

(11) Número de Publicação: **PT 835133 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/295 (2007.10) **A61K 39/275** (2007.10)

A61K 39/285 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1996.06.03**

(30) Prioridade(s): **1995.06.07 US 486969**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.04.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.08.13**
227/2008

(73) Titular(es):

CONNAUGHT TECHNOLOGY CORPORATION
3711 KENNETT PIKE, SUITE 200 GREENVILLE,
DE 19807 **US**

(72) Inventor(es):

ENZO PAOLETTI **US**
JOANNE MAKI **US**

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES RECOMBINANTES DE POXVÍRUS-RAIVA E COMPOSIÇÕES DE COMBINAÇÃO E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

RESUMO**"COMPOSIÇÕES RECOMBINANTES DE POXVÍRUS-RAIVA E COMPOSIÇÕES
DE COMBINAÇÃO E SUAS UTILIZAÇÕES"**

São descritos e reivindicados vírus recombinantes atenuados, contendo DNA codificador de um antigénio do vírus da raiva, em composições de "cocktail" ou de combinação ou multivalentes, assim como métodos para a preparação e utilização das composições, seus produtos de expressão e anticorpos produzidos. Os vírus recombinantes podem ser vírus recombinantes de NYVAC ou de ALVAC. As composições e produtos derivados e anticorpos produzidos possuem várias utilizações preventivas, terapêuticas e de diagnóstico.

DESCRIÇÃO**"COMPOSIÇÕES RECOMBINANTES DE POXVÍRUS-RAIVA E COMPOSIÇÕES DE COMBINAÇÃO E SUAS UTILIZAÇÕES"****CAMPO DO INVENTO**

O presente invento está relacionado com um vírus da varíola dos canários atenuado, recombinante, especialmente um vírus recombinante ALVAC-raiva, suas composições e suas composições de combinação e utilizações das mesmas. Assim, o invento está relacionado com um vírus da varíola dos canários recombinante, vírus esse que expressa produtos de genes do vírus da raiva numa composição; a composição inclui qualquer um de entre: antigénio do vírus da esgana canina, e.g., glicoproteínas HA e/ou F de CDV, antigénio de adenovírus canino tipo 2, antigénio de coronavírus canino, antigénio de parainfluenza canina, antigénio de parvovírus canino, antigénio da Bacterina de *Leptospira canicola-icterohaemorrhagiae* ou qualquer combinação destes antigénios. Tal composição pode induzir uma resposta imunológica contra infecções pelo vírus da raiva, assim como contra qualquer outro antigénio na composição, quando administrada a um hospedeiro; e a composição pode induzir imunidade (resposta) duradoira contra a raiva em cães e pode conferir protecção ou induzir uma resposta imunológica em cachorros tendo imunidade

materna. O invento ainda está relacionado com métodos para a preparação e utilização de tais composições. Descrevemos ainda os produtos de expressão dos poxvírus que por si sós são úteis na indução de uma resposta imune, e.g., indução de anticorpos, anticorpos esses que são úteis contra a infecção pela raiva, ou cujos produtos de expressão ou anticorpos induzidos pelos mesmos, isolados a partir de um animal ou humano ou culturas celulares conforme o caso, são úteis na preparação de um estojo ("kit") de diagnóstico, teste ou ensaio para a detecção da raiva e do vírus recombinante, ou de células infectadas, ou da expressão dos antígenos ou produtos noutros sistemas. Os produtos de expressão isolados e anticorpos induzidos pelos vírus recombinantes são especialmente úteis em estojos ("kits"), testes ou ensaios para a detecção de anticorpos ou antígenos num sistema, hospedeiro, soro ou amostra; e os produtos de expressão são úteis para a produção de anticorpos.

Neste pedido são referidas várias publicações. A citação completa destas referências encontra-se no final da especificação, imediatamente antes das reivindicações, ou onde a publicação é mencionada.

FUNDAMENTO DO INVENTO

O vírus da vacina e, mais recentemente, outros poxvírus têm sido usados para inserção e expressão de genes heterólogos. A técnica básica de inserção de genes

heterólogos em poxvírus vivos infecciosos envolve a recombinação entre sequências de DNA de poxvírus, flanqueantes de um elemento genético heterólogo, num plasmídeo dador e sequências homólogas presentes no poxvírus de resgate (Piccini *et al.*, 1987).

Especificamente, os poxvírus recombinantes são construídos em dois passos conhecidos na área e análogos aos métodos de criação de recombinantes sintéticos de poxvírus, tais como o vírus da vacina e o poxvírus aviário descritos nas Patentes U.S. Nos. 4769330 e 4603112.

Em primeiro lugar, a sequência de DNA dos genes a serem inseridos no vírus, particularmente uma grelha de leitura aberta derivada de uma fonte que não seja poxvírus, é colocada numa construção de plasmídeo de *E. coli*, no qual foi inserido DNA homólogo de uma secção de DNA de poxvírus. Separadamente, a sequência de DNA do gene a ser inserido é ligada a um promotor. A ligação promotor-gene é posicionada na construção de plasmídeo de forma que a ligação promotor-gene seja flanqueada, em ambos os extremos, por DNA homólogo de uma sequência de DNA flanqueante de uma região do DNA de poxvírus contendo um *locus* não essencial. A construção de plasmídeo resultante é então amplificada por crescimento dentro da bactéria *E. coli* (Clewell, 1972) e isolada (Clewell *et al.*, 1969; Maniatis *et al.*, 1982).

Em segundo lugar, o plasmídeo isolado contendo a sequência de DNA do gene a ser inserido é usado para

transfectar uma cultura celular, e.g., fibroblastos de embriões de galinha, juntamente com o poxvírus. A recombinação entre DNA homólogo de poxvírus no plasmídeo e no genoma viral, respectivamente, dá um poxvírus modificado pela presença, numa região não essencial do seu genoma, das sequências de DNA estranhas. O termo DNA "estranho" designa DNA exógeno, particularmente DNA de uma fonte que não seja poxvírus, que codifica produtos de genes heterólogos normalmente não produzidos pelo genoma em que o DNA exógeno é colocado.

A recombinação genética é, em geral, a permuta de secções homólogas de DNA entre duas cadeias de DNA. Em determinados vírus o RNA pode substituir o DNA. As secções homólogas de ácido nucleico são secções de ácido nucleico (DNA ou RNA) que possuem a mesma sequência de bases nucleotídicas.

A recombinação genética pode ocorrer naturalmente durante a replicação ou produção de novos genomas virais dentro da célula hospedeira infectada. Assim, a recombinação genética entre genes virais pode ocorrer durante o ciclo replicativo viral, que ocorre numa célula hospedeira co-infectada com dois ou mais vírus diferentes ou outras construções genéticas. Uma secção de DNA derivada de um primeiro genoma é usada indiferentemente na construção da secção do genoma de um segundo vírus co-infectante em que o DNA é homólogo do primeiro genoma viral.

No entanto, a recombinação pode também ocorrer entre secções de DNA em diferentes genomas que não são perfeitamente homólogas. Se uma dessas secções de um primeiro genoma for homóloga de uma segunda secção de um outro genoma, excepto no que respeita à presença dentro da primeira secção de, por exemplo, uma marca genética ou um gene codificador de um determinante antigénico inserido numa porção do DNA homólogo, a recombinação ainda pode ocorrer e os produtos dessa recombinação são então detectáveis pela presença daquela marca genética ou gene no genoma viral recombinante. Outras estratégias foram recentemente descritas para a geração de vírus da vacina recombinante.

A expressão bem sucedida da sequência genética inserida pelo vírus infeccioso modificado requer duas condições. Em primeiro lugar, a inserção deve ser numa região não essencial do vírus, de forma que o vírus modificado se mantém viável. A segunda condição para a expressão do DNA inserido é a presença de um promotor devidamente colocado relativamente ao DNA inserido. O promotor deve ser colocado de forma que fique situado a montante da sequência de DNA a ser expressa.

O vírus da vacina foi usado com êxito para imunizar contra a varíola, culminando na erradicação mundial da varíola em 1980. No decurso da sua história, surgiram muitas estirpes de vacina. Estas diferentes

estirpes demonstram imunogenicidade variável e estão implicadas em graus variáveis em potenciais complicações, as mais graves das quais são a encefalite pós-vacinal e varíola generalizada (Behbehani).

Com a erradicação da varíola, tornou-se importante um novo papel para o vírus da vacina, o de um vector manipulável geneticamente para a expressão de genes heterólogos. Genes codificadores de um grande número de antigénios heterólogos foram expressos no vírus da vacina, resultando muitas vezes em imunidade protectora contra a exposição ao agente patogénico correspondente (revisto em Tartaglia *et al.*, 1990).

Observou-se que o fundo genético do vector da vacina afecta a eficácia protectora do imunogénio heterólogo expresso. Por exemplo, a expressão da gp340 do vírus de Epstein Barr (EBV) na estirpe vacinal Wyeth do vírus da vacina não protegeu saguins cabeça de algodão contra o linfoma induzido pelo vírus EBV, enquanto a expressão do mesmo gene na estirpe laboratorial WR do vírus da vacina foi protectora (Morgan *et al.*, 1988).

É extremamente importante um equilíbrio entre a eficácia e a segurança de um candidato a vacina recombinante baseado em vírus da vacina. O vírus recombinante deve apresentar um ou mais imunogénios de forma a induzir uma resposta imune protectora no animal vacinado, mas sem quaisquer propriedades patogénicas

significativas. Assim, a atenuação da estirpe vectora constitui um avanço muito desejável relativamente ao estado actual da tecnologia.

Foram identificados vários genes da vacina que não são essenciais para a replicação do vírus em culturas de tecidos e cuja deleção ou inactivação reduz a virulência numa variedade de sistemas animais.

O gene codificador da cinase de timidina (*tk*) do vírus da vacina foi mapeado (Hruby *et al.*, 1982) e sequenciado (Hruby *et al.*, 1983; Weir *et al.*, 1983). A inactivação ou deleção completa do gene da cinase de timidina não inibe a replicação do vírus da vacina numa variedade de células em cultura de tecidos. O vírus da vacina TK⁻ é igualmente capaz de se replicar *in vivo* no local da inoculação numa variedade de hospedeiros e quando administrado por uma variedade de vias.

Foi demonstrado para herpes simples tipo 2 que a inoculação intravaginal de cobaios com vírus TK⁻ resultou em títulos de vírus significativamente mais baixos na espinal medula do que a inoculação com vírus TK⁻ (Stanberry *et al.*, 1985). Foi demonstrado que a actividade TK codificada por herpesvírus *in vitro* não é importante para a replicação viral em células metabolicamente activas, mas é necessária para a replicação do vírus em células quiescentes (Jamieson *et al.*, 1974).

A atenuação de vírus da vacina TK⁻ foi demonstrada em ratinhos inoculados pelas vias intracerebral e intraperitoneal (Buller *et al.*, 1985). A atenuação foi observada tanto para a estirpe laboratorial neurovirulenta WR como para a estirpe vacinal Wyeth. Nos ratinhos inoculados pela via intradérmica, vírus da vacina recombinante TK⁻ gerou anticorpos neutralizantes anti-vacina equivalentes ao vírus da vacina TK⁺ parental, indicando que neste sistema de ensaio a perda da função TK não baixou significativamente a imunogenicidade do vector vírus da vacina. Após a inoculação intranasal de ratinhos com vírus da vacina recombinante TK⁻ e TK⁺ (estirpe WR), foi encontrada significativamente menos disseminação de vírus para outros locais, incluindo o cérebro (Taylor *et al.*, 1991a).

Uma outra enzima envolvida no metabolismo de nucleótidos é a redutase de ribonucleótidos. Demonstrou-se que a perda da actividade de redutase de ribonucleótidos viral codificada pelos vírus herpes simples (HSV), através da deleção do gene codificador da subunidade grande, não tem qualquer efeito na replicação viral e na síntese de DNA em células em divisão *in vitro*, mas compromete gravemente a capacidade do vírus para se replicar em células cultivadas em meio sem soro (Goldstein *et al.*, 1988). Usando um modelo de ratinho para a infecção aguda do olho por HSV e para a infecção latente reactivável dos gânglios trigeminais, foi observada uma redução da virulência para HSV sem a subunidade grande da redutase de ribonucleótidos,

comparativamente com a virulência apresentada por HSV selvagem (Jacobson *et al.*, 1989).

Tanto a subunidade pequena (Slabaugh *et al.*, 1988) como a grande (Schmidt *et al.*, 1988) da redutase de ribonucleótidos foram identificadas no vírus da vacina. A inativação insercional da subunidade grande da redutase de ribonucleótidos na estirpe WR do vírus da vacina leva à atenuação do vírus conforme avaliado pela inoculação intracraniana de ratinhos (Child *et al.*, 1990).

O gene da hemaglutinina do vírus da vacina (HA) foi mapeado e sequenciado (Shida, 1986). O gene HA do vírus da vacina não é essencial para a replicação em cultura de tecidos (Ichihashi *et al.*, 1971). A inativação do gene HA do vírus da vacina resulta na redução da neurovirulência em coelhos inoculados pela via intracraniana e lesões menores no local da inoculação intradérmica em coelhos (Shida *et al.*, 1988). O locus HA foi usado para a inserção de genes heterólogos na estirpe WR (Shida *et al.*, 1987), em derivados da estirpe Lister (Shida *et al.*, 1988) e na estirpe Copenhagen (Guo *et al.*, 1989) do vírus da vacina. Observou-se que o vírus da vacina recombinante TK⁻ expressando genes heterólogos é imunogénico (Guo *et al.*, 1989; Itamura *et al.*, 1990; Shida *et al.*, 1988; Shida *et al.*, 1987) e protector contra a exposição ao agente patogénico relevante (Guo *et al.*, 1989; Shida *et al.*, 1987).

O vírus da varíola bovina (estirpe vermelho Brighton) produz pústulas vermelhas (hemorrágicas) na membrana corioalantóica de ovos de galinha. Deleções espontâneas dentro do genoma de varíola bovina originam mutantes que produzem pústulas brancos (Pickup *et al.*, 1984). A função hemorrágica (u) localiza-se numa proteína de 38 KDa codificada por um gene precoce (Pickup *et al.*, 1986). Demonstrou-se que este gene, tendo homologia com os inibidores das proteases serínicas, inibe a resposta inflamatória do hospedeiro contra o vírus da varíola bovina (Palumbo *et al.*, 1989) e é um inibidor da coagulação sanguínea.

O gene u está presente na estirpe WR do vírus da vacina (Kotwal *et al.*, 1989b). Os ratinhos inoculados com um recombinante do vírus da vacina WR, no qual a região u foi inactivada por inserção de um gene heterólogo, produzem níveis mais elevados de anticorpos contra o produto do gene heterólogo comparativamente com ratinhos inoculados com um vírus da vacina recombinante semelhante em que o gene u está intacto (Zhou *et al.*, 1990). A região u está presente numa forma defectiva não funcional na estirpe Copenhagen do vírus da vacina (grelha de leitura aberta B13 e B14 de acordo com a terminologia descrita por Goebel *et al.*, 1990a,b).

O vírus da varíola bovina está localizado, nas células infectadas, em corpos de inclusão citoplasmáticos do tipo A ("ATI") (Kato *et al.*, 1959). Pensa-se que a

função de ATI seja a protecção dos viriões do vírus da varíola bovina durante a disseminação de animal para animal (Bergoin *et al.*, 1971). A região ATI do genoma da varíola bovina codifica uma proteína de 160 KDa que forma a matriz dos corpos ATI (Funahashi *et al.*, 1988; Patel *et al.*, 1987). O vírus da vacina, apesar de conter uma região homóloga no seu genoma, de um modo geral não produz ATI. Na estirpe WR do vírus da vacina, a região ATI do genoma é traduzida como uma proteína de 94 KDa (Patel *et al.*, 1988). No vírus da vacina estirpe Copenhagen, a maior parte das sequências de DNA correspondentes à região ATI está eliminada, com o restante extremo 3' da região fundido com sequências a montante da região ATI formando a grelha de leitura aberta (ORF) A26L (Goebel *et al.*, 1990a,b).

Foi descrita uma variedade de deleções espontâneas (Altenburger *et al.*, 1989; Drillien *et al.*, 1981; Lai *et al.*, 1989; Moss *et al.*, 1981; Paez *et al.*, 1985 ; Panicali *et al.*, 1981) e manipuladas (Perkus *et al.*, 1991 ; Perkus *et al.*, 1989 ; Perkus *et al.*, 1986) perto do extremo esquerdo do genoma do vírus da vacina. Demonstrou-se, através de inoculação intracraniana em ratinhos, que uma estirpe WR do vírus da vacina com uma deleção espontânea de 10 Kb (Moss *et al.*, 1981; Panicali *et al.*, 1981) é atenuada (Buller *et al.*, 1985). Demonstrou-se mais tarde que esta deleção inclui 17 ORFs potenciais (Kotwal *et al.*, 1988b). Genes específicos dentro da região deletada incluem a virocina N1L e uma proteína de 35 KDa (C3L, de acordo com a terminologia descrita em Goebel *et al.*,

1990a,b). A inativação insercional de N1L reduz a virulência por inoculação intracraniana em ratinhos normais e labros (Kotwal *et al.*, 1989a). A proteína de 35 Kda é secretada, tal como N1L, para o meio das células infectadas com vírus da vacina. A proteína possui homologia com a família das proteínas que controlam o complemento, particularmente a proteína de ligação ao complemento 4B (C4bp) (Kotwal *et al.*, 1988a). Tal como a C4bp celular, a proteína de 35 KDa da vacina liga-se ao quarto componente do complemento e inibe a cascata clássica do complemento (Kotwal *et al.*, 1990). Assim a proteína de 35 KDa do vírus da vacina parece estar envolvida no auxílio do vírus à evasão dos mecanismos de defesa imune do hospedeiro.

O extremo esquerdo do genoma da vacina inclui dois genes que foram identificados como genes de gama de hospedeiro, K1L (Gillard *et al.*, 1986) e C7L (Perkus *et al.*, 1990). A deleção de ambos os genes reduz a capacidade do vírus da vacina para se replicar numa variedade de linhas celulares humanas (Perkus *et al.*, 1990).

Dois outros sistemas de vectores vacinais envolvem a utilização vírus da varíola aviária, que são poxvírus com restrição natural de gama de hospedeiros. Tanto o vírus da varíola das galinhas (FPV) como o vírus da varíola dos canários (CPV) foram manipulados de forma a expressarem produtos de genes heterólogos. O vírus da varíola das galinhas (FPV) é o vírus protótipo do género Avipox da família dos Poxvírus. O vírus causa uma doença

economicamente importante nas aves de capoeira, a qual tem sido bem controlada desde os anos 20 através da utilização de vacinas vivas atenuadas. A replicação dos vírus da varíola aviária está limitada a espécies aviárias (Matthews, 1982) e não existem descrições na literatura de poxvírus aviários causadores de uma infecção produtiva em espécies não aviárias, incluindo o homem. Esta restrição de hospedeiros proporciona uma barreira de segurança inerente à transmissão do vírus a outras espécies e torna uma proposição atraente o uso de vectores vacinais baseados em poxvírus aviários para aplicações veterinárias e humanas.

FPV tem sido usado com vantagem como vector de expressão de antigénios derivados de patogénios de aves de capoeira. A proteína hemaglutinina de um vírus da gripe aviária virulento foi expressa num FPV recombinante (Taylor *et al.*, 1988a). Após inoculação do recombinante em galinhas e perus, foi induzida uma resposta imune protectora contra a exposição a vírus da gripe virulento heterólogo (Taylor *et al.*, 1988a). Foram desenvolvidos FPVs recombinantes expressando as glicoproteínas de superfície do vírus da doença de Newcastle (Taylor *et al.*, 1990; Edbauer *et al.*, 1990).

Apesar da restrição de hospedeiros para a replicação de FPV e CPV aos sistemas aviários, os recombinantes derivados destes vírus expressam proteínas extrínsecas em células de origem não aviária. Ainda, mostrou-se que tais vírus recombinantes induzem respostas

imunológicas dirigidas contra o produto de gene heterólogo e, quando adequado, conferem protecção contra a exposição ao correspondente agente patogénico (Tartaglia et al., 1993a,b; Taylor et al., 1992; 1991b; 1988b).

Particularmente nos E.U.A., uma vacina de combinação, multivalente ou "cocktail" ou composição imunológica da raiva (antigénio da raiva combinado com um ou mais antigénios numa composição), particularmente para caninos, não está actualmente disponível devido à incapacidade das várias combinações anteriores passarem o teste de eficácia. Tais combinações anteriores apresentam o que é conhecido como "interferência na eficácia", nomeadamente a falência de um ou mais antigénios, tais como o antigénio da raiva, ou antigénios suplementares, na composição de combinação em manter ou atingir a eficácia. Pensa-se que isto seja devido à interferência sobre o antigénio estimulador de uma resposta imunológica, antigénica, de anticorpo ou protectora no hospedeiro, e.g. cães, quando administrado, devido à presença de um ou mais antigénios suplementares para além dos antigénios da raiva. Por exemplo, os antigénios da raiva numa combinação com outros antigénios estão sujeitos à interferência na estimulação de uma resposta imunológica, antigénica, de anticorpo ou protectora pelos outros antigénios presentes na composição, ou interferem com a mesma, quando a composição é administrada a cães. Mais particularmente, os antigénios da raiva, quando administrados com um ou mais, ou com a totalidade, dos antigénios do vírus da esgana

canina, antigénios de adenovírus canino, antigénios de coronavírus canino, antigénios de parainfluenza canina, antigénios de parvovírus canino e antigénios de bacterina de *Leptospira*, podem interferir com a resposta induzida por aqueles antigénios e vice-versa. No entanto, para outros hospedeiros, tais como gatos, são conhecidas vacinas de combinação. Talvez, sem pretender estar limitado a uma teoria particular, a "interferência de eficácia" seja devida a (i) alguma peculiaridade do sistema biológico do hospedeiro, e.g., canino ou (ii) à reacção com o sistema biológico do hospedeiro, e.g., canino, dos antigénios da raiva actualmente conhecidos ou (iii) à reacção com o sistema biológico do hospedeiro, e.g. canino, dos outros antigénios conhecidos em tais composições de combinação anteriores ou (iv) a alguma combinação dos factores (i) a (iii). Quaisquer composições de combinação conhecidas contendo o antigénio da raiva não incluem recombinantes e possuem um adjuvante.

Independentemente da teoria, pensa-se que não existe actualmente uma composição de combinação para a raiva com antigénios suplementares, especialmente para uso canino, que não apresente interferência de eficácia. Existe assim a necessidade de uma composição de combinação para a raiva, especialmente para uso canino. Assim, em cachorros e cães, os antigénios da raiva são, geralmente, administrados separadamente e não numa composição de combinação com um ou mais antigénios suplementares, para protecção. Seria de facto surpreendente, inesperado e não óbvio poder-se

formular uma composição de combinação (com antigénios suplementares) para a raiva, *i.e.*, uma composição multivalente contra a raiva, que não apresente interferência de eficácia, especialmente em caninos, particularmente, porque como se mostra pelo presente conhecimento da interferência de eficácia, não se pode simplesmente combinar composições de antigénios para preparar uma composição de combinação ou multivalente ou "cocktail" útil. Neste caso (relativo à frase anterior), "composições de antigénios" pode significar poxvírus recombinantes que codificam e expressam por si só um antigénio ou uma combinação de tais recombinantes e antigénios. Será igualmente desejável que um antigénio da raiva, que possa ser usado numa composição de combinação ou "cocktail" para caninos, possa também ser usado numa composição para outros hospedeiros, tais como felinos. Desta forma, o antigénio da raiva para várias composições veterinárias de combinação, multivalente ou "cocktail", não necessita de variar, proporcionando assim uma vantagem económica na sua produção.

Ainda, será vantajoso que tal antigénio da raiva proporcione protecção a longo prazo ou induza uma resposta a longo prazo para caninos, assim como protecção, ou induza uma resposta em cachorros com imunidade maternal contra a raiva. Como é do conhecimento dos familiarizados com a matéria, a imunidade materna é uma imunidade que um recém-nascido adquire da sua mãe quando do nascimento e/ou por aleitamento, imunidade essa que, após um período de tempo, desaparece no recém-nascido, deixando assim o recém-nascido

susceptível. Ainda, deve ser considerado que a presença de anticorpos maternos no recém-nascido pode evitar que o recém-nascido obtenha uma resposta protectora ou imunológica quando administrada uma composição antigénica, e.g., uma vacina, significando assim que o recém-nascido deve entrar num período de pouca ou nenhuma imunidade, i.e., susceptibilidade, à exposição ao agente patogénico antes da administração de uma composição de antigénio ou vacina. Relativamente à imunidade materna, é feita referência à Patente U.S. 5338683, publicada em 16 de Agosto, 1994.

Seria ainda mais vantajoso, surpreendente e inesperado se o antigénio da raiva que pode ser usado numa composição de combinação, "cocktail" ou multivalente, sem interferência de eficácia em caninos, que ser usado nessa composição para outros hospedeiros, tais como felinos, e que proporciona resposta ou protecção a longo prazo em cães, assim como uma resposta ou protecção em cachorros, apesar da imunidade materna, for um vírus recombinante, como seja um recombinante de poxvirus-vírus da raiva. E, ainda, será especialmente surpreendente e inesperado que este recombinante de poxvirus-vírus da raiva esteja modificado de forma a ser atenuado, e.g., um recombinante de vírus da vacina atenuado-vírus da raiva ou um recombinante de avipox atenuado-vírus da raiva, como seja um recombinante NYVAC-raiva ou ALVAC-raiva; porque, por exemplo, atendendo à atenuação e diminuição ou ausência de replicação produtiva do poxvirus no hospedeiro, os

familiarizados com a matéria, especialmente, não esperariam e ficariam surpreendidos pela utilidade do recombinante atenuado numa composição "cocktail", multivalente ou de combinação para caninos e outros hospedeiros, especialmente numa composição que proporciona resposta ou protecção a longo prazo em caninos e resposta ou protecção em cachorros apesar da imunidade protectora materna.

Os vectores poxvirus atenuados serão também especialmente vantajosos para composições antigénicas ou vacinais, especialmente composições de combinação, "cocktail" ou multivalentes, particularmente face aos vectores atenuados apresentarem propriedades patogénicas reduzidas, ou poucas ou nenhuma, relativamente ao hospedeiro alvo ou em relação a hospedeiros inesperados, possivelmente acidentais, tais como aqueles que trabalham com o vector na formulação ou na administração do vector ou antigénio ou que possam de outra forma entrar em contacto com ele. Ou seja, os vectores poxvirus atenuados apresentam propriedades patogénicas reduzidas, ou poucas ou nenhuma, para os hospedeiros alvo, tais como cães, cachorros, gatos, gatinhos e similares e para hospedeiros inesperados, possivelmente acidentais, como sejam seres humanos envolvidos na formulação do vector numa composição para administração ou na administração da composição (e.g., veterinários, técnicos, outros trabalhadores) ou que possam de outro modo entrar em contacto com o vector (e.g. donos de animais de companhia).

Pode assim ser apreciado que a produção de um poxvírus recombinante com vírus da raiva e de composições e produtos derivados do mesmo, particularmente recombinantes da raiva baseados em NYVAC ou ALVAC e composições e produtos derivados dos mesmos, especialmente as composições contendo antigénios suplementares, e.g., composições "cocktail" ou multivalentes ou de combinação e produtos derivados das mesmas que não possuem interferência de eficácia em caninos, podendo ser administradas a outros hospedeiros, como sejam felinos (como uma composição recombinante de poxvírus e raiva ou como um componente na composição "cocktail" ou de combinação ou multivalente) e podendo induzir resposta ou protecção a longo prazo em cães e resposta ou protecção em cachorros apesar da imunidade materna, será um avanço muito desejável relativamente à actual tecnologia.

SUMÁRIO DO INVENTO

É portanto um objectivo deste invento proporcionar vírus recombinantes modificados mais seguros e proporcionar um método para a preparação de tais vírus recombinantes.

Outros objectivos deste invento incluem: proporcionar uma composição de poxvírus recombinante ou uma composição de antigénio, de preferência uma composição recombinante de poxvírus-raiva, a qual é uma composição antigénica ou vacinal ou imunológica (i.e., uma composição

contendo um recombinante que expressa um antigénio da raiva, ou o produto da expressão do antigénio), preferencialmente, tal composição terá um aumento do nível de segurança e/ou eficácia comparativamente com composições conhecidas e composições "cocktail" ou multivalentes ou de combinação; proporcionar métodos para a sua preparação e utilização; e, mais de preferência, proporcionar composições que possam ser eficazes como composições "cocktail" ou multivalentes ou de combinação para caninos, assim como para outros hospedeiros, tais como felinos e que também devem, de preferência, poder proporcionar resposta ou protecção a longo prazo, especialmente em caninos, e/ou uma resposta ou protecção apesar da imunidade materna.

Constitui ainda um objectivo deste invento proporcionar um vector modificado para a expressão de um produto génico num hospedeiro, em que o vector é modificado de forma que tenha virulência atenuada no hospedeiro.

Também descrevemos um método para a expressão de um produto génico numa cultura celular *in vitro* usando um vírus recombinante modificado tendo um maior nível de segurança e para a utilização de tal produto em composições.

Estes e outros objectivos e vantagens do presente invento serão mais aparentes após consideração do que se segue.

Descreve-se um vírus recombinante modificado, tendo funções genéticas virais inactivadas, de forma que o vírus recombinante possui virulência atenuada e maior segurança. As funções podem ser não essenciais ou associadas à virulência. O vírus é um vírus da varíola dos canários. O vírus recombinante modificado inclui, dentro de uma região não essencial do genoma viral, uma sequência de DNA heteróloga que codifica um antígeno ou epitopo derivado de vírus da raiva, com antígenos de outros agentes patogénicos.

Num aspecto, o presente invento está relacionado com uma composição antigénica, imunológica ou de vacina ou uma composição terapêutica para a indução de uma resposta antigénica ou imunológica ou protectora num animal hospedeiro inoculado com a composição, a referida composição incluindo um veículo e um vírus recombinante modificado tendo funções genéticas virais não essenciais inactivadas, de forma que o vírus recombinante possua virulência atenuada e maior segurança. O vírus usado na composição de acordo com o presente invento é um vírus da varíola dos canários. O vírus recombinante modificado inclui, dentro de uma região não essencial do genoma viral, uma sequência de DNA heteróloga que codifica pelo menos um epitopo da glicoproteína G da raiva e ainda, a composição possui antígenos suplementares, como seja qualquer um de entre: antígeno do vírus da esgana canina, e.g., glicoproteínas HA e/ou F de CDV, antígeno de adenovírus canino tipo 2, antígeno de coronavírus canino, antígeno

de parainfluenza canina, antigénio de parvovírus canino, antigénio da Bacterina de *Leptospira canicola* - *icterohaemorrhagiae*, qualquer combinação destes antigénios; ou outros recombinantes tais como recombinantes de outros poxvírus que expressem um ou a totalidade destes antigénios suplementares.

Num outro aspecto, o presente invento está relacionado com utilizações que empregam a referida composição para a preparação de um medicamento ou tratamento imunológico ou indução de uma resposta imunológica num indivíduo ou animal; por exemplo, para obtenção de uma resposta *in vivo* contra o antigénio da raiva sozinho ou conjuntamente com qualquer um de entre: antigénio de vírus da esgana canina, e.g., glicoproteínas HA e/ou F de CDV, antigénio de adenovírus canino tipo 2, antigénio de coronavírus canino, antigénio de parainfluenza canina, antigénio de parvovírus canino, antigénio da Bacterina de *Leptospira canicola* - *icterohaemorrhagiae* ou qualquer combinação destes antigénios. O medicamento pode ser administrado a caninos ou a outros hospedeiros, como sejam felinos. O medicamento pode ser administrado a caninos ou outros hospedeiros para imunidade ou resposta a longo prazo ou para resposta ou protecção de recém-nascidos, e.g., cachorros, apesar da imunidade materna.

O presente invento descreve um método para a expressão do produto de um gene numa célula *in vitro*, através da introdução numa célula de um vírus recombinante

modificado tendo virulência atenuada e maior segurança. O vírus recombinante modificado pode incluir, dentro de uma região não essencial do genoma viral, uma sequência de DNA heteróloga que codifica uma proteína antigénica, e.g. derivada de vírus da raiva. O produto pode então ser administrado a indivíduos ou animais para estimular uma resposta imune e a administração pode ser do antígeno isolado ou em conjunto com outros antígenos numa composição multivalente ou "cocktail". Os anticorpos induzidos podem ser úteis nos indivíduos para a prevenção ou tratamento da raiva ou de outras doenças e os anticorpos de indivíduos ou de animais ou os produtos de expressão *in vitro* isolados podem ser usados em estojos ("kits") de diagnóstico, ensaios ou testes para determinar a presença ou ausência numa amostra, tal como soros, da raiva ou de outros agentes patogénicos ou antígenos derivados dos mesmos ou anticorpos contra eles (e portanto a ausência ou presença do vírus ou dos produtos, ou de uma resposta imune contra o vírus ou antígenos).

Assim, o presente invento está relacionado com um vírus recombinante modificado e composições que incluem os mesmos, com antígenos suplementares ou recombinantes suplementares expressando tais antígenos numa composição "cocktail", ou de combinação ou multivalente, e com utilizações que empregam tal vírus ou composição para induzir uma resposta num hospedeiro, e.g., caninos, felinos, caninos tendo imunidade materna. O vírus pode ter inactivadas funções genéticas virais não essenciais de

forma que o vírus possui virulência atenuada e o vírus recombinante modificado ainda contem DNA de uma fonte heteróloga numa região não essencial do genoma viral. O DNA codifica o antigénio do vírus da raiva, em combinação com outros antigénios de outras doenças. Em particular, as funções genéticas são inactivadas através da deleção de uma grelha de leitura aberta codificadora de um factor de virulência ou através da utilização de vírus naturalmente restringidos em termos de gama de hospedeiros. O vírus usado de acordo com o presente invento é um vírus da varíola dos canários.

Um poxvírus adequado é um ALVAC que foi atenuado, por exemplo, através de mais de 200 passagens seriadas em fibroblastos embrionários de galinha, um lote assim obtido foi sujeito a quatro purificações sucessivas de placas em agar, a partir da qual um clone foi amplificado através de cinco passagens adicionais.

É igualmente descrito o produto de expressão do recombinante de poxvírus-raiva do invento e suas utilizações, como seja para formar composições antigénicas, imunológicas ou de vacinas, especialmente composições multivalentes, ou "cocktail" ou de combinação, para administração a um hospedeiro, e.g., animais, tais como caninos ou felinos, ou a um animal recém-nascido ou para administração para protecção ou resposta a longo prazo ou para tratamento, prevenção, diagnóstico ou testagem, e métodos que empregam tais composições.

No entanto, é nesta altura salientado que uma composição multivalente, ou "cocktail" ou de combinação, compreende qualquer um de: (i) uma composição contendo um recombinante de vírus da varíola dos canários-raiva de acordo com o invento e um antigénio suplementar que é um antigénio derivado de: antigénio do vírus da esgana canina, e.g., glicoproteínas HA e/ou F de CDV, antigénio de adenovírus canino tipo 2, antigénio de coronavírus canino, antigénio de parainfluenza canina, antigénio de parvovírus canino, antigénio da bacterina de *Leptospira canicola - icterohaemorrhagiae* ou qualquer combinação destes antigénios; ou (ii) uma composição contendo um recombinante de vírus da varíola dos canários-raiva do presente invento e um outro recombinante de poxvírus que codifica e expressa um outro antigénio, que é um antigénio derivado de qualquer um de: antigénio do vírus da esgana canina, e.g., glicoproteínas HA e/ou F de CDV, antigénio de adenovírus canino tipo 2, antigénio de coronavírus canino, antigénio de parainfluenza canina, antigénio de parvovírus canino, antigénio da bacterina de *Leptospira canicola - icterohaemorrhagiae* ou qualquer combinação destes antigénios; ou (iii) uma combinação contendo um vírus da varíola dos canários recombinante do presente invento que codifica e expressa antigénio da raiva e um antigénio suplementar que é um antigénio seleccionado de entre: antigénio do vírus da esgana canina, e.g., glicoproteínas HA e/ou F de CDV, antigénio de adenovírus canino tipo 2, antigénio de coronavírus canino, antigénio de parainfluenza canina,

antigénio de parvovírus canino, antigénio da bacterina de *Leptospira canicola* - *icterohaemorrhagiae* ou qualquer combinação destes antigénios. Certamente, em (i), o recombinante poxvírus-raiva pode ser substituído com o produto de expressão derivado do mesmo; em (ii), o recombinante de poxvírus-raiva pode codificar e expressar antigénios suplementares; e em (iii) podem estar presentes antigénios suplementares.

Descreve-se a descoberta de que os recombinantes de ALVAC, particularmente recombinantes de ALVAC-raiva, não apresentam interferência de eficácia em combinação com outros antigénios, sejam os antigénios suplementares presentes como antigénios ou como produto da co-expressão ou expressão simultânea (ao derivarem da expressão do mesmo recombinante ou de outro recombinante (S)); e que os recombinantes ALVAC-raiva proporcionam protecção a longo prazo e protecção na presença de imunidade materna. O presente invento não requer necessariamente um adjuvante e pode empregar um ou mais recombinantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A descrição detalhada que se segue, dada como exemplo, mas não destinada a limitar o invento às realizações específicas descritas, poderá ser melhor entendida conjuntamente com os desenhos apensos, em que:

FIG. 1 mostra esquematicamente um método para a

construção do plasmídeo pSD460 para deleção do gene da cinase de timidina e geração do vírus da vacina recombinante vP410;

FIG. 2 mostra esquematicamente um método para a construção do plasmídeo pSD486 para deleção da região hemorrágica e geração do vírus da vacina recombinante vP553;

FIG. 3 mostra esquematicamente um método para a construção do plasmídeo pMP494 Δ para deleção da região ATI e geração do vírus da vacina recombinante vP618;

FIG. 4 mostra esquematicamente um método para a construção do plasmídeo pSD467 para deleção do gene da hemaglutinina e geração do vírus da vacina recombinante vP723;

FIG. 5 mostra esquematicamente um método para a construção do plasmídeo pMPCK1 Δ para deleção do grupo de genes [C7L-KIL] e geração do vírus da vacina recombinante vP804;

FIG. 6 mostra esquematicamente um método para a construção do plasmídeo pSD548 para deleção da subunidade grande da redutase de ribonucleótidos e geração do vírus da vacina recombinante vP866 (NYVAC);

FIG. 7 mostra esquematicamente um método para a

construção do plasmídeo pRW842 para inserção do gene da glicoproteína G da raiva no locus da deleção de TK e geração do vírus da vacina recombinante vP879;

FIG. 8 mostra a sequência de DNA (SEQ ID NO:27) de um fragmento PvuII do vírus da varíola dos canários contendo a ORF C5.

