawford et al, Science 310, 482 - 485 (2005)). A HA viral é uma determinante crítica da especificidade das espécies hospedeiras do vírus influenza.

Os antígenos de influenza dessa invenção podem ser
25 isolados de cachorros, cavalos, porcos e aves, tanto domésticas quanto selvagens. Os animais escolhidos para a coleta de amostra devem apresentar síndromes clínicas agudas e/ou sub-agudas as quais podem incluir sintomas respiratórios de

brados a severos e febre. Animais também podem exibir sinais de anorexia e letargia. métodos de isolamento de vírus são bem conhecidos pelas pessoas versadas na técnica incluindo: inoculação das culturas de células de mamíferos ou de aves, 5 ovos embrionados com amostras de mucos nasal ou da faringe de espécies clínicas, coleção por "swabbing" da passagem nasal ou garganta ou pela coletânea de tecidos tais como: baço, pulmão, amígdala e fígado e lavagem interna do pulmão. O efeito citopático do vírus pode ser observado na cultura ce- 10 lular, e o fluido alantóico ou os lisatos celulares podem ser testados quanto à sua capacidade de aglutinar hemácias humanas, de galo, peru ou porquinhos-da-índia, evidência presumível para a presença de um vírus influenza.

Nomenclatura de cepas virais e de possíveis antígenos. Variedades de vírus influenza do tipo A são subdivi- 15 didas em subtipos baseando-se nas características antigênicas de suas glicoproteínas na superfície do virion. Essas glicoproteínas virais são hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Tipicamente, o subtipo HA é nomeado primeiro e o NA em 20 segundo, dessa forma, H3N8 se refere a um vírus com o subtipo de hemaglutinina 3 e o subtipo de neuraminidase 8. O subtipo é baseado na análise sorológica da HA e da NA. Usando os procedimentos aqui revelados, uma vacina para qualquer um desses subtipos pode ser feita. Atualmente, existem 16 sub- 25 tipos de HA identificados e 9 subtipos de NA identificados. Pode haver mais no tipo selvagem que ainda não tenham sido descritos. Especificamente, os subtipos identificados incluem H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13,

H14, H15 e H16 e N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 e N9. Todas essas combinações de subtipos, e qualquer combinação desses e qualquer subtipo e combinação de subtipos futuros que serão identificados no futuro usando os procedimentos descritos acima ou procedimentos substancialmente similares são por meio disto descritos e reivindicados como antígenos úteis dessa invenção. Todas as outras combinações de subtipos de HA e de NA são reveladas. Isso inclui, mas não está limitado, aos subtipos H3N8 e H7N7.

10 A hemaglutinina de vírus influenza (HA) é a glicoproteína da superfície do virion que liga o vírus aos seus receptores nas células hospedeiras e funde o envelope viral com as membranas das vesículas endocíticas para iniciar o processo infeccioso. Ela é também o componente do virion mais importante na estimulação e formação dos anticorpos protetores. A seqüência de aminoácidos da HA e, dessa forma, o local dos seus sítios de N-glicosilação é determinada pelo genoma viral.

20 O genoma de RNA de filamento negativo, segmentado do vírus influenza é replicado por uma RNA polimerase dependente de RNA a qual não tem uma função de revisão eficaz, levando a uma alta taxa de erros de transcrição que podem resultar em substituições de aminoácidos na superfície das glicoproteínas de HA e NA. Uma das conseqüências dessa alta freqüência de mutação é que as populações virais contêm mutantes que diferem da maioria na quantidade e posição das glicanas N-ligadas na HA. As estruturas desses oligossacarídeos podem ser determinadas por suas posições na HA e pelo

arranjo de enzimas biossintéticas e de limpeza fornecidas pela célula hospedeira no qual o vírus cresce. Dessa forma, a plasticidade do genoma viral e a maquinaria de glicosilação especificada pelo hospedeiro podem, juntas, criar populações virais que são mais heterogêneas na estrutura e função do que poderia ser desenvolvido por qualquer processo individualmente. Essa diversidade é considerada como sendo responsável pela sobrevivência desses vírus numa variedade de nichos biológicos e para a sua capacidade de superar os efeitos inibitórios de neutralização de anticorpos e de agentes antivirais. Mutações no genoma viral de várias cepas foram identificadas e aquelas variedades modificadas também são aqui reivindicadas. Por exemplo, alguns desses mutantes são descritos em *Transmission of Equine Influenza to Dogs* (P.C. Crawford et al., *Science* 310, 482-485 (2005) aqui incorporado por referência.

Essa invenção também revela uma vacina feita de uma variedade específica coletada e identificada como Variedade de Influenza de Equino A/Equino/2/Miami/1/63. Essa variedade é depositada na American Type Culture Collection, 10801, Universidade Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 como ATCC VR 317. Essa variedade foi originalmente isolada a partir de lavagens nasais de um cavalo doente em Miami em 1963. O vírus foi passado 5 vezes em embriões de galinha. O vírus foi depois classificado como H3N8.

Outro exemplo de um vírus influenza H3N8 norte-americano derivado de um cavalo é A/Equino/Kentucky/1998. Exemplos adicionais de derivados de H3N8 de um cavalo são

A/Equino/Kentucky/15/2002, A/Equino/Ohio/1/2003,
A/Equino/Kentucky/1/1994, A/Equino/Massachusetts/213/2003,
A/Equino/Wisconsin/2003 e A/Equino/Newmarket/A2/1993.

Essa invenção também revela uma vacina feita de
5 uma variedade específica coletada e identificada como uma
variedade de Influenza Canina A/canino/Iowa/13628/2005 e a
variedade A/canino/Iowa/9A1/B5/08/D12. A última variedade,
variedade A/canino/Iowa/9A1/B5/08/D12, foi depositada como
UC 25508, em 29 de junho de 2006, na American Type Culture
10 Collection, 10801, Universidade Boulevard, Manassas, VA
20110-2209, o número de acesso ATCC sendo PTA-7694. O vírus
é adicionalmente classificado como H3N8.

Além das variedades acima nós revelamos uma varie-
dade obtida da seguinte forma. Identificar um cachorro ou
15 grupo de cachorros exibindo sinais clínicos de doença respi-
ratória, obter amostras de secreções orais ou nasais ou a-
mostras derivadas de tecido respiratório ou de tecido de ór-
gão interno de cachorros, ensaiar as amostras e identificar
a presença de um vírus influenza H3N8. Usando os procedimen-
20 tos aqui descritos, isolar, purificar, cultivar, crescer,
produzir, concentrar esse antígeno de vírus e identificar
como vírus de influenza canino da Pfizer. Adaptar a e passar
ou em ovos embrionados ou em células caninas ou ambos, iden-
tificar como Master Seed, vírus H3N8 de influenza canina. Um
25 vírus de influenza H3N8 derivado de canino é preferido. um
H3N8 derivado de equino ou suíno pode também ser usado, as-
sim como um vírus influenza do subtipo H3 ou N8. Nós revela-
mos uma variedade obtida da seguinte forma. Infectar um ca-

chorro ou grupo de cachorros com H3N8 de influenza eqüino. De cachorros exibindo os sinais clínicos ou subclínicos de doença respiratória, obter amostras de secreções orais e nasais, ou amostras derivadas de tecido respiratório ou de lavagem interna pulmonar ou de tecido de órgão interno dos cachorros, ensaiar as amostras e identificar a presença de um vírus influenza H3N8. Ao usar os procedimentos aqui descritos, isolar, purificar, cultivar, crescer, produzir, concentrar esse antígeno de vírus e identificar como vírus de influenza canino. Adaptar a e passar ou em ovos embrionados ou em células caninas ou ambos, identificar como Master Seed, vírus H3N8 de influenza canina. Um vírus de influenza H3N8 derivado de canino é preferido. um H3N8 derivado de eqüino ou suíno pode também ser usado, assim como um vírus influenza do subtipo H3 ou N8. O vírus H3N8 derivado de suíno é tratado da mesma forma que o vírus derivado de eqüino ou canino que é completamente aqui descrito.

PARTE 2. DESCRIÇÕES DETALHADAS DA PRODUÇÃO, MANUFATURA, FORMULAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE VACINAS PRODUZIDAS DOS ANTÍGENOS DA PARTE 1.

Parte 2a) Discussão. Os antígenos de vírus da Parte 1 podem ser feitos em composições úteis de matéria compreendendo o antígeno viral modificado para reduzir a sua virulência e formulado numa formulação útil ou formulação de vacina. As seguintes descrições proporcionam detalhes para a produção, manufatura, formulação e administração de vacinas úteis para a prevenção ou tratamento de sinais clínicos associados co a infecção por vírus influenza em cachorros, o

na prevenção de doença em cachorros por um vírus de influenza canino ou eqüino. A infecção por influenza canina a ser tratada pode ser causada por vírus de influenza eqüino ou ela pode ser um novo influenza canino modificado derivado de um vírus influenza de eqüino. Os tratamentos descritos aqui podem agir como um adjuvante na prevenção do espalhamento do vírus influenza canino ou eqüino na doença canina.

São aqui descritos métodos e materiais para tratar e imunizar animais com uma vacina e, particularmente, cachorro contra vírus de influenza canina e eqüina. O método inclui a administração ao cachorro de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma primeira, de uma segunda e/ou de uma terceira vacina que seja capaz de induzir uma resposta imune, e particularmente no cachorro contra os vírus de influenza H3N8. A vacina da presente invenção é geralmente tencionada para ser um tratamento profilático o qual imuniza cachorros contra a doença causada por variedades virulentas de vírus influenza eqüinos ou caninos.

Aqui, nós revelamos vacinas que proporcionam imunidade ativa e/ou passiva. Ou a vacina inteira, ou fragmentos imunogênicos específicos de suas proteínas poderiam ser esperados como sendo eficazes quando dada como um tratamento terapêutico contra vírus de influenza eqüina ou canina. Dessa forma, a imunidade que é fornecida pela presente invenção pode ser ou imunidade ativa ou passiva, e o uso tencionado da vacina pode ser ou profilático ou terapêutico. Numa modalidade preferida, a vacina ainda inclui uma vacina para imunizar um cachorro contra qualquer forma de vírus de influen-

za canina ou eqüina.

Parte 2b) Produção de vacina e concentração de antígeno. A vacina descrita nessa seção pode ser produzida pelo crescimento do vírus selecionado nas células. A produção do vírus é preferida em cultura de células de mamíferos eqüinos ou caninos. O crescimento de vírus (antígeno) ou a produção em ovos também é preferido. As linhagens de células de rim de cachorro são preferidas. A propagação viral pode também ser efetuada em qualquer meio útil e em linhagens celulares permissivas, as quais podem ser derivadas de linhagens celulares de aves ou mamíferos derivadas de linhagens celulares de felinos, eqüinos, bovinos ou suínos. As vacinas tipicamente contêm TCID₅₀ entre 10³ e 10⁹, níveis de vírus antes da inativação. Alternativamente, o conteúdo de antígeno na preparação do vírus poderia ser avaliado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI), pelo ensaio da hemaglutinação ou difusão radial individual e ao usar esse ensaio uma pessoa poderia preferir uma vacina com um título entre 10 a 10.000 unidades de HA/mL, mais tipicamente entre 100 a 2000 unidades de HA/mL, e freqüentemente entre 100 a 1000 unidades de HA/mL como a quantidade administrada por dose.

Crescimento viral: linhagens celulares e ovos embrionados. A linhagem celular preferida para a propagação do vírus influenza é o rim canino (DK). Outras linhagens celulares podem ser utilizadas, as quais incluem o rim eqüino primário e imortalizado (EK), a derme eqüina (ED), testículo de suíno (ST), rim de suíno (PK), rim de bovino (BK), rim de

felino (FK), Vero e fibroblastos de embrião de galinha imortalizados e primários (CEF). O sistema de cultura celular preferido para crescer o vírus influenza é uma cultura de monocamada aderente tradicional. Alternativamente, a suspensão e os sistemas de cultura de células microcarreadores também podem ser utilizados. Um microcarreador preferido é formado por contas microcarreadoras Cytodex 3 (Amersham Biosciences Ltd.). Outros exemplos de microcarreadores incluem contas compostas de vidro, silicone e dextrana, DEAE, colágeno, dextrana e gelatina.

O recipiente preferido para cultivar linhagens celulares e a propagação do vírus influenza é a garrafa em cilindro, a área superficial da garrafa em cilindro preferida é de 1760 cm², mas pode variar de 490 - 4250 cm². Alternativamente, outros formatos de cultura de células úteis incluem frascos (150 cm² - 420 cm²), módulos empilhados (21.000 cm² - 340.000 cm²) e tanques de agitação (1,0 L - 900 L). A multiplicidade preferida de infecção (MOI) é de 0,001 a 0,1, mas pode variar de 0,0001 a 2,0. A janela preferida para coletar vírus da cultura celular é do dia 2 até o dia 5 após a infecção, mas pode variar do dia 1 até o dia 7 após a infecção.

A propagação do vírus também pode ser efetuada pela inoculação dos ovos embrionados. Tipicamente ovos embrionados de 0 a 12 dias de idade são usados para a propagação de vírus. Preferivelmente, ovos embrionados de 7 a 8 dias de idade são usados para o crescimento viral. O vírus é inoculado na cavidade amniótica do ovo. O vírus se replica nas

células da membrana amniótica e grandes quantidades são liberadas de volta para dentro do fluido amniótico. Depois de 2 a 3 dias após a inoculação, o vírus no fluido amniótico pode ser coletado.

5 Meio de cultura celular: Formulações de meio de cultura celular preferidas para propagar vírus influenza incluem, mas não estão limitadas, aos seguintes: meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM), Meio Eagle Modificado Basal, Meio Optimum e Leibovitz-15 (L-15). Tipicamente, o meio de
10 cultura é suplementado com 0,1 a 10 unidades de tripsina. Alternativamente, equivalentes derivados vegetais de tripsina (por exemplo, Accutase) variando de 2 - 100 unidades podem também ser usados em cultura celular para a propagação eficiente do vírus. Meio de cultura celular pode ser usado
15 na ausência ou presença de componentes derivados de animais. Um exemplo de suplementação com um componente derivado animal é o soro irradiado com gama variando de 0,5 - 10% da concentração final.

20 Parte 2c) Preparação da vacina inativa ou morta, subunidade e atenuada, viva modificada.

 Inativa ou morta. Numa modalidade da presente invenção, a vacina compreende uma vacina de vírus influenza H3N8 inativada ou morta compreendendo uma variedade eqüina ou canina H3N8 selecionada de qualquer variedade de influenza infecciosa eqüina ou canina. Ver Transmission of Equine
25 Influenza to Dogs (P.C. Crawford et al., Science 310, 482-485 (2005)). A vacina pode também ser compreendida de H3N8 de influenza derivada de suíno ou qualquer influenza do subtipo

H3 ou N8. A vacina inativada pode ser feita por métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, uma vez que o vírus é propagado até altos títulos, poderia ser prontamente aparente para aqueles indivíduos versados na técnica que a massa antigênica viral poderia ser obtida por métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a massa antigênica viral pode ser obtida por diluição, concentração ou extração. Todos esses métodos tem sido empregados para obter a massa antigênica viral apropriada para produzir vacinas. O vírus pode ser inativado por tratamento com formalina (por exemplo, 0,1 - 10%), beta-propiolactona (BPL) (por exemplo, 0,01 - 10%) ou com etilenimina binária (BEI) (por exemplo, 1 - 10 mM) a qual é preferida aqui, ou usando outros métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. Condições e agentes comumente usados são sugeridos, porém outros agentes e concentrações devem ser aparentes para uma pessoa versada na técnica.

Além da produção de vírus mortos detalhada acima, várias formas de atenuação são também possíveis e são bem conhecidas e descritas na técnica e aqui aplicáveis. Atenuação levando a vacinas vivas modificadas também é possível. Algumas dessas técnicas são descritas aqui e abaixo. Dentre as formas mais preferidas de atenuação estão a passagem contínua numa cultura celular, a passagem contínua em animais, os vários métodos para gerar modificações genéticas e mutagênese química ou por ultravioleta.