FIGS. 9A e 9B mostram esquematicamente um método para a construção do vírus da varíola dos canários recombinante vCP65 (ALVAC-RG);

FIG. 10 mostra esquematicamente as ORFs deletadas para gerar NYVAC; e

FIGS. 11A a 11D mostram os gráficos dos títulos de anticorpos neutralizantes contra a raiva (RFFIT, UI/ml), efeito de reforço de HDC e vCP65 ($10^{5,5}$ TCID₅₀) em voluntários previamente imunizados com a mesma vacina ou com uma vacina alternativa (vacinas dadas nos dias 0, 28 e 180, títulos de anticorpos medidos nos dias 0, 7, 28, 35, 56, 173, 187 e 208).

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O ALVAC é um vector atenuado, baseado no vírus da varíola dos canários, que é um derivado obtido por clonagem de placas da vacina autorizada para o vírus da varíola dos canários, Kanapox (Tartaglia et al., 1992). ALVAC tem

algumas propriedades gerais que são as mesmas propriedades gerais de Kanapox. Também se demonstrou que os vírus recombinantes baseados em ALVAC expressando imunogénios extrínsecos são eficazes como vectores de vacinas (Tartaglia et al., 1993a,b). Este vector avipox está restringido a espécies aviárias para a replicação produtiva. Nas culturas de células humanas, a replicação do vírus da varíola dos canários é abortada na fase precoce do ciclo de replicação viral antes da síntese de DNA viral. No entanto, quando manipulados para expressar imunogénios extrínsecos, observa-se expressão e processamentos autênticos *in vitro* em células de mamífero e a inoculação em numerosas espécies de mamífero induz resposta imune humoral e celular contra o imunogénio extrínseco e proporciona protecção contra a exposição ao agente patogénico cognato (Taylor et al., 1992; Taylor et al., 1991b). Os recentes ensaios clínicos de Fase I, na Europa e nos Estados Unidos, de um recombinante de vírus da varíola dos canários/glicoproteína da raiva (ALVAC-RG) demonstraram que a vacina experimental é bem tolerada e induz níveis protectores de títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva (Cadoz et al., 1992; Fries et al., 1992). Ainda, células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) derivadas dos vacinados com ALVAC-RG demonstraram níveis significativos de proliferação de linfócitos quando estimulados com vírus da raiva purificado (Fries et al., 1992).

NYVAC, ALVAC e TROVAC também foram reconhecidos

como únicos entre todos os poxvírus pelo Recombinant DNA Advisory Committee do National Institute of Health ("NIH") (U.S. Public Health Service), que publica as normas de contenção física de material genético, como sejam vírus e vectores, *i.e.*, normas de procedimentos de segurança para a utilização de tais vírus e vectores baseadas na patogenicidade do vírus ou vector particular, o qual deu uma redução do nível de contenção física: de BSL2 para BSL1. Nenhum outro poxvírus tem um nível de contenção física BSL1. Mesmo a estirpe Copenhagen do vírus da vacina - a vacina mais comum contra a varíola - tem um nível de contenção física mais elevado; designadamente BSL2. Assim, na área foi reconhecido que NYVAC, ALVAC e TROVAC possuem uma patogenicidade mais baixa que qualquer outro poxvírus.

Claramente baseado nos perfis de atenuação dos vectores NYVAC, ALVAC e TROVAC e na sua demonstrada capacidade para induzir respostas imunológicas, humoral e celular, contra imunogénios extrínsecos (Tartaglia *et al.*, 1993a,b; Taylor *et al.*, 1992; Konishi *et al.*, 1992) tais vírus recombinantes oferecem uma vantagem distinta relativamente a vírus recombinantes baseados em vírus da vacina.

O processo de administração para o vírus recombinante poxvírus-raiva ou para o seu produto de expressão, composições do invento tais como composições imunológicas, antigénicas ou de vacina ou composições terapêuticas, incluindo composições multivalentes,

"cocktail" ou de combinação, pode ser através de uma via parental (intradérmica, intramuscular ou subcutânea). Tal administração permite uma resposta imune sistémica.

Mais genericamente, as composições antigénicas, imunológicas ou de vacina de poxvírus-raiva ou composições terapêuticas (composições contendo recombinantes de poxvírus-vírus da raiva do invento) podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas dos familiarizados com o campo farmacêutico ou veterinário. Tais composições podem ser administradas em dosagens e através de técnicas conhecidas dos familiarizados com a área médica ou veterinária, tendo em consideração factores tais como idade, sexo, peso, espécie e condição do doente particular e da via de administração. A composição é co-administrada ou administrada sequencialmente com composições do invento ou com composições "suplementares" imunológicas, antigénicas ou de vacina ou terapêuticas, proporcionando assim composições multivalentes, ou "cocktail" ou de combinação, do invento e utilizações que as empregam.

Tais composições "suplementares" incluem antígenos purificados de qualquer um de entre:

antígeno do vírus da esgana canina, e.g., glicoproteínas HA e/ou F de CDV, antígeno de adenovírus canino tipo 2, antígeno de coronavírus canino, antígeno de parainfluenza canina, antígeno de parvovírus canino, antígeno da bacterina de *Leptospira canicola* - *icterohaemorrhagiae* ou

qualquer combinação destes antigénios;

ou da expressão *in vitro* de tais antigénios por um poxvírus recombinante ou outro sistema vector; ou tais composições "suplementares" podem incluir um ou mais poxvírus recombinantes que expressam antigénios derivados de:

antigénio do vírus da esgana canina, e.g., glicoproteínas HA e/ou F de CDV, antigénio de adenovírus canino tipo 2, antigénio de coronavírus canino, antigénio de parainfluenza canina, antigénio de parvovírus canino, antigénio da bacterina de *Leptospira canicola - icterohaemorrhagiae* ou qualquer combinação destes antigénios. Novamente, os ingredientes e forma (sequenciada ou co-administração) de administração, assim como as dosagens podem ser determinados tendo em consideração factores tais como idade, sexo, peso, espécies e condição do doente particular e da via de administração. Neste aspecto deve-se referir W09526751 dirigida a sequências nucleotídicas e de aminoácidos de antigénios de herpesvírus canino e seus recombinantes e suas utilizações e W0952778 dirigida a recombinantes de poxvírus-vírus da esgana canina (CDV) e composições e métodos que empregam esses recombinantes.

Exemplos de composições do invento incluem preparações líquidas para administração, e.g., oral, nasal, anal, vaginal, peroral, intragástrica, etc., a administração de tais suspensões, xaropes ou elixires; e preparações para administração parentérica, subcutânea, intra-

dérmica, intramuscular ou intravenosa (e.g., administração injectável) como sejam suspensões ou emulsões estéreis. Em tais composições o poxvírus recombinante ou antigénios podem ser misturados com um veículo, diluente ou excipiente adequado, como seja água, soro fisiológico, glucose ou similares estéreis. As composições podem também ser liofilizadas. As composições podem conter substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tamponantes de pH, aditivos de gelificação ou estimuladores da viscosidade, conservantes, agentes aromatizantes, corantes e similares, dependendo da via de administração e da preparação pretendida. Livros de texto convencionais tais como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17^a edição, 1985, podem ser consultados para produzir preparações adequadas, sem experimentação adicional. As dosagens adequadas podem ser igualmente baseadas nos exemplos abaixo.

Ainda, os produtos de expressão dos poxvírus recombinantes do invento e composições compreendendo os mesmos podem ser usados directamente para estimular uma resposta imune em indivíduos ou em animais. Assim, os produtos de expressão podem ser usados em composições do invento em vez do poxvírus recombinante do invento ou para além dele nas composições atrás referidas.

Ainda, o poxvírus recombinante do invento e os produtos de expressão derivados do mesmo e composições do invento estimulam uma resposta imune ou de anticorpos em

seres humanos e animais; e assim, estes produtos são antigénicos. A partir destes anticorpos ou antigénios podem ser preparados, por técnicas conhecidas, anticorpos monoclonais e esses anticorpos monoclonais ou os antigénios podem ser empregues em ensaios conhecidos de ligação de anticorpos, estojos ("kits") de diagnóstico ou testes para determinar a presença ou ausência de antigénios particulares da raiva ou outros; e, conseqüentemente, a presença ou ausência do vírus ou "outra" doença ou a expressão de um ou mais antigénios (na raiva ou "noutros" sistemas antigénicos) ou para determinar se uma resposta imune contra o vírus ou "outra" doença ou "outros" antigénios foi simplesmente estimulada. Aqueles anticorpos monoclonais ou os antigénios podem ser igualmente empregues em cromatografia de imunoabsorção para recuperar ou isolar raiva ou "outros" agentes patogénicos ou produtos de expressão do poxvírus recombinante do invento ou composições do invento.

Os métodos para a produção de anticorpos monoclonais e para a utilização de anticorpos monoclonais e utilizações e métodos contra a raiva ou "outros" antigénios - os produtos de expressão dos poxvírus e composições do invento - são conhecidos dos familiarizados com a área. Podem ser usados em métodos, estojos ("kits"), testes ou ensaios de diagnóstico, assim como para recuperar materiais por cromatografia de imunoabsorção ou por imunoprecipitação.

Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas produzidas por células de hibridoma. Um anticorpo monoclonal reage com um único determinante antigénico e proporciona maior especificidade do que um anticorpo convencional derivado do soro. Ainda, o rastreio de um grande número de anticorpos monoclonais torna possível seleccionar um anticorpo individual com especificidade, avidéz e isotipo pretendidos. As linhas celulares de hibridoma proporcionam uma fonte constante e pouco dispendiosa de anticorpos quimicamente idênticos e preparações de tais anticorpos podem ser facilmente normalizados. Os métodos para a produção de anticorpos monoclonais são conhecidos dos familiarizados com a matéria, e.g., Koprowski, H. *et al.*, Patente U.S. N° 4196265, publicado em 1 de Abril, 1989.

São conhecidas as utilizações de anticorpos monoclonais. Uma dessas utilizações é em métodos de diagnóstico, e.g., David, G. e Greene, H, Patente U.S. N° 4376110, publicada em 8 de Março, 1983.

Os anticorpos monoclonais foram igualmente usados para recuperar materiais por cromatografia de imunoabsorção, e.g., Milstein, C. 1980, *Scientific American* 243:66, 70.

Assim, o poxvírus recombinante e composições do invento possuem várias utilidades aqui estabelecidas. Existem também outras utilidades para as realizações do invento.

Uma melhor compreensão do presente invento e das suas muitas vantagens surgirá dos exemplos que se seguem, descritos a título exemplificativo.

EXEMPLOS

Clonagem e síntese de DNA: Construíram-se, testaram-se e amplificaram-se plasmídeos de acordo com procedimentos convencionais (Maniatis *et al.*, 1982; Perkus *et al.*, 1985; Piccino *et al.*, 1987). As endonucleases de restrição foram adquiridas à Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, New England Biolabs, Beverly, MA; e Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN. O fragmento Klenow da polimerase de *E. coli* foi adquirido à Boehringer Mannheim Biochemicals. A exonuclease BAL-31 e a ligase de DNA de T4 foram adquiridas à New England Biolabs. Os reagentes foram usados como especificado pelos vários fornecedores.

Os oligodesoxirribonucleótidos sintéticos foram preparados num sintetizador de DNA Applied Biosystems 380B como anteriormente descrito (Perkus *et al.*, 1989). A sequenciação de DNA foi realizada pelo método de terminação de cadeias didesoxi (Sanger *et al.*, 1977) usando Sequenase (Tabor *et al.*, 1987) como anteriormente descrito (Guo *et al.*, 1989). A amplificação por reacção em cadeia da polimerase (PCR) para verificação da sequência (Engelke *et al.*, 1988) foi realizada usando sequências iniciadoras

sintetizadas por encomenda e o estojo ("kit") de reagentes de amplificação de DNA GeneAmp (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) num termociclador automático Perkin Elmer Cetus DNS Thermal Cycler. As sequências de DNA em excesso foram eliminadas dos plasmídeos através de digestão com endonucleases de restrição, seguida de digestão limitada pela exonuclease BAL-31 e mutagénese (Mandeki, 1986) usando oligonucleótidos sintéticos.

Células, vírus e transfecção. As origens e condições de cultura da estirpe Copenhagen do vírus da vacina foram anteriormente descritas (Guo *et al.*, 1989). A geração de vírus recombinantes através de recombinação, hibridação *in situ* de filtros de nitrocelulose e rastreio da actividade de β -galactosidase foram anteriormente descritos (Piccini *et al.*, 1987).

As origens e condições de cultura da estirpe Copenhagen do vírus da vacina e NYVAC foram anteriormente descritas (Guo *et al.*, 1989; Tartaglia *et al.*, 1992). A geração de vírus recombinantes através de recombinação, hibridação *in situ* de filtros de nitrocelulose e rastreio da actividade de β -galactosidase foram anteriormente descritos (Panicali *et al.*, 1982; Perkus *et al.*, 1989).

O vírus da varíola dos canários parental (estirpe Rentschler) é uma estirpe vacinal para canários. A estirpe vacinal foi obtida a partir de um isolado selvagem e atenuada através de mais de 200 passagens seriadas em

fibroblastos embrionários de galinha. Um stock viral de partida foi sujeito a quatro purificações de placas consecutivas em agar e um clone de uma placa foi amplificado através de cinco passagens adicionais, após o que o stock de vírus foi usado como vírus parental em testes de recombinação *in vitro*. O isolado do vírus da varíola dos canários purificado de placas foi designado ALVAC.

A estirpe de vírus da varíola das galinhas (FPV) designada FP-1 foi anteriormente descrita (Taylor et al., 1988a). É uma estirpe vacinal atenuada útil para a vacinação de pintos com dias de idade. A estirpe Duvette do vírus parental foi adquirida em França como uma pústula de vírus da varíola das galinhas. O vírus foi atenuado através de aproximadamente 50 passagens seriadas em ovos embrionados de galinha, seguido de 25 passagens em células fibroblásticas de embrião de galinha. O vírus foi sujeito a quatro purificações sucessivas de placas. Um isolado de placa foi ainda amplificado em células primárias CEF e estabelecido um stock de vírus, designado TROVAC.

Os vectores virais NYVAC, ALVAC e TROVAC e seus derivados foram propagados como descrito anteriormente (Piccini et al., 1987; Taylor et al., 1988a,b). Células Vero e fibroblastos embrionários de galinha (CEF) foram propagados como descrito anteriormente (Taylor et al., 1988a,b)

Relativamente a NYVAC e especialmente aos Exemplos 1 a 6, é feita referência à Patente US N° 5364773.

EXEMPLO 1 (Preparativo)CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PSD460 PARA DELEÇÃO DO GENE DA
CINASE DE TIMIDINA (J2R)

Referindo agora a FIG. 1, o plasmídeo pSD406 possui HindIII J do vírus da vacina (pos. 83359-88377) clonado em pUC8. pSD406 foi cortado com HindIII e PvuII e o fragmento de 1,7 Kb do lado esquerdo de HindIII J clonado em pUC8 cortado com HindIII/SmaI, formando pSD447. pSD447 possui a totalidade do gene J2R (pos. 83855-84385). O codão de iniciação está contido num local NlaIII e o codão de terminação está contido no local SspI. A direcção da transcrição está indicada por uma seta na FIG. 1.

Para obter o braço flanqueante esquerdo, foi isolado um fragmento HindIII/EcoRI de 0,8 Kb a partir de pSD447, depois digerido com NlaIII e isolado um fragmento HindIII/NlaIII de 0,5 Kb. Os oligonucleótidos sintéticos MPSYN43/MPSYN44 (SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2)

			<u>SmaI</u>	
MPSYN43	5'	TAATTA	ACTAGCTACCCGGG	3'
MPSYN44	3'	GTACATTAATTGATCGATGGGCCCTTAA		5'
		<u>NlaIII</u>	<u>EcoRI</u>	

foram ligados com o fragmento HindIII/NlaIII de 0,5 Kb no vector pUC18 cortado com HindIII/EcoRI, dando origem ao plasmídeo pSD449.

Para se obter um fragmento de restrição contendo o braço flanqueante direito do vírus da vacina e sequências do vector pUC, pSD447 foi cortado com SspI (parcial) dentro de sequências do vírus da vacina e HindIII na junção pUC/vírus da vacina e isolado um fragmento vector de 2,9 Kb. Este fragmento vector foi ligado aos oligonucleótidos sintéticos MPSYN45/MPSYN46 emparelhados (SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:4)

```

      HindIII SmaI
MPSYN45 5' AGCTTCCCGGGTAAGTAATACCTCAAGGAGAAAACGAA
MPSYN46 3'      AGGGCCCATTCATTATGCAGTTCCTCTTTTGCTT

```

```

      NotI           SspI
ACGATCTGTAGTTAGCGGCCCTAATTAACTAAT 3' MPSYN45
TGCTAGACATCAATCGCCGGCGGATTAATTGATTA 5' MPSYN46

```

dando origem a pSD459.

Para combinar os braços flanqueantes esquerdo e direito num plasmídeo, um fragmento HindIII/SmaI de 0,5 Kb foi isolado a partir de pSD449 e ligado ao plasmídeo vector pSD459 cortado com HindIII/SmaI, dando origem ao plasmídeo pSD460. pSD460 foi usado como plasmídeo dador para recombinação com a estirpe Copenhagen do vírus da vacina parental tipo selvagem VC-2. Sintetizou-se uma sonda marcada com ³²P através de extensão de uma sequência iniciadora usando MPSYN45 (SEQ ID NO:3) como matriz e o oligonucleótido complementar de 20 meros MPSYN47 (SEQ ID NO:5) (5' TTAGTTAATTAGGCGGCCGC 3') como sequência inici-

adora. O vírus recombinante vP410 foi identificado por hibridação de placas.

EXEMPLO 2 (Preparativo) - CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PSD846 PARA DELEÇÃO DA REGIÃO HEMORRÁGICA (B13R + B14R)

Referindo agora a FIG. 2, o plasmídeo pSD419 possui SalIG do vírus da vacina (pos. 160744 - 173351) clonado em pUC8. pSD422 possui o fragmento SalI contíguo do vírus da vacina para a direita, SalI J (pos. 173351 - 182746) clonado em pUC8. Para construir um plasmídeo deletado na região hemorrágica, u, B13R - B14R (pos. 172549 - 173552), pSD419 foi usado como fonte para o braço flanqueante esquerdo e pSD422 foi usado como fonte do braço flanqueante direito. A direcção da transcrição para a região u está indicada por uma seta na FIG. 2.

Para remover sequências indesejáveis de pSD419, as sequências para a esquerda do local NcoI (pos. 172253) foram removidos por digestão de pSD419 com NcoI/SmaI seguido de produção de extremos cerses com o fragmento Klenow da polimerase de *E. coli* e ligação dando origem ao plasmídeo pSD476. Um braço flanqueante direito do vírus da vacina foi obtido por digestão de pSD422 com HopI no codão de terminção de B14R e por digestão com NruI 0,3 Kb para a direita. Este fragmento de 0,3 Kb foi isolado e ligado com um fragmento vector HincII de 3,4 Kb isolado a partir de pSD476, dando origem ao plasmídeo pSD477. A localização da deleção parcial da região u do vírus da vacina em pSD477

está indicada por um triângulo. As restantes sequências codificadoras de B13R em pSD477 foram removidas por digestão com ClaI/HpaI e o fragmento vector resultante foi ligado com os oligonucleótidos sintéticos emparelhados SD22mero/SD20mero (SEQ ID NO6/SEQ ID NO:7)

		<u>ClaI</u>		<u>BamHI</u>	<u>HpaI</u>	
SD22mer	5'	CGATTACTATGAAGGATCCGTT				3'
SD20mer	3'	TAATGATACTTCCTAGGCAA				5'

dando origem a pSD479. pSD479 possui um codão de iniciação (sublinhado) seguido de um local BamHI. Para colocar Beta-galactosidase de *E. coli* no locus da deleção (u) B13-B14 sob o controlo do promotor u, um fragmento BamHI de 3,2 Kb contendo o gene da Beta-galactosidase (Shapira et al., 1983) foi inserido no local BamHI de pSD479, dando origem a pSD479BG. pSD479BG foi usado como plasmídeo dador para recombinação com o vírus da vacina vP410. O vírus da vacina recombinante vP533 foi isolado como uma placa azul na presença do substrato cromogénico X-gal. Em vP533 a região B13R-B14R foi eliminada e substituída por Beta-galactosidase.

Para remover as sequências de Beta-galactosidase de vP533, o plasmídeo pSD486, foi utilizado um derivado de pSD477 contendo uma região de poliadaptador mas sem codão de iniciação na junção da deleção u. Primeiro o fragmento vector ClaI/HpaI de pSD477 referido atrás foi ligado aos oligonucleótidos sintéticos emparelhados SD42mero/SD40mero (SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:9)

```

          ClaI          SacI          XhoI          HpaI
SD42mer  5' CGATTACTAGATCTGAGCTCCCCGGGCTCGAGGGATCCGTT 3'
SD40mer  3'  TAATGATCTAGACTCGAGGGGCGGAGCTCCCTAGGCAA 5'
          BglII          SmaI          BamHI

```

dando origem ao plasmídeo pSD478. Em seguida o local EcoRI na junção pUC/vírus da vacina foi destruído através da digestão de pSD478 com EcoRI seguido de preenchimento dos extremos com o fragmento Klenow da polimerase de *E. coli* e ligação, dando origem ao plasmídeo pSD478E⁻. pSD478E⁻ foi digerido com BamHI e HpaI e ligado com os oligonucleótidos sintéticos emparelhados HEM5/HEM6 (SEQ ID NO:10/SEQ ID NO:11)

```

          BamHI EcoRI HpaI
HEM5  5' GATCCGAATTCTAGCT 3'
HEM6  3' GCTTAAGATCGA 5'

```

dando origem ao plasmídeo pSD486. pSD486 foi usado como plasmídeo dador para recombinação com o vírus da vacina recombinante vP533, dando origem a vP553, o qual foi isolado como uma placa transparente na presença de X-Gal.

EXEMPLO 3 - CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PMP494Δ PARA DELEÇÃO DA REGIÃO ATI (A26L)

Referindo agora a Fig. 3, pSD414 possui SalIB clonado em pUC8. Para remover as sequências de DNA indesejáveis para a esquerda da região A26L, pSD414 foi cortado com XbaI dentro das sequências do vírus da vacina (pos. 137079) e com HindIII na junção pUC/vírus da vacina, depois dotado de extremos cerses com o fragmento Klenow da

polimerase de *E. coli* e ligado, resultando no plasmídeo pSD483. Para remover sequências de DNA do vírus da vacina para a direita da região A26L, pSD483 foi cortado com EcoRI (pos. 140665 e na junção pUC/vírus da vacina) e ligado, formando o plasmídeo pSD484. Para remover a região codificadora A26L, pSD484 foi cortado com NdeI (parcial) a montante da ORF A26L (pos. 139004) e com HpaI (pos. 137889) ligeiramente a jusante da ORF A26L. O fragmento vector de 5,2 Kb foi isolado e ligado aos oligonucleótidos sintéticos emparelhados ATI3/ATI4 (SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:13)

```

      NdeI
ATI3 5' TATGAGTAACTTAACTCCTTTGTTAATTAAAAGTATATTCAAAAAATAAGT
ATI4 3' ACTCATTGAATTGAGAAAACAATTAATTTTCATATAAGTTTTTATTCA

```

```

      BglII EcoRI HpaI
TATATAAATAGATCTGAATTCGTT 3' ATI3
ATATATTTATCTAGACTTAAGCAA 5' ATI4

```

reconstruindo a região a montante de A26L e substituindo a ORF A26L com uma região de poli-adaptador mais curta contendo os locais de restrição BglII, EcoRI e HpaI, como indicado atrás. O plasmídeo resultante foi designado pSD485. Uma vez que os locais BglII e EcoRI na região do poli-adaptador de pSD485 não são únicos, os locais BglII e EcoRI indesejáveis foram removidos do plasmídeo pSD483 (descrito atrás) através de digestão com BglII (pos. 140136) e com EcoRI na junção pUC/vírus da vacina, seguido de preenchimento dos extremos com o fragmento Klenow da polimerase de *E. coli* e ligação. O plasmídeo resultante foi designado pSD489. O fragmento ClaI (pos. 137198)/EcoRV

(139048) de 1,8 Kb derivado de pSD489 contendo a ORF A26L foi substituído com o correspondente fragmento ClaI/EcoRV de 0,7 Kb, contendo o poli-adaptador, derivado de pSD485, dando origem a pSD492. Os locais BglII e EcoRI na região do poli-adaptador de pSD492 são únicos.

Uma cassette BglII de 3,3 Kb contendo o gene da Beta-galactosidase de *E. coli* (Shapira et al., 1983), sob o controle do promotor 11 KDa do vírus da vacina (Bertholet et al., 1985; Perkus et al., 1990), foi inserida no local BglII de pSD492, formando pSD493KBG. O plasmídeo pSD493KBG foi usado para recombinação com o vírus de resgate vP553. O vírus da vacina recombinante, vP581, contendo Beta-galactosidase na região da deleção de A26L, foi isolado como uma placa azul na presença de X-gal.

Para gerar um plasmídeo para a remoção de sequências de Beta-galactosidase do vírus da vacina recombinante vP581, a região do poliadaptador do plasmídeo pSD492 foi eliminada por mutagênese (Mandecki, 1986) usando o oligonucleótido sintético MPSYN177 (SEQ ID NO:14) (5' AAAATGGGCGTGGATTGTAACTTTATATAACTTATTTTTTGAATATAC 3'). No plasmídeo resultante, pMP494Δ, removeu-se DNA do vírus da vacina abrangendo as posições 137889-138937, incluindo a totalidade da ORF A26L. A recombinação entre o pMP494Δ e o recombinante do vírus da vacina contendo a Beta-galactosidase, vP581, resultou no mutante com deleção vP618, o qual foi isolado como uma placa transparente na presença de X-gal.

EXEMPLO 4 - CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PMP467 PARA DELEÇÃO DO GENE DA HEMAGLUTININA (A56R)

Referindo agora a Fig. 4, o fragmento de restrição SalI G do vírus da vacina (pos. 160744-173351) atravessa a junção HindIII A/B (pos. 162539). pSD419 possui SalI G do vírus da vacina clonado em pUC8. A direcção da transcrição para o gene da hemaglutinina (HA) está indicada por uma seta na Fig. 4. As sequências do vírus da vacina derivadas de HindIII B foram removidas por digestão de pSD419 com HindIII dentro das sequências do vírus da vacina e na junção pUC/vírus da vacina, seguido de ligação. O plasmídeo resultante, pSD456, possui o gene HA, A56R, flanqueado por 0,4 Kb de sequências do vírus da vacina para a esquerda e 0,4 Kb de sequências do vírus da vacina para a direita. As sequências codificadoras de A56R foram removidas cortando pSD456 com RsaI (parcial; pos. 161090) a montante das sequências codificadoras de A56R e com EagI (pos. 162054) perto do extremo do gene. O fragmento vector RsaI/EagI derivado de pSD456 foi isolado e ligado com oligonucleótidos sintéticos emparelhados MPSYN59 (SEQ ID NO:15), MPSYN62 (SEQ ID NO:17) e MPSYN61 (SEQ ID NO:18)

RsaI

MPSYN59 5' ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTATAGGT-
MPSYN62 3' TGTGCTTACTAAAAGATTTTCATAAACCTTTCAAAATATCCA-

MPSYN59 AGTTGATAGAACAAAATACATAATTT 3'
MPSYN62 TCAACTATCT 5'

MPSYN60 5' TGTAATAAATAATCACTTTTTATA-
 MPSYN61 3' TGTTTTATGTATTAAACATTTTATTAGTGAAAAATAT-

	<u>Bgl</u> III	<u>Sma</u> I	<u>Pst</u> I	<u>Eag</u> I	
MPSYN60	CTAAGATCTCCCGGGCTGCAGC				3'
MPSYN61	GATTCTAGAGGGCCCGACGTCGCCG				5'

reconstruindo as sequências de DNA a montante da ORF A56R e substituindo a ORF A56R com uma região de poli-adaptador como indicado atrás. O plasmídeo resultante é pSD466. A deleção de sequências do vírus da vacina em pSD466 abrange as posições 161185-162053. O local da deleção em pSD466 está indicado por um triângulo na Fig. 4.

Uma cassete BglIII/BamHI (parcial) de 3,2 Kb contendo o gene da Beta-galactosidase de *E. coli* (Shapira *et al.*, 1983) sob o controle do promotor 11 Kda do vírus da vacina (Bertholet *et al.*, 1985; Guo *et al.*, 1989) foi inserida no local BglIII de pSD466, formando pSD466KBG. O plasmídeo pSD466KBG foi usado na recombinação com o vírus de resgate vP618. O vírus da vacina recombinante, vP708, contendo Beta-galactosidase na deleção A56R, foi isolado como uma placa azul na presença de X-gal.

As sequências de Beta-galactosidase foram removidas de vP708 usando o plasmídeo dador pSD467. pSD467 é idêntico a pSD466, excepto os locais EcoRI, SmaI e BamHI terem sido removidos da junção pUC/vírus da vacina por digestão de pSD466 com EcoRI/BamHI, seguido de preenchimento dos extremos com o fragmento Klenow da polimerase de *E. coli* e ligação. A recombinação entre vP708 e pSD467

resultou num mutante recombinante com deleção de sequências do vírus da vacina, vP723, o qual foi isolado como uma placa incolor na presença de X-gal.

EXEMPLO 5 - CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PMPCSK1Δ PARA DELEÇÃO DE GRELHAS DE LEITURA ABERTAS [C7L-K1L]

Referindo agora a Fig.5, foram utilizados os clones de vírus da vacina que se seguem na construção de pMPCSK1Δ. pSD420 é SalI H clonado em pUC8. Em pSD451, as sequências de DNA para a esquerda do local SphI (pos. 27416) em HindIII M foram removidas (Perkus et al., 1990). pSD409 é HindIII M clonado em pUC8.

Para proporcionar um substrato para a deleção do grupo de genes [C7L-K1L] do vírus da vacina, a Beta-galactosidase de *E. coli* foi primeiro inserida no locus da deleção de M2L do vírus da vacina (Guo et al., 1990) como se segue. Para eliminar o local BglII em pSD409, o plasmídeo foi cortado com BglII em sequências de vírus da vacina (pos. 28212) e com BamHI na junção pUC/vírus da vacina, depois ligado para formar o plasmídeo pMP409B. pMP409B foi cortado no local único SphI (pos. 27416). As sequências codificadoras de M2L foram removidas por mutagénese (Guo et al., 1990; Mandecki, 1986) usando o oligonucleótido sintético

MPSYN82 (SEQ ID NO:19) 5' TTCCTGTATATTTGCACCAATTAGATCTT-
ACTCAAATAATGTAACAATA 3'

O plasmídeo resultante, pMP409D, possui um local BglIII único inserido no *locus* da deleção M2L como indicado atrás. Uma cassette BamHI (parcial)/BglII de 3,2 Kb contendo o gene da Beta-galactosidase de *E. coli* (Shapira *et al.*, 1983) sob o controlo do promotor de 11 Kda (Bertholet *et al.*, 1985) foi inserido em pMP409D cortado com BglII. O plasmídeo resultante, pMP409DBG (Guo *et al.*, 1990) foi usado como plasmídeo dador para recombinação com o vírus da vacina de resgate vP723. O vírus da vacina recombinante, vP784, contendo Beta-galactosidase inserida no *locus* da deleção M2L, foi isolado como uma placa azul na presença de X-gal.

Um plasmídeo com os genes do vírus da vacina deletados [C7L-K1L], foi montado em pUC8 cortado com SmaI, HindIII e preenchidos os extremos com o fragmento Klenow da polimerase de *E. coli*. O braço flanqueante esquerdo consistindo nas sequências HindIII C do vírus da vacina foi obtido por digestão de pSD420 com XbaI (pos. 18628), seguido de preenchimento dos extremos com o fragmento Klenow da polimerase de *E. coli* e digestão com BglII (pos. 19706). O braço flanqueante direito consistindo em sequências HindIII K do vírus da vacina foi obtido por digestão de pSD451 com BglII (pos. 29062) e EcoRV (pos. 29778). O plasmídeo resultante, pMP581CK não possui sequências do vírus da vacina entre o local BglII (pos. 19706) em HindIII C e o local BglII (pos. 29062) em HindIII K. O local da deleção de sequências do vírus da vacina no

plasmídeo pMP581CK está indicado por um triângulo na FIG. 5.

Para remover o excesso de DNA na junção da deleção do vírus da vacina, o plasmídeo pMP581CK foi cortado nos locais NcoI dentro das sequências do vírus da vacina (pos. 18811; 19655), tratado com a exonuclease Bal-31 e sujeito a mutagénese (Mandecki, 1986) usando o oligonucleótido sintético MPSYN233 (SEQ ID NO:20) 5'-TGTCATTTAACTACTACTATTAATAAAAAATAATATTTATT-3'. O plasmídeo resultante, pMPCSK1Δ, não possui sequências do vírus da vacina entre as posições 18805 e 29108, abrangendo 12 grelhas de leitura abertas do vírus da vacina [C7L-K1L]. A recombinação entre pMPCSK1Δ e o recombinante de vírus da vacina contendo Beta-galactosidase, vP784, resultou num mutante com deleção de sequências do vírus da vacina, vP804, o qual foi isolado como uma placa transparente na presença de X-gal.

EXEMPLO 6 (Preparativo) - CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PSD548 PARA DELEÇÃO DA SUBUNIDADE GRANDE DA REDUTASE DE RIBONUCLEÓTIDOS (I4L)

Referindo agora a Fig. 6, o plasmídeo pSD405 possui HindIII I do vírus da vacina (pos. 63875-70367) clonado em pUC8. pSD405 foi digerido com EcoRV dentro das sequências do vírus da vacina (pos. 67933) e com SmaI na junção pUC/vírus da vacina e ligado, formando o plasmídeo pSD518. pSD518 foi usado como fonte de todos os fragmentos

de restrição do vírus da vacina usados na construção de pSD548.

O gene I4L do vírus da vacina estende-se entre as posições 67371 e 65059. A direcção da transcrição para I4L está indicada por uma seta na Fig. 6. Para se obter um fragmento de plasmídeo vector sem uma porção das sequências codificadoras de I4L, pSD518 foi digerido com BamHI (pos. 653819 e HpaI (pos. 67001) e preenchidos os extremos usando o fragmento Klenow da polimerase de *E. coli*. Este fragmento vector de 4,8 Kb foi ligado a uma cassete SmaI de 3,2 Kb contendo o gene da Beta-galactosidase de *E. coli* (Shapira et al., 1983) sob o controlo do promotor 11 Kda do vírus da vacina (Bertholet et al., 1985; Perkus et al., 1990), resultando no plasmídeo pSD524KBG. pSD524KBG foi usado como plasmídeo dador para recombinação com o vírus da vacina vP804. O vírus da vacina recombinante, vP855, contendo Beta-galactosidase numa deleção parcial do gene I4L, foi isolado como uma placa azul na presença de X-gal.

Para remover Beta-galactosidase e a restante ORF I4L de vP855, foi construído o plasmídeo de deleção pSD548. Os braços flanqueantes esquerdo e direito do vírus da vacina foram montados separadamente em pUC8 como detalhado abaixo e apresentado esquematicamente na Fig. 6.

Para construir um plasmídeo vector para aceitar o braço flanqueante esquerdo do vírus da vacina, pUC8 foi cortado com BamHI/EcoRI e ligado aos oligonucleótidos

sintéticos emparelhados 518A1/518A2 (SEQ ID NO:21/SEQ ID NO:22)

```

      BamHI   RsaI
518A1  5'  GATCCTGAGTACTTTGTAATATAATGATATATATTTTCACTTTATCTCAT
518A2  3'      GACTCATGAAACATTATATTACTATATATAAAAGTGAAATAGAGTA

```

```

              BglII   EcoRI
      TTGAGAATAAAAAGATCCTTAGG      3'   518A1
      AACTCTTATTTTCTAGAATCCTTAA 5'   518A2

```

formando o plasmídeo pSD531. pSD531 foi cortado com RsaI (parcial) e BamHI e isolado um fragmento vector de 2,7 Kb. pSD518 foi cortado com BglII (pos. 64459)/RsaI (pos. 64994) e isolado um fragmento de 0,5 Kb. Os dois fragmentos foram ligados formando pSD537, o qual possui o braço esquerdo flanqueante completo das sequências codificadoras de I4L do vírus da vacina.

Para construir um plasmídeo vector para aceitar o braço flanqueante direito do vírus da vacina, pUC foi cortado com BamHI/EcoRI e ligado aos oligonucleótidos sintéticos emparelhados 518B1/518B2 (SEQ ID NO:23/SEQ ID NO:24)

```

      BamHI BglIII SmaI
518B1  5'  GATCCAGATCTCCCGGAAAAAAATTATTTAACTTTTCATTAATAG-
518B2  3'      GTCTAGAGGGCCCTTTTTTTTAATAAATTGAAAAGTAATTATC-

```

```

              RsaI   EcoRI
      GGATTTGACGTATGTAGCGTACTAGG      3'   518B1
      CCTAAACTGCATACTACGCATGATCCTTAA 5'   518B2

```

formando o plasmídeo pSD532. pSD532 foi cortado com RsaI

(parcial)/EcoRI e isolado um fragmento vector de 2,7 Kb. pSD518 foi cortado com RsaI dentro das sequências do vírus da vacina (pos. 67436) e EcoRI na junção vírus da vacina/pUC e isolado um fragmento de 0,6 Kb. Os dois fragmentos foram ligados, formando pSD538, o qual possui o braço flanqueante à direita das sequências codificadoras de I4L.

O braço flanqueante direito do vírus da vacina foi isolado como um fragmento EcoRI/BglII de 0,6 Kb derivado de pSD538 e ligado ao plasmídeo vector pSD537 cortado com EcoRI/BglII. No plasmídeo resultante, pSD539, a ORF I4L (pos. 65047-67386) foi substituída por uma região de poli-adaptador, a qual é flanqueada por 0,6 Kb de DNA do vírus da vacina à esquerda e 0,6 Kb de DNA do vírus da vacina à direita, num fundo de pUC. O local da deleção dentro de sequências do vírus da vacina está indicado por um triângulo na Fig. 6. Para evitar a possível recombinação de sequências de Beta-galactosidase na porção de pSD539 derivada de pUC com sequências de Beta-galactosidase no vírus da vacina recombinante vP855, a cassete de deleção de I4L do vírus da vacina foi transferida de pSD539 para pRC11, um derivado de pUC do qual foram removidas todas as sequências de Beta-galactosidase e substituídas com uma região de poli-adaptador (Colinas *et al.*, 1990). pSD539 foi cortado com EcoRI/PstI e isolado o fragmento de 1,2 Kb. Este fragmento foi ligado a pRC11 cortado com EcoRI/PstI (2,35 Kb), formando pSD548. A recombinação entre pSD548 e o recombinante contendo Beta-galactosidase, vP855, resultou

num mutante com deleção no vírus da vacina vP866, o qual foi isolado como uma placa transparente na presença de X-gal.

O DNA do vírus da vacina recombinante vP866 foi analisado por digestão com enzimas de restrição seguido de electroforese em gel de agarose. Os padrões de restrição foram os esperados. As reacções em cadeia da polimerase (PCR) (Engelke et al., 1988) usando vP866 como matriz e sequências iniciadoras flanqueantes dos seis *loci* com deleções, descritos detalhadamente atrás, produziram fragmentos de DNA com os tamanhos esperados. A análise das sequências dos fragmentos gerados por PCR, à volta das áreas das junções das deleções, confirmou que as junções eram as esperadas. O vírus da vacina recombinante vP866, contendo as seis deleções obtidas por manipulação genética como descrito atrás, foi designado estirpe vacinal "NYVAC" do vírus da vacina.

EXEMPLO 7 (Preparativo) - INSERÇÃO DE UM GENE G DA GLICO-PROTEÍNA DA RAIVA EM NYVAC

O gene codificador da glicoproteína G da raiva sob o controlo do promotor H6 do vírus da vacina (Taylor et al., 19887a,b) foi inserido na deleção TK do plasmídeo pSD513. pSD513 é idêntico ao plasmídeo pSD460 (Fig. 1), excepto no que respeita à presença de uma região de poli-adaptador.

Referindo agora a Fig. 7, a região do poliadaptador foi inserida cortando pSD460 com SmaI e ligando o plasmídeo vector aos oligonucleótidos sintéticos emparelhados VQ1A/VQ1B (SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:26)

```

          SmaI BglII XhoI PstI NarI BamHI
VQ1A  5'  GCGAGATCTCTCGAGCTGCAGGGCGCCGGATCCTTTTCT  3'
VQ1B  3'  CCCTCTAGAGAGCTCGACGTCCCGCGCCTAGGAAAAGA  5'

```

para formar o plasmídeo vector pSD513. pSD513 foi cortado com SmaI e ligado a uma cassete de 1,8 Kb com extremos SmaI contendo o gene codificador da glicoproteína G da raiva sob o controlo do promotor H6 do vírus da vacina (Taylor *et al.*, 1988a,b). O plasmídeo resultante foi designado pRW842. pRW842 foi usado como plasmídeo dador para a recombinação com o vírus de resgate NYVAC (vP866). O vírus da vacina recombinante vP879 foi identificado por hibridação de placas usando uma sonda de DNA marcada com ³²P contra sequências codificadoras da glicoproteína G do vírus da raiva.

Os vírus recombinantes modificados do presente invento oferecem vantagens como vectores de vacinas recombinantes. A virulência atenuada do vector reduz vantajosamente a possibilidade de uma infecção devido à vacinação no indivíduo vacinado e também diminui a transmissão de indivíduos vacinados a não vacinados ou contaminação do ambiente.

Os vírus recombinantes modificados são também

vantajosamente usados num método para a expressão de um produto numa cultura celular *in vitro*, através da introdução na célula do vírus modificado recombinante tendo DNA heterólogo que codifica e expressa produtos de genes na célula.

EXEMPLO 8 - CONSTRUÇÃO DE RECOMBINANTES DE ALVAC EXPRES-
SANDO A GLICOPROTEÍNA G DO VÍRUS DA RAIVA

Este exemplo descreve o desenvolvimento de ALVAC, um vector do vírus da varíola dos canários, e de um recombinante vírus da varíola dos canários-raiva designado ALVAC-RG (vCP65) e a sua segurança e eficácia.

Células e vírus. O vírus da varíola dos canários parental (estirpe Rentschler) é uma estirpe vacinal para os canários. A estirpe vacinal foi obtida a partir de um isolado selvagem e atenuada através de mais de 200 passagens seriadas em fibroblastos embrionários de galinha. Uma preparação viral foi sujeita a quatro purificações sucessivas de placas em agar e um clone de uma das placas foi amplificado através de cinco passagens adicionais, após o que o stock de vírus foi usado como vírus parental nos testes de recombinação *in vitro*. O isolado de vírus da varíola dos canários purificado de placas foi designado ALVAC.

Construção de um vector de inserção de vírus da varíola dos canários. Um fragmento PvuII de 880 pb de vírus da varíola dos canários foi clonado entre os locais PvuII

de pUC9 para formar prW764.5. A sequência deste fragmento está apresentada na Fig. 8 (SEQ ID NO:27) entre as posições 1372 e 2251. Foram definidos os limites de uma grelha de leitura aberta designada C5. Foi determinado que a grelha de leitura aberta fosse iniciada na posição 166 dentro do fragmento e terminada na posição 487. A deleção de C5 foi feita sem interrupção das grelhas de leitura abertas. As bases da posição 167 até à posição 455 foram substituídas pela sequência (SEQID NO:28) GCTTCCCGGAATTCTAGCTAGCTAGTTT. Esta sequência de substituição possui locais de inserção HindIII, SmaI e EcoRI, seguidos de codões de paragem da tradução e de um sinal de terminação da transcrição reconhecido pela polimerase de RNA do vírus da vacina (Yuen *et al.*, 1987). A deleção da ORF C5 foi realizada como descrito abaixo. O plasmídeo prW764.5 foi cortado parcialmente com RsaI e o produto linear foi isolado. O fragmento linear RsaI foi novamente cortado com BglII e o fragmento prW764.5 agora com uma deleção RsaI a BglII, desde a posição 156 até à posição 462, foi isolado e usado como vector para os seguintes oligonucleótidos sintéticos:

RW145 (SEQ ID NO:29):

ACTCTCAAAAGCTTCCCGGAATTCTAGCTAGCTAGTTTTATAAA

RW146 (SEQ ID NO:30):

GATCTTTATAAAAACTAGCTAGCTAGAAATTCCTCGGAAGCTTTTGAGAGT

Os oligonucleótidos RW145 e RW146 foram emparelhados e inseridos no vector prW764.5 RsaI e BglII descrito atrás. O plasmídeo resultante foi designado prW831.

Construção do vector de inserção com o gene G da raiva. A construção de pRW838 está ilustrada abaixo. Os oligonucleótidos A a E, que sobrepõem o codão de iniciação da tradução do promotor H6 com o ATG de G da raiva, foram clonados em pUC9 como pRW737. Os oligonucleótidos A a E possuem o promotor H6, começando em NruI, até ao local HindIII de G da raiva seguido de BglIII. As sequências dos oligonucleótidos A a E ((SEQ ID NO:42)-(SEQ ID NO:46)) são:

**A (SEQ ID NO:31): CTGAAATTATTTTCATTATCGCGATATCCGTTAA
GTTTGTATCGTAATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGT**

**B (SEQ ID NO:32): CATTACGATACAAACTTAACGGATATCGCGATAA
TGAAATAATTTTCAG**

**C (SEQ ID NO:33): ACCCCTTCTGGTFTTTCCGTTGTGTTTGGGAAA
TTCCCTATTTACACGATCCCAGACAAGCTTAGATCTCAG**

**D (SEQ ID NO:34): CTGAGATCTAAGCTTGTCTGGGATCGTGTAATA
GGGAATTTCCCAAAACA**

**E (SEQ ID NO:35): CAACGGAAAAACCAGAAGGGGTACAAACAGGAGA
GCCTGAGGAAC**

O diagrama dos oligonucleótidos emparelhados A a E é como se segue:



Os oligonucleótidos A a E foram fosforilados,

emparelhados (95°C durante 5 minutos, depois arrefecidos até à temperatura ambiente) e inseridos entre os locais PvuII de pUC9. O plasmídeo resultante, pRW737, foi cortado com HindIII e BglIII e usado como vector para o fragmento HindIII-BglIII de 1,6 kpb de ptg155PRO (Kieny *et al.*, 1984) dando origem a pRW739. O local HindIII de ptg155PRO está 86 pb a jusante do codão de iniciação da tradução de G da raiva. BglIII está a jusante do codão de paragem da tradução de G da raiva em ptg155PRO. pRW739 foi parcialmente cortado com NruI, completamente cortado com BglIII e um fragmento NruI-BglIII de 1,7 Kpb, contendo o extremo 3' do promotor H6 anteriormente descrito (Taylor *et al.*, 1988a,b; Guo *et al.*, 1989; Perkus *et al.*, 1989) e a totalidade do gene de G da raiva, foi inserido entre os locais NruI e BamHI de pRW824. O plasmídeo resultante foi designado pRW832. A inserção em pRW824 adicionou o promotor H6 5' de NruI. A sequência de pRW824 de BamHI seguido de SmaI (SEQ ID NO:36): GGATCCCCGGG. pRW824 é um plasmídeo que possui um gene não importante ligado precisamente ao promotor H6 do vírus da vacina. A digestão com NruI e BamHI remove totalmente este gene não importante. O fragmento SmaI de 1,8 kpb de pRW832, contendo o promotor H6 de G da raiva, foi inserido no local SmaI de pRW831, para formar o plasmídeo pRW838.

Desenvolvimento de ALVAC-RG. O plasmídeo pRW838 foi usado para transfectar células CEF primárias infectadas com ALVAC, usando o método de precipitação com fosfato de cálcio anteriormente descrito (Panicali *et al.*, 1982;

Piccini *et al.*, 1987). As placas positivas foram selecionadas com base na hibridação com uma sonda específica de G da raiva e sujeitas a 6 ciclos sequenciais de purificação de placas, até ser conseguida uma população pura. Uma placa representativa foi então amplificada e o recombinante ALVAC resultante foi designado ALVAC-RG (vCP65) (ver também Figs. 9A e 9B). A inserção correcta do gene G da raiva no genoma de ALVAC sem mutação subsequente foi confirmada por análise de sequências.

Imunofluorescência. Durante as fases finais da montagem das partículas maduras de vírus da raiva, o componente glicoproteico é transportado do aparelho de Golgi para a membrana citoplasmática, onde se acumula, com o extremo carboxilo estendendo-se para o citoplasma e o grosso da proteína na superfície externa da membrana celular. Para confirmar que a glicoproteína da raiva expressa em ALVAC-RG foi correctamente apresentada, realizou-se imunofluorescência em células CEF primárias infectadas com ALVAC ou ALVAC-RG. Realizou-se imunofluorescência como anteriormente descrito (Taylor *et al.*, 1990) usando um anticorpo monoclonal contra a glicoproteína G da raiva. Foi detectada forte fluorescência na superfície de células CEF infectadas com ALVAC-RG mas não com ALVAC parental.

Imunoprecipitação. Monocamadas de células CEF primárias, Vero (uma linha de células de rim de macaco verde africano ATCC # CCL81) e células MRC-5 (linha celular

do tipo fibroblasto derivada de tecido normal de pulmão fetal humano ATCC # CCL171) foram inoculadas a 10 ufp por célula com o vírus ALVAC parental e com o vírus recombinante ALVAC-RG na presença de metionina marcada radioativamente com ^{35}S e tratadas como anteriormente descrito (Taylor et al., 1990). As reacções de imunoprecipitação foram realizadas com um anticorpo monoclonal específico da glicoproteína G da raiva. A expressão eficiente de uma glicoproteína específica da raiva com um peso molecular de aproximadamente 67 Kda foi detectada para o recombinante ALVAC-RG. Não foram detectados produtos específicos da raiva nas células não infectadas ou em células infectadas com o vírus ALVAC parental.

Experiências de passagens sequenciais. Em estudos com o vírus ALVAC numa gama de espécies não aviárias não foi observada infecção proliferativa ou doença evidente (Taylor et al., 1991b). No entanto, para estabelecer que nem o vírus parental nem o vírus recombinante poderiam ser adaptáveis à replicação em células não aviárias, foi efectuada uma experiência de passagens sequenciais.

Os dois vírus, ALVAC e ALVAC-RG, foram inoculados ao longo de 10 passagens cegas sequenciais em três substratos celulares:

(1) células primárias fibroblásticas embrionárias de galinha (CEF) produzidas a partir de embriões de galinha com 11 dias de idade;

(2) células Vero - uma linha celular contínua de células de rim de macaco verde africano (ATCC # CCL81); e

(3) células MRC-5 - uma linha celular diplóide derivada de tecido de pulmão fetal humano (ATCC # CCL171.

A inoculação inicial foi realizada a uma moi de 0,1 ufp por célula, usando três placas de 60 mm para cada substrato celular contendo 2×10^6 células por placa. Uma placa foi inoculada na presença de 40 µg/ml de citosina arabinósido (Ara C), um inibidor da replicação do DNA. Após um período de absorção de 1 hora a 37°C, o inóculo foi removido e a monocamada lavada para remover o vírus não adsorvido. Nesta altura, o meio foi substituído por 5 ml de EMEM + 2% NBCS em duas placas (amostras t0 e t7) e 5 ml de EMEM + 2% de NBCS contendo 40 µg/ml de Ara C na terceira (amostra t7A). A amostra t0 foi congelada a -70°C para dar uma indicação do vírus residual adicionado. As amostras t7 e t7A foram incubadas a 37°C durante 7 dias, após o que os conteúdos foram colhidos e as células rebentadas por sonicação indirecta.

Um ml da amostra t7 de cada substrato celular foi inoculado, sem diluição, em três placas do mesmo substrato celular (para dar as amostras t0, t7 e t7A) e numa placa de células primárias CEF. As amostras t0, t7 e t7A foram tratadas como para a primeira passagem. A inoculação adicional em células CEF foi incluída para proporcionar um

passo de amplificação para uma detecção mais sensível do vírus que possa estar presente em células não aviárias.

Este procedimento foi repetido para 10 (CEF-MRC-5) ou 8 (Vero) passagens cegas sequenciais. As amostras foram então congeladas e descongeladas três vezes e testadas por titulação em monocamadas primárias de CEF.

A produção de vírus em cada amostra foi então determinada por titulação de placas em monocamadas de CEF com agarose. Os resultados da experiência estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Os resultados indicam que, tanto ALVAC parental como ALVAC-RG recombinante se replicam em monocamadas de CEF sem perda do título. Nas células Vero, os níveis de vírus caem para níveis inferiores ao limiar de detecção após 2 passagens para ALVAC e 1 passagem para ALVAC-RG. Nas células MRC-5, foi observado um resultado semelhante e não foi detectado vírus após 1 passagem. Apesar de nas Tabelas 1 e 2 só estarem apresentados os resultados para quatro passagens, a série foi continuada durante 8 (Vero) e 10 (MRC-5) passagens sem adaptação detectável de qualquer um dos vírus à replicação em células não aviárias.

Na passagem 1 estavam presentes níveis relativamente elevados de vírus na amostra t7 em células MRC-5 e Vero. No entanto, este nível de vírus foi equivalente ao observado na amostra t0 e na amostra t7A incubada na

presença de citosina arabinósido em que não ocorre replicação viral. Isto demonstrou que os níveis de vírus observados aos 7 dias em células não aviárias representavam vírus residual e não vírus replicado de novo.

Para tornar o ensaio mais sensível, uma porção da colheita aos 7 dias, para cada substrato celular, foi inoculada numa monocamada permissiva CEF e colhida quando da observação de efeito citopático (CPE) ou aos 7 dias caso não fosse evidente CPE. Os resultados desta experiência estão apresentados na Tabela 3. Mesmo após amplificação num substrato permissivo, o vírus foi detectado apenas em células MRC-5 e Vero em mais duas passagens. Estes resultados indicam que nas condições usadas, não houve adaptação do vírus às células Vero ou MRC-5.

Inoculação de macacos. Quatro macacos seropositivos para HIV foram inicialmente inoculados com ALVAC-RG como descrito na Tabela 4. Após 100 dias estes animais foram novamente inoculados para determinar um efeito de reforço e mais sete animais foram inoculados com uma gama de doses. Colheu-se sangue em intervalos adequados e analisaram-se os soros, após inactivação pelo calor a 56°C durante 30 minutos, relativamente à presença de anticorpos anti-raiva usando o ensaio rápido de inibição de focos de fluorescência ("RFFI") (Smith *et al.*, 1973).

Inoculação de chimpanzés. Dois chimpanzés machos, adultos (na gama de 50 a 65 Kg de peso), foram inoculados

intramuscularmente ou subcutaneamente com 1×10^7 ufp de vCP65. Os animais foram monitorizados relativamente a reacções e colhido sangue em intervalos regulares para análise da presença de anticorpos anti-raiva com o teste RFFI (Smith *et al.*, 1973). Os animais foram novamente inoculados com uma dose equivalente 13 semanas após a inoculação inicial.

Inoculação de ratinhos. Grupos de ratinhos foram inoculados com 50 a 100 μ l de uma gama de diluições de diferentes lotes de vCP65. Os ratinhos foram inoculados na pata. No dia 14, os ratinhos foram infectados por inoculação intracraniana de 15 a 43 LD₅₀ para ratinhos da estirpe virulenta CVS da raiva. A sobrevivência dos ratinhos foi monitorizada e uma dose protectora de 50% (PD₅₀) calculada aos 28 dias pós-inoculação.

Inoculação de cães e gatos. Dez cães Beagle, com 5 meses de idade, e 10 gatos, com 4 meses de idade, foram inoculados subcutaneamente com 6,7 ou 7,7 log₁₀ TCID₅₀ de ALVAC-RG. Quatro cães e quatro gatos não foram inoculados. Fizeram-se colheitas de sangue dos animais aos 14 e 28 dias pós-inoculação e avaliaram-se os anticorpos anti-raiva num teste RFFI. Os animais que receberam 6,7 log₁₀ TCID₅₀ de ALVAC-RG foram infectados, 29 dias após vacinação, com 3,7 log₁₀ LD₅₀ para ratinhos (cães) ou 4,3 log₁₀ LD₅₀ (gatos) da estirpe NYGS do vírus da raiva.

Inoculação de macacos esquilo. Três grupos de

quatro macacos esquilo (*Saimiri sciureus*) foram inoculados com um de três vírus (a) ALVAC-RG, o vírus da varíola dos canários parental, (b) ALVAC-RG o recombinante que expressa a glicoproteína G da raiva ou (c) vCP37, um vírus da varíola dos canários recombinante que expressa a glicoproteína do invólucro do vírus da leucemia felina. As inoculações foram realizadas sob anestesia com cetamina. Cada um dos animais recebeu ao mesmo tempo: (1) 20 µl instilados na superfície do olho direito sem escarificação; (2) 100 µl em várias gotas na boca; (3) 100 µl em cada um dos dois locais de injeção intradérmica na pele barbeada da face externa do braço direito; e (4) 100 µl no músculo anterior da coxa direita.

Quatro macacos foram inoculados com cada um dos vírus, dois com um total de 5,0 log₁₀ ufp e dois com um total de 7,0 log₁₀ ufp. Colheu-se sangue dos animais em intervalos regulares e os soros foram analisados relativamente à presença de anticorpos anti-raiva usando um teste RFFI (Smith et al., 1973). Os animais foram monitorizados diariamente relativamente a reacções à vacinação. Seis meses após a inoculação inicial, os quatro macacos receberam ALVAC-RG, dois macacos que receberam inicialmente vCP37 e dois macacos que receberam inicialmente ALVAC, assim como um macaco naíve, foram inoculados com 6,5 log₁₀ ufp de ALVAC-RG subcutaneamente. Os soros foram monitorizados relativamente à presença de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva num teste RFFI (Smith et al., 1973).

Inoculação de linhas celulares humanas com ALVAC-RG. Para determinar se se pode obter expressão eficiente de um gene heterólogo em células não aviárias em que o vírus não se replica produtivamente, cinco tipos de células, um aviário e quatro não aviários, foram analisados relativamente à produção de vírus, expressão do gene heterólogo da glicoproteína G da raiva e acumulação de DNA específico viral. As células inoculadas foram:

- (a) Vero, células de rim de macaco verde africano, ATCC # CCL81;
- (b) MRC-5, pulmão embrionário humano, ATCC # CCL171;
- (c) amnion humano WISH, ATCC # CLL25;
- (d) Detroit-532, prepúcio humano, síndrome de Down, ATCC # CCL54; e
- (e) células primárias CEF.

As células fibroblásticas embrionárias de galinha produzidas a partir de embriões de galinha com 11 dias de idade foram incluídas como controlo positivo. Todas as inoculações foram realizadas em monocamadas de 2×10^6 células como discutido abaixo.

A. Métodos de análise de DNA

Três placas de cada uma das linhas celulares foram inoculadas com 5 ufp/célula do vírus a testar, deixando uma placa extra de cada linha celular não inoculada. Uma placa foi incubada na presença de 40 µg/ml

de citosina arabinósido (Ara C). Após um período de adsorção de 60 minutos a 37°C, o inóculo foi removido e a monocamada lavada duas vezes para remover o vírus não adsorvido. O meio (com ou sem Ara C) foi então substituído. As células de uma placa (sem Ara C) foram colhidas como uma amostra do tempo zero. As restantes placas foram incubadas a 37°C durante 72 horas, altura em que as células foram colhidas e usadas para analisar a acumulação de DNA. Cada uma das amostras de 2×10^6 células foi ressuspensa em 0,5 ml de soro fisiológico tamponado com fosfatos (PBS) contendo EDTA 40 mM e incubada durante 5 minutos a 37°C. Um volume igual de agarose a 1,5%, pré-aquecida a 42°C, e contendo EDTA 120 mM foi adicionado à suspensão de células e misturado suavemente. A suspensão foi transferida para um molde de agarose e deixada a endurecer durante pelo menos 15 min. Os moldes de agarose sólida foram então removidos e incubados durante 12-16 horas a 50°C num volume de tampão de lise (1% sarkosyl, 100 µg/ml de proteinase K, Tris HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 200 mM) que cobre completamente o molde. O tampão de lise foi então substituído por 5,0 ml de TBE 0,5X (Tris-borato 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 0,5 mM) estéril e equilibrado a 4°C durante 6 horas com 3 mudas de tampão TBE. O DNA viral dentro do molde foi fraccionado a partir da mistura de RNA e DNA celular usando um sistema de electroforese de campo pulsado. A electroforese foi realizada durante 20 horas a 180 V com uma rampa de 50-90 seg a 15°C em TBE 0,5X. O DNA foi corrido com padrões de peso molecular do DNA de lambda. Após electroforese a banda de DNA viral foi visualizada por coloração com brometo de etídio. O DNA foi então

transferido para uma membrana de nitrocelulose e hibridado com uma sonda marcada radioativamente preparada a partir de DNA genómico de ALVAC purificado.

B. Estimativa da produção de vírus

As placas foram inoculadas exactamente como descrito atrás, com excepção de a multiplicidade de infecção usada ser de 0,1 ufp/célula. Às 72 horas pós-infecção, as células foram lisadas por três ciclos sucessivos de congelação e descongelação. A produção de vírus foi avaliada por titulação de placas em monocamadas de CEF.

C. Análise da expressão do gene G da raiva.

Inocularam-se placas com vírus recombinante ou parental a uma multiplicidade de infecção de 10 ufp/célula, deixando uma placa como controlo não infectado. Após um período de adsorção de uma hora, o meio foi removido e substituído por meio sem metionina livre. Após um período de 30 minutos, o meio foi removido e substituído com meio sem metionina contendo 20 μ Ci/ml de 35 S-metionina. As células infectadas foram marcadas durante a noite (aproximadamente 16 horas), depois lisadas pela adição de tampão de lise A. Realizou-se imunoprecipitação como anteriormente descrito (Taylor et al., 1990) usando um anticorpo monoclonal específico da glicoproteína G da raiva.

Resultados: Estimativa da produção viral. Os resultados da titulação da produção, às 72 horas após inoculação com 0,1 ufp por célula, estão apresentados na Tabela 5. Os resultados indicam que enquanto uma infecção produtiva pode ser conseguida nas células aviárias, não é detectada produção de vírus por este método nos quatro sistemas celulares não aviários.

Análise da acumulação de DNA viral. Para determinar se o bloqueio da replicação viral nas células não aviárias ocorre antes ou após a replicação do DNA, o DNA dos lisados celulares foi fraccionado por electroforese, transferido para nitrocelulose e testado quanto à presença de DNA viral específico. O DNA das células CEF não infectadas, células CEF infectadas com ALVAC-RG no tempo zero, células CEF infectadas com ALVAC-RG às 72 horas pós-infecção e células CEF infectadas com ALVAC-RG às 72 horas pós-infecção na presença de 40 µg de citosina arabinósido apresentaram todas alguma actividade de fundo, provavelmente devido a DNA celular de CEF contaminante na preparação da sonda de DNA ALVAC marcada radioactivamente. No entanto, as células CEF infectadas com ALVAC-RG às 72 horas pós-infecção apresentaram uma forte banda na região de aproximadamente 350 Kpb, representando a acumulação de DNA viral específico de ALVAC. Não foi detectada esta banda quando a cultura foi incubada na presença do inibidor da síntese de DNA, citosina arabinósido. Amostras equivalentes produzidas em células Vero mostraram uma banda muito suave a aproximadamente 350 Kpb nas células Vero infectadas com ALVAC-RG no tempo zero.

Este nível representou vírus residual. A intensidade da banda foi amplificada às 72 horas pós-infecção indicando que ocorreu algum nível de replicação de DNA viral específico nas células Vero, o qual não resultou num aumento da progénie viral. Amostras equivalentes produzidas em células MRC-5 indicaram que não foi detectada acumulação de DNA viral específico nestas condições nesta linha celular. Esta experiência foi então estendida para incluir outras linhas celulares humanas, especificamente células WISH e Detroit-532 inoculadas com ALVAC-RG. Deve-se notar que os limites de detecção deste método não foram bem avaliados e a acumulação de DNA viral pode ocorrer, mas num nível abaixo da sensibilidade do método. Outras experiências em que a replicação do DNA viral foi medida por incorporação de ^3H -timidina suportam os resultados obtidos com as células Vero e MRC-5.

Análise da expressão de genes da raiva. Para determinar a ocorrência de expressão génica viral, particularmente a do gene heterólogo inserido, nas linhas de células humanas mesmo na ausência da replicação de DNA viral, fizeram-se experiências de imunoprecipitação com os lisados marcados com ^{35}S -metionina de células, aviárias e não aviárias, infectadas com ALVAC e ALVAC-RG. Os resultados de imunoprecipitação usando o anticorpo monoclonal específico da glicoproteína G da raiva demonstraram imunoprecipitação específica de uma glicoproteína de 67 Kda em células CEF, Vero e MRC-5, WISH e Detroit infectadas com ALVAC-RG. Não foram detectados tais produtos específicos do gene da raiva em qualquer um

dos lisados de células infectadas com o vírus parental ou não infectadas.

Os resultados desta experiência indicaram que nas linhas celulares humanas analisadas, se bem que o recombinante ALVAC-RG fosse capaz de iniciar uma infecção e de expressar um produto de gene heterólogo sob o controlo da transcrição do promotor precoce/tardio de H6 do vírus da vacina, a replicação não prosseguiu com síntese de DNA, nem houve qualquer progénie viral detectável produzida. Nas células Vero, se bem que fosse observado algum nível de acumulação de DNA específico de ALVAC-RG, não foi detectada progénie viral por estes métodos. Estes resultados indicam que, nas linhas celulares humanas analisadas, o bloqueio da replicação viral ocorre antes do início da replicação do DNA, enquanto que nas células Vero, o bloqueio ocorre após o início da replicação do DNA viral.

Para determinar se a glicoproteína do vírus da raiva expressa em ALVAC-RG era imunogénica, uma série de espécies animais foi testada através da inoculação do recombinante. A eficácia das actuais vacinas da raiva é avaliada num sistema modelo de ratinho. Um teste semelhante foi portanto realizado usando ALVAC-RG. Nove preparações diferentes de vírus (incluindo um lote vacinal (J) produzido após 10 passagens seriadas do vírus inicial em cultura de tecidos) com títulos infecciosos variando entre 6,7 e 8,4 $\log_{10}$ TCID₅₀ por ml foram seriadamente diluídos e 50 a 100 μ l das diluições inoculados na pata de ratinhos com quatro a seis semanas de idade. Os ratinhos foram

infectados 14 dias mais tarde, através da via intracraniana, com 300 μ l da estirpe CVS do vírus da raiva contendo 15 a 43 LD₅₀ por ratinho, determinado pela titulação da letalidade num grupo controlo de ratinhos. A potência, expressa como PD₅₀ (Dose protectora de 50%), foi calculada aos 14 dias pós-infecção. Os resultados da experiência estão apresentados na Tabela 6. Os resultados indicaram que ALVAC-RG foi consistentemente capaz de proteger os ratinhos contra a infecção pelo vírus da raiva com um valor de PD₅₀ variando entre 3,33 e 4,56 com um valor médio de 3,73 (DP 0,48). Numa extensão deste estudo, ratinhos machos foram inoculados intracranialmente com 50 μ l de vírus contendo 6,0 log₁₀ TCID₅₀ de ALVAC-RG ou um volume equivalente de uma suspensão de células não infectadas. Os ratinhos foram mortos nos dias 1, 3 e 6 pós-inoculação e os seus cérebros removidos, fixados e seccionados. O exame histopatológico não mostrou evidência de neurovirulência de ALVAC-RG em ratinhos.

Para avaliar a segurança e eficácia de ALVAC-RG em cães e gatos, foi analisado um grupo de cães Beagle com 14,5 meses de idade e de gatos com 14,4 meses de idade. Quatro animais de cada espécie não foram vacinados. Cinco animais receberam 6,7 log₁₀ TCID₅₀ subcutaneamente e cinco animais receberam 7,7 log₁₀ TCID₅₀ pela mesma via. Colheu-se sangue dos animais para análise relativamente a anticorpos anti-raiva. Os animais que receberam 6,7 log₁₀ TCID₅₀ de ALVAC-RG foram infectados aos 29 dias após vacinação com 3,7 log₁₀ de LD₅₀ para ratinhos (cães, no músculo temporal) ou 4,3 log₁₀ de LD₅₀ para ratinhos (gatos, no pescoço) da

estirpe NYGS do vírus da raiva. Os resultados da experiência estão apresentados na Tabela 7.

Não foram observadas reacções adversas à inoculação nos cães e gatos com qualquer uma das doses do vírus inoculado. Quatro dos 5 cães imunizados com $6,7 \log_{10}$ TCID₅₀ tinham títulos de anticorpos no dia 14 pós-vacinação e todos os cães tinham títulos aos 29 dias. Todos os cães ficaram protegidos da infecção experimental que matou três dos quatro controlos. Nos gatos, três dos cinco gatos que receberam $6,7 \log_{10}$ TCID₅₀ tinham títulos de anticorpos específicos no dia 14 e todos os gatos eram positivos no dia 29, se bem que o título médio de anticorpos fosse baixo da ordem de 2,9 UI. Três dos cinco gatos sobreviveram à infecção que matou todos os gatos controlo. Todos os gatos imunizados com $7,7 \log_{10}$ TCID₅₀ tinham títulos de anticorpos no dia 14 e no dia 29, o título da média geométrica foi calculado como 8,1 Unidades Internacionais.

Avaliou-se a resposta imune em macacos esquilos (*Saimiri sciureus*) à inoculação com ALVAC, ALVAC-RG e um vírus da varíola dos canários recombinante não relacionado. Grupos de macacos foram inoculados como descrito atrás e os soros foram analisados quanto à presença de anticorpos específicos do vírus da raiva. Para além das reacções típicas na pele, causadas pela inoculação através da via intradérmica, não foi observada reactividade adversa em qualquer um dos macacos. Pequenas quantidades de vírus residual foram isoladas das lesões da pele após inoculação intradérmica nos dias dois e quatro após-inoculação. Todas

as amostras foram negativas no dia sete e daí em diante. Não houve reacção local à injeção intramuscular. Os quatro macacos inoculados com ALVAC-RG desenvolveram anticorpos anti-raiva neutralizantes no soro conforme medido por um teste RFFI. Aproximadamente seis meses após a inoculação inicial, todos os macacos e mais um macaco naïve foram novamente inoculados pela via subcutânea na face externa da coxa esquerda com $6,5 \log_{10}$ TCID₅₀ de ALVAC-RG. Os soros foram analisados relativamente à presença de anticorpos anti-raiva. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Quatro dos cinco macacos naïve para a raiva produziram respostas serológicas aos sete dias pós-inoculação com ALVAC-RG. Todos os cinco macacos tinham anticorpos detectáveis aos 11 dias pós-inoculação. Dos quatro macacos com exposição prévia à glicoproteína da raiva, todos apresentaram um aumento significativo no título de neutralização dos soros entre os dias 3 e 7 pós-vacinação. Os resultados indicam que a vacinação de macacos esquilo com ALVAC-RG não produz efeitos secundários adversos e pode ser induzida uma resposta primária de anticorpos neutralizantes. Uma resposta anamnética é igualmente induzida quando da revacinação. A exposição prévia a ALVAC ou a um vírus da varíola dos canários recombinante, expressando um gene heterólogo não relacionado, não interfere com a indução de uma resposta imune anti-raiva quando da revacinação.

A resposta imunológica de macacos seropositivos

para HIV-2 à inoculação com ALVAC-RG foi igualmente avaliada. Os animais foram inoculados como descrito atrás e a presença de anticorpos neutralizantes anti-raiva no soro avaliada num ensaio RFFI. Os resultados, apresentados na Tabela 9, indicaram que os animais positivos para HIV-2 inoculados pela via subcutânea desenvolveram anticorpos anti-raiva aos 11 dias após inoculação. Uma resposta anamnéstica foi detectada após uma inoculação de reforço administrada aproximadamente três meses após a primeira inoculação. Não se detectou resposta em animais que receberam a vacinação pela via oral. Ainda, uma série de seis animais foi inoculada com doses decrescentes de ALVAC-RG, administradas por via intramuscular ou subcutânea. Cinco dos seis animais inoculados responderam aos 14 dias pós-vacinação sem diferença significativa no título de anticorpos.

Dois chimpanzés com exposição prévia a HIV foram inoculados com $7,0 \log_{10}$ TCID₅₀ de ALVAC-RG por via subcutânea ou intramuscular. Aos 3 meses pós-inoculação os animais foram novamente vacinados de forma idêntica. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Não foi observada reactividade adversa ao inóculo pelas vias intramuscular ou subcutânea. Ambos os chimpanzés responderam à inoculação primária aos 14 dias e foi detectada um forte crescimento da resposta após nova vacinação.

TABELA 1. PASSAGEM SEQUENCIAL DE ALVAC EM CÉLULAS AVIÁRIAS
E NÃO AVIÁRIAS.

		<u>CEF</u>	<u>Vero</u>	<u>MRC-5</u>
Passagem 1				
Amostra	t0 ^a	2,4	3,0	2,6
	t7 ^b	7,0	1,4	0,4
	t7A ^c	1,2	1,2	0,4
Passagem 2				
Amostra	t0	5,0	0,4	N.D. ^d
	t7	7,3	0,4	N.D.
	t7A	3,9	N.D.	N.D.
Passagem 3				
Amostra	t0	5,4	0,4	N.D.
	t7	7,4	N.D.	N.D.
	t7A	3,8	N.D.	N.D.
Passagem 4				
Amostra	t0	5,2	N.D.	N.D.
	t7	7,1	N.D.	N.D.
	t7A	3,9	N.D.	N.D.

a: Esta amostra foi colhida no tempo zero e representa o vírus residual inoculado. O título é expresso como log₁₀ ufp/ml.

b: Esta amostra foi colhida aos 7 dias pós-infecção.

c: Esta amostra foi inoculada na presença de 40 µg/ml de citosina arabinósido e colhida aos 7 dias pós-infecção.

d: Não detectável.

TABELA 2. PASSAGEM SEQUENCIAL DE ALVAC-RG EM CÉLULAS
AVIÁRIAS E NÃO AVIÁRIAS.

		<u>CEF</u>	<u>Vero</u>	<u>MRC-5</u>
Passagem 1				
Amostra	t0 ^a	3,0	2,9	2,9
	t7 ^b	7,1	1,0	1,4
	t7A ^c	1,8	1,4	1,2
Passagem 2				
Amostra	t0	5,1	0,4	0,4
	t7	7,1	N.D. ^d	N.D.
	t7A	3,8	N.D.	N.D.
Passagem 3				
Amostra	t0	5,1	0,4	N.D.
	t7	7,2	N.D.	N.D.
	t7A	3,6	N.D.	N.D.
Passagem 4				
Amostra	t0	5,1	N.D.	N.D.
	t7	7,0	N.D.	N.D.
	t7A	4,0	N.D.	N.D.

a: Esta amostra foi colhida no tempo zero e representa o vírus residual inoculado. O título é expresso como log₁₀ ufp/ml.

b: Esta amostra foi colhida aos 7 dias pós-infecção.

c: Esta amostra foi inoculada na presença de 40 µg/ml de citosina arabinósido e colhida aos 7 dias pós-infecção.

d: Não detectável.