Vacinas de subunidade. Além disso, vacinas de subunidade de influenza eqüino ou canino podem ser produzidas

por técnicas de expressão recombinante as quais incluem, mas não estão limitadas, a expressão procariótica heteróloga (por exemplo, *E.coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* etc.) e expressão eucariótica heteróloga (por exemplo, levedura [5] [*Pichia*, *Yarrowia*] células de insetos [Baculovírus], etc. e vetores virais (por exemplo, adenovírus canino, adenovírus humano, poxvírus, herpesvírus canino).

Atenuada e viva modificada. Uma vacina canina de vírus atenuado é preparada de vírus influenza cultivado em 10 uma linhagem celular ou ovo, preferivelmente um influenza derivado de H3N8, que tenha sido atenuado por passagem serial incluindo a passagem serial em temperaturas sub-ótimas até um estado onde ele não seja mais capaz de causar doença, mas que ainda seja capaz de eliciar uma resposta imune protetora. 15

A atenuação de um vírus influenza pode ser alcançada pela passagem serial de uma variedade de vírus influenza do tipo selvagem em cultura celular. A variedade de vírus pode ser passada numa variedade de sistemas celulares até 20 que a sua capacidade de produzir doença seja perdida enquanto seu caráter imunogênico é completamente retido. Uma vez inoculado no hospedeiro, o vírus pode ser capaz de multiplicação até alguma extensão. Variedades virais atenuadas adequadas também podem ser obtidas por passagem em série para 25 obter uma cepa superatenuada. A "superatenuação" significa que a quantidade de passagens para atenuação tem sido substancialmente maior do que o que é normalmente necessário para a remoção da patogenicidade. O vírus atenuado retém a sua

antigenicidade depois dessas várias passagens, por exemplo, retendo tanto os seus antígenos de hemaglutinina quanto de neuraminidase, de forma que a sua capacidade imunogênica não seja prejudicada. Tais variedades não produzem praticamente
5 sintomas ou efeitos colaterais quando administradas, e dessa forma são vacinas seguras e eficazes.

A atenuação do vírus influenza pode ser alcançada através de adaptação ao frio de uma variedade de vírus influenza. As variedades de vírus influenza adaptadas ao frio
10 podem ser produzidas por métodos os quais incluem a passagem de um vírus influenza do tipo selvagem, seguido pela seleção para o vírus que cresce numa temperatura reduzida. Vírus influenza adaptados ao frio podem ser produzidos, por exemplo, pela passagem seqüencial de um vírus influenza do tipo sel-
15 vagem em ovos de galinha embrionados em temperaturas progressivamente mais baixas, selecionando dessa forma certos membros da mistura viral, os quais replicam estavelmente em temperatura reduzida. Uma variedade de vírus influenza adaptado ao frio pode exibir um fenótipo sensível à temperatura.
20 Um vírus influenza adaptado ao frio sensível à temperatura se replica em temperaturas reduzidas, mas não se replica mais ou forma placas em células de cultura de tecido em certas temperaturas de crescimento mais elevadas nas quais o vírus do tipo selvagem irá se replicar e formar placas. Uma
25 temperatura na qual um vírus sensível à temperatura irá crescer é referida aqui como uma temperatura "permissiva" para aquele vírus sensível à temperatura, e uma temperatura mais elevada na qual o vírus sensível à temperatura não irá

crescer, mas na qual um vírus do tipo selvagem correspondente irá crescer, e referida aqui como temperatura "não-permissiva" para aquele vírus sensível à temperatura. Por exemplo, certos vírus de influenza adaptados ao frio sensíveis à temperatura se replicam em ovos de galinha embrionados numa temperatura de ou abaixo de 30 °C, e irão formar placas nas células de cultura de tecidos numa temperatura permissiva de cerca de 34 °C, mas não irão formar placas em células de cultura de tecido em temperatura não-permissiva de cerca de 37 °C. Certos vírus de influenza adaptados ao frio podem ter um fenótipo de interferência dominante. Isto é, eles dominam uma infecção quando co-infectados em células com outros vírus influenza, dificultando dessa forma o crescimento daquele outro vírus. um vírus influenza adaptado ao frio pode também ser produzido através de formas recombinantes. Nessa abordagem, uma ou mais modificações específicas, associadas com adaptação ao frio identificadas, atenuação, sensibilidade de temperatura ou fenótipos de interferência dominante são identificadas e são introduzidas de volta para uma variedade de vírus influenza do tipo selvagem usando uma abordagem genética reversa. A genética reversa requer o uso de complexos de RNA polimerase isolados de células infectadas com o vírus influenza para transcrever segmentos do genoma de vírus influenza artificiais contendo a(s) mutação/mutações, incorporando o(s) segmento(s) de RNA sintetizado(s) em partículas virais usando um vírus auxiliador (helper), e a seguir selecionando para vírus contendo as alterações desejadas.

Parte 2d) Adjuvantes de vacina, formulações, formas e veículos. Componentes de vacinas aqui apresentados irão preferivelmente incluir um ou mais adjuvantes. Adjuvantes incluem, mas não estão limitados, ao sistema adjuvante

5 RIBI (Ribi Inc.), sais de alumínio, incluindo Alum (0,5 - 20%, mais preferivelmente é menos do que 10%, mais preferivelmente são 2 e 5%), fosfato de alumínio (0,5 - 20%, mais preferivelmente é menos do que 10%, mais preferivelmente são

10 2 e 5%), hidróxido de alumínio (Alhydrogel ou Rehydrogel variando de 0,5 - 20%, mais preferivelmente é menos do que 10%, mais preferivelmente são 2 e 5%), colesterol, emulsões óleo-em-água, emulsões água-em-óleo tais como, por exemplo, adjuvantes completos e incompletos de Freund, co-polímero em

15 bloco (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adjuvante AMPHIGEN®, saponina e saponinas tais como Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) com concentrações de saponina preferidas de 10 - 100 microgramas e de cerca de 50 microgramas preferida ou outras frações de saponina,

20 nina, monofosforil-lipídeo A, adjuvante de lipídeo amina avridina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante ou de outra forma), toxina de cólera ou muramil dipeptídeo, dentre muitos outros. As composições imunogênicas podem ainda incluir um ou mais outros agentes imunomodulatórios tais

25 como, por exemplo, interleucinas, interferons ou outras citocinas. As composições imunogênicas também podem incluir gentamicina e Merthiolate.

Componentes das vacinas podem incluir excipientes

farmaceuticamente aceitáveis, incluindo veículos, solventes e diluentes, agentes isotônicos, agentes tamponantes, estabilizantes, conservantes, agentes imunomodulatórios (por exemplo, interleucinas, interferons ou outras citocinas), agentes vasoconstritores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos e semelhantes. Veículos típicos, solventes e diluentes incluem água, salina, dextrose, etanol, glicerol e semelhantes. Agentes isotônicos representativos incluem cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol, lactose e semelhantes. Estabilizantes úteis incluem gelatina, albumina e semelhantes.

Vacinas de vírus de influenza H3N8 são fornecidas em várias formas, dependendo da via de administração, dos requerimentos de estocagem e semelhantes. Por exemplo, as vacinas podem ser preparadas como soluções aquosas ou dispersões adequadas para uso em seringas, gotejadores, nebulizadores, etc. ou podem ser preparadas como pós liofilizados, os quais são reconstituídos em salina, tampão HEPES ou a fração imunogênica aquosa de uma segunda vacina de canino e semelhante, antes do uso.