TABELA 3. AMPLIFICAÇÃO DE VÍRUS RESIDUAL ATRAVÉS DA
PASSAGEM EM CÉLULAS CEF.

		<u>CEF</u>	<u>Vero</u>	<u>MRC-5^a</u>
ALVAC				
Passagem	2 ^a	7,0 ^b	6,0	5,5
	3	7,5	4,1	5,1
	4	7,5	N.D. ^c	N.D.
	5	7,1	N.D.	N.D.
ALVAC-RG				
Passagem	2 ^a	7,2	5,5	5,5
	3	7,2	5,0	5,1
	4	7,2	N.D.	N.D.
	5	7,2	N.D.	N.D.

a: Passagem 2 representa a amplificação em células CEF de amostra do dia 7 da Passagem 1.

b: Título expresso como $\log_{10}$ ufp/ml.

c: Não detectável.

TABELA 4. ESQUEMA DA INOCULAÇÃO DE MACACOS RESUS COM ALVAC-RG (VCP65)

Animal	Inoculação
176L	Primária: 1×10^8 ufp de vCP65 oralmente em TANG
	Secundária: 1×10^7 ufp de vCP65 mais 1×10^7 ufp de vCP82 ^a pela via SC
185L	Primária: 1×10^8 ufp de vCP65 oralmente em TANG
	Secundária: 1×10^7 ufp de vCP65 mais 1×10^7 ufp de vCP82 pela via SC
177L	Primária: 5×10^7 ufp de vCP65 por via SC
	Secundária: 1×10^7 ufp de vCP65 mais 1×10^7 ufp de vCP82 pela via SC
186L	Primária: 5×10^7 ufp de vCP65 por via SC
	Secundária: 1×10^7 ufp de vCP65 mais 1×10^7 ufp de vCP82 pela via SC
178L	Primária: 1×10^7 ufp de vCP65 por via SC
182L	Primária: 1×10^7 ufp de vCP65 por via IM
179L	Primária: 1×10^6 ufp de vCP65 por via SC
183L	Primária: 1×10^6 ufp de vCP65 por via IM
180L	Primária: 1×10^6 ufp de vCP65 por via SC
184L	Primária: 1×10^5 ufp de vCP65 por via IM
187L	Primária: 1×10^7 ufp de vCP65 oralmente

a: vCP82 é um vírus da varíola dos canários recombinante que expressa os genes da proteína de fusão e da hemaglutinina do vírus do sarampo.

TABELA 5. ANÁLISE DA PRODUÇÃO VIRAL EM CÉLULAS AVIÁRIAS E NÃO AVIÁRIAS INOCULADAS COM ALVAC-RG

Tempo da amostra/ Tipo de célula	t0	t72	t72A ^b
Exp. 1			
CEF	3,3 ^a	7,4	1,7
Vero	3,0	1,4	1,7
MRC-5	3,4	2,0	1,7

(continuação)			
Tempo da amostra/ Tipo de célula	t0	t72	t72A ^b
Exp. 2			
CEF	2,9	7,5	<1,7
WISH	3,3	2,2	2,0
Detroit-532	2,8	1,7	<1,7
a: Título expresso em log ₁₀ ufp/ml.			
b: Cultura incubada na presença de 40 µg/ml de citosina arabinósido			

TABELA 6: POTÊNCIA DE ALVAC-RG TESTADO EM RATINHOS

Teste	Dose da infecção ^a	PD ₅₀ ^b
Stock inicial	43	4,56
Inóculo primário	23	3,34
Lote de vacina H	23	4,52
Lote de vacina I	23	3,33
Lote de Vacina K	15	3,64
Lote de vacina L	15	4,03
Lote de vacina M	15	3,32
Lote de vacina N	15	3,39
Lote de vacina J	23	3,42
a: Expresso como LD ₅₀ para ratinho		
b: Expresso como log ₁₀ TCID ₅₀		

TABELA 7. EFICÁCIA DE ALVAC-RG EM CÃES E GATOS

Dose	Cães		Gatos	
	Anticorpos ^a	Sobrevivência ^b	Anticorpos	Sobrevivência
6,7	11,9	5/5	2,9	3/5
7,7	10,1	N.T.	8,1	N.T.

a: Anticorpos no dia 29 pós-inoculação expressos como título da média geométrica em Unidades Internacionais

b: Expressa como a proporção de sobreviventes relativamente aos animais infectados

TABELA 8. RESPOSTA SEROLÓGICA ANTI-RAIVA DE MACACOS ESQUILO INOCULADOS COM VÍRUS DA VARÍOLA DOS CANÁRIOS RECOMBINANTES

Macaco	Exposição prévia	Anticorpos séricos neutralizantes anti-raiva ^a						
		-196 ^b	0	3	7	11	21	28
22	ALVAC ^c	NT ^g	<1,2	<1,2	<1,2	2,1	2,3	2,2
51	ALVAC ^c	NT	<1,2	<1,2	1,7	2,2	2,2	2,2
39	vCP37 ^d	NT	<1,2	<1,2	1,7	2,1	2,2	NT ^g
55	vCP37 ^d	NT	<1,2	<1,2	1,7	2,2	2,1	NT
37	ALVAC-RG ^e	2,2	<1,2	<1,2	3,2	3,5	3,5	3,2
53	ALVAC-RG ^e	2,2	<1,2	<1,2	3,6	3,6	3,6	3,4
38	ALVAC-RG ^f	2,7	<1,7	<1,7	3,2	3,8	3,6	NT
54	ALVAC-RG ^f	3,2	<1,7	<1,5	3,6	4,2	4,0	3,6
57	nenhum	NT	<1,2	<1,2	1,7	2,7	2,7	2,3

a: Determinado pelo teste RFTI nos dias indicados e expresso em Unidades Internacionais

b: Da-196 representa o soro do dia 28 após a vacinação primária

c: Os animais receberam 5,0 log₁₀ TCID₅₀ de ALVAC

d: Os animais receberam 5,0 log₁₀ TCID₅₀ de vCP37

e: Os animais receberam 5,0 log₁₀ TCID₅₀ de ALVAC-RG

f: Os animais receberam 7,0 log₁₀ TCID₅₀ de ALVAC-RG

g: Não testado

TABELA 9. INOCULAÇÃO DE MACACOS RESUS COM ALVAC-RG^A

Dias após inoculação	Via da inoculação primária										
	Or/Tang		SC		SC		IM		SC		OR
	176L ^b	185L	177L	186L	178L	182L	179L	183L	180L	184L	187L ^b
-84	-	-		-							
-9	-	-	-	-	-	-	-				
3	-	-	-	-							
6	-	-	±	±							
11	-	-	16d	128							
19	-	-	32	128							
35	-	-	32	512	-		-				
59	-	-	64	256							
75	-	-	64	128	-		-				
99c	-	-	64	256	-		-	-	-	-	-
2	-	-	32	256	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	512	512	-	-	-	-	-	-	-
15	16	16	512	512	64	32	64	128	32	-	-
29	16	32	256	256	64	64	32	128	32	-	-
55		32				32	16	32	16	-	
57	16		128	128	16						-

a: Ver tabela 9 para esquema de inoculações.

b: Os animais 176L e 185L receberam 8,0 log₁₀ ufp por via oral em 5 ml de Tang. O animal 187L recebeu 7,0 log₁₀ ufp por via oral sem Tang.

c: Dia de nova vacinação para os animais 176L, 185L, 177L e 186L por via SC e vacinação primária para os animais 178L, 182L, 179L, 183L, 180L, 184L e 187L.

d: Títulos expressos como o inverso da última diluição que mostrou inibição da fluorescência num teste RFFII.

TABELA 10. INOCULAÇÃO DE CHIMPANZÉS COM ALVAC-RG

Semanas após inoculação	Animal 431 I.M.	Animal 457 S.C.
0	<8 ^a	<8
1	<8	<8
2	8	32
4	16	32
8	16	32
12 ^b /0	16	8
13/1	128	128
15/3	256	512
20/8	64	128
26/12	32	128

a: Título expresso como o inverso da última diluição que mostrou inibição de fluorescência num teste RFFI

b: Dia da re-inoculação

EXEMPLO 9 - IMUNIZAÇÃO DE SERES HUMANOS USANDO VÍRUS DA
VARÍOLA DOS CANÁRIOS EXPRESSANDO A GLICOPROTEÍNA DA RAIVA
(ALVAC-RG: VCP65)

ALVAC-RG (vCP65) foi obtido como descrito no Exemplo 9 e Figs 9A e 9B. Para aumentar a escala de produção e produzir a vacina, ALVAC-RG (vCP65) foi replicado em CEF primárias derivadas de ovos especificados como desprovidos de agentes patogênicos. As células foram infectadas a uma multiplicidade de 0,1 e incubadas a 37°C durante três dias.

A suspensão de vírus da vacina foi obtida por disrupção com ultra-sons das células infectadas em meio sem soro; os detritos celulares foram então removidos por centrifugação e filtração. A suspensão clarificada resultante foi suplementada com um estabilizador da liofilização (mistura de aminoácidos), distribuída por frascos de doses individuais e liofilizada. Três lotes com título decrescente foram preparados através de diluições seriadas de dez vezes da suspensão de vírus, numa mistura de meio sem soro e estabilizador de liofilização, antes da liofilização.

Os testes de controlo de qualidade foram aplicados aos substratos celulares, meios e inóculos de vírus e ao produto final, com ênfase para a pesquisa de agentes adventícios e inocuidade em roedores de laboratório. Não foi encontrada qualquer característica indesejável.

Dados pré-clínicos: Estudos *in vitro* indicaram que as células Vero ou MRC-5 não suportam o crescimento de ALVAC-RG (vCP65); uma série de oito (VERO) e 10 (MRC) passagens cegas seriadas não causaram adaptação detectável do vírus ao crescimento em linhas não aviárias. Análises de linhas celulares humanas (MRC-5, WISH, Detroit 532, HEL, HNK ou células linfoblastóides transformadas com EBV) infectadas ou inoculadas com ALVAC-RG (vCP65) não apresentaram acumulação de DNA específico de vírus,

sugerindo que nestas células o bloqueio da replicação ocorre antes da síntese do DNA. No entanto, é significativa a expressão do gene da glicoproteína da raiva em todas as linhas celulares testadas, indicando que o passo abortivo no ciclo replicativo do vírus da varíola dos canários ocorre antes da replicação do DNA viral.

A segurança e eficácia de ALVAC-RG (vCP65) foram documentadas numa série de experiências em animais. Uma série de espécies incluindo canários, galinhas, gansos, roedores de laboratório (ratinhos lactentes e adultos), hamsters, cobaias, coelhos, cães e gatos, macacos esquilo, macacos resus e chimpanzés, foram inoculados com doses que variaram entre 10^5 e 10^8 ufp. Foi usada uma variedade de vias, mais frequentemente a subcutânea, a intramuscular e a intradérmica, mas também a oral (macacos e ratinhos) e intracerebral (ratinhos).

Nos canários, ALVAC-RG (vCP65) causou uma lesão no local da escarificação sem indicação de doença ou de morte. A inoculação intradérmica de coelhos resultou numa reacção no local de inoculação típica dos poxvírus, a qual não se espalhou e cicatrizou em sete a dez dias. Não houve efeitos adversos devido a vírus da varíola dos canários em qualquer um dos animais testados. A imunogenicidade foi documentada pelo aparecimento de anticorpos anti-raiva após inoculação de ALVAC-RG (vCP65) em roedores, cães, gatos e primatas, conforme medido pelo teste rápido de inibição de focus de fluorescência (RFFIT). A protecção foi também

demonstrada através da infecção experimental com vírus da raiva em ratinhos, cães e gatos imunizados com ALVAC-RG (vCP65).

Voluntários. Foram incluídos vinte e cinco voluntários adultos saudáveis, com idades compreendidas entre os 20 e os 45 anos, sem história prévia de imunização contra a raiva. O seu estado de saúde foi avaliado através de histórias médicas completas, exames físicos, análises hematológicas e químicas do sangue. Os critérios de exclusão incluíram gravidez, alergias, depressão imune de qualquer tipo, doença debilitante crónica, cancro, injeção de globinas imunes nos últimos três meses e seropositividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou para o antigénio de superfície do vírus da hepatite B.

Desenho do estudo. Os participantes foram distribuídos ao acaso para receber vacina da raiva de células diplóides humanas (HDC) lote E0751 (Pasteur Merieux Serum & Vaccine, Lyon, France) ou a vacina do estudo ALVAC-RG (vCP65).

O ensaio foi projectado como um estudo de escalonamento de doses. Foram usados sequencialmente três lotes da vacina experimental ALVAC-RG (vCP65), em três grupos de voluntários (Grupos A, B e C), com duas semanas de intervalo entre cada passo. A concentração dos três lotes foi de $10^{3,5}$, $10^{4,5}$, $10^{5,5}$ Doses Infecciosas em Cultura de Tecidos (TCID₅₀) por dose, respectivamente.

Cada um dos voluntários recebeu duas doses da mesma vacina, subcutaneamente, na região deltóide, com um intervalo de quatro semanas. A natureza da vacina injectada não era conhecida dos participantes na altura da primeira injeção mas conhecida do investigador.

Para minimizar o risco de hipersensibilidade imediata quando da segunda injeção, os voluntários do Grupo B associados à dose média da vacina experimental foram injectados 1 h antes com a dose mais baixa e os associados à dose mais elevada (Grupo C) receberam sucessivamente a dose mais baixa e a dose média com intervalos de 1 hora.

Seis meses mais tarde, aos que receberam a dose mais elevada de ALVAC-RG (vCP65) (Grupo C) e a vacina HDC foi-lhes dada uma terceira dose de vacina; foram então distribuídos ao acaso para receberem a mesma vacina ou a vacina alternativa. Como resultado, formaram-se quatro grupos correspondendo ao seguinte esquema de imunização: 1. HDC, HDC-HDC; 2. HDC, HDC-ALVAC-RG (vCP65); 3. ALVAC-RG (vCP65), ALVAC-RG (vCP65)-HDC; 4. ALVAC-RG (vCP65), ALVAC-RG (vCP65), ALVAC-RG (vCP65).

Monitorização dos efeitos secundários. Todos os indivíduos foram monitorizados durante 1 h após injeção e novamente examinados diariamente nos cinco dias seguintes. Foi-lhes pedido que registassem reacções locais e

sistémicas nas três semanas seguintes e foram questionados telefonicamente duas vezes por semana.

Investigadores do laboratório. Foram colhidas amostras de sangue antes da inclusão e dois, quatro e seis dias após cada injeção. A análise incluiu contagem de células totais do sangue, ensaios de enzimas hepáticas e da cinase de creatinina.

Ensaio de anticorpos. Os ensaios de anticorpos foram efectuados sete dias antes da primeira injeção e aos dias 7, 28, 35, 56, 173, 187 e 208 do estudo.

Os níveis de anticorpos neutralizantes contra a raiva foram determinados com o teste rápido de inibição de focus de fluorescência (RFFIT) (Smith et al., 1973). Os anticorpos contra vírus da varíola dos canários foram medidos por ELISA directa. O antigénio, uma suspensão de vírus da varíola dos canários purificado desagregada com 0,1% de Triton X-100, foi usado para revestir microplacas. Diluições fixas dos soros reagiram durante duas horas à temperatura ambiente e os anticorpos que reagiram foram revelados com um soro de cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase. Os resultados estão expressos como a densidade óptica lida a 490 nm.

Análise. Vinte e cinco indivíduos foram incluídos e completaram o estudo. Houve 10 do sexo masculino e 15 do sexo feminino e a idade média foi de 31,9 (21 a 48). Todos,

excepto três dos indivíduos tinham evidência de vacinação anterior contra a varíola; os três restantes não tinham escara típica nem história de vacinação. Três indivíduos receberam as doses mais baixas da vacina experimental ($10^{3,5}$ e $10^{4,5}$ TCID₅₀), nove indivíduos receberam $10^{5,5}$ TCID₅₀ e dez receberam a vacina HDC.

Segurança (Tabela 11). Durante a série de imunizações primárias, foi observada febre superior a 37,7°C dentro de 24 após injeção num recipiente de HDC (37,8°C) e num recipiente de $10^{5,5}$ TCID₅₀ de vCP65 (38°C). Não foi observada qualquer outra reacção sistémica atribuível à vacinação em qualquer um dos participantes.

Foram observadas reacções locais em 9/10 recipientes da vacina HDC injectada subcutaneamente e em 0/3, 1/3 e 9/ recipientes de $10^{3,5}$, $10^{4,5}$ e $10^{5,5}$ TCID₅₀ de vCP65, respectivamente.

A brandura foi o sintoma mais comum e foi sempre suave. Outros sintomas locais incluíram vermelhidão e endurecimento, os quais foram também suaves e transitórios. De um modo geral, todos os sintomas surgiram dentro de 24 horas e nunca duraram mais de 72 horas.

Não houve alteração significativa nas contagens de células do sangue, nos valores de enzimas hepáticas ou na cinase de creatina.

Respostas imunitárias; Anticorpos neutralizantes contra a raiva (Tabela 12). Vinte e oito dias após a primeira injeção todos os recipientes de HDC tinham títulos protectores ($\geq 0,5$ IU/ml). Pelo contrário nenhum dos grupos A e B ($10^{3,5}$ e $10^{4,5}$ TCID₅₀) e apenas 2/9 no grupo C ($10^{5,5}$ TCID₅₀) dos recipientes de ALVAC-RG (vCP65) atingiram este título protector.

Ao dia 56 (*i.e.* 28 dias após a segunda injeção) foram atingidos títulos protectores em 0/3 do Grupo A, 2/3 do grupo B e 9/9 do Grupo C dos recipientes da vacina ALVAC-RG (vCP65) e persistiram nos 10 recipientes de HDC.

Ao dia 56, os títulos das médias geométricas foram de 0,05, 4,4 e 11,5 UI/ml nos grupos A, B, C e HDC, respectivamente.

Ao dia 180, os títulos de anticorpos contra a raiva tinham diminuído substancialmente em todos os indivíduos mas permaneceram acima do nível protector de 0,5 UI/ml em 5/10 dos recipientes de HDC e em 5/9 dos recipientes de ALVAC-RG (vCP65); os títulos das médias geométricas foram de 0,51 e 0,45 IU/ml nos grupos HDC e C, respectivamente.

Anticorpos contra o vírus da varíola dos canários (Tabela 13). Os títulos pré-ímmes observados variaram entre 0,22 e 1,23 unidades DO, apesar da ausência de qualquer contacto prévio com canários nos indivíduos com os

títulos mais elevados. Quando definido como superior a duas vezes o aumento entre os títulos de pré-imunização e os títulos após a segunda injeção, foi obtida seroconversão em 1/3 dos indivíduos no grupo B e em 9/9 dos indivíduos no grupo C enquanto que nenhum indivíduo seroconverteu nos grupos A ou HDC.

Injeção de reforço. A vacina foi igualmente bem tolerada seis meses mais tarde, quando da injeção de reforço: foi observada febre em 2/9 recipientes do reforço de HDC e em 1/10 recipientes do reforço de ALVAC-RG (vCP65). As reacções locais foram observadas em 5/9 recipientes do reforço de HDC e em 6/10 recipientes do reforço de ALVAC-RG (vCP65).

Observações. As Figs. 11A e 11D mostram gráficos dos títulos de anticorpos neutralizantes contra a raiva (Teste rápido de inibição de focos de fluorescência ou RFFIT, UI/ml: Efeito do reforço de HDC e vCP65 ($10^{5,5}$ TCID₅₀) em voluntários anteriormente imunizados com a mesma vacina ou com uma vacina alternativa. As vacinas foram dadas nos dias 0, 28 e 180. Os títulos de anticorpos foram medidos nos dias 0, 7, 28, 35, 36, 56, 173 e 187 e 208.

Como se mostra nas FIGs 11A a 11D, a dose de reforço dada resultou num aumento dos títulos de anticorpos em todos os indivíduos, independentemente do esquema de imunização. No entanto, o reforço de ALVAC-RG (vCP65) induziu globalmente respostas imunes mais baixas do que o

reforço de HDC e o grupo ALVAC-RG (vCP65), ALVAC-RG (vCP65) - ALVAC-RG (vCP65) teve títulos significativamente mais baixos do que os três outros grupos. De forma semelhante, a injeção de reforço de ALVAC-RG (vCP65) resultou num aumento dos títulos de anticorpos contra vírus da varíola dos canários em 3/5 dos indivíduos que receberam previamente a vacina HDC e nos cinco indivíduos previamente imunizados com ALVAC-RG (vCP65).

Em geral, nenhum dos efeitos secundários locais derivados da administração de vCP65 foi indicativo de uma replicação local do vírus. Em particular, não se observaram lesões da pele, tais como as observadas após injeção da vacina. Apesar da aparente ausência de replicação do vírus, a injeção resultou, nos voluntários, na geração de quantidades significativas de anticorpos contra o vector vírus da varíola dos canários e contra a glicoproteína da raiva expressa.

Os anticorpos neutralizantes contra a raiva foram testados com o teste de inibição dos focos de fluorescência (RFFIT) que se sabe estar bem correlacionado com o teste de seroneutralização em ratinhos. Dos 9 recipientes de $10^{5,5}$ TCID₅₀, cinco tiveram níveis baixos de respostas após a primeira dose. Os títulos protectores dos anticorpos contra a raiva foram obtidos após a segunda injeção em todos os recipientes da dose mais elevada testada e mesmo em 2 dos 3 recipientes da dose média. Neste estudo, ambas as vacinas foram dadas subcutaneamente, como geralmente recomendado

para as vacinas vivas, mas não para a vacina HDC inactivada. Esta via de injeção foi seleccionada por permitir uma avaliação mais cuidadosa do local de injeção, mas isto poderá explicar o aparecimento tardio de anticorpos em recipientes de HDC: de facto, nenhum dos recipientes de HDC teve um aumento de anticorpos no dia 7, enquanto que na maior parte dos estudos em que a vacina HDC é dada intramuscularmente tal aconteceu numa proporção significativa dos indivíduos (Klietmann *et al.*, Geneva, 1981: Kuwert *et al.*, Geneva, 1981). No entanto, este invento não está necessariamente limitado à via de administração subcutânea.

O valor de GMT (título da média geométrica) dos anticorpos neutralizantes contra a raiva foi inferior para a vacina em estudo relativamente à vacina controlo de HDC, mas ainda bem acima do título mínimo necessário para a protecção. O claro efeito dose-resposta obtido com as três dosagens usadas neste estudo sugere que uma dosagem mais elevada deverá induzir uma resposta mais forte. Certamente, a partir desta descrição, os familiarizados com a matéria podem seleccionar uma dosagem adequada para um determinado doente.

A capacidade de reforço da resposta de anticorpos é um outro resultado importante deste Exemplo; de facto, um aumento dos títulos de anticorpos contra a raiva foi obtido em todos os indivíduos após a dose dos 6 meses, qualquer que seja o esquema de imunização, mostrando que a imunidade pré-existente induzida pelo vector vírus da varíola dos

canários ou pela glicoproteína da raiva não teve qualquer efeito bloqueador no reforço com o candidato recombinante a vacina ou com a vacina convencional HDC contra a raiva. Isto contrasta com os resultados de outros autores com recombinantes de vacina em humanos, em que a resposta imunitária pode ser bloqueada por imunidade pré-existente (Cooney et al., 1991; Etinger et al.)

Assim, este Exemplo demonstra claramente que um poxvírus incapaz de se replicar pode servir como vector de imunização em seres humanos, com todas as vantagens conferidas pelos agentes que se replicam em termos de resposta imunitária, mas sem o problema da segurança criado por um vírus totalmente permissivo. E, a partir desta descrição, que inclui este Exemplo e outros, dosagens adequadas e modos de administração ou imunização de recombinantes, contendo raiva ou outras sequências codificadoras ou seus produtos de expressão, estão dentro do âmbito dos familiarizados com a matéria assim como modos para a expressão *in vitro*.

TABELA 11: REACÇÕES NOS 5 DIAS APÓS A VACINAÇÃO

Dosagem de vCP65 (TCID ₅₀)	10 ^{3,5}		10 ^{4,5}		10 ^{5,5}		Controlo HDC	
Injecção	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
Nº de vacinados	3	3	3	3	9	9	10	10
temp >37,7°C	0	0	0	0	0	1	1	0
dor	0	0	1	1	6	8	8	6
vermelhidão	0	0	0	0	0	4	5	4
endurecimento	0	0	0	0	0	4	5	4

TABELA 12: ANTICORPOS NEUTRALIZANTES ANTI-RAIVA (REFIT;
UI/ML) TÍTULOS INDIVIDUAIS E TÍTULOS DAS MÉDIAS GEOMÉTRICA
(GMT)

		Dias				
Nº	TCID ₅₀ /dose	0	7	28	35	56
1	10 ^{3,5}	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,2
3	10 ^{3,5}	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
4	10 ^{3,5}	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	G.M.T.	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
6	10 ^{4,5}	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
7	10 ^{4,5}	<0,1	<0,1	<0,1	2,4	1,9
10	10 ^{4,5}	<0,1	<0,1	<0,1	1,6	1,1
	G.M.T.	<0,1	<0,1	0,1	0,58	0,47
11	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	1,0	3,2	4,3
13	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	0,3	6,0	8,8
14	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	0,2	2,1	9,4
17	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	<0,1	1,2	2,5
18	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	0,7	8,3	12,5
20	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	3,7
21	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	0,2	2,6	3,9
23	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	<0,1	1,7	4,2
25	10 ^{5,5}	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	0,9
	G.M.T.	<0,1	<0,1	0,16	1,9	4,4*
2	HDC	<0,1	<0,1	0,8	7,1	7,2
5	HDC	<0,1	<0,1	9,9	12,8	18,7
8	HDC	<0,1	<0,1	12,7	21,1	16,5

(continuação)

N°	TCID ₅₀ /dose	Dias				
		0	7	28	35	56
9	HDC	<0,1	<0,1	6,0	9,9	14,3
12	HDC	<0,1	<0,1	5,0	9,2	25,3
15	HDC	<0,1	<0,1	2,2	5,2	8,6
16	HDC	<0,1	<0,1	2,7	7,7	20,7
19	HDC	<0,1	<0,1	2,6	9,9	9,1
22	HDC	<0,1	<0,1	1,4	8,6	6,6
24	HDC	<0,1	<0,1	0,8	5,8	4,7
	G.M.T.	<0,1	<0,1	2,96	9,0	11,5*
* p = 0,007 teste t de student						

TABELA 13 : ANTICORPOS PARA VÍRUS DA VARÍOLA DOS CANÁRIOS:
TÍTULOS DAS MÉDIAS GEOMÉTRICAS POR ELISA

Dosagem de vCP65 TCID ₅₀ /dose	Dias				
	0	7	28	35	56
10 ^{3,5}	0,69	ND	0,76	ND	0,68
10 ^{4,5}	0,49	0,45	0,56	0,63	0,87
10 ^{5,5}	0,38	0,38	0,77	1,42	1,63
Controlo HDC	0,45	0,39	0,40	0,35	0,39
* densidade óptica na diluição de 1/25					

EXEMPLO 10 - COMPARAÇÃO DA LD₅₀ DE ALVAC E NYVAC COM VÁRIAS
ESTIRPES DO VÍRUS DA VACINA

Ratinhos. Ratinhos Swiss Webster, machos, aloge-

neicos foram adquiridos à Taconic Farms (Germantown, NY) e mantidos com rações para ratinhos e água *ad libitum* até serem usados às 3 semanas de idade (ratinhos "normais"). Os ratinhos Swiss Webster recém-nascidos, alogeneicos, foram de ambos os sexos e adquiridos após o final da gravidez realizado pelo Taconic Farms. Todos os ratinhos recém-nascidos foram entregues num período de dois dias.

Vírus. ALVAC derivou da purificação em placas de uma população de vírus da varíola dos canários e foi preparado em células primárias fibroblásticas embrionárias de galinha (CEF). Após purificação por centrifugação em gradientes de densidade de sucrose, ALVAC foi quantificado em unidades formadoras de placas em células CEF. A variante WR(L) do vírus da vacina foi obtida através de selecção de fenótipos de placa grande de WR (Panicali *et al.*, 1981). A estirpe vacinal do Wyeth New York State Board of Health de vírus da vacina foi adquirida à Pharmaceuticals Calf Lymph Type Vaccine Dryvax, número de controlo 302001B. O vírus da vacina estirpe Copenhagen VC-2 foi adquirido ao Institute Merieux, França. O vírus da vacina estirpe NYVAC derivou de Copenhagen VC-2. Todas as estirpes de vírus da vacina, excepto a estirpe Wyeth, foram propagadas em células Vero de rim de macaco verde africano, purificadas por centrifugação em gradiente de densidade de sucrose e quantificadas em unidades formadoras de placas em células Vero. A estirpe Wyeth foi propagada em células CEF e quantificada em unidades formadoras de placas em células CEF.

Inoculações. Grupos de 10 ratinhos normais foram inoculados intracranialmente (ic) com 0,05 ml de uma de várias diluições de vírus preparadas seriadamente numa base de 10 vezes, diluindo as preparações stock em soro fisiológico estéril tamponado com fosfatos. Nalguns casos, a preparação do stock de vírus não diluído foi usada para inoculação.

Grupos de 10 ratinhos recém-nascidos, com 1-2 dias de idade, foram inoculados ic de forma semelhante aos ratinhos normais excepto ter-se usado um volume de injeção de 0,03 ml.

Todos os ratinhos foram observados diariamente relativamente à mortalidade, por um período de 14 dias (ratinhos recém-nascidos) ou 21 dias (ratinhos normais) após inoculação. Os ratinhos que foram encontrados mortos na manhã a seguir à inoculação foram excluídos devido à potencial morte por trauma.

A dose letal necessária para produzir mortalidade em 50% da população experimental (LD_{50}) foi determinada pelo método proporcional de Reed e Muench.

Comparação da LD_{50} de ALVAC e NYVAC com várias estirpes de vírus da vacina para ratinhos alogeneicos jovens através da via ic. Em ratinhos normais, jovens, a virulência de NYVAC e ALVAC foram várias ordens de grandeza mais baixas do que para as estirpes do vírus da vacina

testadas (Tabela 14). Observou-se que NYVAC e ALVAC são mais de 3000 vezes menos virulentos em ratinhos normais do que a estirpe Wyeth; mais de 12500 vezes menos virulentos do que a estirpe parental VC-2; e mais de 63000000 vezes menos virulentos do que a variante WR(L). Estes resultados sugerem que NYVAC está altamente atenuado comparativamente com outras estirpes de vírus da vacina e que ALVAC é de um modo geral não virulento para ratinhos jovens quando administrado intracranialmente, se bem que ambos possam causar mortalidade em ratinhos em doses extremamente elevadas ($3,85 \times 10^8$ UFPs, ALVAC e 3×10^8 UFPs, NYVAC) por um mecanismo indeterminado através desta via de inoculação.

Comparação da LD₅₀ de ALVAC e NYVAC com várias estirpes de vírus da vacina em ratinhos alogeneicos recém-nascidos inoculados por via ic. A virulência relativa de 5 estirpes de poxvírus para ratinhos normais recém-nascidos, foi testada por titulação num sistema modelo de infecção intracraniana (ic) (Tabela 15). Com a mortalidade como ponto limite, os valores de LD₅₀ indicaram que ALVAC é mais de 100000 vezes menos virulento do que a estirpe vacinal Wyeth do vírus da vacina; mais de 200000 vezes menos virulento do que a estirpe Copenhagen VC-2; e mais de 25000000 vezes menos virulento do que a variante WR-L do vírus da vacina. No entanto, a dose mais elevada testada, $6,3 \times 10^7$ UFPs, resultou em 100% de mortalidade. Taxas de mortalidade de 33,3% foram observadas com $6,3 \times 10^6$ UFPs. A causa da morte, ainda que de facto não determinada, não foi

provavelmente de natureza toxicológica ou traumática, uma vez que o tempo médio de sobrevivência (MST) dos ratinhos do grupo de dosagem mais elevada (aproximadamente 6,3 LD₅₀) foi de 6,7±1,5 dias. Quando comparado com WR(L) numa dose de infecção de 5 LD₅₀, em que MST é 4,8±0,6 dias, o MST dos ratinhos infectados com ALVAC foi significativamente mais longo (p = 0,001).

Relativamente a NYVAC, Wyeth é cerca de 15000 vezes mais virulenta; VC-2, mais de 35000 vezes mais virulenta; e WR(L) mais de 3000000 vezes mais virulenta. De forma semelhante a ALVAC, as duas doses mais elevadas de NYVAC, 6 x 10⁸ e 6 x 10⁷ UFPs, causaram mais de 100% de mortalidade. No entanto, o MST de ratinhos infectados com a dose mais elevada, correspondendo a 380 LD₅₀, foi de apenas 2 dias (9 mortos no dia 2 e 1 no dia 4). Pelo contrário, todos os ratinhos infectados com a dose mais elevada de WR-L, equivalente a 500 LD₅₀, sobreviveram até ao dia 4.

TABELA 14. DOSE LETAL PARA 50% CALCULADA PARA RATINHOS INFECTADOS COM VÁRIAS ESTIRPES DE VÍRUS DA VACINA E COM VÍRUS DA VARÍOLA DOS CANÁRIOS (ALVAC) PELA VIA IC.

Estirpe de poxvírus	LD ₅₀ calculada (UFPs)
WR(L)	2,5
VC-2	1,26 x 10 ⁴
WYETH	5,00 x 10 ⁴
NYVAC	1,58 x 10 ⁸
ALVAC	1,58 x 10 ⁸

TABELA 15. DOSE LETAL PARA 50% CALCULADA PARA RATINHOS RECÉM-NASCIDOS INFECTADOS COM VÁRIAS ESTIRPES DE VÍRUS DA VACINA E COM VÍRUS DA VARÍOLA DOS CANÁRIOS (ALVAC) PELA VIA IC.

Estirpe de poxvírus	LD ₅₀ calculada (UFPs)
WR(L)	0,4
VC-2	0,1
WYETH	1,6
NYVAC	1,58 x 10 ⁶
ALVAC	1,00 x 10 ⁷

EXEMPLO 11 - AVALIAÇÃO DE NYVAC (VP866) E NYVAC-RG (VP879)

Imunoprecipitações. Monocamadas pré-formadas de células aviárias e não aviárias foram inoculadas com 10 ufp por célula de vírus NYVAC parental (vP866) ou NYVAC-RG (vP879). A inoculação foi realizada em EMEM sem metionina e suplementado com 2% de soro fetal bovino dialisado. Após uma hora de incubação, o inóculo foi removido e o meio substituído com EMEM (sem metionina) contendo 20 µCi/ml de ³⁵S-metionina. Após uma incubação durante a noite de aproximadamente 16 horas, as células foram lisadas pela adição de Tampão A (1% Nonidet P-40, Tris 10 mM, pH7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 0,01% de azida de sódio, 500 unidades por ml de aprotinina e 0,02% de fluoreto de fenilmetilsulfonilo) A imunoprecipitação foi realizada usando o anticorpo monoclonal específico da glicoproteína da raiva designado 24-3F10 fornecido pelo Dr. C. Trinarchi,

Griffith Laboratories, New York State Department of Health, Albany, New York, e um conjugado de rato anti-ratinho adquirido à Boehringer Mannheim Corporation (Cat. #605-500). Proteína A Sepharose CL-4B adquirida à Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, New Jersey, foi usada como matriz de suporte. Os imunoprecipitados foram fraccionados em géis de 10% de poliacrilamida de acordo com o método de Dreyfuss *et al.*, (1984). Os géis foram fixados, tratados para fluorografia com Na-salicilato 1M, durante uma hora, e expostos a filme Kodak XAR para visualizar as espécies de proteínas imunoprecipitadas.

Fontes dos animais. Coelhos brancos New Zealand foram adquiridos a Hare-Marland (Hewitt, New Jersey). Ratinhos alogeneicos Swiss Webster, machos, com três semanas de idade, ratinhos alogeneicos Swiss Webster fêmeas no fim da gravidez e ratinhos labros ($nu^{+}nu^{+}$) Swiss Webster com quatro semanas de idade foram adquiridos a Taconic Farms, Inc. (Germantown, New York). Todos os animais foram mantidos de acordo com as normas do NIH. Todos os protocolos animais foram aprovados pela IACUUC institucional. Quando necessário, os ratinhos com doença terminal foram mortos.

Avaliação das lesões em coelhos. Cada um de dois coelhos foi inoculado intradermicamente, em múltiplos locais, com 0,1 ml de PBS contendo 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ou 10^8 ufps de cada vírus a testar ou apenas com PBS. Os coelhos foram observados diariamente desde o dia 4 até à resolução

das lesões. Os endurecimentos e ulcerações foram medidos e registados.

Vírus recuperado dos locais de inoculação. Um único coelho foi inoculado intradermicamente, em múltiplos locais, com 0,1 ml de PBS contendo 10^6 , 10^7 ou 10^8 ufps de cada vírus a testar ou apenas com PBS. Após 11 dias, o coelho foi morto e amostras de biópsias da pele, colhidas de cada local de inoculação, foram preparadas assepticamente por disrupção mecânica e sonicação indirecta para recuperação do vírus. Os vírus infecciosos foram testados por titulação de placas em monocamadas de CEF.

Virulência em ratinhos. Grupos de dez ratinhos, ou cinco na experiência de ratinhos labros, foram inoculados ip com uma das várias diluições de vírus em 0,5 ml de PBS estéril. Também é feita referência ao Exemplo 11.

Tratamento com ciclofosfamida (CY). Os ratinhos foram injectados por via ip com 4 mg (0,02 ml) de CY (Sigma) no dia -2, seguido de injeção do vírus no dia 0. Nos dias seguintes à infecção, os ratinhos foram injectados ip com CY: 4 mg no dia 1; 2 mg nos dias 4, 7 e 11; 3 mg nos dias 14, 18, 21, 25 e 28. A imunossupressão foi indirectamente monitorizada através da contagem de leucócitos com um contador Coulter no dia 11. A média das contagens de leucócitos foi de 13500 células por μl para ratinhos não tratados (n=4) e 4220 células por μl para os ratinhos controlo tratados com CY (n = 5).