A vacina para qualquer uma das modalidades da presente invenção é formulada num veículo farmaceuticamente aceitável de acordo com o modo de administração a ser usado. Uma pessoa versada na técnica pode prontamente formular uma vacina que compreende um influenza de equino ou canino vivo ou morto ou um fragmento imunogênico seu, um vírus recombinante ou vetor bacteriano codificando influenza equino ou canino, um fragmento imunogênico específico seu ou uma molé-

cula de DNA codificando influenza eqüino ou canino ou um fragmento imunogênico específico seu.

em casos onde a injeção intramuscular é preferida, uma formulação isotônica é preferida. Geralmente, aditivos para a isotonicidade podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose. Em casos particulares, soluções isotônicas tais como salina tamponada com fosfato são preferidas. As formulações podem ainda proporcionar estabilizantes tais como gelatina e albumina. Em algumas modalidades, um agente vasoconstritor é adicionado à formulação. As preparações farmacêuticas de acordo com a presente invenção são fornecidas estéreis e livres de pirogênio. Entretanto, é bem sabido pelas pessoas versadas na técnica que as formulações preferidas para o veículo farmacêuticamente aceitável o qual compreende as vacinas da presente invenção são aqueles veículos farmacêuticos aprovados nas regulações promulgadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, ou a agência governamental equivalente num país estrangeiro tal como Canadá ou México ou qualquer uma das nações européias para qualquer vacina canina, vacinas de subunidade (antígeno) de polipeptídeo, vacinas de vetor de vírus recombinante e vacinas de DNA. Conseqüentemente, o veículo farmacêuticamente aceitado para a produção comercial da vacina da presente invenção é um veículo que já está aprovado ou será aprovado pela agência governamental apropriada nos Estados Unidos da América ou país estrangeiro. A vacina pode ainda ser misturada com um adjuvante que é farmacêuticamente aceitável. Em certas formulações da vacina da presente invenção,

a vacina é combinada com outras vacinas caninas para produzir um produto de vacina polivalente que pode proteger os caninos contra uma ampla variedade de doenças causadas por outros patógenos caninos.

5 As composições da vacina opcionalmente podem incluir diluentes líquidos, semi-sólidos ou sólidos farmacêuticamente aceitáveis compatíveis com a vacina (isto é, estéreis e não-tóxicos) que servem como veículos farmacêuticos, excipientes ou meio. Diluentes podem incluir água, salina,
10 dextrose, etanol, glicerol e semelhantes. Agentes isotônicos podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose dentre outros. Estabilizantes incluem albumina, dentre outros. Qualquer adjuvante conhecido na técnica pode ser usado na composição da vacina, incluindo adjuvantes me-
15 tabilizáveis e não-metabolizáveis, adjuvantes baseados em óleo tal como o Adjuvante Completo de Freund e o Adjuvante Incompleto de Freund, adjuvantes baseados em micolato (por exemplo, trealose dimicolato), lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), peptidoglicanas (isto é, mureínas, mucopeptídeos ou
20 glicoproteínas tais como N-Opaca, muramil dipeptídeo [MDP] ou análogos de MDP), proteoglicanas (por exemplo, extraídas da *Klebsiella pneumoniae*), preparações de estreptococos (por exemplo, OK432), Biostim™ (por exemplo, 01K2), as "Isocoms" da EP 109 942, EP 180 564 e EP 231 039, hidróxido de alumí-
25 nio, saponina, DEAE-dextrana, óleos neutros (tal como miglioil), óleos vegetais (tal como óleo de araquis), lipossomas e polióis Pluronic®.

As composições imunogênicas da presente invenção

podem ser feitas em várias formas dependendo da via de administração. Por exemplo, as composições imunogênicas podem ser feitas na forma de dispersões ou soluções aquosas estéreis adequadas para uso injetável, ou feitas em formas liofilizadas usando técnicas de liofilização. Composições imunogênicas liofilizadas são tipicamente mantidas em cerca de 4 °C, e podem ser reconstituídas numa solução estabilizante, por exemplo, em salina e/ou em HEPES, com ou sem adjuvante.

Além disso, as composições imunogênicas e de vacina da presente invenção podem incluir um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis. Conforme aqui utilizado, um "veículo farmacologicamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, adjuvantes, agentes estabilizantes, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos, agentes retardadores de adsorção e semelhantes. O(s) veículo(s) devem ser "aceitáveis" no sentido de serem compatíveis com os componentes da invenção e não prejudiciais ao indivíduo a ser imunizado. Tipicamente, os veículos serão estéreis e livres de pirogênio.

Parte 2e) Ensaio e dosagens de vacina. Os tamanhos das doses de vacinas de vírus influenza H3N8 tipicamente variam em volume de cerca de 2,0 até 0,1 mL, dependendo da via de administração. As vacinas inativadas tipicamente contêm entre 10^3 e 10^9 TCID₅₀, níveis do vírus antes da inativação. Alternativamente, o conteúdo de antígeno na preparação viral poderia preferir uma vacina com um título entre 10 a 10.000 unidades de HA/mL, ele pode ter de 100 a 2.000

unidades de HA/mL e, mais preferivelmente, tem entre 100 - 1.000 unidades de HA/mL como a quantidade administrada por dose. Para vacinas contendo vírus vivos modificados ou vírus atenuados, uma dose terapeuticamente eficaz irá geralmente variar de cerca de 10^5 TCID₅₀ até cerca de 10^8 TCID₅₀, inclusive. Para vacinas contendo antígenos de subunidade, tais como proteínas de H3 ou N8 de influenza, uma dose terapeuticamente eficaz geralmente varia de cerca de 10 µg até cerca de 100 µg, inclusive. Enquanto as quantidades e concentrações dos adjuvantes e aditivos úteis no contexto da presente invenção podem ser prontamente determinadas pelo artesão habilitado, a presente invenção contempla composições compreendendo de cerca de 50 µg até cerca de 2.000 µg de adjuvante e, preferivelmente de cerca de 500 µg/2 mL de dose da composição de vacina.

Ensaio. O vírus influenza pode ser detectado por isolamento de vírus ou por antígeno viral, RNA viral ou por métodos de detecção de anticorpo específicos. métodos usados para detectar vírus ou componentes virais incluem a imunofluorescência do tecido do pulmão, células epiteliais nasais ou conteúdos de lavagem interna bronquioalveolar, imunohistoquímica das amostras de tecido, ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), reação em cadeia da polimerase (PCR), cultura de célula e imunoperoxidase, manchamento com anticorpo fluorescente para a determinação do tipo e do subtipo do vírus e um rápido teste de membrana de imunensaio de enzima. Tecidos tipicamente avaliados para o vírus influenza incluem pulmões, lavagens internas de pulmões, amígdalas, traquéia,

baço assim como soro. Anticorpos monoclonais também são disponíveis que se alvejam especificamente vários epítomos de vírus, a saber epítomos de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). O ensaio sorológico mais comum para a diagnose de influenza é o ensaio de inibição de hemaglutinina (HI). Uma de suas vantagens é que ele pode discriminar entre diferentes subtipos e variantes antigênicas num subtipo. O ensaio de HI pode ser efetuado usando soro derivado de eqüino, canino, suíno ou aves. Um método mais preciso para medir anticorpo é pela técnica de hemólise radial individual (SRH). SRH é mais sensível do que os ensaios de HI e tem um grau maior de precisão. um aumento de 50% na área da zona representa uma elevação no anticorpo e é evidência de infecção recente.

15 Parte 2f) Regulação de tempo e vias de administração. Inoculação de um cachorro é preferivelmente feita para um cachorro que é de 6 semanas e, mais preferivelmente, de 8 semanas ou mais velho. Os cachorros devem receber preferivelmente 2 dosagens, cada uma tipicamente administrada 3 a 4
20 semanas separadamente, preferivelmente 3 semanas, através de injeção subcutânea (SC) dependendo da condição do cachorro e de seu ambiente. Isso poderia ser para obter uma resposta imunogênica completa e ampla. Em outra modalidade da presente invenção, o cachorro é submetido a uma série de 3 vacinações
25 para produzir uma resposta imune ampla e completa. A revacinação anual com uma única dose é recomendada. Pode ser dado opcionalmente um impulsor para os cachorros em 3 e/ou 6 meses, caso necessário. A via preferida é a injeção subcutâ-

nea, usando cerca de 1 mL, porém as vias intramuscular (IM), usando cerca de 1 mL, ou a intradérmica (ID) usando de 0,1 a 0,3 mL, oral, oronasal e nasal, usando de 0,2 a 0,5 mL também são preferidas. Outros tempos, sítios de injeção, quantidades usadas e tipo de administração serão aparentes para
5 uma pessoa normalmente versada na técnica.

A via de administração para qualquer uma das modalidades da vacina da presente invenção inclui, mas não está limitada, a intradérmica, intramuscular, intra-ocular, intraperitoneal, intravenosa, oral, oronasal e subcutânea, assim como por inalação, supositório ou transdérmica. As vias preferidas de administração incluem a injeção intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, oronasal e subcutânea. A vacina pode ser administrada por quaisquer meios que incluam,
10 porém que não estejam limitados, a seringas, nebulizadores, "misters", dispositivos de injeção sem agulha ou armas de gene de bombardeamento de microprojéteis (bombardeamento biolístico).

PARTE 3. DESCRIÇÕES ESPECÍFICAS DA PRODUÇÃO, 20 MANUFATURA, FORMULAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DAS VACINAS SELECIONADAS

Aqui nós proporcionamos descrições específicas mais detalhadas de uma vacina monovalente morta ou inativada, para o tratamento de influenza canino.

25 Parte 3a) Vacina de influenza canino monovalente de vírus morto ou inativado

Usando qualquer um dos antígenos descritos na Parte 1 acima, incluindo o antígeno H3N8 derivado de influenza

preferido derivado de Influenza Canino ou Eqüino, incluindo culturas inativadas e adjuvantes de vírus influenza H3N8.

Vacina de influenza canino bivalente de vírus morto ou inativado

5 Usando qualquer um dos antígenos descritos na Parte 1 acima, preferivelmente um antígeno H3N8 derivado de influenza derivado de influenza canino e eqüino, culturas inativadas e com adjuvante de vírus de influenza H3N8. Enquanto o antígeno canino é derivado de um vírus de influenza canino
10 e o antígeno de eqüino é derivado de um vírus de influenza eqüino. O antígeno canino também pode consistir de dois vírus de influenza caninos ou de dois vírus de influenza eqüinos.

Vacina caninas trivalentes de vírus morto ou inativado
15

Usando qualquer um dos antígenos descritos na Parte 1 acima, porém mais preferivelmente um antígeno H3N8 derivado de influenza derivado de influenza canino ou eqüino, culturas inativadas e com adjuvante de vírus influenza H3N8.
20 As seguintes vacinas trivalentes são descritas: a) o antígeno canino A é derivado de um vírus de influenza canino e um antígeno eqüino é derivado de dois vírus de influenza eqüinos, b) um antígeno canino é derivado de dois vírus de influenza caninos e um antígeno equivalente é derivado de um
25 vírus de influenza eqüino, c) um antígeno canino é derivado de três vírus de influenza caninos e/ou um antígeno de eqüino é derivado de três vírus de influenza de eqüino. Qualquer combinação dos acima é descrita para fazer uma vacina triva-

lente.

Parte 3b) Concentração de antígeno e Produção de Vacina Morta ou Inativada.

A vacina descrita nessa seção pode ser produzida
5 pelo crescimento dos vírus selecionados nas células.

A produção do vírus é preferida em cultura de células de mamífero de equino ou canino, também preferido é o crescimento viral (antígeno) ou produção em ovos também é preferida. As linhagens de células de rim de cachorro são
10 mais preferidas. A propagação viral pode também ser efetuada em qualquer meio útil, incluindo linhagens de células permissivas, as quais podem ser derivadas de linhagens de células de felinos, de equinos, bovinas, de aves ou de suínos. As vacinas devem conter entre 10^5 e 10^8 TCID₅₀, níveis de vírus anteriores da inativação. Alternativamente, a preparação
15 do vírus poderia ser avaliada pelo teste de Inibição da Hemaglutinação (HI) ou pelo ensaio de hemaglutinação. Usando esse ensaio, uma pessoa poderia preferir uma vacina com um título entre 10 a 10.000 unidades de HA/mL, mais tipicamente
20 entre 100 a 2.000 unidades de HA/mL, e geralmente entre 100 a 1.000 unidades de HA/mL, conforme a quantidade administrada.

Crescimento do vírus morto ou inativado: linhagens celulares e ovos embrionados

25 O sistema de cultura celular preferido para crescer vírus influenza é a cultura de monocamada aderente tradicional. Alternativamente, a suspensão e sistemas de cultura de células microcarreadores também podem ser utilizados.

Um microcarreador preferido são contas de microcarreador Cytodex 3 (Amersham Biosciences Ltd.). O recipiente preferido para cultivar linhagens celulares e a propagação do vírus influenza é o formato de garrafa cilíndrica, a área de superfície da garrafa cilíndrica preferida é de 1760 cm², mas
5 pode variar de 850 - 4250 cm². A multiplicidade de infecção preferida (MOI) é de 0,001 a 0,1, mas pode variar de 0,0001 a 2,0. A coleta preferida de vírus da cultura celular é do dia 2 ao dia 5 após a infecção, mas pode variar do dia 1 até
10 o dia 7 após a infecção.

Meio de cultura celular: Formulações de meio de cultura celular preferidas para propagar o crescimento de vírus influenza incluem, mas não estão limitadas às seguintes: meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM), Meio Eagle
15 Modificado Basal, Meio Optimem e Leibovitz-15 (L-15). Tipicamente, o meio de cultura é suplementado com 0,1 a 10 unidades de tripsina.

Parte 3c) Inativação do morto ou inativado. Depois da produção os vírus podem ser mortos ou inativados com
20 qualquer método comumente usado na técnica. Um método mais preferido poderia ser a inativação dos fluidos virais com BEI, descrito abaixo. É também útil inativar os vírus contendo fluidos com formalina ou BPL.

Parte 3d) Adjuvantes de vacina morta ou inativada,
25 formulações, formas e veículos. Os antígenos da Parte 1 e, particularmente, dos vírus inativados ou mortos podem ser formulados de uma variedade de formas para produzir uma vacina útil. Uma formulação preferida é para combinar a vacina

morta com um adjuvante. Vários adjuvantes podem ser usados com as vacinas dessa invenção, várias preferidas são percebidas. A quantidade de adjuvantes tipicamente compreende de cerca de 25 µg até cerca de 1000 µg, inclusive, ou uma dose de 1 mL. Adjuvantes especialmente úteis para a Vacina de Influenza Canino são os seguintes, os quais podem ser usados em combinações, combinações preferidas percebidas: sais de alumínio, incluindo Alum (0,5 - 20%, mais preferivelmente é menos do que 10%, mais preferivelmente são 2 e 5%), fosfato de alumínio (0,5 - 20%, mais preferivelmente é menos do que 10%, mais preferivelmente são 2 e 5%), hidróxido de alumínio (Alhydrogel ou Rehydrogel variando de 0,5 - 20%, mais preferivelmente é menos do que 10%, mais preferivelmente são 2 e 5%), adjuvante AMPHIGEN®, saponinas (são preferidas as Quil A ou QS-21 ou QA-21, variando de 1 - 100 µg Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) com concentrações preferidas de saponina de 10 - 100 microgramas e de cerca de 50 microgramas preferida, colesterol ou outros polímeros sintéticos, DEAE dextrana, Squalene, etc.

Adjuvantes e combinações preferidos são: 2, 3, 4, ou 5% de Alum, qualquer combinação de Alum com QuilA, colesterol, uso de qualquer formulação e adjuvante de vacina comercial conhecido. São especialmente preferidos os Alum 2 a 5 % sozinho, Quil A sozinho e Quil A e colesterol, o qual é conhecido como "QAC". QAC pode ser usado sozinho ou juntamente com colesterol e Quil A adicional. Outros adjuvantes conhecidos também podem ser usados. Os outros componentes

das vacinas podem ser ajustados para modificar as propriedades físicas e químicas das vacinas. Por exemplo, adjuvantes tipicamente compreendem de cerca de 25 µg até cerca de 1.000 µg inclusive, de uma dose de 1 mL. Similarmente, a vacina aqui descrita poderia ser combinada com antibióticos, os quais podem compreender de cerca de 1 µg até cerca de 60 µg inclusive de uma dose de 1 mL. Outros ingredientes são possíveis.

Parte 3e) Dosagens e ensaios de vacinas mortas ou inativadas. Os tamanhos de doses das vacinas de vírus de influenza H3N8 tipicamente variam de cerca de 2,0 até 0,1 mL, dependendo da via de administração. Para vacinas contendo vírus vivos modificados ou vírus atenuados, uma dose terapeuticamente eficaz irá geralmente variar de cerca de 10^5 TCID₅₀ até cerca de 10^8 TCID₅₀, inclusive. Para vacinas contendo antígenos de subunidade, tais como as proteínas H3 ou N8 de influenza, uma dose terapeuticamente eficaz varia de cerca de 10 µg até cerca de 100 µg, inclusive. Para vacinas contendo vírus influenza inativado, as vacinas devem conter entre 10^3 e 10^9 TCID₅₀, níveis de vírus antes da inativação. A vacina irá preferivelmente ter entre 100 - 1.000 unidades de HA/mL como a quantidade administrada por dose. A mais preferida é de cerca de 640 HA por dose.