Cálculo de LD₅₀. A dose letal necessária para produzir 50% de mortalidade (LD₅₀) foi determinada pelo método proporcional de Reed e Muench (Reed e Muench, 1938).

Testagem da potência de NYVAC-RG em ratinhos. Ratinhos de quatro a seis semanas de idade foram inoculados na pata com 50 a 100 µl de uma gama de diluições (2,0 - 8,0 log₁₀ doses infecciosas para 50% de culturas de tecidos (TCID₅₀)) de W-RG (Kieny *et al.*, 1984), ALVAC-RG (Taylor *et al.*, 1991b) ou NYVAC-RG. Cada um dos grupos consistiu em oito ratinhos. Aos 14 dias pós-vacinação, os ratinhos foram infectados por inoculação intracraniana com 15 LD₅₀ da estirpe CVS do vírus da raiva (0,03 ml). No dia 28, os ratinhos que sobreviveram foram contados e calculada a dose protectora de 50% dos animais (PD₅₀).

Derivação de NYVAC (vP866). A estirpe NIVAC do vírus da vacina foi gerada a partir de VC-2, um isolado clonado de placas da estirpe vacinal Copenhagen. Para gerar NYVAC a partir de VC-2, dezoito ORFs de vacina, incluindo uma série de funções virais associadas a virulência, foram deletadas com precisão, através de uma série de manipulações sequenciais, como já descrito nesta descrição. Estas deleções foram construídas de forma a evitar o aparecimento de novas grelhas de leitura indesejáveis. A Fig. 10 descreve esquematicamente as ORFs eliminadas para gerar NYVAC. No topo da Fig. 10 está descrito o mapa de restrição do genoma do vírus da vacina (isolado de placas

VC-2, estirpe Copenhagen). Estão aumentadas as seis regiões de VC-2 que foram sequencialmente eliminadas na geração de NYVAC. As deleções foram já descritas nesta descrição (Exemplos 1 a 6). Por debaixo dos *loci* das deleções estão enumeradas as ORFs que foram removidas dos *loci*, juntamente com as funções ou homologias e massa molecular dos produtos dos genes.

Estudos de replicação de NYVAC e ALVAC em linhas celulares de tecido humano. Para determinar o nível de replicação da estirpe NYVAC do vírus da vacina (vp866) em células de origem humana seis linhas celulares foram inoculadas com uma multiplicidade de 0,1 ufp por célula em cultura líquida e incubadas durante 72 horas. O clone parental Copenhagen (VC-2) foi inoculado paralelamente. Células primárias fibroblásticas embrionárias de galinha (CEF) (obtidas a partir de ovos embrionados com 10-11 dias de idade de origem SPF, Spafas, Inc., Storrs, CT) foram incluídas para representar um substrato celular permissivo para todos os vírus. As culturas foram analisadas com base em dois critérios: a ocorrência de replicação viral produtiva e expressão de antígeno extrínseco.

O potencial de replicação de NYVAC numa série de células humanas está apresentado na Tabela 16. Tanto VC-2 como NYVAC sofrem replicação produtiva em células CEF, ainda que NYVAC com rendimentos ligeiramente reduzidos. VC-2 é também capaz de se replicar produtivamente nas seis linhas celulares humanas testadas com rendimentos

comparáveis, excepto na linha celular linfoblastóide JT-1 transformada por EBV (linha celular linfoblastóide humana transformada com o vírus Epstein-Barr, ver Rickinson *et al.*, 1984). Pelo contrário, NYVAC está altamente atenuado na sua capacidade para se replicar produtivamente em qualquer uma das linhas celulares humanas testadas. Foram obtidos pequenos aumentos de vírus infeccioso acima dos níveis residuais a partir de células MRC-5 (ATCC #CCL171, originárias de pulmão embrionário humano), DETROIT 532 (ATCC # CCL54, prepúcio humano, Síndrome de Down), HEL 299 (ATCC #CCL137, células humanas de pulmão embrionário) e HNK (células de rim humano de recém-nascido, Whittiker Bioproducts, Inc. Walkersville, MD, Cat#70-151) infectadas com NYVAC. A replicação nestas linhas celulares foi significativamente reduzida quando comparada com as produções de vírus obtidas a partir de células CEF infectadas com NYVAC ou com VC-2 parental (Tabela 16). Deve-se salientar que as produções às 24 horas, em células CEF, para NYVAC e VC-2 são equivalentes à produção às 72 horas. A incubação das culturas de linhas celulares humanas durante mais 48 horas (mais dois ciclos de crescimento viral) pode, portanto, ter amplificado a produção relativa de vírus obtida.

Consistente com os níveis baixos das produções de vírus obtidos nas linhas celulares humanas, MRC-5 e DETROIT 532, foram observados níveis detectáveis mas reduzidos de acumulação de DNA específico de NYVAC. O nível de acumulação de DNA nas linhas celulares MRC-5 e DETROIT infectadas com NYVAC, relativamente ao observado em células

CEF infectadas com NYVAC, é paralelo às produções relativas de vírus. A acumulação de DNA viral específico de NYVAC não foi observada em qualquer uma das outras células humanas.

Uma experiência equivalente foi também realizada usando o poxvírus aviário, ALVAC. Os resultados da replicação viral estão apresentados na Tabela 16. Não foi detectável progénie viral em qualquer uma das linhas celulares humanas, consistente com a restrição da gama de hospedeiros do vírus da varíola dos canários às espécies aviárias. Também é consistente com a ausência de replicação produtiva de ALVAC nestas células humanas a não detecção da acumulação de DNA específico de ALVAC em qualquer uma das linhas celulares humanas.

Expressão da glicoproteína da raiva por NIVAC-RG (vP879) em células humanas. Para determinar se a expressão eficiente de um gene heterólogo poderá ser obtida na ausência de níveis significativos de replicação viral produtiva, as mesmas linhas celulares foram inoculadas com NYVAC recombinante expressando a glicoproteína do vírus da raiva (vP879, Exemplo 7) na presença de ³⁵S-metionina. A imunoprecipitação da glicoproteína da raiva foi realizada a partir do lisado da cultura marcada radioativamente usando um anticorpo monoclonal específico para a glicoproteína da raiva. Foi detectada a imunoprecipitação de uma proteína de 67 KDa consistente com uma forma totalmente glicosilada da glicoproteína da raiva. Não foi detectado produto com reacção cruzada serológica em lisados de células não

infectadas ou infectadas com NYVAC parental. Resultados equivalentes foram obtidos com todas as outras células humanas analisadas.

Inoculações na pele de coelho. A indução e natureza das lesões da pele de coelhos após inoculações intradérmicas (id) foram anteriormente usadas como medição da patogenicidade de estirpes do vírus da vacina (Buller *et al.*, 1988; Child *et al.*, 1990; Fenner, 1958, Flexner *et al.*, 1987; Ghendon e Chernos 1964). Assim, a natureza das lesões associadas a inoculações id com as estirpes do vírus da vacina WR (ATCC #VR119 purificado de placas em células CV-1, ATCC #CCL70, e um isolado de placas designado variante L, ATCC #VR2035, seleccionado como descrito em Panicali *et al.*, 1981)), WYETH (ATCC #VR325 comercializado como DRYVAC pela Wyeath Laboratories, Marietta, PA), COPENGAGEN (VC-2) e NYVAC foram avaliadas por inoculação de dois coelhos (A069 e A128). Os dois coelhos apresentaram diferentes sensibilidades globais aos vírus, o coelho A128 apresentando menos reacções graves do que o coelho A069. No coelho A128 as lesões foram relativamente pequenas e resolvidas aos 27 dias pós-inoculação. No coelho A069, as lesões foram intensas, especialmente para os locais de inoculação de WR e resolvidas apenas após 49 dias. A intensidade das lesões foi também dependente da localização dos locais de inoculação relativamente à rede de drenagem linfática. Em particular, todos os locais situados acima da coluna vertebral apresentaram lesões mais intensas e necessitaram de tempos mais longos para resolver as lesões

localizadas nos flancos. Todas as lesões foram medidas diariamente desde o dia 4 até ao desaparecimento da última lesão e calculadas as médias do tamanho máximo das lesões e dos dias necessários para as curar (Tabela 17). Não foram observadas reacções locais nos locais injectados com o controlo PBS. Foram observadas lesões ulcerativas nos locais injectados com as estirpes do vírus da vacina WR, VC-2 e WYEATH. Significativamente, nenhum endurecimento ou lesões ulcerativas foram observados nos locais de inoculação com NYVAC.

Persistência de vírus infeccioso no local da inoculação. Para avaliar a persistência relativa destes vírus no local da inoculação, um coelho foi inoculado intradermicamente, em múltiplos locais, com 0,1 ml de PBS contendo 10^6 , 10^7 ou 10^8 ufp de VC-2, WR, WYETH ou NYVAC. Para cada um dos vírus, a dose de 10^7 ufp foi situada acima da coluna vertebral, flanqueada pelas doses de 10^6 e 10^8 . Os locais de inoculação foram observados diariamente durante 11 dias. WR induziu a resposta mais intensa, seguido de VC-2 e WYEATH (Tabela 18). A ulceração foi primeiro observada no dia 9 para WR e WYEATH e no dia 10 para VC-2. Os locais inoculados com NYVAC ou controlo PBS não apresentaram endurecimento ou ulceração. No dia 11 após inoculação, amostras de pele derivadas dos locais de inoculação foram destruídas mecanicamente e o vírus titulado em células CEF. Os resultados estão apresentados na Tabela 18. Em nenhum dos casos foi recuperado mais vírus nesta altura do que o administrado. A recuperação da

estirpe WR do vírus da vacina foi de aproximadamente 10^6 ufp de vírus em cada local, independentemente da quantidade de vírus administrada. A recuperação das estirpes WYEATH e VC-2 do vírus da vacina foi de 10^3 a 10^4 ufp, independentemente da quantidade administrada. Nenhum vírus infeccioso foi recuperado dos locais inoculados com NYVAC.

Inoculação de ratinhos geneticamente ou quimicamente imunodeficientes. A inoculação intraperitoneal de doses elevadas de NYVAC (5×10^8 ufp) ou ALVAC (10^8 ufp) em ratinhos labros não causou mortes, lesões e doença aparente ao longo do período de observação de 100 dias. Pelo contrário, os ratinhos inoculados com WR (10^3 a 10^4 ufp), WYEATH (5×10^7 ou 5×10^8 ufp) ou VC-2 (10^4 a 10^9 ufp) apresentaram lesões disseminadas típicas de poxvírus, primeiro nas patas, depois na cauda, seguidas de orquite grave nalguns animais). Nos ratinhos infectados com WR ou com WYEATH, o aparecimento de lesões disseminadas conduziu, de um modo geral, a eventual morte, enquanto que a maior parte dos ratinhos infectados com VC-2 eventualmente recuperaram. Os valores de LD_{50} calculados estão apresentados na Tabela 19.

Em particular, os ratinhos inoculados com VC-2 começaram a apresentar lesões nas suas patas (pápulas vermelhas) e 1 a 2 dias mais tarde na cauda. Estas lesões ocorreram entre 11 e 13 dias pós-inoculação (pi) em ratinhos que receberam as doses mais elevadas (10^9 , 10^8 , 10^7 e 10^6 ufp), no dia 16 pi em ratinhos que receberam 10^5 ufp

e nos dias 21 pi nos ratinhos que receberam 10^4 ufp. Não foram observadas lesões em ratinhos inoculados com 10^3 e 10^2 ufp durante o período de observação de 100 dias. Foi observada orquite no dia 23 pi em ratinhos que receberam 10^9 e 10^8 ufp e aproximadamente 7 dias mais tarde nos outros grupos (10^7 a 10^4 ufp). A orquite foi especialmente intensa nos grupos de 10^9 e 10^8 ufp e, apesar de regredir, foi observada até ao final do período de observação de 100 dias. Algumas lesões do tipo varíola foram observadas na pele de alguns ratinhos, ocorrendo por volta de 30-35 dias pi. A maior parte das lesões tipo varíola cicatrizaram normalmente entre os 60-90 dias pi. Apenas um ratinho morreu no grupo inoculado com 10^9 ufp (dia 34 pi) e um ratinho morreu no grupo inoculado com 10^8 ufp (dia 94 pi). Não foram observadas outras mortes nos ratinhos inoculados com VC-2.

Os ratinhos inoculados com 10^4 ufp da estirpe WR do vírus da vacina começaram a apresentar lesões tipo varíola no dia 17 pi. Estas lesões pareceram idênticas às lesões apresentadas pelos ratinhos injectados com VC-2 (patas e cauda inchadas). Os ratinhos inoculados com 10^3 fpu da estirpe WR não desenvolveram lesões até aos 34 dias pi. A orquite foi observada apenas nos ratinhos inoculados com a dose mais elevadas de WR (10^4 ufp). Durante as fases mais tardias do período de observação, surgiram lesões à volta da boca e os ratinhos pararam de comer. Todos os ratinhos inoculados com 10^4 ufp de WR morreram ou foram mortos quando necessário, entre 21 dias e 31 dias pi.

Quatro de cinco ratinhos injectados com 10^3 ufp de WR morreram ou foram mortos quando necessário entre os 35 dias e os 57 dias pi. Não foram observadas mortes em ratinhos inoculados com doses mais baixas de WR (1 a 100 ufp).

Os ratinhos inoculados com a estirpe WYEATH do vírus da vacina em doses mais elevadas (5×10^7 e 5×10^8 ufp) mostraram lesões nas patas e caudas, desenvolveram orquite e morreram. Os ratinhos injectados com 5×10^6 ou menos de WYEATH não mostraram sinais de doença ou lesões.

Como se mostra na Tabela 19, os ratinhos tratados com CY proporcionam um modelo mais sensível para testar a virulência de poxvírus do que os ratinhos labros. Os valores de LD_{50} para as estirpes WR, WYEATH e VC-2 do vírus da vacina foram significativamente mais baixos neste sistema modelo do que no modelo de ratinhos labros. Ainda, desenvolveram-se lesões em ratinhos injectados com vírus da vacina WYEATH, WR e VC-2, como se mostra abaixo, com as doses mais elevadas de cada um dos vírus resultando na formação mais rápida de lesões. Tal como foi observado nos ratinhos labros, os ratinhos tratados com CY injectados com NYVAC ou ALVAC não desenvolveram lesões. No entanto, ao contrário dos ratinhos labros, foram observadas algumas mortes em ratinhos tratados com CY infectados com NYVAC ou ALVAC, independentemente da dose. Estas ocorrências ao acaso são suspeitas como causa de morte.

Os ratinhos injectados com todas as doses de

WYEATH ($9,5 \times 10^4$ a $9,5 \times 10^8$ ufp) apresentaram lesões tipo varíola na sua cauda e/ou nas suas patas, entre 7 e 15 dias pi. Ainda, as caudas e as patas incharam. A evolução das lesões da cauda foi típica das lesões do tipo varíola com formação de uma pápula, ulceração e finalmente formação de uma crosta. Os ratinhos inoculados com todas as doses de VC-2 ($1,65 \times 10^5$ a $1,65 \times 10^9$) também desenvolveram lesões tipo varíola nas suas caudas e/ou patas análogas às dos ratinhos injectados com WYEATH. Estas lesões foram observadas entre 7 e 12 dias pós-inoculação. Não foram observadas lesões em ratinhos injectados com doses mais baixas de vírus WR, se bem que tenham ocorrido mortes nestes grupos.

Testagem da potência de NYVAC-RG. Para determinar que a atenuação da estirpe COPENHAGEN do vírus da vacina foi realizada sem alterar significativamente a capacidade da estirpe NYVAC resultante como vector útil, foram realizados testes de potência comparativos. Para monitorizar o potencial imunogénico do vector durante as manipulações genéticas sequenciais, efectuadas para atenuar o vírus, foi usada uma glicoproteína da raiva como antigénio repórter extrínseco. A eficácia protectora dos vectores que expressam o gene da glicoproteína da raiva foi avaliada no teste convencional de potência com ratinhos NIH (Seligmann, 1973). A Tabela 20 demonstra que os valores de PD_{50} obtidos com o vector NYVAC altamente atenuado são idênticos aos obtidos usando um recombinante baseado em COPENHAGEN contendo o gene da glicoproteína da raiva no

locus tk (Kieny et al., 1984) e aos valores de PD_{50} obtidos com ALVAC-RG, um vector baseados em vírus da varíola dos canários restringido à replicação a espécies aviárias.

Observações. NYVAC, sem os genes de virulência conhecidos e tendo características de replicação *in vitro* restrictas, foi analisado em sistemas de modelo animal para avaliar as suas características de atenuação. Estes estudos foram realizados comparando com a estirpe laboratorial neurovirulenta do vírus da vacina, WR, duas estirpes vacinais de vírus da vacina, WYETH (New York City Board of Health) e COPENHAGEN (VC-2), assim como com uma estirpe de vírus da varíola dos canários, ALVAC (ver também o Exemplo 11). Em conjunto estes vírus proporcionaram um espectro de potencial patogénico relativo no modelo de infecção de ratinho e no modelo da pele de coelho, sendo WR a estirpe mais virulenta, WYEATH e COPENHAGEN (VC-2) proporcionando estirpes de vacina atenuadas anteriormente utilizadas com características documentadas e ALVAC proporcionando um exemplo de um poxvírus cuja replicação está restringida a espécies aviárias. Os resultados destas análises *in vivo* demonstram claramente as propriedades altamente atenuadas de NYVAC relativamente às estirpes do vírus da vacina WR, WYEATH e COPENHAGEN (VC-2) (Tabelas 14-20). Significativamente, os valores de LD_{50} para NYVAC foram comparáveis aos observados com os do poxvírus aviário ALVAC, restringido aos hospedeiros aviários. As mortes devidas a NYVAC, assim como a ALVAC, foram observadas apenas quando foram administradas doses extremamente elevadas por via

intracraniana (Exemplo 11, Tabelas 14, 15, 19). Ainda não foi estabelecido se estas mortes foram devidas a consequências não específicas da inoculação de uma massa elevada de proteína. Os resultados das análises em modelos de ratinhos imunocomprometidos (labros e tratados com CY) também demonstraram características de atenuação relativamente elevada de NYVAC, comparativamente com as estirpes WR, WYEATH e COPENHAGEN (Tabelas 17 e 18). É de notar que não houve evidência de infecção disseminada por vírus da vacina, nem foi observada doença vacinal em animais inoculados com NYVAC ou em animais inoculados com ALVAC ao longo do período de observação. A deleção de múltiplos genes associados a virulência em NYVAC mostra um efeito sinérgico relativamente à patogenicidade. Uma outra medida de inocuidade de NYVAC foi proporcionada pela administração intradérmica na pele de coelho (Tabelas 17 e 18). Considerando os resultados com ALVAC, um vírus incapaz de se replicar em espécies não aviárias, a capacidade de se replicar no local de inoculação não é a única demonstração de reactividade, uma vez que a inoculação intradérmica de ALVAC causou áreas de endurecimento numa forma dependente de dose. Assim, é provável que outros factores para além da capacidade replicativa contribuam para a formação das lesões. A deleção de genes específicos associados a virulência em NIVAC evita a ocorrência de lesões.

Em conjunto, os resultados deste Exemplo e dos Exemplos que se seguem, incluindo o Exemplo 10, demonstram a natureza altamente atenuada de NYVAC relativamente a WR e

às estirpes vacinais do vírus da vacina anteriormente utilizadas, WYEATH e COPENHAGEN. De facto, o perfil patogénico de NYVAC, nos sistemas de modelo animal testados, foi semelhante ao de ALVAC, um poxvírus conhecido por se replicar produtivamente apenas em espécies aviárias. A capacidade aparentemente restringida de NYVAC para se replicar produtivamente em células humanas (Tabela 16) e noutras espécies, incluindo o ratinho, suíno, cão e cavalo, proporciona uma barreira considerável que limita ou evita a potencial transmissão a contactos não vacinados ou para o ambiente em geral, para além de proporcionar um vector com probabilidade reduzida de disseminação no indivíduo vacinado.

Significativamente, demonstrou-se que os candidatos a vacinas baseados em NYVAC são eficazes. Os recombinantes de NYVAC que expressam os produtos de genes heterólogos de uma série de agentes patogénicos induzem respostas imunitárias contra os produtos de genes heterólogos em várias espécies animais, incluindo primatas. Em particular, um recombinante baseado em NYVAC que expressa a glicoproteína da raiva foi capaz de proteger ratinhos contra a infecção letal pela raiva. A potência do recombinante da glicoproteína da raiva baseado em NYVAC foi comparável ao valor de PD_{50} para um recombinante baseado em COPENHAGEN contendo a glicoproteína da raiva no *locus tk* (Tabela 20). Também se demonstrou que os recombinantes baseados em NYVAC induzem anticorpos neutralizantes contra o vírus do sarampo em coelhos e protecção contra a infecção

pelo vírus da pseudo-raiva e pelo vírus da encefalite japonesa em suínos. A estirpe NYVAC altamente atenuada confere vantagens de segurança para aplicações médicas nos seres humanos e veterinárias nos animais (Tartaglia *et al.*, 1992). Ainda, a utilização de NYVAC como um sistema vector de expressão geral em laboratório pode grandemente reduzir os perigos biológicos associados à utilização de vírus da vacina.

Pelos critérios que se seguem, os resultados deste Exemplo e dos outros Exemplos aqui apresentados, incluindo o Exemplo 10, mostram que NYVAC está altamente atenuado: a) ausência de endurecimento ou ulceração detectável no local da inoculação (pele de coelho); b) eliminação rápida do vírus infeccioso do local de inoculação intradérmica (pele de coelho); c) ausência de inflamação testicular (ratinhos labros); d) virulência grandemente reduzida (infecção intracraniana, em ratinhos com três semanas de idade e em recém-nascidos); e) patogenicidade grandemente reduzida e incapacidade de se disseminar em indivíduos imunodeficientes (ratinhos labros e tratados com ciclofosfamida); e f) capacidade dramaticamente reduzida para se replicar numa variedade de células humanas em cultura de tecidos. No entanto, apesar de estar altamente atenuado, NYVAC, como vector, mantém a capacidade de induzir fortes respostas imunitárias contra antigénios extrínsecos.

TABELA 16: REPLICAÇÃO DE COPENHAGEN (VC-2), NYVAC E ALVAC
EM LINHAS CELULARES AVIÁRIAS OU HUMANAS

Células	Horas pós-infecção	Produção ^a			% de produção
		VC-2	NYVAC	ALVAC	
CEF	0	3,8 ^b	3,7	4,5	
	24	8,3	7,8	6,6	
	48	8,6	7,9	7,7	
	72	8,3	7,7	7,5	25
	72A ^c	<1,4	1,8	3,1	
MRC-5	0	3,8	3,8	4,7	
	72	7,2	4,6	3,8	0,25
	72A	2,2	2,2	3,7	
WISH*	0	3,4	3,4	4,3	
	72	7,6	2,2	3,1	0,0004
	72 ^a	- ^d	1,9	2,9	
DETROIT	0	3,8	3,7	4,4	
	72	7,2	5,4	3,4	1,6
	72 ^a	1,7	1,7	2,9	
HEL	0	3,8	3,5	4,3	
	72	7,5	4,6	3,3	0,125
	72 ^a	2,5	2,1	3,6	
JT-1	0	3,1	3,1	4,1	
	72	6,5	3,1	4,2	0,039
	72A	2,4	2,1	4,4	
HNK	0	3,8	3,7	4,7	
	72	7,6	4,5	3,6	0,079
	72A	3,1	2,7	3,7	

(continuação)

Células	Horas pós-infecção	Produção ^a	% de produção
a: Produção de NYVAC às 72 horas pós-infecção expressa como percentagem da produção de VAC-2 após 72 horas na mesma linha celular. b: Título expresso como Log₅₀ ufp por ml. c: A amostra foi incubada na presença de 40 µg/ml de citosina arabinósido. d: Não determinado. *: ATCC #CCL25 células amnióticas humanas.			

TABELA 17. ENDURECIMENTO E ULCERAÇÃO NO LOCAL DA INOCULAÇÃO
INTRADÉRMICA NA PELE DE COELHO.

Estirpe viral	Dose ^a	Endurecimento		Ulceração	
		Tamanho ^b	Dias ^c	Tamanho	Dias
WR	10 ⁴	386	30	88	30
	10 ⁵	622	35	149	32
	10 ⁶	1057	34	271	34
	10 ⁷	877	35	204	35
	10 ⁸	581	25	88	26
WYEATH	10 ⁴	32	5	-- ^d	--
	10 ⁵	116	15	--	--
	10 ⁶	267	17	3	15
	10 ⁷	202	17	3	24
	10 ⁸	240	29	12	31
VC-2	10 ⁴	64	7	--	--
	10 ⁵	86	8	--	--

(continuação)

Estirpe viral	Dose ^a	Endurecimento		Ulceração	
		Tamanho ^b	Dias ^c	Tamanho	Dias
	10 ⁶	136	17	--	--
	10 ⁷	167	21	6	10
	10 ⁸	155	32	6	8
NYVAC	10 ⁴	--	--	--	--
	10 ⁵	--	--	--	--
	10 ⁶	--	--	--	--
	10 ⁷	--	--	--	--
	10 ⁸	--	--	--	--
^a ufp do vírus da vacina indicado em 0, ml de PBS inoculados intradermicamente num local. ^b tamanho máximo médio das lesões (mm ²) ^c título médio após inoculação para cicatrização completa da lesão. ^d sem lesões discerníveis					

TABELA 18. PERSISTÊNCIA DE POXVÍRUS NO LOCAL DA INOCULAÇÃO INTRADÉRMICA

Vírus	Dose do inóculo	Vírus total recuperado
wR	8,0 ^a	6,14
	7,0	6,26
	6,0	6,21
WYEATH	8,0	3,66
	7,0	4,10
	6,0	3,59

(continuação)

Vírus	Dose do inóculo	Vírus total recuperado
VC-2	8,0	4,47
	7,0	4,74
	6,0	3,97
NYVAC	8,0	0
	7,0	0
	6,0	0
a: expresso como $\log_{10}$ ufp.		

TABELA 19. ESTUDOS DA VIRULÊNCIA EM RATINHOS IMUNOCOM-PROMETIOS

Estirpe de poxvírus	LD ₅₀ ^a	
	Ratinhos labros	Ratinhos tratados com ciclofosfamida
WR	422	42
VC-2	$>10^9$	$<1,65 \times 10^5$
WYEATH	$1,58 \times 10^7$	$1,83 \times 10^6$
NYVAC	$>5,50 \times 10^8$	$7,23 \times 10^8$
ALVAC	$>10^9$	$\geq 5,00 \times 10^{8b}$
a: dose letal para 50% (ufp) calculada para ratinhos labros ou tratados com ciclofosfamida para os vírus da vacina indicados e para ALVAC pela via intraperitoneal		
b: 5 em 10 ratinhos morreram com a dose mais elevada de 5×10^8 ufp.		

TABELA 20. EFICÁCIA COMPARATIVA DE NYVAC-RG E ALVAC-RG EM RATINHOS

Recombinante	PD ₅₀ ^a
W-RG	3,74
ALVAC-RG	3,86
NYVAC-RG	3,70

a: Ratinhos com quatro a seis semanas de idade foram inoculados na pata com 50-100 µl de uma gama de diluições (2,0 -8,0 log₁₀ doses que causam 50% de infecção em cultura de tecidos (TCID₅₀) de VV-RG (Kieny *et al.*, 1984), ALVAC-RG (vCP65) ou NYVAC-RG (vP879). No dia 14, os ratinhos de cada grupo foram infectados por inoculação intracraniana de 30 µl de uma estirpe CVS viva do vírus da raiva correspondendo a 15 doses que causam 50% de letalidade (LD₅₀) em ratinhos. No dia 28, os ratinhos que sobreviveram foram contados e calculada uma dose protectora de 50% (PD₅₀)

EXEMPLO 12 - DURAÇÃO DA IMUNIDADE EM CÃES INDUZIDA POR VCP-

65

Este Exemplo testa em cães a duração da imunidade induzida pelo recombinate variola dos canários-raiva vCP65 usando uma única imunização com 10^{6,7} TCID₅₀.

Materiais:

53 cães, com 8 meses de idade, sem anticorpos

contra o vírus da raiva (Beagle) e o recombinante vCP-65 produzido em CEF na sexta passagem, contendo $10^{6,7}$ TCID₅₀/ml.

Métodos:

Imunização

No dia 0, 41 cães foram inoculados por via subcutânea, com 1 ml da suspensão de vCP65. Doze (12) cães não foram inoculados (animais controlos). Dois animais vacinados morreram de morte inespecífica.

Testagem serológica

Colheu-se sangue de todos os cães no dia 0 e 1, 2, 3, 6 meses após vacinação. Colheu-se sangue de alguns dos cães noutros pontos de tempo (12, 24 e 36 meses após vacinação).

Para um seguimento a curto prazo, colheu-se sangue de 10 cães nos dias 0, 7, 14 e 21.

Anticorpos contra a raiva: RFFITest (SN).

Anticorpos contra a varíola dos canários: ELISA: técnica indirecta contra vírus total purificado.

Teste de segurança

Desde o dia 0 ao dia 7: observação diária e registo da temperatura para cada animal.

Desde o dia 7 ao dia 28: observação semanal.

Infecção

Um primeiro grupo de 5 cães foi infectado seis meses após vacinação, por inoculação intramuscular de $10^{3,4}$ doses letais (LD)50%/ratinho, no músculo temporal (2 x 0,5 ml). Três (3) animais controlos não vacinados receberam o mesmo inóculo na mesma altura.

Um segundo grupo de 11 cães vacinados foi infectado nas mesmas condições, 12 meses após vacinação e ao mesmo tempo, três (3) animais testemunha foram igualmente infectados.

Um segundo grupo de 11 cães vacinados foi infectado, nas mesmas condições, 24 meses após vacinação. Ao mesmo tempo, três (3) animais controlos foram igualmente infectados.

Um quarto grupo de doze (12) cães vacinados foi infectado, nas mesmas condições, 36 meses após vacinação. Ao mesmo tempo, três (3) animais controlos foram igualmente infectados.

Resultados:Segurança de vCP65

Nenhum dos cães apresentou reacção local ou geral (ver Tabelas de temperatura 26 e 27).

Serologia

Anticorpos contra a raiva: Ab SN contra a raiva foram induzidos em todos os 41 cães vacinados. O nível máximo foi observado entre 14 e 28 dias, seguido de um decréscimo rápido (ver Tabelas 21, 22 e 29).

Anticorpos CP: todos os cães eram positivos no dia 28. Apenas um cão induziu um nível baixo de Ab e este estava correlacionado com um nível baixo de anticorpos contra a raiva (ver Tabelas 23 e 24).

Infecção

Todos os cães vacinados sobreviveram após infecção realizada 6 ou 12 meses mais tarde (ver Tabela 25). Dez de onze (10/11) sobreviveram à infecção aos 24 meses e 11/12 sobreviveram à infecção 36 meses após a vacinação (ver Tabela 28).

A titulação de Ab contra a raiva foi realizada 2

meses após a infecção nos cães que sobreviveram (infecção aos 6 meses). Os cinco (5) cães tinham um nível elevado de Ab.

Discussão:

A cinética de anticorpos observada nos cães imunizados foi muito rápida e na altura da infecção, aos 12 meses, a maior parte deles eram quase "negativos". Apesar deste facto, 100% estavam protegidos. Vários cães induziram níveis particularmente baixos de anticorpos contra a raiva: menos de 1 U.I. um mês após vacinação. Um deles foi resistente à infecção aos 12 meses. Os outros 3 foram infectados mais tarde.

TABELA 21 CINÉTICA DE ANTICORPOS CONTRA A RAIVA (RFFIT)
INDUZIDOS PELO RECOMBINANTE VARÍOLA DOS CANÁRIOS/RAIVA
VCP65 I: SEGUIMENTO A LONGO PRAZO

Grupo	Cão N°	Anticorpos em U.I. (tempo em meses)						
		0	1	2	3	6	(°8)	12
VCP65 10 ^{6,7} /ml	N1V9	0,74	7,45	0,93	0,07	0,18		0,09
	N3V9	0,29	7,45	0,29	0,23	0,74		0,15
	N2V9	1,17	3,73	0,29	0,23	0,23		0,07
	N3W22	0,23	9,38	0,93	0,23	0,12		0,05
	N5W22	0,23	4,70	0,93	0,23	0,59	7,40	
	N4V9	0,59	11,80	0,74	0,18	0,23		0,15
	N1W38	0,47	18,71	1,17	0,74	0,47		0,15
	N8W22	0,74	2,35	0,59	0,23	1,85		0,15
	N7W22	0,74	7,45	1,17	0,23	0,18	7,40	
	N8V14	0,23	7,45	0,74	0,23	0,23		0,38

		(continuação)						
Grupo	Cão N°	Anticorpos em U.I. (tempo em meses)						
		0	1	2	3	6	(°8)	12
	N7V14	0,47	3,73	0,29	0,15	0,15		0,15
	N1R54	0,23	7,45	2,94	0,47	0,59		0,12
	N9V14	0,23	0,94	0,29	0,07	0,18		0,15
	N2S44	0,47	0,74	0,09	0,07	0,07		0,05
	N3T2	0,47	2,35	0,29	0,07	0,07		0,05
	N5V49	0,23	18,71	1,48	0,47	0,59		0,38
	N4V49	0,23	7,45	0,93	0,23	0,29	2,30	
	N2V49	0,29	2,35	0,19	0,15	0,18		0,05
	N1V49	0,23	7,45	0,93	0,23	0,12		0,09
	N1V83	0,07	1,87	0,59	0,12	0,18		0,05
	N2T90	0,23	7,45	1,17	0,59	0,23	1,80	
	N3V57	0,47	14,86	1,17	0,47	0,74	7,40	
VCP65	N2V57	0,23	7,45	1,17	0,23	0,23		0,15
10 ^{6,7} /ml	N10W22	0,07	7,45	0,37	0,23	0,15		0,15
	N5W38	0,23	4,70	0,93	0,23	0,23		0,15
	N9W22	0,18	2,96	0,59	0,23	0,29		0,15
	N13V14	0,74	7,45	0,37	0,18	0,07		0,15
	N12V14	0,59	2,35	0,15	0,07	0,12		0,05
	N3S44	0,07	0,93	0,18				
	N4R54	0,29	7,45	2,34	0,29	0,74	0,47	
	N5V9	0,07	7,45	0,93	0,18	0,47		0,09
	N6V9	0,47	2,35	0,93	0,23	0,74		0,15
	N8V9	0,29	7,45	0,93	0,23	0,15		0,05
	N4R18	0,23	7,45	0,93	0,23	0,93		0,12
	N3W38	0,12	37,33	2,34	0,23	0,93		0,15
	N4W38	0,23	18,71	4,67	0,47	0,74		0,47
	N4V57	0,23	7,45	2,94	0,47	1,17		0,29
	N5T90	0,23	2,35	0,74	0,12	0,74		0,07
	N6V49	0,18	2,35	0,39	0,23	0,23		0,15
	N3S110	0,59	7,45	0,93	0,47	0,74		0,29
	N9R27	0,07	0,94	0,93	0,23	0,59		0,09
	Média	0,28	6,11	0,71	0,22	0,31		0,13
	geométrica							

(continuação)

Grupo	Cão N°	Anticorpos em U.I. (tempo em meses)					
		0	1	2	3	6	(°8) 12
Controlos	N1S44	0,74	0,74	0,07	0,02	0,07	0,05
	N1V57	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,05
	N3T90	0,23	0,94	0,09	0,07	0,07	0,05
	N1S10	0,74	0,47	0,09	0,07	0,07	0,05
	N10V14	0,23	0,74	0,09	0,07	0,07	0,05
	N14V14	0,23	0,59	0,07	0,07	0,07	0,05
	N5R54	0,23	0,59	0,07	0,07	0,07	0,05
	N7V9	0,59	0,49	0,09	0,07	0,07	0,05
	N2W38	0,74	1,17	0,15	0,07	0,07	0,05
	195	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	
	194	0,59	0,47	0,09	0,07	0,07	
	198	0,29	0,05	0,18	0,07	0,07	
	X	0,30	0,37	0,09	0,06	0,07	

TABELA 22 CINÉTICA DE ANTICORPOS CONTRA A RAIVA (RFFIT)
INDUZIDOS PELO RECOMBINANTE VARÍOLA DOS CANÁRIOS/RAIVA
VCP65 II: SEGUIMENTO A CURTO PRAZO

Grupo	Cão N°	Anticorpos em U.I. (tempo em dias)							
		0	7	14	21	28	60	90	180 360
	N10W22	0,07	0,74	4,70	9,38	7,45	0,37	0,23	0,15 0,15
	N9W22	0,18	0,74	11,80	4,70	2,95	0,59	0,23	0,29 0,15
	N3S44	0,07	0,29	3,73	2,96	0,93	0,18		
	N5V9	0,07	0,74	7,45	7,45	7,45	6,93	0,18	0,47 0,09
	N3W38	0,12	0,74	59,16	59,16	37,33	2,34	0,23	0,93 0,15
	N4V57	0,23	0,74	9,38	18,71	7,45	2,94	0,47	1,17 0,29
	N5T90	0,23	1,17	4,70	7,45	2,35	0,74	0,12	0,74 0,07
	N6V49	0,18	0,74	11,80	7,45	2,35	0,29	0,23	0,23 0,15
	N3S110	0,59	3,73	4,86	4,70	7,45	0,93	0,47	0,74 0,29
	N9R27	0,07	0,23	2,35	4,45	0,94	0,93	0,23	0,59 0,09
	Média geom.	0,14	0,74	7,47	8,12	4,18	0,74	0,24	0,49 0,14

TABELA 23 CINÉTICA DE ANTICORPOS CONTRA A VARÍOLA DOS
CANÁRIOS (ELISA) INDUZIDOS PELO RECOMBINANTE VARÍOLA DOS
CANÁRIOS/RAIVA VCP65 I: SEGUIMENTO A LONGO PRAZO