Parte 3f) Morta ou inativada, regulação do tempo e via de administração. Ver Parte 2f para a regulação do tempo de vacinação. A via preferida é a injeção subcutânea, SC, usando cerca de 1 mL, porém a intramuscular, IM, de cerca de 1 mL de intradérmica usando 1,0 - 0,2 mL e a oronasal, e a

nasal usando 0,2 a 0,5 mL também são preferidas.

PARTE 4. COMBINAÇÃO DE VACINAS

Os antígenos e vacinas dessa invenção podem ser combinados com outros produtos ou vacinas. Por exemplo, eles
5 podem ser combinados ou na fração líquida ou dessecada com a linha Canine Vanguard® da Pfizer, a qual inclui muitos produtos, e/ou a linha Canine Vanguard Plus® da Pfizer, a qual também inclui muitos produtos, incluindo o Vanguard Plus
10 CCV/L4® e outras combinações para oferecer a completa proteção contra doenças de filhote de cachorro principais. O antígeno do vírus influenza eqüino ou canino pode ser combinado em quaisquer várias combinações com os seguintes antígenos caninos; parainfluenza canino (CPIV), vírus de indisposição canina (CDV), parvovírus canino (CPV), adenovírus-1
15 canino (CAV-1), adenovírus-2 canino (CAV-2), *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira bratislava*, coronavírus respiratório canino (CRCV), coronavírus canino entérico (CCV), coronavírus bovino (BCV) e antígeno da *Bordetella bronchiseptica*.
20

Além disso, os antígenos do vírus de influenza eqüino ou canino e as vacinas dessa invenção podem ser combinadas com vacinas de *Bordetella bronchiseptica* (p68 ou Bronchicine® ou Canvac CCI®) e/ou parainfluenza canino (CPIV)
25 e/ou coronavírus respiratório canino (CRCV) e/ou coronavírus bovino (BCV) para proporcionar uma vacina pré-abordagem para proteger contra os agentes comuns da tosse de canil. A dosagem inicial das vacinas de combinação poderiam ser 2 doses

de 1 mL com intervalo de 3 semanas, um único incentivador de 1 mL poderia ser dado antes das abordagens subseqüentes.

PARTE 5. EXEMPLOS ESPECÍFICOS DAS VACINAS

As seguintes vacinas são especificamente fornecidas.

Exemplos 1 - 3 Célula de mamífero crescida.

H3N8 de eqüino da Pfizer derivado de célula (A/Equino/2/Miami/1/1963) em a) 2 ou 5% de Alum ou b) em QAC.

Exemplos 4 - 6 Célula de mamífero crescida.

H3N8 de canino isolado clínico da Pfizer derivado de célula (A/Canino/Iowa/9A1/B5/D8/D12 em a) 2 ou 5% de Alum ou b) em QAC.

Exemplos 7 - 9 Ovo de ave crescido

H3N8 de eqüino da Pfizer derivado de ovo em a) 2 ou 5% de Alum ou b) em QAC.

Exemplos 10 - 11 Ovo de ave crescido

H3N8 canino isolado clínico da Pfizer derivado de ovo em a) 2 ou 5% de Alum ou b) em QAC.

PARTE 6. EXEMPLOS ESPECÍFICOS DE PROCEDIMENTOS DE TESTAGEM DE VACINA

As vacinas dessa invenção podem ser avaliadas e confirmadas usando o seguinte.

Cachorros de pesquisa de raça de 6 semanas de idade ou mais de propósito são administradas as vacinas aqui descritas. Os cachorros são divididos em grupos de vacina usando de 5 a 20 cachorros por grupo. A vacina é administrada como duas doses de 1 mL ou duas doses de 0,5 mL com 3 se-

manas de intervalo através da via subcutânea ou intramuscular. É dada vacina de placebo aos cachorros de controle. Amostras de soro são coletadas a partir de cada cachorro no dia da primeira e da segunda vacinação, a seguir duas vezes após a segunda vacinação, assim como após o desafio. O soro de cachorros vacinados é testado para a soro conversão para o antígeno da vacina através da HI (inibição da hemaglutinina) ou SRH (hemólise radial individual). Os cachorros são desafiados com vírus H3N8 por aerossol ou gotas através da via intranasal ou oral (a qual pode incluir intratecal) no dia 14 ou no dia 28 após a segunda vacinação. Os cachorros são observados após o desafio por sinais clínicos para a doença pelo monitoramento dos sinais clínicos, tais como sintomas respiratórios, febre, anorexia, letargia. As secreções nasais são coletadas por "swabbing" dos cachorros vacinados e dos controles não-vacinados dia sim dia não após o desafio por 10 - 14 dias para medir o espalhamento do vírus de desafio. A presença do espalhamento do vírus é confirmada pelo cultivo do tecido celular (preferivelmente rim de cachorro). Amostras de tecidos incluindo traquéia, amígdala, pulmão são coletadas de um subgrupo de cachorros após o desafio. A presença do vírus nas amostras de tecido de cachorro é confirmada conforme descrito acima ou de análise imunoistoquímica. Pela comparação do espalhamento do vírus de desafio e do vírus em amostras de tecido, cachorros vacinados com uma vacina eficaz terão uma carga viral mais baixa ou quantidades de vírus mais baixas em comparação com cachorros de controle não-vacinados. Uma vacina eficaz irá resultar numa carga vi-

ral mais baixa ou numa quantidade de vírus mais baixa num animal vacinado e animais vacinados demonstrarão uma redução nos sinais clínicos associados com infecção por influenza em comparação com um controle não-vacinado.

5 Exemplos específicos

Avaliação do estudo de eficácia e desafio de vacinas de Influenza caninos em cachorros. Avaliação de vacina de influenza de eqüino, de vírus morto para proporcionar proteção cruzada em caninos contra o vírus influenza.

10 Para avaliar a soroproteção de vírus de influenza de eqüinos; vacinas contendo A/Equino/2/Miami/1/63 e A/Equino/Ohio/1/2003, cachorros com de 7 a 10 semanas de idade foram divididos em um dos nove grupos de tratamento (Tabela 2). Os cachorros foram vacinados com uma dose de 1,0
15 mL através da via subcutânea nos Dias de Estudo 0 e 21. O sangue para o soro foi coletado de todos os cachorros registrados no estudo nos Dias de Estudo 0 (primeira vacinação), 21 (segunda vacinação) e 35 (14 dias após a segunda vacinação). Todas as amostras de soro foram ensaiadas para HAI para o Miami63, Ohio03 e CIV. Os dados de resposta sorológica
20 estão apresentados na Tabela 3. Diferenças estatisticamente significativas nos títulos sorológicos em comparação com animais não-vacinados foram demonstradas no Dia de Estudo 35 nos seguintes grupos IVP: T02, T03, T04, T06, T07, T08 e T09
25 (Tabela 3). Adicionalmente, diferenças significativas foram observadas no Dia de Estudo 21 para os seguintes grupos IVP: T06, T07, T08, e T09 (Tabela 3).

Segurança preliminar

Além de medir a resposta sorológica, a segurança de vacina preliminar foi avaliada nesse estudo. De um modo geral, nenhuma reação associada com vacina clinicamente importante foi observada com qualquer um dos IVPs avaliados.

5 Nenhuma reação sistêmica associada com vacina foi observada durante o curso do estudo. Adicionalmente, nenhum aumento de tamanho do sítio de injeção foi observado após a primeira vacinação em qualquer um dos grupos de tratamento. No Dia 21 (antes da 2ª vacinação, pequenos aumentos de tamanho foram

10 detectados no apalpamento do sítio de injeção nos 34 animais dos cinco grupos de tratamento. Desses grupos, quatro (T02, T03, T06 e T07) são auxiliados com Alum 2%, enquanto o quinto grupo de tratamento (T09) é auxiliado com Quil-

15 A/Colesterol/Mais outros adjuvantes. O volume médio geométrico no aumento de tamanho do Dia 21 variou de tamanho de 0,07 até 0,24 cm³ pelos tratamentos.