Grupo	Cão N°	DO a 450 nm (soros a 1/100) (tempo em meses)						
		0	1	2	3	6	(*8)	12
vCP65 10 ^{6,7} /ml	N1V9	0,10	0,40	0,33	0,17	0,04		0,01
	N3V9	0,14	0,30	0,20	0,11	0,02		0
	N2V9	0,10	0,27	0,24	0,11	0,09		0
	N3W22	0,11	0,26	0,27	0,15	0,03		0
	NSW22	0,12	0,26	0,22	0,15	0,00	0,03	
	N4V9	0,14	0,32	0,17	0,07	0,00		0
	N1W38	0,10	0,42	0,30	0,14	0,03		0
	N8W22	0,13	0,28	0,22	0,10	0,03		0
	N7W22	0,08	0,37	0,29	0,21	0,03	0,02	
	N8V14	0,10	0,44	0,29	0,09	0,04		0
	N7V14	0,08	0,28	0,19	0,05	0,00		0,02
	N1R54	0,03	0,23	0,18	0,09	0,00		0
	N9V14	0,08	0,34	0,26	0,05	0,04		0
	N2S44	0,15	0,31	0,25	0,09	0,03		0,01
	N3T2	0,06	0,20	0,13	0,00	0,00		0
	N5V49	0,05	0,38	0,24				
	N4V49	0,09	0,34	0,20	0,01	0,00		0
	N2V49	0,02	0,32	0,22	0,00	0,06		0
	N1V49	0,09	0,33	0,25	0,14	0,00		0
	N1V83	0,13	0,25	0,28	0,10	0,00		0,02
	N2T90	0,05	0,42	0,37	0,09	0,14	0,01	
	N3V57	0,04	0,53	0,51	0,28	0,17	0,01	
	N2V57	0,05	0,38	0,39	0,11	0,07		0,01
	N10W22	0,05	0,28	0,26	0,01	0,05		0
	N5W38	0,04	0,44	0,37	0,24	0,05		0
	N9W22	0,10	0,31	0,25	0,18	0,05	0,00	0,01
	N13V14	0,15	0,30	0,13	0,15	0,00		0,01
	N12V14	0,18	0,33	0,20	0,18	0,01		0,03
	N3S44	0,10	0,37	0,33				
	N4R54	0,10	0,28	0,26	0,16	0,06		0

(continuação)							
Grupo	Cão N°	DO a 450 nm (soros a 1/100) (tempo em meses)					
		0	1	2	3	6	(*8) 12
vCP65 10 ^{6,7} /ml	N5V9	0,11	0,33	0,24	0,14	0,05	0,02
	N6V9	0,00	0,31	0,40	0,08	0,05	0,02
	N8V9	0,09	0,35	0,29	0,08	0,06	0,01
	N4R18	0,13	0,30	0,23	0,09	0,02	0,01
	N3W38	0,10	0,38	0,26	0,05	0,06	
	N4W38	0,07	0,58	0,41	0,16	0,08	0
	N4V57	0,07	0,29	0,24	0,08	0,04	0,01
	N5T90	0,06	0,23	0,22	0,06	0,00	0
	N6V49	0,08	0,28	0,30	0,14	0,07	0,01
	N3S110	0,10	0,23	0,28	0,18	0,10	0,01
	N9R27	0,06	0,11	0,17	0,07	0,01	0,01
	Média geométrica	0,09	0,33	0,26	0,11	0,04	0,01
Controlos	N1S44	0,06	0,18	0,16	0,02	0,00	0,01
	N1V57	0,04	0,17	0,13	0,00	0,00	0,01
	N3T90	0,00	0,16	0,07	0,00	0,00	0,00
	N1S10	0,09	0,16	0,16	0,00	0,00	0,01
	N10V14	0,09	0,18	0,08	0,00	0,00	0,00
	N14V14	0,04	0,19	0,06	0,00	0,00	0,00
	N5R54	0,09	0,17	0,09	0,00	0,00	0,00
	N7V9	0,13	0,15	0,15	0,00	0,00	0,00
	N2W38	0,10	0,18	0,10	0,00	0,00	
	195	0,06	0,12	0,17	0,00	0,00	
	194	0,90	0,13	0,23	0,00	0,00	
	98	0,13	0,05	0,13	0,00	0,00	
	Média geométrica	0,08	0,15	0,13	0,00	0,00	0,00

(*): 8 meses = titulação de anticorpos 2 meses após a infecção

TABELA 24 CINÉTICA DE ANTICORPOS CONTRA A VARÍOLA DOS
CANÁRIOS (ELISA) INDUZIDOS PELO RECOMBINANTE VARÍOLA DOS
CANÁRIOS/RAIVA VCP65 II: SEGUIMENTO A CURTO PRAZO

Grupo	Cão N°	DO a 450 nm (soros a 1/100) (tempo em dias)								
		0	7	14	21	28	60	90	180	360
vCP65	N10W22	0,05	0,19	0,24	0,22	0,28	0,26	0,01	0,05	0
10 ^{6,7} /ml	N9W22	0,10	0,14	0,29	0,32	0,31	0,25	0,18	0,05	0
	N3S44	0,10	0,15	0,23	0,33	0,37	0,33			
	N5V9	0,11	0,15	0,30	0,30	0,33	0,24	0,14	0,05	0,02
	N3W38	0,10	0,11	0,40	0,37	0,38	0,26	0,05	0,06	
	N4V57	0,07	0,13	0,31	0,29	0,39	0,24	0,08	0,04	0,01
	N5T90	0,06	0,07	0,27	0,29	0,23	0,22	0,06	0	0
	N6V49	0,08	0,11	0,36	0,34	0,28	0,30	0,14	0,07	0,01
	N3S110	0,10	0,14	0,28	0,37	0,23	0,28	0,18	0,1	0,01
	N9R27	0,06	0,08	0,15	0,11	0,11	0,17	0,07	0,01	0,01
	X	0,08	0,13	0,28	0,29	0,29	0,26	0,10	0,05	0,01

TABELA 25

IMUNIDADE DURADORA EM CÃES IMUNIZADOS COM CP/RAIVA						
1: <u>ANIMAIS</u> : Cães (Beagle) 8 meses de idade, sem anticorpos contra a raiva						
2: <u>RECOMBINANTE</u> : vCP-65, 6ª passagem em células CEF.						
3: <u>IMUNIZAÇÃO</u> : 1 ml (10 ^{6,7} TCID ₅₀), por via subcutânea, no dia zero.						
4: <u>TESTES SEROLÓGICOS</u> : Anticorpos SN contra a raiva, "Teste rápido de inibição de focos de fluorescência".						
5. <u>INFECÇÃO</u> : 0,5 ml da estirpe virulenta em cada um dos músculos temporais (estirpe NYGS).						
I: infecção aos 6 meses (10 ^{3,4} LD ₅₀ -ratinho/cão)						
ANTICORPOS SN CONTRA A RAIVA (RFFIT)						
Grupo	Cão N°	Máximo observado log U.I.	log U.I.	Dia da infecção log U.I.	Resultado (*)	Taxa de sobrevivência
vacinado	N2T90	2,2 (D28)	7,75	0,7	0,23	100%
	N3V57	2,5 (D28)	14,8	0,7	0,23	
	N4V49	2,2 (D28)	7,45	0,8	0,29	
	N5W22	2 (D28)	8,7	1,1	0,59	
	N7W22	2,2 (D28)	7,45	0,6	0,18	

(continuação)

IMUNIDADE DURADORA EM CÃES IMUNIZADOS COM CP/RAIVA							
1: <u>ANIMAIS</u> : Cães (Beagle) 8 meses de idade, sem anticorpos contra a raiva							
2: <u>RECOMBINANTE</u> : vCP-65, 6ª passagem em células CEF.							
3: <u>IMUNIZAÇÃO</u> : 1 ml ($10^{6,7}$ TCID ₅₀), por via subcutânea, no dia zero.							
4: <u>TESTES SEROLÓGICOS</u> : Anticorpos SN contra a raiva, "Teste rápido de inibição de focos de fluorescência".							
5. <u>INFECÇÃO</u> : 0,5 ml da estirpe virulenta em cada um dos músculos temporais (estirpe NYGS).							
I: infecção aos 6 meses ($10^{3,4}$ LD ₅₀ -ratinho/cão)							
ANTICORPOS SN CONTRA A RAIVA (RFFIT)							
Grupo	Cão N°	Máximo observado		Dia da infecção		Resultado	Taxa de
		log	U.I.	log	U.I.	(*)	sobrevivência
controle	194	1 (D28)	0,47	0,2	0,07	D(16)	0%
	195	0,2 (028)	0,07	0,2	0,07	D(24)	
	198	1 (D28)	0,47	0,2	0,07	D(17)	
II: infecção aos 12 meses ($10^{3,4}$ LD ₅₀ -ratinho/cão)							
ANTICORPOS SN CONTRA A RAIVA (RFFIT)							
Grupo	Cão N°	Máximo observado		Dia da infecção		Resultado	Taxa de
		Log	U.I.	Log	U.I.	(*)	sobrevivência
vacinado	N1V9	2,2 (0,28)	7,45	0,5	0,09	S	100%
	N3V9	2,2 (0,28)	7,45	0,7	0,15	S	
	N2V9	1,9 (0,28)	3,73	0,4	0,07	S	
	N7W22	2,3 (0,28)	9,78	0,2	0,05	S	
	N4V9	2,2 (0,28)	7,45	0,7	0,15	S	
	N1W38	2,6 (0,28)	18,7	0,7	0,15	S	
	N8W22	1,7 (0,28)	2,35	0,7	0,15	S	
	N8V14	2,2 (0,28)	7,45	1,1	0,38	S	
	N7V14	1,9 (0,28)	3,73	0,7	0,15	S	
	N1R45	2,2 (0,28)	7,45	0,6	0,12	S	
	N9V14	1,3 (2,8)	0,94	0,7	0,15	S	
controle	N10V14	1,2 (0,28)	0,74	0,2	0,05	D(14)	0%
	N14V14	1,1 (0,28)	0,59	0,2	0,05	D(13)	
	N5R54	1,2 (0,28)	0,74	0,2	0,05	D(14)	
(*): S = Sobreviventes, D(16) = Mortos, 16 dias após infecção							

TABELA 26: ESTUDO DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE EM CÃES
IMUNIZADOS COM O RECOMBINANTE VARÍOLA DOS CANÁRIOS/RAIVA
VCP65: TEMPERATURAS

Dia	0	1	2	3	4	7
Cão						
N8W22	39,5	38,6	38,4	39,3	39,4	39
N5W22	40,2	39,5	38,8	39,7	39,9	39,6
N7W22	39,7	38,8	38,5	39,6	39,4	39,3
N7V14	39,9	39,6	39,1	39,5	39,4	39,6
N1W38	39,2	39,5	38,1	38,9	38,8	38,9
N9V14	39,4	38,7	38,9	39,3	39,8	39,2
N2V9	39,4	38,4	39,3	39	38,5	39,2
N4V9	39,7	39	39,4	39,1	39,2	39,3
N5V49	39,6	39,5	39,5	39,2	39	39,1
N1V9	40	38,7	39,2	39,3	38,9	39,3
N2V49	39,4	39,2	39,2	39,2	39,1	38,8
N1V83	40	39,2	39,3	39,3	39,1	39,2
N3S110	39,1	38,4	38,7	38,7	38,8	38,3
N3S44	39,4	38,5	39	38,9	39	38,7
N5T90	38,9	38,5	38,9	38,9	36,8	38,7
N9R77	38,9	38,7	39,2	38,8	38,8	38,7
N6V49	39,2	39	38,7	38,7	38,7	38,4
N3W38	39,1	38,4	38,9	38,9	38,6	38,3
N5V9	39,9	39,3	39,8	39,2	39,3	39,2
N4V57	39,7	39,8	39,8	39,8	39	39,2
N10W22	39,4	39,7	39,3	39	38,8	38,8
N4W38	38,6	38,4	38,5	38,3	38,4	38,2

(continuação)

Dia	0	1	2	3	4	7
Cão						
N8V9	39,8	39,6	39,9	39,5	39,3	39,3
N5W38	39,4	38,3	38,8	38,2	38,3	38,6
N12V14	38,7	38,7	39	38,9	38,6	38,8
N9W22	39,2	39	39,3	39,5	39,1	38,8
N12V14	38,7	38,2	39	38,9	38,6	38,8
N4R18	39,2	38,7	39,3	39,3	39,2	39,2
N4R54	39,2	39,2	39,1	39,3	39,1	38,8
N6V9	39,2	39,6	39,7	39,4	39,2	39,3
N13V14	39,2	39,2	39	39,2	39	38,9
N2V44	39,1	39,8	39,2	39,1	38,6	38,6
N8V14	39,9	38,9	39,3	38,8	39,1	39,2
N1V49	39,3	39	39,1	39,2	38,7	39
N4V49	39,1	38,7	39,5	39	38,6	39,1
N1R54	39,6	38,5	39,6	39,1	38,6	39,1
N3V57	39,2	38,6	39,2	38,8	38,9	39
N3V9	39,6	39,4	39,5	39,3	38,7	39,4
N3W22	39,4	39,5	39,2	39,4	39,1	39
M3T2	39,3	39,3	39,4	39,1	39,2	39,3
N2T90	39,5	39	39,3	38,9	38,9	38,9
N2V57	39,4	39	39,5	39,2	38,7	38,9
Média geométrica	39,4	39,0	39,2	39,1	38,9	39,0

TABELA 27: TEMPERATURAS

Dia	0	1	2	3	4	7
Cão						
N1V57	39,5	39,2	39,6	39,5	39,4	39,1
N1S10	39,3	38,4	39,3	39,4	38,9	39,1
N1S44	39,2	39,6	39,6	39,7	39,1	39,3
N3T90	39,4	39,4	39,8	39,9	38,9	39
N2W38	38,5	38,4	38,8	38,6	38,5	38,5
N5R54	39,2	39,2	39,1	39,2	39	39,2
N7V9	39,1	39,5	39,6	39,4	39,1	39,5
N10V14	38,5	39,9	39,3	39	39,5	38,8
N14V14	38,9	39,7	39,3	39,4	39,2	39,3
195	38	37,2	37,6	37,6	38,6	38
194	38,4	38,2	38,3	38,3	37,6	38,4
198	39	38,2	38,1	38	38,4	37,8
MÉDIA	38,9	38,9	39,0	39,0	38,9	38,8

TABELA 28

1: <u>Animais</u> : Cães (Beagle) 8 meses de idade, sem anticorpos contra a raiva
2: <u>Recombinante</u> : vCP-65, 8ª passagem em células CEF.
3: <u>Imunização</u> : 1 ml ($10^{6,7}$ TCID ₅₀), por via subcutânea, no dia zero.
4: <u>Testes serológicos</u> : Anticorpos SN contra a raiva, "Teste rápido de inibição de focos de fluorescência".
5. <u>Infeccção</u> : 0,5 ml da estirpe virulenta em cada um dos músculos temporais (estirpe NYGS) infecção aos 24 meses ($10^{6,7}$ LD ₅₀ -ratinho/cão)

(continuação)

Grupo	Cão N°	ANTICORPOS SN CONTRA A RAIVA (RFFIT)				Resul- tado	Taxa de sobrevivência	Anticorpos SN 40 dias	
		Máximo observado		Dia da infecção				após infecção	
		Log	U.I.	Log	LU.	(*)		Log	U.I.
vacinado	N2944	12 (D25)	0,74	0,2	0,02	D(14)			
	N3T2	17 (D25)	2,35	0,5	0,04	S		2,6	9,3
	N5V49	2,6 (D25)	18,7	1,6	0,47	S		2,6	9,3
	N2V49	1,7 (D25)	2,35	10,4	0,03	S	10/11	2,5	14,7
	N1V49	2,2 (D25)	7,35	1,2	0,12	S		2,5	7,4
	N1V83	1 (D28)	1,87	1,1	0,15	S	91%	-	-
	N2V57	2,2 (D28)	7,35	1,2	0,19	S		2,6	9,3
	N10W22	2,3 (D21)	9,38	1	0,12	S		2,6	9,3
	NSW38	2 (D25)	4,70	1,1	0,15	S		2,6	9,3
	N9W22	2,4 (D14)	11,8	0,5	0,07	S		2,5	7,4
	N13V14	2,2 (D25)	7,35	1,3	0,23	S		2,6	9,3
controlo	N1V57	0,2 (D28)	0,07	0,2	0,02	D(14)		-	-
	N2W38	1,4 (D28)	1,17	0,2	0,02	D(15)	0%	-	-
	N7V8	1,1 (D14)	0,49	0,2	0,02	D(14)		-	-

(continuação)

Grupo	Cão N°	ANTICORPOS SN CONTRA A RAIVA (RFFIT)				Resultado	Taxa de sobrevivência	Anticorpos SN 40 dias após infecção
		Máximo observado	Dia da infecção					
		Log U.I.	Log LU.			(*)		Log U.I.
IV Infecção aos 36 meses (10 ^{6,7} LD ₅₀ -ratinho/cão)								
Grupo	Cão N°	ANTICORPOS SN CONTRA A RAIVA (RFFIT)				Resultado	Taxa de sobrevivência	
		Máximo observado	Dia da infecção					
		Log U.I.	Log LU.	(*)				
vacinados	NV14	1,7 (D28)	2,35	0,6	0,05	D(13)		
	N4R54	2,2 (D25)	7,45	1,6	0,59	S		
	N5V9	2,2 (D14)	7,45	1	0,29	S		
	N6V9	1,7 (D25)	2,35	1,2	0,23	S	10/11	
	N6V9	2,2 (D26)	7,45	1,3	0,15	S	11/12	
	N3W35	>3,1 (D14)	>59	1	0,15	S		
	N4W36	2,6 (D28)	18,71	1,6	0,59	S	92%	
	N4V57	2,6 (D21)	18,71	1	0,15	S		
	N5T90	2,2 (D21)	7,45	1,1	0,19			
	N6V49	2,4 (D14)	11,8	1	0,15	S		
	N3S110	2,2 (D25)	7,45	1,4	0,37	S		
	N9R27	2,2 (D21)	7,45	0,5	0,09	S		
controles	N1844	1,7 (3anos)		1,7	0,74	D(15)		
	N3T90	0,2 (D25)	0.94	0,2	0,02	D(17)	0/3 0%	
	N1510	1,3 (D0)	0,74	1,3	0,29	D(16)		

TABELA 29. CINÉTICA DE ANTICORPOS CONTRA A RAIVA (RFFIT)
INDUZIDOS PELO RECOMBINANTE VARÍOLA DOS CANÁRIOS/RAIVA
VCP65 II:

Grupo	Cão N°	Anticorpos em U.I. (tempo em meses)									
		0	1	2	3	6	(*) 8	12	24	(**) 25	36
vCP65 10 ^{6,7} /ml	N1V9	0,74	7,45	0,93	0,07	0,18		0,09			
	N3V9	0,29	7,45	0,29	0,23	0,74		0,15			
	N2V9	1,17	3,73	0,29	0,23	0,23		0,07			
	N3W22	0,23	9,38	0,93	0,23	0,12		0,05			
	N5W22	0,23	4,70	0,93	0,23	0,59	7,40				
	N4V9	0,59	11,80	0,74	0,18	0,23		0,15			
	N1W38	0,47	18,71	1,17	0,74	0,47		0,15			
	N8W22	0,74	2,35	0,59	0,23	1,85		0,15			
	N7W22	0,74	7,45	1,17	0,23	0,18	7,40				
	N8V14	0,23	7,45	0,74	0,23	0,23		0,38			
	N7V14	0,47	3,73	0,29	0,15	0,15		0,15			
	N1R54	0,23	7,45	2,94	0,47	0,59		0,12			
	N9V14	0,23	0,94	0,29	0,07	0,18		0,15			
	N2S44	0,47	0,74	0,09	0,07	0,07		0,05	0,02		
	N3T2	0,47	2,35	0,29	0,07	0,07		0,05	0,04	93	
	N5V49	0,23	18,71	1,48	0,47	0,59		0,38	0,47	9,3	
	N4V49	0,23	7,45	0,93	0,23	0,29	2,30				
	N2V49	0,29	2,35	0,19	0,15	0,18		0,05	0,03	14,7	
	N1V49	0,23	7,45	0,93	0,23	0,12		0,09	0,12	7,4	
	N1V83	0,07	1,87	0,59	0,12	0,18		0,05	0,15		
	N2T90	0,23	7,45	1,17	0,59	0,23	1,80				
	N3V57	0,47	14,86	1,17	0,47	0,74	7,40				
	N2V57	0,23	7,45	1,17	0,23	0,23		0,15	0,19	93	
	N10W22	0,07	7,45	0,37	0,23	0,15		0,15	0,12	93	
	N5W38	0,23	4,70	0,93	0,23	0,23		0,15	0,15	93	
	N9W22	0,18	2,96	0,59	0,23	0,29		0,15	0,07	7,4	
	N13V14	0,74	7,45	0,37	0,18	0,07		0,15	0,23	93	
	N12V14	0,59	2,35	0,15	0,07	0,12		0,05			0,05
	N3S44	0,07	0,93	0,18							
	N4R54	0,29	7,45	2,34	0,29	0,74		0,47	0,74		0,59

(continuação)

Grupo	Cão N°	Anticorpos em U.I. (tempo em meses)									
		0	1	2	3	6	(*) 8	12	24	(**) 25	36
	N5V9	0,07	7,45	0,93	0,18	0,47		0,09	0,07		0,29
	N6V9	0,47	2,35	0,93	0,23	0,74		0,15	0,12		0,23
	N8V9	0,29	7,45	0,93	0,23	0,15		0,05	0,05		0,15
	N4R18	0,23	7,45	0,93	0,23	0,93		0,12	0,15	Morto antes da infecção	
	N3W38	0,12	37,33	2,34	0,23	0,93		0,15	0,15		0,15
	N4W38	0,23	18,71	4,67	0,47	0,74		0,47	1,5		0,59
	N4V57	0,23	7,45	2,94	0,47	1,17		0,29	0,15		0,15
	N5T90	0,23	2,35	0,74	0,12	0,74		0,07	0,05		0,19
	N6V49	0,18	2,35	0,29	0,23	0,23		0,15	0,05		0,15
	N3S110	0,59	7,45	0,93	0,47	0,74		0,29	0,6		0,37
	N9R27	0,07	0,94	0,93	0,23	0,59		0,09	0,15		0,09
	Média	0,28	5,11	0,71	0,22	0,31		0,13	0,13		0,20
	geométrica										
controle	N1S44	0,74	0,74	0,07	0,02	0,07		0,05			0,74
	N1V57	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07		0,05	0,02		
	N3T90	0,23	0,94	0,09	0,07	0,07		0,05			0,02
	N1S10	0,74	0,47	0,09	0,07	0,07		0,05			0,29
	N10V14	0,23	0,74	0,09	0,07	0,07		0,05			
	N14V14	0,23	0,59	0,07	0,07	0,07		0,05			
	N5R54	0,23	0,74	0,09	0,07	0,07		0,05			
	N7V9	0,59	0,49	0,09	0,07	0,07		0,05	0,02		
	N2W38	0,74	1,17	0,15	0,07	0,07		0,05	0,02		
	195	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07					
	194	0,59	0,47	0,09	0,07	0,07					
	198	0,29	0,05	0,18	0,07	0,07					
X	0,30	0,37	0,09	0,06	0,07		0,05	0,02		0,45	

(*) : 8 meses = titulação de anticorpos 2 meses após infecção

(**) : 25 meses = titulação de anticorpos 40 dias após infecção

TABELA 30

DURAÇÃO DA IMUNIDADE EM CÃES IMUNIZADOS COM O RECOMBINANTE				
ALVAC/RAIVA VCP-65				
SUMÁRIO DOS RESULTADOS DO EXEMPLO 12				
CÃES VACINADOS: 41				
MORTES NÃO ESPECÍFICAS: 2				
CÃES VACINADOS E INFECTADOS: 39				
CÃES CONTROLOS E INFECTADOS: 12				
	Vacinação		Controlos	
	Nb.	Sobrevivências	Nb.	Sobrevivências
Infecção aos 6 meses	5	5/5	3	0/3
Infecção aos 12 meses	11	11/11	3	0/3
Infecção aos 24 meses	11	10/11	3	0/3
Infecção aos 36 meses	12	11/12	3	0/3
Total	39	37/39	12	0/12
%		94,9%		0%

EXEMPLO 13: IMUNIZAÇÃO DE CACHORROS TENDO ANTICORPOS
MATERNALIS COM O RECOMBINANTE DE ALVAC/RAIVA VCP65

MATERIAIS:

Animais: 16 cachorros Beagle nascidos de mães imunes que receberam um reforço de Rabisin duas semanas antes do parirem.

Vacinas: Alvac/raiva (vCP65): lote liofilizado,

contendo 1ml de 10^8 TCID₅₀ e Rabisin: lote 1 RBN de 581,7 U.I./dose.

MÉTODOS:

Imunização: Os cachorros permaneceram com as suas mães até ao desmame. Quando tinham duas semanas de idade foram distribuídos ao acaso por 4 grupos:

- A: 4 cachorros receberam 1 ml SC de vCP65 a 10^8 TCID₅₀/ml
- B: 4 cachorros receberam 1 ml SC de vCP65 a $10^{6,7}$ TCID₅₀/ml
- C: 4 cachorros receberam 1 ml SC Rabisin
- D: 4 cachorros não foram vacinados = "Controlos"

Serologia: Colheu-se sangue de todos os cachorros nos dias 0, 14, 28, 49, 82, 105 e 119. Dos animais que sobreviveram após a infecção foi colhido sangue no dia 160. Titulação de Ab contra a raiva: RFFIT. Titulação de Ab CP: ELISA.

Infecção: No dia 119 após imunização, todos os cachorros foram infectados por inoculação IM de $10^{4,1}$ MLD₅₀ no músculo temporal.

RESULTADOS:

Anticorpos CP (varíola dos canários) (Ver Tabela 31): Apesar do fundo elevado e heterólogo observado, a

vacinação foi demonstrada pelo aumento médio dos anticorpos contra a varíola dos canários CP.

Anticorpos (Ac) contra a raiva e taxa de protecção (Ver Tabelas 31 e 32): Comparativamente com o decréscimo dos Ac passivos nos controlos, observou-se uma estabilização ou mesmo um aumento do título SN nos grupos vacinados até ao dia 28. Não é possível diferenciar os 3 grupos vacinados. Todos os cachorros imunizados com Rabisin ou vCP65 a 10^8 TCID₅₀ sobreviveram após infecção, enquanto que 50% (2/4) dos cachorros vacinados com $10^{6,7}$ TCID₅₀ foram protegidos.

A imunização dos cachorros com 2 semanas de idade, tendo uma elevada taxa de Ab SN, foi possível com Rabisin ou vCP65 a 10^8 TCID₅₀.

A vacinação nas mesmas condições, usando vCP-65 a $10^{6,7}$ TCID₅₀, induziu 50% de protecção.

Este exemplo ilustra que as composições do recombinante poxvírus-raiva (e.g., composições de vCP65) podem induzir protecção apesar da imunidade materna em cachorros.

TABELA 31

IMUNIZAÇÃO DE CACHORROS TENDO ANTICORPOS MATERNOS						
GRUPO	CACHORRO N°	DO A 450 NM DOS ANTICORPOS CP, SOROS A 1/100, NOS DIAS				
		0	28	49	82	119
A	465D19	0,223	0,234	0,175	0,367	0,237
	464A6C	0,131	0,332	0,232	0,361	0,311
vCP65	464C62	0,108	0,297	0,203	0,266	0,283
	463B7E	0,026	0,269	0,261	0,203	0,053
10 ⁸	X	0,122	0,283	0,218	0,299	0,221
	STD	0,070	0,036	0,032	0,069	0,101
B	26356A	0,06	0,198	0,307	0,505	0,313
	260545	0,065	0,404	0,308	0,374	0,24
vCP65	263906	0,121	0,322	0,255	0,363	0,298
	26033F	0,107	0,234	0,229	0,328	0,295
10 ^{6,7}	X	0,088	0,290	0,275	0,393	0,287
	STD	0,026	0,080	0,034	0,067	0,028
D	222C01	0,039	0,221	0,105	0,282	0,211
	221465	0,227	0,184	0,11	0,254	0,286
	221D62	0,15	0,141	0,227	0,144	0,234
	221B11	0,1	0,142	0,167	0,208	0,232
Controlos	X	0,129	0,172	0,152	0,222	0,241
	STD	0,069	0,033	0,050	0,052	0,028

TABELA 32

RECOMBINANTE ALVAC/RAIVA VCP65												
IMUNIZAÇÃO DE CACHORROS COM ANTICORPOS MATERNOS												
		ANTICORPOS CONTRA A RAIVA EM LOG ₁₀ , NOS DIAS:								Sobrevivência após infecção		
Grupo	Cachorro n ^a	0	14	28	49	82	105	119	160			
A	465D19	1,9	2,5	1,8	1,1	0,8	1,1	0,8	1,2	S	100%	
	464A6C	2,6	2,3	2,6	0,7	0,6	0,8	0,4	1,1	S		
	464C62	2,4	1,8	2,5	1,2	0,7	1,2	0,7	1,2	S		
	463B7E	1,8	2,5	2,3	1,1	0,6	1,2	0,7	1	S		
10 ⁸	X	2,18	2,28	2,30	1,03	0,68	1,08	0,65	1,13			
	STD	0,33	0,29	0,31	0,19	0,08	0,16	0,15	0,08			
B	26358 ^a	2,2	2,3	2,2	1,3	1,4	1,7	1,4	2,2	S		50%
	260545	2,3	2,6	2,2	1,8	1,2	0,8	0,2		D(13)		
	263906	1,47	1,9	1,7	0,8	0,5	0,6	0,7		D(17)		
	26033F	2	2,2	1,9	1,3	1,2	1,1	0,7	1	S		
10 ^{6,7}	X	1,99	2,25	2,00	1,30	1,08	1,05	0,75	1,60			
	STD	0,32	0,25	0,21	0,35	0,34	0,42	0,43				
C	254363	2,8	2,5	2,2	1,7	1,7	1,7	1,4	1,7	S	100%	
	253054	2	2,2	2,4	1,7	1,1	0,8	0,4	1,2	S		
	254809	2	2,6	2,6	1,7	1,2	1,6	1,7	1,2	S		
	251F30	2,4	2,4	2,5	1,4	1,4	1,4	1,2	1,1	S		
RABISIN	X	2,30	2,43	2,43	1,68	1,35	1,38	1,18	1,30			
	STD	0,33	0,15	0,15	0,18	0,23	0,35	0,48	0,23			
D	222C01	2,2	2	1,7	0,6	0,5	0,6	0,4		D(14)		0%
	221465	2	2,4	1,7	0,8	1	1	0,6		D(14)		
	221D62	2,2	2	1,7	0,6	0,7	0,5	0,2		D(14)		
	221B11	2,4	1,7	1,4	0,2	0,2	0,5	0,2		D(17)		
Controlos	X	2,20	2,03	1,63	0,55	0,60	0,65	0,35				
	STD	0,14	0,25	0,13	0,22	0,29	0,21	0,17				
(*) : infecção no dia 121, com 10 ^{4,1} MLD ₅₀ /cão												

(*) : infecção no dia 121, com $10^{4,1}$ MLD₅₀/cão

TABELA 33

RECOMBINANTE ALVAC/RAIVA VCP65												
IMUNIZAÇÃO DE CACHORROS COM ANTICORPOS MATERNOs												
		ANTICORPOS CONTRA A RAIVA EM UNIDADES INTERNACIONAIS (U.I.) NOS DIAS:								Sobrevivência após infecção		
Grupo	Cachorro n ^a	0	14	28	49	82	105	119	160			
A	465D19	1,17	4,7	0,93	0,15	0,07	0,09	0,09	0,47	S	100%	
	464A6C	5,88	2,95	5,88	0,06	0,05	0,05	0,04	0,37	S		
	464C62	3,71	0,93	4,7	0,19	0,06	0,12	0,07	0,47	S		
	463B7E	0,93	4,7	2,95	0,15	0,05	0,12	0,07	0,29	S		
10 ⁸	X(GEOM.)	2,21	2,79	2,95	0,13	0,06	0,09	0,06	0,39			
B	26358/6A	2,34	2,95	2,34	0,23	0,3	0,37	0,37	4,67	S		50%
	260545	2,95	5,88	2,34	0,74	0,19	0,05	0,02		D(13)		
	263906	0,37	1,17	0,74	0,07	0,04	0,03	0,07		D(17)		
	26033F	1,48	2,34	1,17	0,23	0,19	0,09	0,07	0,29			
10 ^{6,7}	X(GEOM.)	1,39	2,63	1,48	0,23	0,14	0,08	0,08	1,35			
C	254363/2	9,32	4,7	2,34	0,59	0,59	0,37	0,37	1,48	S	100%	
	253054	1,48	2,34	3,71	0,59	0,15	0,05	0,04	0,47	S		
	254809	1,48	5,88	5,88	0,59	0,19	0,29	0,74	0,47	S		
	251F30	3,71	3,71	4,7	0,3	0,3	0,18	0,23	0,37	S		
RABISIN	X(geom.)	2,95	3,94	3,94	0,50	0,27	0,18	0,22	0,59			
D	222C01	2,34	2	1,7	0,05	0,04	0,03	0,04		D(14)		
	221465	1,48	2,4	1,7	0,07	0,12	0,09	0,06		D(14)		
	221D62	2,34	2	1,7	0,05	0,06	0,02	0,02		D(14)		
	221B11	3,71	1,7	1,4	0,02	0,02	0,02	0,02		D(17)		
Controlos	X(geom.)	2,34	2,01	1,62	0,04	0,05	0,03	0,03				
(*) : infeccção no dia 121, com 10 ^{4,1} MLD ₅₀ /cão												

EXEMPLO 14 - IMUNOGENICIDADE CONTRA A RAIVA DURANTE UM ANO E TESTE DE SEGURANÇA EM CÃES PARA UMA VACINA COMPREENDENDO UMA FRACÇÃO RECOMBINANTE DA RAIVA (VCP65) COMBINADA COM FRACÇÕES CONVENCIONAIS: ESGANA CANINA, ADENOVÍRUS TIPO 2, CORONAVÍRUS, PARAINFLUENZA, PARVOVÍRUS, VACINA DA RAIVA, VÍRUS VIVO MODIFICADO, VECTOR VARÍOLA DOS CANÁRIOS, BACTERINA DE *LEPTOSPIRA CANICOLA* - *ICTEROHAEMORRHAGIAE*.

Este exemplo demonstra a protecção contra a infecção pela raiva, durante pelo menos um ano após vacinação, e avalia a eficácia, segurança e ausência de interferência desta vacina recombinante em cachorros com 9 a 12 semanas de idade.

Mais especificamente, este Exemplo demonstra a protecção contra a raiva, durante pelo menos um ano, por um antigénio recombinante da raiva (vCP65), incluído na vacina de combinação canina DACPiP-CP65 e DACIP+LCI, e avalia a segurança desta vacina de combinação quando administrada pela via sucutânea (SC) a cachorros jovens e a ausência de interferência das diferentes fracções umas sobre as outras (Ver também o Exemplo 15, infra).

Um vector vivo da varíola dos canários foi usado para preparar um vírus vacinal, vector, recombinante com a raiva. O vector da varíola dos canários foi manipulado por técnicas de engenharia genética de forma a ter inserido o gene codificador da glicoproteína de superfície (G) do

vírus da raiva. O antígeno vacinal recombinante da raiva foi preparado com a quinta passagem (vCP65X+5) do lote original. Este produtor de antígeno pode ser usado numa vacina monovalente. Pode igualmente ser liofilizado em combinação com outros cinco antígenos caninos vivos modificados. Por uma questão de clarificação, as abreviaturas que se seguem para estes antígenos serão usadas neste Exemplo e nas Tabelas inclusas neste Exemplo:

Componente de MLV

Abreviatura

Vírus da esgana canina (CDV)	D
Adenovírus canino (CAV-2)	A
Coronavírus canino (CCV)	C
Parainfluenza canina (Cpi)	Pi
Parvovírus canino (CPV)	P
Vector da varíola dos canários/raiva (recombinante)	CP65

A bacterina bivalente da *Leptospira canicola* e da *Leptospira icterohaemorrhagiae*, usada para re-hidratar a vacina DACPiP-CP65 e DACPiP, é abreviada como LCI.

PROCEDIMENTO:

Trinta (30) cães seronegativos para a raiva foram vacinados duas vezes, por via subcutânea, com uma dose de 1 ml de uma vacina de combinação liofilizada (DACPiP-

CP65+LCI) contendo DACPiP e com uma fracção recombinante da raiva (vCP65), diluída numa combinação de bacterinas de duas leptospiros (LCI). Tinta (30) cães seronegativos para a raiva foram vacinados com a mesma vacina de combinação sem a fracção de raiva recombinante (DACPiP+LCI) e serviu como controlos da raiva. As amostras de soro foram colhidas nos Dias 0, 28, 60, 90, 180, 270 e 390 pós vacinação e usou-se RFFIT para obter o seu título de anticorpos contra a raiva. Todos os cães foram infectados 365 dias após a segunda vacinação. Os sintomas e a mortalidade foram registados diariamente durante 90 dias após infecção. Mais especificamente,

Animais: Sessenta (60) cães seronegativos para a raiva, com 9 a 12 semanas de idade, foram adquiridos a Harlan Sprague Dawley.

Vacinados: Trinta (30) dos cães receberam a sua primeira vacinação com a combinação da raiva recombinante (DACPiP-CP65+LCI) nas seguintes idades (Tabela 34):

TABELA 34

Número de cães	Idade quando da 1ª vacinação
1	9 semanas
6	10 semanas
9	11 Semanas
14	12 semanas

Controlos: Trinta (30) cães controlos que receberam a mesma vacina de combinação sem a raiva recombinante (DACPiP-LCI) foram classificados, com base na idade, como se segue:

TABELA 35

Número de cães	Idade quando da 1ª vacinação
1	9 semanas
7	10 semanas
9	11 Semanas
13	12 semanas

Vacinas: DACPiP-CP65 e DACPiP: Estas vacinas foram preparadas de acordo com a seguinte formulação:

TABELA 36

Antigénio	Volume em DACPiP-CP65 (ml)	Volume em DCAPiP (ml)
D	157,00	157,00
A	1,57	1,57
C	35,00	40,00
Pi	70,00	70,00
P	52,00	56,00
CP65	10,00	0,00
Estabilizador	174,00	174,00
Total	499,57	498,57

Estas suspensões vacinais DACPiP-CP65 e DACPiP foram distribuídas por ampolas contendo 1,3 ml de suspensão e liofilizadas no dia 8 e 61, respectivamente. Os seus títulos após liofilização estão descritos abaixo.

Bacterina de leptospira (LCI): a cultura de vírus para infecção foi de uma estirpe NYC do vírus da raiva adquirida a NVSL. Quando da formulação, a cultura para infecção foi diluída a 1:100 em CVS, distribuída por ampolas de 1 ml e mantida congelada a -70°C até ser usada.

O protocolo que se segue foi usado durante este estudo (Tabela 37):

TABELA 37

Dias após a primeira vacinação	Actividade
0	Colheita de sangue e vacinação (V_1)
28	Colheita de sangue e vacinação (V_2)
60	Colheita de sangue
90	Colheita de sangue
180	Colheita de sangue
270	Colheita de sangue
390	Colheita de sangue
395	Infecção
485	Fim do estudo

Vacinação:

Grupo de vacinação: Trinta (30) cães receberam uma dose de 1 ml, SQ, da vacina liofilizada (DACPiP-CP65) re-hidratada com a bacterina líquida (LCI).

Grupo controlo: Trinta (30) cães receberam uma dose de 1 ml, SQ, de DACPiP re-hidratada com a bacterina líquida (LCI).

Vacinação de reforço: Quatro semanas após a primeira vacinação, o grupo vacinado recebeu uma dose de 1 ml, SQ, de DACPiP-CP65 e o grupo controlo recebeu uma segunda dose de 1 ml, SQ, de DACPiP. Ambas as vacinas foram re-hidratadas com LCI.

Infecção preliminar: Nove cães foram divididos em três grupos de três cães cada. Os cães do Grupo 1 foram infectados com a cultura de infecção diluída para 10^{-4} , os cães do Grupo 2 foram infectados com a cultura de infecção diluída para 10^{-5} e os cães do Grupo 3 foram infectados com a cultura de infecção diluída para 10^{-6} . A diluição da cultura de infecção foi feita em diluente CVS. Metade de 1 ml da cultura de infecção foi injectada intramuscularmente (IM) em cada um dos músculos masseteres de cada cão. Os cães foram observados diariamente relativamente à mortalidade e/ou aos sinais clínicos associados à raiva.

Infecção: Baseado nos resultados da infecção preliminar, a cultura de infecção foi diluída para $10^{-4,3}$ em solução CVS. Duas ampolas, previamente diluídas para 10^{-2} e mantidas congeladas a -70°C , foram descongelados e combinadas. Um ml e meio (1,5 ml) do total foram adicionados a 28,5 ml de diluente CVS para se obter uma diluição de $10^{-3,3}$. Uma segunda diluição a partir de $10^{-3,3}$ foi feita transferindo 15 ml para 135 ml de CVS para se obter uma diluição final da cultura de infecção de $10^{-4,3}$.

A diluição final da cultura de infecção foi distribuída por 15 ampolas de 10 ml, imediatamente colocadas em gelo e transportadas para o alojamento dos cães. A cultura de infecção diluída foi mantida em gelo ao longo da administração. Todos os cães (vacinados e controlos) foram infectados por inoculação IM de 0,5 ml da cultura de infecção injectado em cada um dos músculos masseteres.

RESULTADOS:

O título da fracção da raiva recombinante foi de $10^{5,6}$, TCID₅₀/dose.

Nenhum dos cachorros apresentou qualquer reacção local ou generalizada após vacinação.

Não foi observada interferência em qualquer fracção (Ver Exemplo 15, infra).

A vacina protegeu 28 de 30 (93,3%) dos cães vacinados contra uma infecção que matou 26 de 30 (86,7%) dos cães controlos.

Mais especificamente,

Pós-infecção: Os cães foram observados diariamente durante 90 dias após a infecção e registados os resultados. Observações tais como sinais nervosos, paralisia e morte foram registadas diariamente. Os tecidos de cérebro derivados do cerebelo, as protuberâncias anelares e o hipocampo foram removidos de cada cão que morreu após a infecção. Os tecidos foram mantidos congelados até ao final do período de observação. No final do período de observação, todos os cães sobreviventes foram mortos.

Foram preparados esfregaços tipo impressão do cérebro de cada animal que morreu da infecção pela raiva, fixados com acetona e corados com globulina anti-raiva marcada com fluoresceína. Uma lâmina positiva para FA foi considerada como confirmatória da infecção pela raiva.

As amostras de sangue foram colhidas nos Dias 0, 30, 60, 90, 180, 270, 365 e 395 após a primeira vacinação e testadas pelo teste rápido de inibição de focos

fluorescentes (RFFIT). Este foi realizado de acordo com 9 CFR 113.209.

Igualmente por uma questão de segurança, os cães foram observados diariamente relativamente a reacções clínicas locais ou sistémicas adversas relacionadas com as administrações da vacina.

Títulos das vacinas: Cada fracção do componente liofilizado das amostras de vacina, que restou após a vacinação, foi titulada e deu os seguintes títulos (Tabela 38):

TABELA 38

Fracção	Título Log ₁₀ - DACPiP-CP65	TCID ₅₀ /ml DACPiP
Esgana	4,3	4,8
Adenovírus tipo 2	4,3	4,9
Coronavírus	6,0	5,7
Parainfluenza	4,2	3,8
Parvovírus	6,0	6,2
Raiva (CP65)	5,6*	N/A
*Média de cinco réplicas da titulação		

Infecção preliminar: Os resultados da infecção preliminar estão apresentados na Tabela 39 abaixo:

TABELA 39

Diluição da cultura para infecção	Cão #	Mortalidade Dias pós-infecção
10^{-4}	2015	15
	2014	12
	2004	13
10^{-5}	2025*	N/A
	3017	14
	2003	16
10^{-6}	3022*	N/A
	3019	17
	3020	31
* Os cães # 2025 e 3022 foram mortos por injeção letal 45 dias pós-infecção.		

Titulação da cultura de infecção: Os resultados da titulação em ratinhos da cultura de infecção para pré-infecção e para a infecção final estão descritos na Tabela 40. O título real da infecção foi de $10^{7,2}$ MLD₅₀/ml.

Infecção de cães: Os resultados da infecção final estão resumidos na Tabela 41 (Vacinados) e na Tabela 42 (Controlos). Cada um dos cães recebeu uma dose de infecção de $10^{7,15}$ MLD₅₀/ml com base em titulações repetidas.

Mortalidade:

Controlos: Vinte e seis (26) dos 30 cães

controles morreram entre 11 e 23 dias pós-infecção. Isto representa uma taxa de mortalidade de 86,7%.

Vacinados: Vinte e oito dos 30 cães vacinados sobreviveram à infecção. Esta é uma taxa de protecção de 93,3%.

Teste FA de esfregaços de cérebros (Tabelas 41 e 42):

Vacinados: FA directa em lâminas de impressão de cérebros mostrou que a morte de 26 cães controles foi causada pelo vírus da raiva.

Serologia: Os títulos RFFIT de amostras de soro colhidas nos dias 0, 30, 60, 90, 180, 270 e 390 após a primeira vacinação estão apresentados nas Tabelas 43 e 44. Os resultados mostram que os cães eram seronegativos quando o estudo começou e que os controles permaneceram negativos ao longo do dia da infecção. O teste foi efectuado de acordo com 9 CRF 113.209.

A seroconversão relativamente à idade em que os cachorros foram vacinados foi analisada e calculado o título médio no Dia 30 após a segunda vacinação (Tabela 45). A tabela mostra que o título pós-vacinal de anticorpos da resposta aumentou independentemente da idade da vacinação.

Segurança: Nenhum dos cachorros vacinados

apresentou qualquer reacção adversa, local ou sistémica, após qualquer uma das duas vacinações.

CONCLUSÃO:

As duas doses, administradas subcutaneamente, de uma vacina DACPiP-CP65+LCI contendo $10^{5,6}$ TCID₅₀/dose de raiva vCP65:

São seguras em cães com 9 a 12 semanas de idade.

Induzem seroconversão baixa e temporária.

Protegem muito eficazmente cães contra uma infecção grave pela raiva durante pelo menos um ano.

Mais especificamente, os cães vacinados com 9 a 12 semanas de idade são protegidos pela vacina da raiva recombinante (vCP65), em combinação com outras vacinas caninas (DACPiP), e re-hidratada com bactéria de leptospira. A mortalidade causada pela cultura de infecção não está dependente da idade do cão quando vacinado pela primeira vez.

Os cães seroconverteram significativamente, mesmo quando foram vacinados com a idade de 9 a 12 semanas, altura em que os anticorpos maternos estavam presentes. No entanto, na altura da infecção os cães vacinados não tinham virtualmente anticorpos detectáveis e ficaram protegidos.

A cultura da infecção diluída no tampão adequado e conservada a -70°C pode ser usada para infectar cães. A titulação de pré-infecção é necessária antes de efectuar um estudo mais importante de imunogenicidade. A dose de infecção administrada foi 50 vezes maior do que a dose que causou 100% de mortalidade em experiências realizadas por NVSL.

A vacina da raiva recombinante VCP65 com um título de $10^{5,6}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ em combinação com DACPiP com ou sem LCI confere protecção durante um período de pelo menos um ano.

As fracções desta vacina de combinação não interferem com a imunogenicidade da fracção da raiva recombinante: A vacina da raiva recombinante protegeu 93,3% dos vacinados contra uma infecção virulenta grave que matou 86,7% dos controlos. A vacina de combinação canina recombinante para a raiva é segura quando administrada a cachorros pela via subcutânea.

TABELA 40: TITULAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA USADO NA INFECÇÃO, LOTE 92-5, DILUÍDO A $10^{-4,3}$ PARA A INFECÇÃO DE CÃES.

Diluição	Titulação #1	Diluição	Titulação #2
10^{-2}	6/6 mortos	$10^{-4,3}$	6/6 mortos
$10^{-2,6}$	6/6 mortos	$10^{-4,9}$	4/6 mortos
$10^{-3,2}$	6/6 mortos	$10^{-5,5}$	2/6 mortos
$10^{-3,8}$	6/6 mortos	$10^{-6,1}$	1/6 mortos
$10^{-4,4}$	6/6 mortos	$10^{-6,7}$	1/6 mortos

(continuação)

Diluição	Titulação #1	Diluição	Titulação #2
$10^{-5,0}$	5/6 mortos	$10^{-7,3}$	0/6 mortos
$10^{-5,6}$	3/6 mortos	$10^{-7,9}$	0/6 mortos
$10^{-6,2}$	36/6 mortos	$10^{-8,5}$	0/6 mortos
$10^{-6,8}$	1/6 mortos		
¹ Infecção/0,3 ml = $10^{-5,9}$ MLD ₅₀ / Infecção/0,03 ml = $10^{-5,4}$ MLD ₅₀ ² Infecção/1 ml dose por cão = $10^{-7,4}$ MLD ₅₀ / Infecção/1 ml dose por cão = $10^{-6,9}$ MLD ₅₀ Dose média por cão = $10^{7,15}$ Dose letal ₅₀ para ratinhos ¹ 0,03 ml da dose de ratinho administrada intracranialmente ² Título equivalente da raiva administrada a cães 51 dias pós-infecção			

TABELA 41 ESTUDO DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE CANINA CONTRA A RAIVA, AO LONGO DE UM ANO, RESULTADOS DA INFECÇÃO DOS VACINADOS

Cão#	Idade (semanas)	Mortalidade DPI	FA do Cérebro
192	12		N/A
196	12		N/A
410	12		N/A
211	12		N/A
221	12		N/A
228	12		N/A
234	12		N/A
414	11		N/A
239	11		N/A

(continuação)

Cão#	Idade (semanas)	Mortalidade DPI	FA do Cérebro
249	11		N/A
260	11		N/A
267	11		N/A
270	10		N/A
420	10		N/A
430	10	21	+
200	12		N/A
417	12		N/A
205	12		N/A
208	12		N/A
216	12		N/A
226	12		N/A
232	12		N/A
245	11		N/A
254	11		N/A
256	11		N/A
264	11		N/A
275	10		N/A
423	10		N/A
427	10	16	+
J401	9		N/A
			N/A
DPI = Dias pós-infecção. Resultado: 2/30 mortos = 6,7% de mortos ou 93,3% de protegidos			

TABELA 42 ESTUDO DA DURAÇÃO DA IMUNIDADE CANINA CONTRA A
RAIVA, AO LONGO DE UM ANO, RESULTADOS DA INFECÇÃO DOS
CONTROLOS

Cão#	Idade (semanas)	Mortalidade DPI	FA do Cérebro
409	12	12	+
415	12	13	+
419	11	12	+
426	10	14	+
434	10	12	+
440	10	13	+
403	9	12	+
194	12	Sobreviveu	N/A
199	12	Sobreviveu	N/A
203	12	14	+
207	12	16	+
210	12	23	+
215	12	15	+
219	12	12	+
223	12	19	+
225	12	15	+
230	12	15	+
235	12	12	+
238	11	11	+
243	11	14	+
247	11	14	+
250	11	14	

(continuação)

Cão#	Idade (semanas)	Mortalidade DPI	FA do Cérebro
253	11	Sobreviveu	N/A
258	11	Sobreviveu	N/A
262	11	18	+
265	11	21	+
271	10	12	+
272	10	14	+
276	10	14	+
280	10	14	+
DPI = Dias pós-infecção.			

TABELA 43 TÍTULO CONTRA A RAIVA NO GRUPO DE VACINADOS
(LOG₁₀) POR RFFIT.

Cão#	Dia 0	Dia 28	Dia 60	Dia 90	Dia 180	Dia 270	Dia 390
410	0,48	0,46	1,41	1,19	1,32	1,41	1,23
417	0,41	0,57	1,32	0,85	0,57	0,80	0,60
414	0,57	0,80	0,97	0,80	0,58	0,46	0,48
420	0,58	0,57	1,67	1,06	0,59	1,02	0,90
423	0,58	0,38	1,06	0,84	0,83	0,61	0,60
427	0,85	0,58	0,61	0,93	1,06	0,38	0,48
430	1,02	0,97	1,19	0,94	0,38	0,62	0,60
401	0,57	0,56	1,76	1,06	0,57	1,11	0,60
192	0,85	0,89	1,32	0,97	0,57	0,7	0,70
196	0,97	0,61	0,97	1,06	0,46	0,61	0,48
200	0,97	0,53	1,06	0,62	0,34	0,43	1,00
205	1,19	0,37	1,72	1,11	0,59	1,19	0,60
208	1,32	0,65	1,28	0,93	0,38	0,38	0,30

(continuação)

Cão#	Dia 0	Dia 28	Dia 60	Dia 90	Dia 180	Dia 270	Dia 390
211	0,57	1,06	1,32	0,85	0,63	0,89	0,48
216	1,11	0,46	1,50	1,32	1,19	0,74	0,70
221	1,06	1,02	1,24	1,02	0,51	0,97	0,70
226	0,89	1,19	1,59	1,15	1,11	0,93	0,48
228	1,02	1,02	1,15	0,65	0,46	0,38	0,70
232	0,89	0,57	1,85	1,24	1,41	1,32	1,28
234	0,97	1,41	1,32	1,15	0,36	0,65	0,48
239	0,57	1,02	1,15	0,89	0,48	0,48	0,30
255	0,97	1,41	2,02	1,37	1,24	1,28	1,23
249	1,19	1,02	1,24	0,93	1,02	1,28	1,00
254	0,89	0,59	1,24	1,06	1,24	1,59	1,32
256	0,97	1,54	2,02	1,54	1,98	1,15	1,51
260	0,93	1,54	1,81	1,19	1,15	1,06	1,20
264	1,06	1,24	1,63	1,06	1,02	0,80	0,60
267	1,06	0,79	1,24	0,65	1,02	0,52	0,48
270	1,15	0,61	1,63	1,06	1,19	1,11	0,60
275	0,76	0,46	1,19	1,32	1,28	1,02	0,60
média	0,88	0,86	1,38	1,03	0,84	0,87	0,72
DP	0,24	0,36	0,33	0,22	0,41	0,34	0,32
DP = Desvio padrão							

TABELA 44 TÍTULO CONTRA A RAIVA NO GRUPO CONTROLO (LOG_{10})
POR RFFIT.

Cão#	Dia 0	Dia 28	Dia 60	Dia 90	Dia 180	Dia 270	Dia 390
409	0,46	0,97	0,36	0,34	0,58	0,36	0,30
415	0,59	0,53	0,36	0,41	0,38	0,46	0,30
419	0,54	0,80	0,34	0,38	0,36	0,58	0,30
426	0,97	0,85	0,46	0,58	0,62	0,38	0,60
434	1,19	0,57	0,38	0,63	0,53	0,36	0,30

PE0835133

- 165 -

(continuação)

Cão#	Dia 0	Dia 28	Dia 60	Dia 90	Dia 180	Dia 270	Dia 390
440	1,19	0,80	0,34	0,49	0,46	0,38	0,30
403	1,11	0,57	0,48	0,58	0,43	0,38	0,70
194	0,85	0,80	0,97	0,49	0,93	0,52	0,48
199	0,57	0,48	0,38	0,46	0,63	0,59	0,95
203	0,78	0,46	0,41	0,45	0,54	0,61	0,60
207	0,61	0,46	0,38	0,58	0,53	0,45	0,30
210	0,61	0,80	0,65	0,45	0,58	0,46	0,48
215	1,19	0,80	0,36	0,58	0,54	0,58	0,70
219	0,65	0,43	0,36	0,38	0,52	0,36	0,60
223	1,15	0,48	0,34	0,34	0,46	0,46	0,48
225	1,37	0,59	0,58	0,38	0,51	0,56	0,48
230	1,28	0,46	0,38	0,51	0,49	0,97	0,48
235	0,97	1,06	0,53	0,58	0,36	0,58	0,30
238	1,11	0,97	0,41	0,89	0,52	0,93	0,48
243	0,53	0,73	0,36	0,62	0,58	0,48	0,48
247	0,57	0,38	0,58	0,43	0,51	0,58	0,90
250	1,41	0,97	1,19	0,65	0,54	1,24	0,70
253	0,93	0,58	0,36	0,49	0,53	0,43	0,30
258	0,97	0,89	0,71	0,53	0,43	0,72	0,60
262	1,19	1,11	0,38	0,53	0,56	0,38	0,60
265	1,19	0,70	0,63	0,36	0,49	0,89	0,48
271	0,85	0,48	0,85	0,51	0,45	0,58	0,48
272	0,65	0,58	0,34	0,38	0,36	0,34	0,60
276	1,41	1,02	0,70	0,43	0,46	1,06	0,48
280	1,24	1,15	0,54	0,46	0,46	1,06	0,48
Média	0,94	0,71	0,51	0,50	0,52	0,58	0,52
DP	0,30	0,23	0,21	0,12	0,11	0,23	0,17

DP = Desvio padrão

TABELA 45 TÍTULO DE ANTICORPOS CONTRA A RAIVA (LOG_{10}) POR RFFIT.

Estatuto de vacinação	Nº de cães	Idade quando da primeira vacinação	Título médio de anticorpos		Aumento do título pós-vacinação
			Dia 0	Dia 60*	
Vacinados (DACPiP-CP65)	1	9	0,57	1,76	1,19
	6	10	0,81	1,23	0,42
	9	11	0,86	1,48	0,62
	14	12	0,91	1,36	0,45
Controlos (DACPiP)	1	9	1,11	0,48	≥0,0
	7	10	1,07	0,52	
	9	11	0,94	0,55	
	13	12	0,85	0,47	
60 dias pós-vacinação ou 30 dias pós-segunda vacinação					

EXEMPLO 15 - ESTUDO DE INTERFERÊNCIA EM CÃES DE UMA VACINA USANDO UMA FRACÇÃO DA RAIVA RECOMBINANTE (VCP65) EM COMBINAÇÃO COM FRACÇÕES CONVENCIONAIS: ESGANA CANINA, ADENOVÍRUS TIPO 2, CORONAVÍRUS, PARAINFLUENZA, PARVOVÍRUS, VACINA DA RAIVA, VÍRUS VIVO MODIFICADO, VECTOR DA VARÍOLA DOS CANÁRIOS VIVO, BACTERINA DE LEPTOSPIRA

Este exemplo demonstra a ausência de interferência em cães da fracção vCP65 da raiva recombinante, incorporada em combinação com outras fracções liofilizadas de CDV, CAV-2, CCV, CPi, CPV e diluída em bacterina de leptospira (LCI) para imunização de cães.

PROCEDIMENTO:

Trinta (30) cães seronegativos para a raiva foram

vacinados duas vezes, subcutaneamente, com uma dose de 1 ml de uma vacina de combinação liofilizada (DACPiP-CP65-LCI) contendo DACPiP e uma fracção da raiva recombinante (vCP65), diluída numa bacterina de duas espécies de leptospira (LCI). Trinta (30) cães seronegativos para a raiva foram vacinados com a mesma vacina de combinação sem a fracção da raiva recombinante (DACPiP+LCI) e serviram como controlos da raiva para o estudo de eficácia descrito no Exemplo 14.

As amostras de soro foram colhidas no Dia 0, Dia 30 e Dia 60 pós-vacinação dos cães de cada grupo e foram testadas por métodos de seroneutralização de vírus e o RFFIT foi empregue para o ensaio de anticorpos contra a raiva. Os resultados do teste de seroneutralização para cada vírus foram comparados entre os vacinados e os controlos usando o título médio $\pm$ desvio padrão. Mais especificamente: o antigénio vacinal recombinante da raiva foi preparado com a quinta passagem (vCP65 X +5) do lote de partida como no Exemplo 14. Este antigénio pode ser usado como vacina monovalente. Pode também, como descrito neste Exemplo e no Exemplo 14, ser liofilizado em combinação com cinco outros antigénios caninos vivos modificados. As abreviaturas neste Exemplo são como no Exemplo 14.

MATERIAL:

Vacinas: DACPiP-CP65 e DACPiP foram preparadas, distribuídas e liofilizadas como no Exemplo 14. O título de

cada componente da vacina, re-hidratado em água estéril após liofilização, foi como no Exemplo 14.

Uma fracção líquida de *Leptospira canicola* e de *Leptospira icterohaemorrhagiae* é uma vacina de produção convencional disponibilizada para venda pela USDA-NVSL em 22 de Setembro de 1992.

Animais, alojamento e administração da vacina: Sessenta (60) cães, com 9 a 12 semanas de idade quando da primeira vacinação, divididos em dois grupos de 30, receberam, com 4 semanas de intervalo, as seguintes vacinas:

TABELA 46

Grupo	V ₁ (vacina)	V ₂ (vacina)
A Vacinados	DACP _i P-CP65+LCI	DACP _i P-CP65+LCI
B Controlos	DACP _i P+LCI	DACP _i P+LCI

O soro de cada cão foi colhido no Dia 0 (dia da vacinação) e nos Dias 28 e 60 pós-vacinação. O soro de cada cão foi titulado relativamente a anticorpos neutralizantes (SN) para CDV, CAV-2, CP_i, CPV e por RFFIT para o vírus da raiva. A ausência de interferência com cada um dos componentes foi confirmada sempre que se observou seroconversão de grandeza comparável nos soros de vacinados e dos controlos.

RESULTADOS: A Tabela 47 abaixo resume o título SN para cada fracção viral na vacina:

TABELA 47

Componente viral	Actividade SN Título de anticorpos (Log ₁₀)**					
	Vacinados			Controlos		
	Dia 0	Dia 28	Dia 60	Dia 0	Dia 28	Dia 60
CDV	0,37	0,82	0,89	0,47	0,95	1,07
±DP*	0,20	0,40	0,35	0,27	0,39	0,35
CAV-2	1,65	2,62	2,72	1,54	2,57	2,70
±DP	0,80	0,39	0,32	0,60	0,27	0,32
CPi	0,65	1,49	1,78	0,65	1,24	1,30
±DP	0,44	0,41	0,32	0,46	0,24	0,11
CPV	2,86	3,85	4,03	3,06	3,19	3,87
±DP	0,89	0,59	0,65	1,13	0,65	0,69
CCV	1,61	2,15	2,10	1,61	2,13	2,04
±DP	0,24	0,24	0,22	0,21	0,25	0,25
CP65	0,88	0,86	1,38	0,94	0,71	0,51
±DP	0,24	0,36	0,33	0,30	0,23	0,21
* Desvio Padrão						
** RFFIT						

Anticorpos neutralizantes contra o vírus da esgana canina: Os resultados individuais estão apresentados na Tabela 48, abaixo. Apesar da maioria dos cães serem seropositivos no Dia 0 (pré-vacinação), a vacinação com a vacina de combinação aumentou a seroconversão da actividade

SN específica de CDV em ambos os grupos sem diferença estatística.

Anticorpos neutralizantes contra o adenovírus canino tipo 2: Os resultados individuais estão apresentados na Tabela 49, abaixo. Os dados indicam não só uma excelente seroconversão em ambos os grupos sem diferença estatística, como também um decréscimo importante no desvio padrão do título individual entre animais.

Anticorpos neutralizantes contra o vírus da parainfluenza canina: Os resultados individuais estão apresentados na Tabela 50, abaixo. Os dados indicam uma seroconversão em ambos os grupos sem diferença estatística.

Anticorpos neutralizantes contra parvovírus canino: Os resultados individuais estão apresentados na Tabela 51, abaixo. Os dados indicam uma excelente seroconvesão no Dia 30 e no Dia 60 pós-primeira vacinação com um desvio padrão da mesma grandeza em ambos os grupos.

Anticorpos neutralizantes contra coronavírus canino: Os resultados individuais estão apresentados na Tabela 52, abaixo. Os dados indicaram uma clara seroconversão induzida pela vacina de combinação DACPiP-CP65+LCI, após apenas uma injeção, com título muito homogêneo e sem diferença para o grupo controle.

Vector vírus da varíola dos canários para o vírus da raiva recombinante (vCP65): Anticorpos neutralizantes séricos (Ver Tabela 53, abaixo). Os anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva foram detectados pelo Teste Rápido de Inibição de Focos Fluorescentes (RFFIT). Existe um claro aumento no título médio de anticorpos ($\log_{10}$) de $0,88 \pm 0,24$ para $1,38 \pm 0,33$ no Dia 60 pós-vacinação. Em 20 cães que tinham títulos $<1,0$ ($\log_{10}$) no Dia 0, 17 tinham seroconvertido para terem títulos $> 1,0$ a $2,0$ ($\log_{10}$) no Dia 30 pós-vacinação.

CONCLUSÃO:

A fracção da raiva recombinante (vCP65) não causa qualquer interferência na resposta imune das outras fracções liofilizadas. Apesar da presença de anticorpos no dia da primeira vacinação, foi observada uma clara seroconversão através da vacinação com todos os componentes apresentando uma grandeza equivalente em ambos os grupos.

A inoculação com a combinação DACPiP-CP65 induz seroconversão significativa mesmo na presença de anticorpos antes da vacinação. Existe um aumento médio no título de $0,5$ ($\log_{10}$) que se mostrou suficiente para induzir protecção contra a infecção virulenta com vírus da raiva selvagem (Ver Exemplo 14).

Experiências anteriores demonstraram que a

vacinação com vacinas da raiva convencionais não induz sempre grandes quantidades de anticorpos circulantes detectáveis. O mesmo fenómeno foi observado com a vacina de combinação da raiva recombinante; mesmo apesar da seroconversão ser de baixa magnitude, o título de anticorpos duplicou em dois terços dos vacinados no dia 30 pós-vacinação. Nesta experiência, 93% dos vacinados foram protegidos contra a infecção pela raiva. Dos animais que sobreviveram à infecção pelo vírus da raiva virulento. Dos outros animais que sobreviveram à infecção pelo vírus da raiva virulento, alguns cães seroconverteram enquanto outros não. Ainda, na altura da infecção, virtualmente todos os cães vacinados não tinham actividade SN específica do vírus da raiva.

TABELA 48: SERONEUTRALIZAÇÃO DE CDV

(Vacinados DACPiP-CP65+LCI)				(Controlos DACPiP+LCI)			
Log(10) do título de anticorpos SN				Log(10) do título de anticorpos SN			
Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.	Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.
410	1,35	1,50	0,90	409	1,35	1,95	1,80
417	0,45	0,45	0,45	415	0,45	1,20	1,05
414	0,45	0,75	0,45	419	0,45	0,45	1,20
420	0,30	0,45	0,45	426	0,45	1,20	1,50
423	0,30	0,75	0,75	343	0,30	0,60	0,60
427	0,30	0,45	0,45	440	0,30	0,75	0,60
430	0,30	0,45	0,75	403	0,45	0,90	1,05
401	0,30	0,75	1,20	194	0,45	0,90	1,05
192	0,30	1,65	1,35	199	0,45	0,75	0,90

(continuação)

(Vacinação DACPiP-CP65+LCI)				(Controlos DACPiP+LCI)			
Log(10) do título de anticorpos SN				Log(10) do título de anticorpos SN			
Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.	Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.
196	0,30	0,90	1,05	203	0,45	1,05	1,05
200	0,45	1,35	1,20	207	1,50	1,20	1,35
205	0,30	0,75	0,75	210	0,45	0,45	1,05
208	0,30	1,95	1,95	215	0,45	1,05	1,50
211	0,30	0,90	0,75	219	0,30	0,75	1,20
216	0,45	0,60	0,75	223	0,45	0,90	1,05
221	0,30	0,45	0,60	225	0,45	0,90	1,05
226	0,30	1,20	1,20	230	0,30	1,95	1,35
228	0,45	0,45	0,45	235	0,45	1,35	1,35
232	0,30	0,45	0,90	238	0,45	0,75	0,45
234	0,30	1,05	1,05	243	0,45	0,45	0,43
239	0,45	0,90	1,05	247	0,45	1,20	1,35
245	0,30	0,75	0,75	250	0,30	1,05	0,90
249	0,30	1,35	1,35	253	0,30	1,05	1,05
254	0,30	0,45	0,75	258	0,30	0,45	0,60
256	0,30	0,90	0,90	262	0,30	1,20	1,35
260	0,30	0,60	0,60	265	0,30	1,20	1,20
264	0,30	0,90	1,35	271	0,45	1,05	1,50
267	0,45	0,75	0,75	272	0,45	0,90	1,35
270	0,30	0,45	0,75	276	0,60	0,45	0,75
275	0,30	0,45	1,05	280	0,45	0,45	0,45
Média	0,37	0,82	0,89	Média	0,47	0,95	1,07
DP	0,20	0,40	0,35	DP	0,27	0,39	0,35

TABELA 49: SERONEUTRALIZAÇÃO DE CAV2

(Vacinados DACPiP-CP65+LCI)				(Controlos DACPiP+LCI)			
Log(10) do título de anticorpos SN				Log(10) do título de anticorpos SN			
Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.	Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.
410	12,0	1,95	2,26	409	1,35	2,70	2,41
417	0,75	2,10	2,56	415	0,45	2,25	2,41
414	0,60	1,95	2,86	419	1,05	2,55	2,41
420	0,75	2,25	2,56	426	0,75	2,55	2,56
423	0,30	2,70	2,41	432	0,45	2,85	2,71
427	0,30	2,85	3,16	440	0,60	2,70	2,56
430	0,30	2,40	2,56	403	0,75	2,70	2,86
401	0,45	2,10	2,56	194	1,65	2,85	3,01
192	1,95	2,85	3,01	199	1,35	2,70	2,26
196	2,55	2,85	3,01	203	1,35	2,25	2,11
200	1,35	2,55	2,41	207	1,65	2,40	2,26
205	1,95	3,00	2,86	210	1,35	2,55	2,86
208	2,55	2,55	2,41	215	1,95	2,85	3,01
211	2,55	3,30	3,46	219	1,35	2,55	2,56
216	2,55	3,15	3,31	223	2,25	2,55	2,86
221	2,40	3,00	3,16	225	1,65	2,55	2,86
226	2,40	2,70	2,41	230	1,80	2,55	2,56
228	2,25	2,70	2,71	235	1,65	2,25	2,26
232	1,95	3,00	2,56	238	1,50	2,55	3,01
234	2,55	2,85	2,86	243	1,35	2,25	2,41
239	1,05	2,25	2,41	247	2,55	3,00	3,16
245	2,55	2,85	3,16	250	2,55	3,00	3,01
249	1,20	1,65	2,11	253	1,35	2,25	2,56
254	2,55	2,85	2,86	258	2,25	2,25	2,71
256	1,95	2,55	2,71	262	2,10	2,85	3,01
260	1,20	2,70	2,56	265	2,10	2,70	3,01
264	1,95	2,70	2,71	271	1,35	1,95	2,41
267	1,80	3,00	2,86	272	1,20	2,25	2,71
270	1,50	2,55	2,71	276	1,95	2,85	3,01
275	1,95	2,55	2,56	280	2,55	2,85	3,46
Média	1,65	2,62	2,72	Média	1,54	2,57	2,70
DP	0,80	0,39	0,32	DP	0,60	0,27	0,32

TABELA 50: SERONEUTRALIZAÇÃO DE CPI

(Vacinados DACPiP-CP65+LCI)				(Controlos DACPiP+LCI)			
Log(10) do título de anticorpos SN				Log(10) do título de anticorpos SN			
Cão #	Título antes da vacinação 10/13/92	Título 28 d.p.v. 11/20/92	Título 60 d.p.v. 12/22/92	Cão #	Título antes da vacinação 10/13/92	Título 28 d.p.v. 11/20/92	Título 60 d.p.v. 12/22/92
410	1,35	1,05	1,50	409	1,35	0,75	1,35
417	1,35	1,65	1,80	415	1,35	0,60	1,05
414	1,35	1,95	2,25	419	1,05	1,35	1,35
420	1,35	1,95	1,65	426	1,35	1,35	1,35
423	1,20	2,80	1,05	434	1,05	1,35	1,05
427	0,90	1,05	1,20	440	1,35	1,35	1,05
430	1,35	1,20	1,35	403	1,35	1,35	1,35
401	1,35	2,25	1,95	194	0,30	1,35	1,35
192	0,30	1,50	1,80	199	0,30	1,35	1,35
196	0,75	1,35	1,35	203	0,30	1,35	1,35
200	0,30	1,65	2,25	207	0,30	1,05	1,35
205	0,30	1,65	1,65	210	0,30	1,35	1,35
208	0,30	1,20	1,65	215	0,45	1,35	1,35
211	0,30	1,80	2,10	219	1,35	1,35	1,35
216	0,30	1,80	2,10	223	1,35	1,35	1,35
221	0,90	1,20	1,50	225	1,20	1,35	1,35
226	0,90	1,35	1,65	230	0,45	1,35	1,35
228	0,45	1,95	1,95	235	0,30	0,90	1,35
232	0,30	1,05	1,80	238	0,30	1,35	1,20
234	0,30	1,05	1,95	243	0,30	1,35	1,35
239	0,45	1,20	1,65	247	0,45	1,35	1,35
245	1,05	1,50	1,65	250	0,30	1,20	1,05
249	0,30	1,20	1,95	253	0,30	0,45	1,20
254	0,30	1,50	1,65	258	0,30	1,35	1,35
256	0,30	1,35	2,10	262	0,45	1,35	1,35
260	0,30	1,05	1,95	265	0,30	1,35	1,35
264	0,30	1,05	2,40	271	0,30	1,35	1,35
267	0,45	1,35	1,80	271	0,30	1,35	1,35
270	0,30	1,50	1,65	276	0,30	1,35	1,35
275	0,30	1,65	2,10	280	0,30	1,20	1,35
Média	0,65	1,49	1,78	Média	0,65	1,24	1,30
DP	0,44	0,41	0,32	DP	0,46	0,24	0,11

TABELA 51: SERONEUTRALIZAÇÃO DE CPV

(Vacinados DACPiP-CP65+LCI)				(Controlos DACPiP+LCI)			
Log(10) do título de anticorpos SN				Log(10) do título de anticorpos SN			
Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.	Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.
410	1,81	4,20	3,61	409	0,30	3,90	3,31
417	1,20	3,60	3,61	415	1,20	3,00	3,01
414	1,81	3,60	3,31	419	0,95	2,10	3,01
420	1,51	3,00	3,31	426	0,60	2,10	4,52
423	1,51	3,30	3,31	434	2,11	3,30	3,91
427	2,41	3,30	2,41	440	2,11	3,30	3,61
430	1,51	3,90	5,12	403	1,81	2,40	2,71
401	1,81	4,20	3,61	194	3,31	3,30	3,61
192	3,31	3,60	3,95	199	3,01	3,60	3,61
196	3,61	3,00	3,61	203	3,61	3,60	3,61
200	3,01	3,90	4,52	207	3,31	4,50	5,12
205	3,61	3,30	3,61	210	3,31	4,20	5,42
208	3,31	3,60	4,52	215	4,21	3,90	3,61
211	2,11	3,60	3,95	219	3,31	1,35	3,30
216	3,01	3,90	4,52	223	3,61	3,30	4,21
221	2,41	3,90	4,82	225	4,82	3,90	3,61
226	2,71	4,80	4,52	230	3,31	3,60	4,82
228	3,31	3,60	3,95	235	4,21	3,30	4,21
232	4,52	4,20	4,21	238	3,01	3,00	4,21
234	4,21	3,60	5,12	243	3,31	3,60	4,21
239	2,41	3,90	4,52	247	4,21	3,30	3,91
245	4,02	3,60	4,21	250	3,31	3,00	3,61
249	3,61	5,10	4,21	253	3,61	3,00	4,52
254	3,01	5,40	5,42	258	3,91	3,30	5,42
256	3,61	4,50	3,91	262	3,91	3,30	3,31
260	3,31	3,60	3,91	265	3,61	3,00	3,61
264	3,61	3,60	3,31	271	4,21	2,40	3,61
267	3,01	4,80	4,21	272	3,01	3,00	3,01
270	3,61	3,19	3,31	276	3,91	3,00	3,61
275	3,01	3,60	4,21	280	271	3,00	3,91
Média	2,86	3,85	4,03	Média	3,06	3,19	3,87
DP	0,89	0,59	0,65	DP	1,13	0,65	0,69