Após a segunda vacinação, os Dias de Estudo 22 a 24, os aumentos de tamanho do sítio de injeção foram observados em 58 dos 87 animais. Esses aumentos de tamanho chegaram ao ponto máximo 24 horas após a vacinação (Dia 22) e decresceram em tamanho para a resolução até o Dia de Estudo 24. Nenhum dos aumentos de tamanho do sítio de injeção foram dolorosos ou quentes ao toque, enquanto cinco foram descobertos como sendo duros quanto à resistência.

25 Avaliação da vacina de influenza de equino, vírus morto para proporcionar proteção cruzada em caninos contra o vírus influenza por desafio.

Seis dos nove grupos de tratamento foram desafia-

dos com CIV: T01, T02, T03, T06, T07 e T09. O Dia de Estudo 0, o dia do desafio, animais 6 semanas depois da segunda vacinação com HA aproximadamente de 1:8 por 50 mL representando aproximadamente 6,9 log por mL de CIV. Os cachorros foram
5 desafiados através da via intra-traqueal num modelo similar ao modelo de doença respiratória de vírus influenza suíno. Sinais clínicos associados com a doença respiratória foram observados diariamente em todos os animais: descarga nasal, descarga ocular, espirro, ânsia de vômito, anorexia, depressão ou tosse. Adicionalmente, temperaturas timpânicas e
10 "swabs" nasais/faríngeos para o isolamento do vírus foram coletados diariamente.

As observações clínicas foram reportadas e monitoradas diariamente até aproximadamente 50% dos animais desafiados exibirem sinais clínicos de doença respiratória. Cinco dias após o desafio, 31 dos 59 animais desafiados exibiram um ou mais dos seguintes sinais clínicos: descarga nasal, descarga ocular e/ou tosse. Conseqüentemente, no Dia de Estudo 5, todos os animais foram eutanasiados e foi efetuada
15 a necropsia. As contagens de consolidação do pulmão foram registradas e as amostras para o isolamento viral coletadas.
20

O percentual de contagens de consolidação do pulmão indicaram que a demonstração bem sucedida de doença respiratória foi alcançada com esse desafio. A consolidação percentual por todos os animais variou de 60% em 9 animais até oito animais com 10 a 35% de consolidação, 26 animais exibindo < de 10% de consolidação e 16 animais não exibindo
25 consolidação (Figura 2). As quantidades de animais com con-

solidação de pulmão pelos grupos de tratamento estão apresentadas na Tabela 5. Enquanto foram observadas diferenças numéricas entre os grupos de tratamento e os controles negativos, diferenças estatisticamente significativas para a consolidação do pulmão, isolamento do vírus no pulmão e dos tecidos das amígdalas não foram detectadas (Tabela 6). Das amostras de lavagem de pulmão, diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) foram detectadas nos resultados de isolamento de vírus entre os controles negativos e T02, T07 e T09 (Tabela 7).

Tabela 2. Grupos de tratamento para o estudo de soro conversão canino.

Grupo	IVP
T01	Salina - Controle negativo
T02	Miami 63 - dose de HAI 320 - Alum 2%
T03	Miami 63 - dose de HAI 640 - Alum 2%
T04	Miami 63 - dose de HAI 320 - Quil-A/colesterol
T05	Miami 63 - dose de HAI 640 - Quil-A/colesterol
T06	Ohio 03 - Dose de HAI 320 - Alum 2%
T07	Ohio 03 - Dose de HAI 640 - Alum 2%
T08	Ohio 03 - Dose de HAI 640 - Quil-A/Colesterol
T09	Ohio 03 - Dose de HAI 640 - Quil-A/Colesterol/mais outros adjuvantes

Tabela 3. Resumo dos dados de títulos sorológicos em cachorros vacinados com vacinas de antígenos de influenza de equino (36252)

Títulos de HAI contra CIV									
Grupo de tratamento			Dia 0	Dia 21			Dia 35		
Grupo	IPV	N	Verdadeiro	Mé- dia geo- mé- tri- ca	Min	Max	GM	Min	Max
T01	Sa- lina	10	<8	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
T02	Mia- mi 63 - bai- xa dose - Alum	9	<8	4,0	4,0	4,0	9,3*	4,0	4,0

	2%								
T03	Mia- mi 63 - alta dose - Alum 2%	10	<8	1,0	4,0	4,0	12,1 *	4,0	128, 0
T04	Mia- mi 63 - Bai- xa dose - Quil - A/co les- te- rol	10	<8	4,0	4,0	4,0	9,2*	4,0	16,0

T05	Mia- mi 63 - alta dose - Quil - A/co les- te- rol	8	<8	4,0	4,0	4,0	7,3	4,0	16,0
T06	Ohio 03 - Bai- xa dose - Alum 2%	10	<8	17,1 *	8,0	64,0	48,5 *	32,0	128, 0
T07	Ohio 03 - alta dose - Alum 2%	10	<8	11,3 *	4,0	32,0	55,7 *	32,0	128, 0
T08	Ohio	10	<8	7,5*	4,0	16,0	18,4	8,0	32,0

	03 - Alta dose - Quil A/Co les- te- rol						*		
T09	Ohio 03 - Alta dose - Quil - A/co les- te- rol/ mais ou- tros adju- van- tes	10	<8	32,0 *	4,0	128, 0	84,4 *	8,0	256, 0
* = diferença significativa entre T01 e o grupo marcado									

(P ≤ 0,05)

Tabela 4. Distribuição de frequência de reações de sítio de injeção positivas em cada dia de estudo por grupo de tratamento

5

Grupo de tratamento		Reações de sítio de injeção positivos						
Grupo	IPV	D0	D2	D3	D21	D22	D23	D24
T01	Salina	0	0	0	0	0	0	0
T02	Miami 63 - baixa dose - Alum 2%	0	0	0	8/8	7/9	8/9	7/9
T03	Miami 63 - alta dose - Alum 2%	0	0	0	8/10	10/10	6/9	8/9
T04	Miami 63 - Baixa dose - Quil-A/colesterol	0	0	0	0	6/10	6/10	5/10
T05	Miami 63 - alta dose - Quil-A/colesterol	0	0	0	0	6/9	5/8	5/8
T06	Ohio 03 - Baixa dose - Alum 2%	0	0	0	6/10	10/10	7/8	9/9
T07	Ohio 03 - alta dose - Alum 2%	0	0	0	7/10	9/10	10/10	9/10

T08	Ohio 03 - Alta dose - Quil-A/Colesterol	0	0	0	0	0	0	0
T09	Ohio 03 - Alta dose - Quil-A/colesterol/mais outros adjuvantes	0	0	0	5/1 0	10/10	10/1 0	8/9

Tabela 5. Quantidade de animais por grupo de tratamento com pontuações de consolidação de pulmão positivas.

IVP	T01	T02	T03	T06	T07	T09
No. Positivo	8	5	9	7	5	9
No. Negativo	2	4	1	3	5	1

5

Tabela 6. Isolamento do vírus de amostras de pulmão e amígdalas por grupo de tratamento

IVP	Vírus isolado? Sim/Não							
	Pulmão				Amígdala			
	Sim		Não		Não		Sim	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
T01	7	70,0	3	30,0	9	90,0	1	10,0
T02	8	88,9	1	11,1	9	100,0	0	0

T03	10	100,0	0	0	10	100	0	0
T06	9	90,0	1	10,0	9	90,0	1	10,0
T07	10	100,0	0	0	10	100,0	0	0
T09	10	100,0	0	0	10	100,0	0	0

Tabela 7. Isolamento de vírus de amostras de lavagem de pulmão por grupo de tratamento.

	Vírus isolado? Sim/Não			
	Não		Sim	
IVP	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
T01	2	20,0	8	80,0
T02	7	77,8	2	22,2*
T03	5	50,0	5	50,0
T06	7	70,0	3	30,0*
T07	10	100,0	0	0*
T09	10	100,0	0	0*

5 * Indica diferença estatisticamente significativa (p ≤ 0,05) entre T01 e o grupo de tratamento.

CONCLUSÃO DAS DESCRIÇÕES ESPECÍFICAS

Deve ser notado que, conforme usado nessa especificação e nas reivindicações em anexo, artigos individuais tais como "um", "uma" e "o" podem se referir a um objeto ou a uma pluralidade de objetos, a não ser que o contexto claramente indique outra coisa. Dessa forma, por exemplo, referência a uma composição contendo "um composto" pode incluir um único composto ou dois ou mais compostos.

15 É para ser entendido que a descrição acima é ten-

cionada para ser ilustrativa e não restritiva. Muitas modalidades serão aparentes para as pessoas versadas na técnica na leitura da descrição acima. O escopo da invenção deve, conseqüentemente, ser determinado com referência às reivindicações em anexo, juntamente com o escopo total dos equivalentes aos quais tais reivindicações são intituladas. As descobertas de todos os artigos e referências, incluindo patentes, pedidos de patente e publicações são aqui incorporadas por referência nas suas totalidades e para todos os propósitos.

Todas as composições e/ou métodos revelados e aqui reivindicados podem ser feitos e executados sem experimentação demasiada à luz da presente descoberta. Enquanto as composições e métodos dessa invenção foram descritos em termos das modalidades preferidas, será aparente para as pessoas versadas na técnica que variações podem ser aplicadas às composições e/ou métodos e nos passos ou na seqüência de passos do método aqui descrito sem sair do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será aparente que certos agentes, os quais são tanto quimicamente quanto fisiologicamente relacionados podem ser substituídos para os agentes aqui descritos enquanto os mesmos resultados ou similares poderiam ser alcançados. Todos os tais substitutos similares e modificações aparentes para as pessoas versadas na técnica são consideradas como estando dentro do espírito, escopo e conceito da invenção, conforme definido pelas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma vacina contendo pelo menos um vírus influenza atenuado ou morto, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para a imunização de cachorros contra o vírus influenza.

5

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é selecionado do grupo consistindo do subtipo H3, N8 e/ou H3N8, e qualquer combinação desses.

10

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é influenza de subtipo H3N8.

15

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é derivado de origem canina ou eqüina.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus pode ou não ser capaz de ser transmitido para um cachorro.

20

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é capaz de ser transmitido para um cachorro.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus não é capaz de ser transmitido para um cachorro.

25

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a quantidade do referido vírus é de 10 a 10.000 unidades de HA.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8,

CARACTERIZADO pelo fato de que a quantidade do referido vírus é de 100 a 1.000 unidades de HA.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é derivado de origem eqüina.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é um vírus influenza eqüino.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é derivado antígeno da cepa de influenza eqüino A/Equino/2/Miami/1/63.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é selecionado do grupo consistindo da

15 a) Cepa de influenza eqüino A/Equino/2/Miami/1/63, e/ou

b) Cepa de influenza eqüino A/Equino/2/Miami/1/63, Vírus de Semente Mestre da cepa de semente passada e depositada, Lote 3 17-9, rotulada como Equine Flu A2,3 17-9 MSV, 1
20 1-2 1-86.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus é derivado de origem canina.

15. Uso, de acordo com as reivindicações 1 - 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido vírus está morto.

16. Uso, de acordo com as reivindicações 1 - 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a referida vacina contém ainda um adjuvante, onde o adjuvante pode ser selecionado de a)

um adjuvante metabolizável, b) um adjuvante não-metabolizável, c) Alum 2%, d) Alum 5%, e) Quil A e f) Colesterol ou qualquer combinação desses.

17. Processo para produzir uma vacina, onde a referida vacina é **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender as composições de vacina conforme reivindicadas nas reivindicações 1 - 14.

Figura 1. Média geométrica das reações de sítio de injeção de cachorros vacinados com vacinas de antígeno equino

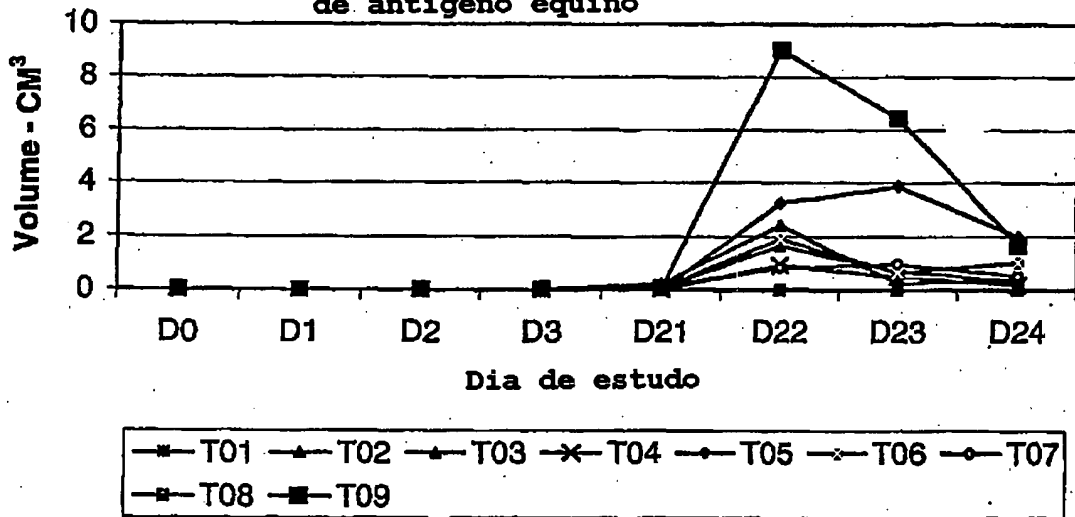
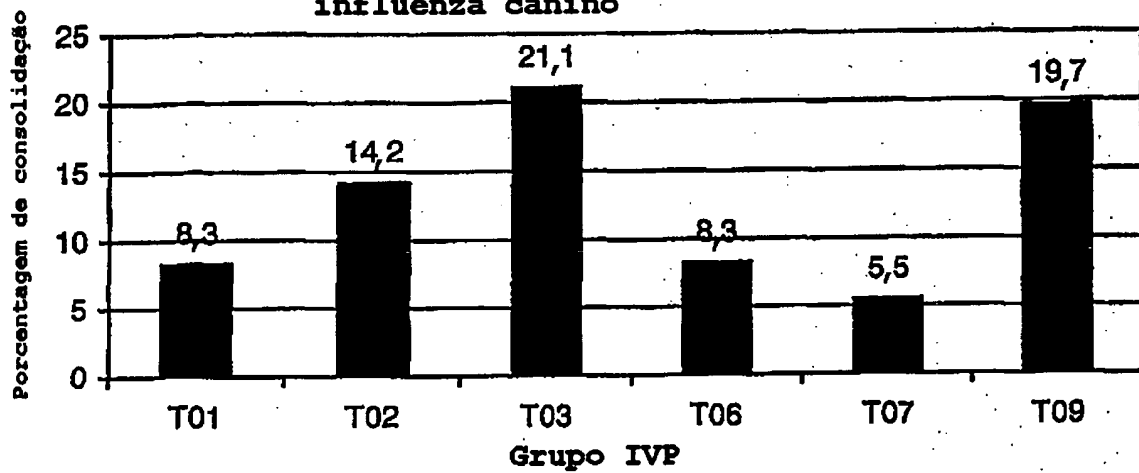


Figura 2. Porcentagem média da consolidação de pulmão em animais vacinados com vacinas de vírus influenza eqüino e desafiados com vírus influenza canino



P 0016325-9

RESUMO

"VACINAS E MÉTODOS PARA TRATAR INFLUENZA CANINO"

A presente invenção se refere ao fornecimento de novas vacinas e tratamentos para as doenças relacionadas com o vírus influenza canino. Ela revela antígenos virais de influenza e métodos de apresentação desses antígenos a caninos, especialmente cachorros. Ele se refere a vacinas atenuadas e mortas. A presente invenção se refere a vírus influenza canino e eqüino experimentalmente gerados. A invenção também inclui influenza A, incluindo H3, N8, H3N8, H7N7 e vírus os quais contêm pelo menos um segmento de genoma de um vírus influenza canino ou eqüino. A presente invenção também se refere ao uso desses vírus em composições terapêuticas para proteger caninos, cachorros em particular, de doenças causadas por vírus influenza.