TABELA 52: SERONEUTRALIZAÇÃO DE CCV

(Vacinados DACPiP-CP65+LCI)				(Controlos DACPiP+LCI)			
Log(10) do título de anticorpos SN				Log(10) do título de anticorpos SN			
Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.	Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.
410	1,58	2,41	2,08	409	1,38	2,08	1,58
417	1,38	1,78	1,88	415	1,38	1,98	1,58
414	1,68	1,88	1,88	419	1,28	1,98	1,68
420	1,38	2,28	2,18	426	1,08	2,13	1,83
423	1,38	1,68	1,68	434	1,38	1,78	1,58
427	1,18	1,78	1,68	440	1,28	1,78	1,68
430	1,48	1,68	1,88	403	1,38	2,18	1,68
401	1,38	1,98	2,28	194	1,98	2,41	2,13
192	1,88	2,32	2,27	199	1,88	2,41	2,18
196	1,48	2,32	2,08	203	1,78	2,38	2,08
200	1,88	2,41	1,88	20,7	1,58	2,18	2,28
205	1,53	2,41	2,28	210	1,68	2,41	2,41
208	1,68	2,41	2,32	215	1,68	1,98	1,98
211	1,98	2,32	2,41	219	1,68	1,98	2,08
216	1,68	2,32	1,83	223	1,58	2,41	2,18
221	1,83	1,98	2,18	225	1,68	1,83	2,28
226	1,68	2,08	2,08	230	1,78	2,25	2,28
228	1,68	2,08	2,08	235	1,78	2,18	2,32
232	1,68	2,18	2,41	238	1,58	2,18	2,08
234	1,68	2,18	2,34	243	1,83	2,41	2,28
239	1,48	1,88	2,08	247	1,58	2,32	1,98
245	1,98	1,98	2,41	250	1,68	2,41	2,18
249	1,98	1,98	2,32	253	1,38	2,41	2,13
254	1,98	1,98	2,28	258	1,83	2,28	1,98
256	1,68	2,41	1,98	262	1,68	1,78	2,32
260	1,58	2,18	1,68	265	1,58	1,68	1,98
264	1,68	2,41	2,18	271	1,68	1,98	2,28
267	1,53	2,28	1,98	272	1,83	1,53	1,83
270	1,08	2,18	2,08	276	1,68	2,38	2,08
275	1,28	2,41	2,18	280	1,68	2,28	2,28
Média	1,61	2,15	2,10	Média	1,61	2,31	2,04
DP	0,24	0,24	0,22	DP	0,21	0,25	0,25

TABELA 53: SERONEUTRALIZAÇÃO DA RAIVA RFFIT

(Vacinados DACPiP-CP65+LCI)				(Controlos DACPiP+LCI)			
Log(10) do título de anticorpos SN				Log(10) do título de anticorpos SN			
Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.	Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.
410	0,48	0,46	1,41	409	0,46	0,97	0,36
417	0,41	0,57	1,32	415	0,59	0,53	0,36
414	0,57	0,80	0,97	419	0,54	0,80	0,34
420	0,58	0,57	1,67	426	0,97	0,85	0,46
423	0,58	0,38	1,06	434	1,19	0,57	0,38
427*	0,85	0,58	0,61	440	1,19	0,80	0,34
430	1,02	0,97	1,19	403	1,11	0,57	0,48
401	0,57	0,56	1,76	194	0,85	0,80	0,97
192	0,85	0,89	1,32	199	0,57	0,48	0,38
196	0,97	0,61	0,97	203	0,78	0,46	0,41
200	0,97	0,53	1,06	207	0,61	0,43	0,38
205	1,19	1,37	1,72	210	0,61	0,80	0,65
208	1,32	0,65	1,28	215	1,19	0,80	0,36
211	0,57	0,56	1,76	194*	0,85	0,80	0,97
192	0,85	0,89	1,32	199*	0,57	0,48	0,38
196	0,97	0,61	0,97	203	0,78	0,46	0,41
200	0,97	0,53	1,06	207	0,61	0,43	0,38
205	1,19	1,37	1,72	210	0,61	0,80	0,65
208	1,32	0,65	1,28	215	1,19	0,80	0,36
211	0,57	1,06	1,32	219	0,65	0,43	0,36
216	1,11	0,46	1,50	223	1,15	0,48	0,34
221	1,06	1,02	1,24	225	1,37	0,59	0,58
226	0,89	1,19	1,59	230	1,28	0,46	0,38
228	1,02	1,02	1,15	235	0,97	1,06	0,53
232	0,89	0,57	1,85	238	1,11	0,97	0,41
234	0,97	1,41	1,32	243	0,53	0,73	0,36
239	0,57	1,02	1,15	247	0,57	0,38	0,58
245	0,97	1,41	2,02	250	1,41	0,97	1,19

(continuação)

(Vacinados DACPiP-CP65+LCI)				(Controlos DACPiP+LCI)			
Log(10) do título de anticorpos SN				Log(10) do título de anticorpos SN			
Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.	Cão #	Título antes da vacinação	Título 28 d.p.v.	Título 60 d.p.v.
249	1,19	1,02	1,24	253*	0,93	0,58	0,36
254	0,89	0,59	1,24	258*	0,97	0,89	0,71
256	0,97	1,54	2,02	262	1,19	1,11	0,38
260	0,93	1,54	1,81	265	1,19	0,70	0,63
264	1,06	1,24	1,63	271	0,85	0,48	0,85
267	1,06	0,79	1,24	272	0,65	0,58	0,34
270	1,15	0,61	1,63	276	1,41	1,02	0,70
275	0,66	0,46	1,19	280	1,24	1,15	0,54
Média	0,88	0,86	1,38	Média	0,94	0,71	0,51
DP	0,24	0,36	0,33	DP	0,30	0,23	0,21

EXEMPLO 16: ENSAIOS VIRICIDAS *IN VITRO* PARA A BACTERINA DE *LEPTOSPIRA CANICOLA-ICTERHAEMORRHAGIAE*, COMO DILUENTE DE UMA VACINA LIOFILIZADA CONTENDO UMA FRACÇÃO DE RAIVA RECOMBINANTE (VCP65) COMBINADA COM FRACÇÕES CANINAS CONVENCIONAIS: VÍRUS DA ESGANA CANINA-ADENOVÍRUS TIPO 2-CORONAVÍRUS-PARAINFLUENZA-VACINA DA RAIVA, VÍRUS VIVO MODIFICADO, VECTOR VARÍOLA DOS CANÁRIOS-BACTERINA DE *LEPTOSPIRA*.

A vacina, DACPiP-CP65, foi re-hidratada com LCI e água. Cada componente das fracções foi titulado de forma a avaliar o efeito viricida de LCI comparando os títulos dos mesmos componentes quando diluídos em LCI ou água. O antígeno vacinal recombinante da raiva foi preparado com a mesma quinta passagem (vCP65 X+5) derivada do stock inicial como no Exemplo 14. O antígeno da raiva foi liofilizado em combinação com os outros cinco antígenos caninos vivos

modificados e foi usado para estudos de eficácia e interferência em cães como descrito nos Exemplos 14 e 15 foram aqui usadas.

A Tabela 54 abaixo resume os títulos obtidos a partir de cada fracção quando diluída em LCI ou água estéril.

TABELA 54

Componente	Título (Log_{10} TCID ₅₀ /dose)					
	CDV	CAV-2	CPi	CPV	CCV	VCP65
DACPiP-CP65+H ₂ O	3,4	5,4	5,7	6,2	6,2	6,5
DACPiP-CP65+LCI	2,8	5,4	5,1	6,2	5,6	6,3
Diferença	-0,6	0,0	-0,6	0,0	-0,6	-0,2

A formulação abaixo foi usada para obter as vacinas de combinação que foram preparadas como no Exemplo 14.

A fracção líquida de *L. canicola* e *L. icterohaemorrhagiae* foi uma produção normal em série (Nº 32010), data de validade 17 de Julho de 1995. Esta série foi disponibilizada por NVSL em 22 de Setembro de 1992.

Linhas celulares: A linha celular de rim canino Madin Darby (MDCK) foi usada para titulação dos componentes CAV-2, CPi e CCV. A linha celular de rim felino Crandell (CRFK) foi usada para titulação de CPV. As células de fibroblastos embrionários de galinha (CEF) foram usadas

para titulação do vírus da raiva recombinante. O meio de crescimento foi F15 com soro fetal bovino.

A actividade viricida da bacterina líquida LCI usada para re-hidratar CACPiP-CP65 foi determinada de acordo com 9CFR 113.35.

A vacina liofilizada DACPiP-CP65 foi re-hidratada com água estéril e testada paralelamente com o componente acima de acordo com CFR 113.35. Os métodos de titulação foram os convencionais. O título viral (Log_{10} TCID₅₀ para CDV, CAV-2, CCV, CPi, CPV e CP65) foi calculado de acordo com o método de Spearman-Kärber.

Os resultados da titulação viral estão resumidos na Tabela 55, abaixo. A re-hidratação da DACPiP-CP65 liofilizada com LCI líquida não reduziu os títulos de CDV, CAV-2, CPi, CPV, CCV e CP65 quando comparado com a re-hidratação com água estéril como diluente.

TABELA 55

Títulos de vírus após re-hidratação de DACPiP-CP65 com LCI (N° de Série 32010) ou com água estéril como diluente						
	Título (Log_{10} TCID ₅₀ /dose)					
Componente	CDV	CAV-2	CPi	CPV	CCV	VCP65
DACPiP-CP65+H ₂ O	3,4	5,4	5,7	6,2	6,2	6,5
DACPiP-CP65+LCI	2,8	5,4	5,1	6,2	5,6	6,3
<i>Diferença</i>	-0,6	0,0	-0,6	0,0	-0,6	-0,2

EXEMPLO 17 - VACINA CANINA RECOMBINANTE DE RAIVA-PARVOVÍRUS, VÍRUS VIVO MODIFICADO: SEGURANÇA E EFICÁCIA APÓS DUAS INOCULAÇÕES SUBCUTÂNEAS DE CÃES COM A VACINA VCP136

Este Exemplo demonstra a segurança, antigenicidade e eficácia de uma vacina recombinante da raiva/parvovírus canino vCP136 em cães (genes da glicoproteína da raiva e de parvovírus canino VP2 (CPV) inseridos no mesmo vector da varíola dos canários). O recombinante vCP136 baseado no vírus da varíola dos canários possui os genes da glicoproteína da raiva e VP2 do parvovírus canino (VP136 e a sua construção estão descritos em USSN 08/105483, aqui incluída como referência); e este Exemplo demonstra a reacção de cães após vacinação SQ com duas doses da vacina vCP136, com 22 dias de intervalo, a resposta humoral de anticorpos dos cães inoculados duas vezes com vCP136, 10^7 UFP/dose, e a resposta imune protectora dos cães vacinados após a exposição oronasal a CPV virulento.

RESULTADOS:

Nenhum dos cães vacinados apresentou reacção adversa local ou sistémica após vacinação.

Os cães vacinados desenvolveram títulos de anticorpos neutralizantes contra parvovírus que variaram entre 1:380 e 1:1530 com um título geométrico médio de anticorpos (GMT) de 1:740.

Quando da exposição oronasal a CPV virulento obtido a partir de NVSL, cinco ou seis cães não vacinados desenvolveram sinais clínicos de infecção por CPV (anorexia e diarreia). Nenhum dos cães vacinados mostrou quaisquer sinais clínicos de infecção por CPV.

CPV foi isolado a partir de seis cães testemunha numa média de 3,0 dias de isolamento por cão. CPV foi isolado a partir de dois dos quatro cães vacinados numa média de 0,5 dia de isolamento por cão.

O padrão de temperatura rectal manteve-se normal nos cães vacinados e não vacinados.

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na leucopenia, do dia 6 após exposição a vírus infeccioso, entre vacinados e controlos.

Os títulos de anticorpos contra a raiva (RFFIT) foram muito elevados em todos os cães vacinados, mesmo após apenas uma única injeção com vCP136.

Mais especificamente: Estado de saúde dos cães Beagle: Todos os cães tinham soros negativos para VNA contra CPV no Dia -4 (dia da chegada) e novamente no Dia zero (0) (dia da primeira vacinação).

Segurança da vacina: Os quatro cães vacinados

duas vezes SQ na região dorsal superior do pescoço (no Dia 0 e no Dia 22) com vCP136 não mostraram reacções adversas locais ou sistémicas.

Estado serológico para CPV (Tabela 56): O nível das actividades VNA contra CPV nos soros obtidos de cães com duas inoculações SQ da vacina vCP136 e subsequentemente expostos a CPV virulento está apresentado na Tabela 56. Os dez cães não apresentaram título detectável de VNA numa diluição final de soro de 1:2 no Dia 0. Seis dos cães não vacinados permaneceram susceptíveis a CPA no Dia 37. Vinte e dois dias após a primeira vacinação com vCP136, os cães 2002, 2021 e 2025 tinham níveis detectáveis de VNA entre 1:8 e 1:12. O cão 2007 não tinha VNA detectável na diluição final de soro de 1:4.

Quinze dias após vacinação de reforço com vCP136, foi registado um aumento marcado do título de VNA. O nível de VNA variou entre 1:380 e 1:1530 (2,6 a 3,2 $\log_{10}$) e GMT de 1:740 (2,8 $\log_{10}$). Treze dias após infecção, cães controlo não vacinados tinham um título VNA que variou entre 1:1530 e 1:16380 (GMT = 1:5260). Por outro lado, os cães vacinados tinham um título de VNA que variou entre 1:1530 e 1:3070 (GMT = 1:2090).

Estatuto serológico para o componente da raiva (Tabela 57): Os quatro cães vacinados seroconverteram com excelente título de anticorpos após a primeira injeção SQ. Foi registado um aumento altamente significativo no título

de anticorpos após a segunda injeção. Nenhum dos cães controlos seroconverteram.

Avaliação da imunidade: Contagem de leucócitos (Tabela 58): Quatro de seis cães não vacinados apresentaram leucopenia começando no Dia 6 após a infecção. A contagem de leucócitos voltou, pouco depois, à gama normal de valores. Dois dos quatro cães vacinados mostraram uma tendência de descida na contagem de leucócitos até ao dia 8 após a infecção. O cão 2002 tinha leucopenia no Dia 5 e o cão 2021 no Dia 7 após a infecção.

Temperatura rectal (Tabela 59): Não se observou diferença aparente nos valores diários da temperatura rectal entre os cães vacinados e não vacinados; não se detectou qualquer anormalidade.

Sinais clínicos (Tabela 60): Cinco de seis cães não vacinados desenvolveram evidência visível de infecção viral. Foram observados graus variáveis de anorexia e ocorrência de diarreia mucóide ou com sangue em graus variáveis. Nenhum dos quatro cães vacinados apresentou evidência clínica de infecção por CPV.

Isolamento de vírus (Tabela 61): Isolou-se vírus a partir de seis cães controlo. Nalguns destes cães, o vírus foi detectado logo no Dia 1 após infecção e mais tarde no Dia 8 após infecção. Nalguns casos, o vírus foi detectado apenas após uma segunda subpassagem em células

CRFK. O vírus foi isolado a partir de dois dos quatro vacinados, apenas durante um dia para cada cão, e apenas após a segunda subpassagem na cultura celular CRFK.

O teste é válido porque os seis cães controlos permaneceram susceptíveis a CPV no dia da infecção. Não foi registada qualquer diferença na temperatura diária rectal entre cães vacinados e não vacinados. A análise estatística da contagem de leucócitos revelou uma diferença significativa entre cães vacinados e cães controlos apenas no Dia 6 após infecção. A evidência clínica de infecção por CPV (anorexia e esgana) foi observada apenas entre cães não vacinados. O vírus usado na infecção foi excretado durante um total de 18 dias de isolamento, numa média de 3 dias de isolamento por cão não vacinado comparado com um total de 2 dias de isolamento numa média de 0,5 dia de isolamento por cão vacinado. Ainda, entre os cães vacinados, o vírus só foi detectado após a segunda subcultura em culturas celulares, sugerindo uma quantidade baixa de vírus excretado na amostra fecal.

Os cães não foram infectados pelo vírus da raiva virulento. No entanto, o nível de actividade SN para a raiva apresentado após duas injeções foi consistente com os níveis associados à protecção contra a infecção pela raiva. Os dados aqui apresentados mostram uma marcada resposta protectora dos cães vacinados relativamente à infecção por CPV quando comparado com a dos cães não vacinados.

CONCLUSÃO:

Duas inoculações subcutâneas de cães susceptíveis com vacina recombinante raiva-parvovírus canino baseada em varíola dos canários (composição vCP136), com 10^7 UFP por dose, resultou em: Produção de níveis excelentes de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva mesmo após uma injeção; produção de níveis satisfatórias de anticorpos neutralizantes contra CPV; e diferença significativa nas manifestações clínicas e subclínicas da infecção por CPV entre cães vacinados e não vacinados. Assim, vCP136, ou outra composição contendo um recombinante contendo sequências codificadoras da raiva e de um outro antigénio, é útil e não apresenta interferência da eficácia.

TABELA 56 NÍVEL DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES DE CPV E DE VÍRUS DA RAIVA NOS SOROS OBTIDOS A PARTIR DE CÃES VACINADOS COM VCP136 E NÃO VACINADOS.

Número do grupo	Número do cão	Tipo de vacina	Dia 0	Dia 22	Dia 36	Dia 50
I Controlo 1	830	Sem vacina parvo	<2	<2	<2	2048
Controlo 2	832		<2	<2	<2	1536
Controlo 3	843		<2	<2	<2	2048

(continuação)

Número do grupo	Número do cão	Tipo de vacina	Dia 0	Dia 22	Dia 36	Dia 50
Controlo 4	2019		<2	<2	<2	16384
Controlo 5	2020		<2	<2	<2	8192
Controlo 6	3015		<2	<2	<2	24156
II VAX 1	2002	vCP136	<2	8	512	3072
VAX 2	2007		<2	<4	1024	2048
VAX 3	2021		<2	12	384	2048
VAX 4	2025		<2	8	1536	1536

TABELA 57 TÍTULO DE ANTICORPOS CONTRA A RAIVA DE CÃES
VACINADOS SQ DUAS VEZES COM VCP136

Número do cão		2002	2007	2021	2025
Título	Dia 0	21,1	3,8	4	3,8
	Dia 22	434	129,6	262,3	129,6
	Dia 36	>1778,3	>1778,3	>1778,3	718,3
UI	Dia 0	0,51	0,09	0,1	0,09
	Dia 22	10,43	3,11	6,3	3,11
	Dia 36	>42,75	>42,75	>42,75	17,27
Legenda: UI - Unidades Internacionais					

TABELA 58 CONTAGEM DIÁRIA DE LEUCÓCITOS DOS CÃES VACINADOS E CONTROLOS APÓS INFECÇÃO ORONASAL COM CPV VIRULENTO LOTE 90-05

Número do cão	Número da etiqueta na orelha	Temperatura rectal antes e após a infecção oronasal com CPV virulento												
		Dia -2	Dia -1	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
Controlo 1	830	9800	ND	ND	11400	9100	10100	10600	14200	6300	9700	11300	12100	14400
Controlo 2	832	9300	ND	ND	10600	10300	12600	10300	9900	8600	11000	8200	12100	11300
Controlo 3	843	10100	ND	ND	9000	9700	9900	8400	8200	6700	9000	6500	5000	7400
Controlo 4	2019	9200	ND	ND	7800	8200	8400	8600	8900	7500	6900	7800	8700	7900
Controlo 5	2020	10800	ND	ND	9700	10000	9900	7800	9000	7700	10000	9900	10500	10900
Controlo 6	3015	8500	ND	ND	8000	7600	8700	9700	13200	6900	9900	7700	8400	5800
	Média	9616,7			9416,7	9150,0	9933,3	9140,0	10566,7	7283,3	9416,7	8566,7	9466,7	9616,7
	DP	729,0			1304,4	970,8	1354,8	1030,6	2288,1	753,7	1269,4	1580,8	2470,3	2880,6
Vax 1	2002	9800	ND	ND	11600	10800	11400	11600	3400	10900	85	9400	1100	11600
Vax 2	2007	9300	ND	ND	9000	10200	105	10200	13000	8000	5900	10100	9400	10500
Vax 3	2021	11000	ND	ND	13100	10500	9800	8500	8200	8100	7900	7300	8000	9600
Vax 4	2025	10500	ND	ND	11000	10200	10500	9600	14700	10200	12100	10700	10200	12300
	Média	10150,0			11175,0	10425,0	10550,0	9975,0	9825,0	9300,0	8600,0	9375,0	9650,0	11000,0
	DP	650,0			1470,3	248,7	587,9	1118,9	4409,3	1274,8	2238,3	1283,3	1107,9	1032,0

Legenda: ND = não efectuado; DP = Desvio padrão

Notas: Três de seis cães não vacinados e dois de quatro cães não vacinados apresentaram uma contagem de leucócitos reduzida entre o dia 5 e o dia 7 pós-infecção.

TABELA 59 TEMPERATURA RECTAL DIÁRIA DOS CÃES VACINADOS E CONTROLOS APÓS INFECÇÃO ORONASAL COM CPV VIRULENTO LOTE 90-05

Número do cão	Número da etiqueta na orelha	Temperatura rectal antes e após a infecção oronasal com CPV virulento												
		Dia -2	Dia -1	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
Controlo 1	830	101,9	ND	103,0	102,7	101,9	102,8	102,7	103,0	103,4	102,2	101,9	102,0	101,8
Controlo 2	832	102,4	ND	103,5	102,1	103,3	102,1	102,1	100,9	101,6	101,7	101,8	101,9	102,4
Controlo 3	843	101,9	ND	102,7	102,0	102,2	101,0	102,9	102,2	101,5	103,5	101,8	102,4	102,8
Controlo 4	2019	102,9	ND	102,0	102,7	101,0	101,0	102,7	101,1	101,4	101,6	101,6	101,4	104,5
Controlo 5	2020	101,4	ND	102,9	101,8	102,2	101,2	102,3	102,8	102,1	102,7	101,9	100,9	101,7
Controlo 6	3015	102,1	ND	101,7	102,8	102,9	101,7	102,0	102,6	102,4	101,9	102,1	103,0	102,0
	Média	102,1		102,6	102,4	102,3	101,6	102,5	102,1	102,1	102,3	101,9	101,9	102,5
	DP	0,5		0,6	0,4	0,7	0,7	0,3	0,8	0,7	0,7	0,1	0,7	1,0
Vax 1	2002	102,1	ND	102,0	101,5	101,8	102,4	102,7	101,8	102,0	103,4	102,3	102,3	101,9
Vax 2	2007	104,0	ND	100,4	102,1	102,8	102,6	103,0	103,5	102,5	102,3	102,5	102,4	102,2
Vax 3	2021	103,1	ND	103,1	101,7	102,3	102,3	101,5	100,7	101,2	101,9	101,8	101,9	102,5
Vax 4	2025	102,5	ND	102,5	104,1	102,0	102,4	102,7	102,2	102,1	102,4	102,8	102,9	102,4
	Média	102,9		102,0	102,4	102,2	102,4	102,5	102,1	102,0	102,5	102,4	102,4	102,3
	DP	0,7		1,0	1,0	0,4	0,1	0,6	1,0	0,5	0,6	0,4	0,4	0,2

Notas: A temperatura rectal elevada mantida e significativa não é evidente entre cães não vacinados e vacinados

TABELA 60 OBSERVAÇÃO CLÍNICA DIÁRIA DOS CÃES VACINADOS E CONTROLOS APÓS INFECÇÃO ORONASAL COM CPV
VIRULENTO LOTE 90-05

Número do cão	Número da etiqueta na orelha	Sinais clínicos nos dias antes e após a infecção com CPV												
		Dia -2	Dia -1	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
Controlo 1	830	N	N	N	N	N	N	N	A(1); D(1)	A(1); D(3+b)	A(5); n/F	A(1); D(3+B)	N	N
Controlo 2	832	N	N	N	N	N	N	A(3); D(1)	A(3)	A(1)	A(1); D(1)	D(1)	N	N
Controlo 3	843	N	N	N	N	A(1)	N	A(1)	A(1)	A(3)	A(5); D(3+b)	A(5); D(3+b)	N	N
Controlo 4	2019	N	N	N	N	N	N	N	A(1); D(1)	A(1); D(1)	N	N	N	N
Controlo 5	2020	N	N	N	N	N	N	N	A(1); D(1)	A(3); D(1)	N	N	N	N
Controlo 6	3015	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Média	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	DP													
Vax 1	2002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Vax 2	2007	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Vax 3	2021	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Vax 4	2025	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Média	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	DP	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda: N = Normal A = anorexia (1 = ligeiro; 3 = médio; 5 = grave)

D = diarreia (1 = ligeira; 3 = média; 5 = grave)

n/F = não foram colhidas fezes

TABELA 61 ISOLAMENTO DE VÍRUS A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS COLHIDAS DE CÃES NÃO VACINADOS E VACINADOS
APÓS INFECÇÃO COM CPV VIRULENTO

Número do cão	Número da etiqueta na orelha	Isolamento de Vírus em Dias Antes e Depois de Infecção com CPV										
		Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
Controlo 1	830											
Controlo 2	832											
Controlo 3	843											
Controlo 4	2019											
Controlo 5	2020											
Controlo 6	3015											
Vax 1	2002											
Vax 2	2007											
Vax 3	2021											
Vax 4	2025											

Legenda:



= Não foi isolado qualquer CPV a partir de amostras fecais

= Foi isolado CPV a partir de amostras fecais apenas após a primeira tentativa de isolamento

= Foi isolado CPV a partir de amostras fecais apenas após a segunda subpassagem em culturas celulares

EXEMPLO 18 - VACINA DA RAIVA, RESPOSTA SEROLÓGICA AO VECTOR VIVO DA VARÍOLA DOS CANÁRIOS E SEGURANÇA EM CÃES INFECTADOS COM VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA E NÃO INFECTADOS

Este Exemplo demonstra a segurança e a resposta de anticorpos para um vírus recombinante varíola dos canários-raiva (vCP65) em gatos infectados com vírus da leucemia felina (gatos FeLV $\oplus$) e não infectados (gatos FeLV). Nestes grupos, 30 gatos tinham exposição prévia a um vírus recombinante varíola dos canários-leucemia felina. Os restantes 28 gatos nunca tinham sido expostos ao vector varíola dos canários (Ver Tabela 65). Duas doses de vírus vCP65 foram administradas subcutaneamente (Dia 0 e Dia 20-22). As respostas de anticorpos contra a raiva foram determinadas pelo teste rápido de inibição de focos de fluorescência (RFFIT). Mais especificamente: (vCP97 está descrito em USSN 08/105483; vCP212 foi obtido usando vCP177 (USSN 08/105483, Exemplo 50) como vírus de resgate e pC3DOFGAGVQ (USSN 08/105483, Exemplo 53) como DNA dador (USSN 08/105483 aqui incluído como referência)).

Animais: Grupo 1 (FeLV-):

Foram usados dez gatos negativos para anticorpos contra a raiva, previamente vacinados com duas doses de um vírus recombinante varíola dos canários-leucemia felina (vCP97) e infectados com vírus da leucemia felina (FeVL). Receberam (vCP97) no Dia 0 e no Dia 21. Foram infectados duas semanas mais tarde após uma dose imunossupressiva de

corticosteróides. Colheu-se sangue de duas em duas semanas após infecção e os seus soros foram avaliados relativamente à presença de antígeno FELV p27 por ELISA. Apenas um gato (#1953) apresentou transitoriamente antigenemia após a infecção. Nove semanas após a infecção todos os gatos foram negativos para antigenemia FeLV antes da vacinação com o vírus varíola dos canários-raiva (vCP65).

O grupo 1 (ver Tabela 64): Gatos (n=10) foram divididos em dois grupos de dosagem. Um grupo (N = 5) recebeu duas doses de $10^{6,0}$ TCID₅₀/dose. Ambos os grupos foram vacinados e receberam reforço aproximadamente três semanas depois. As amostras de sangue foram colhidas de acordo com o esquema que se segue (Tabela 62):

TABELA 62

Dia	Actividade
0	Vacinação
7	Colheita de sangue
22	Reforço/colheita de sangue
36	Colheita de sangue
49	Colheita de sangue

Grupo 2 (FeLV +):

Foram usados dezoito gatos negativos relativamente a anticorpos contra a raiva. Os gatos não tinham sido vacinados com vírus um recombinante antes da infecção

experimental. Foram infectados com FeLV após uma imunossupressão. Onze semanas após a infecção observaram-se 7 gatos negativos para FeLV (FeLV⁻) e 11 positivos para FeLV (FeLV⁺) antes da vacinação com o vírus varíola dos canários-raiva (vCP65).

Grupo 2 (Ver Tabela 65): Os gatos (n = 18) foram divididos em dois grupos de dosagem e receberam duas doses de vCP65 a $10^{5,0}$ ou $10^{6,0}$ TCID₅₀/dose. Os animais foram vacinados uma primeira vez e depois receberam um reforço vinte e dois dias mais tarde. Colheram-se amostras de sangue de acordo com o esquema que se segue (Tabela 63):

TABELA 63

Dia	Actividade
0	Vacinação
22	Reforço/colheita de sangue
36	Colheita de sangue

Grupo 3: (FeLV⁻):

Foram usados trinta gatos negativos relativamente a anticorpos contra a raiva. Os gatos receberam uma dose de (vCP97) sozinho ou em combinação com um outro recombinante de varíola dos canários-FeVL (vCP212) e uma segunda dose três semanas mais tarde e foram infectados duas semanas mais tarde após a segunda dose, depois de uma dose imunossupressora de corticosteróides. Colheu-se sangue duas

semanas após a infecção e os soros foram avaliados relativamente à presença de antígeno FeLV p27 por ELISA. Apenas um gato (K2) tinha antigenemia FeLV_e após infecção. Nove semanas após infecção, vinte e nove gatos tinham FeLV_e e um gato manteve-se FeLV₊ antes da vacinação com vírus da varíola dos canários-raiva (vCP65) e os recombinantes de herpes felino (FHV) (vCP243 e vP1164).

Geração de um recombinante baseado em ALVAC expressando as glicoproteínas gB, gC e gD de FHV-1 (vCP243). Os genes codificadores dos homólogos gB, gC e gD de FHV-1, sob o controlo dos promotores I3L, H6 e 42K, respectivamente, foram inseridos num único vector ALVAC, no local C6, para gerar vCP243. O plasmídeo dador necessário para esta inserção, pJCA109, foi gerado como se segue.

Construção do plasmídeo dador pJCA109. Uma cassette de expressão promotor I3L/gene gB de FHV-1 foi obtida como dois fragmentos derivados do plasmídeo pJCA079: um fragmento SmaI/BamHI contendo o promotor I3L ligado à porção 5' do gene gB (fragmento A) e um fragmento BamHI/HindIII de 2155 pb contendo a restante porção 3' do gene gB (fragmento B).

Um fragmento NruI/EcoRI de 1650 pb, contendo o extremo 3' do promotor H6 ligado ao gene gC de FHV-1, foi obtido a partir do plasmídeo pJCA100 e ligado a um fragmento do vector pBS-SK⁺H6 digerido com NruI/EcoRI (Este vector continha o promotor H6 clonado na região do poli-

adaptador de pBS-SK⁺). O plasmídeo resultante foi designado pJCA108. A cassette de expressão H6/gC foi isolada a partir de pJCA108 como um fragmento HindIII/EcoRI de 1830 pb (fragmento C).

Uma cassette de expressão, promotor 42K/gene gD de FHV-1, foi obtida a partir do plasmídeo pJCA080 como um fragmento EcoRI/XhoI (fragmento D).

Os fragmentos A, B, C e D foram subsequentemente ligados ao fragmento vector pC6L digerido com SmaI/XhoI para gerar o plasmídeo pJCA109. O plasmídeo dador do local C6 de ALVAC, pJCA109, possui as cassetes de expressão promotor I3L/gene gB, o promotor H6/gene gC e o promotor 42K/gene gD, orientadas da esquerda para a direita, respectivamente, entre os braços flanqueantes de ALVAC C6.

A derivação de plasmídeos intermediários usados na geração de pJCA109 é como se segue.

pJCA079: O plasmídeo pJCA001 (USSN 07/502.834, Exemplo 15) foi digerido com BamHI e EcoRI para obter um fragmento de 900 pb contendo a porção central de gB (fragmento A). O plasmídeo pJCA076 foi digerido com XbaI e BamHI para obter um fragmento de 840 pb contendo o promotor I3L ligado à porção 5' mutada de gB (fragmento B). O plasmídeo pJCA077 foi digerido com EcoRI e XhoI para se obter um fragmento de 1255 pb contendo a porção 3' de gB (fragmento C). Os fragmentos A, B e C foram ligados uns aos

outros e ao vector pBS-SK⁺ digerido com XbaI-XhoI para produzir pJCA079.

pJCA076: Sequências iniciadoras JCA158 (SEQ ID NO:37) (5'TTTTCTAGACTGCAGCCCGGGACATCATGC AGTGGTTAAAC 3') e JCA211 (SEQ ID NO:56) 5'GTGGACACATATAGAAAGTCG3') foram usadas para sintetizar por PCR um fragmento XbaI-cerse de 510 pb (fragmento A), contendo um TTTTNT mutado, usando o plasmídeo pJCA075 como matriz. As sequências iniciadoras JCA212 (SEQ ID NO:38) (5'CACCTT CAGGATCTACTGTGCG3') e JCA213 (SEQ ID NO:39) (5'GGGTTTCAGAGGCAGTTC 3') foram usadas para sintetizar por PCR um fragmento cerse-BamHI (fragmento B) usando o plasmídeo pJCA001 como matriz. O fragmento A foi digerido com XbaI e fosforilado. O fragmento B foi digerido com BamHI e fosforilado. Os fragmentos A e B foram então ligados um ao outro e ao vector pBS-SK⁺ digerido com XbaI-BamHI para produzir pJCA076.

pJCA075: As sequências iniciadoras MP287 (SEQ ID NO:40) (5'GATTAAACCTAAATAATTGT 3') e JCA158 (SEQ ID NO: 41) (5' TTTTCTAGACTGCAGCCCGGGACATCATGCAGTGGTTAAAC 3') foram usadas para sintetizar, por PCR, um fragmento promotor I3L XbaI-cerse de 120 pb (fragmento A) usando o plasmídeo pMP691 como matriz (pMP691 possui o promotor I3L ligado a um gene irrelevante - o gene da glicoproteína da raiva - no plasmídeo pCOPCS). As sequências iniciadoras JCA213 (SEQ ID NO:42) (5'GGGTTTCAGAGG CAGTTC 3') e JCA238 (SEQ ID NO:43) (5' ATGTCCACTCGTGGCGATCTT 3') foram usadas para sintetizar, por PCR, um fragmento de 720 pb que se estende a partir do

ATG 5' de gB do FHV (fragmento B) usando o plasmídeo pJCA001 como matriz. O fragmento A foi digerido com XbaI e fosforilado. O fragmento B foi digerido com BamHI e fosforilado. Os fragmentos A e B foram então ligados ao vector pBS-SK⁺ digerido com XbaI-BamHI para produzir pJCA075.

pJCA077: As sequências iniciadoras JCA239 (SEQ ID NO:44) (5'ACGCATGATGACAAGATTATTATC 3') e JCA249 (SEQ ID NO:45) (5'CTGTGGA ATTCGCAATGC) foram usadas para sintetizar, por PCR, um fragmento EcoRI-cerse de 695 pb de gB do FHV (fragmento A) usando o plasmídeo pJCA001 como matriz. As sequências iniciadoras JCA221 (SEQ ID NO:46) (5'AAACTGCAGCCCGGGAAGCTTACAAAAATTAGACAAGATTTGTTTC AGTATC 3') e JCA247 (SEQ ID NO:47) (5'GGTATGGCAAATTTCTTTTCAGGGACTC-GGGGATGTG 3') foram usadas para sintetizar, por PCR, um fragmento cerse-PstI de 560 pb do extremo 3' de gB do FHV (fragmento B) usando o plasmídeo pJCA001 como matriz. O fragmento A foi digerido com EcoRI e fosforilado. O fragmento B foi digerido com PstI e fosforilado. Os fragmentos A e B foram então ligados ao vector pIBI21 digerido com EcoRI-PstI para produzir o plasmídeo pJCA077.

pJCA100: As sequências iniciadoras JCA274 (SEQ ID NO: 48) (5' CATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAGACGATAT-AGGATGGGAC3') e JCA275 (SEQ ID NO:49) (5'ACTATTTTCAATA-CTGAC 3') foram usadas para sintetizar, por PCR, um fragmento NruI-SalI de 107 pb contendo o extremo 3' do

promotor H6 ligado à porção 5' de gC (fragmento A) usando o plasmídeo pFHVEcoRIF como matriz. As sequências iniciadoras JCA276 (SEQ ID NO:50) (5'AAATGTGTACCACGGGAC 3') e JCA277 (SEQ ID NO:51) (5' AAGAA GCTTCTGCAGAATTCGTTAACAAAAATCATTATAATCGCCGGGGATGAG 3') foram usadas para sintetizar por PCR um fragmento EcoRV-HindIII de 370 pb contendo a porção 3' de gC (fragmento B) usando o plasmídeo pJCA095 como matriz. O fragmento A foi digerido com NruI e SalI, O fragmento B foi digerido com EcoRV e HindIII. Obteve-se um fragmento HindIII-NruI de 100 pb contendo o extremo 5' do promotor H6 (fragmento C). O plasmídeo pJCA095 foi digerido com BamHI e EcoRV para obter um fragmento de 580 pb contendo a porção central de gC (fragmento D). Os fragmentos A e C foram ligados ao vector pBS-SK⁺ digerido com HindIII-SalI para produzir o plasmídeo pJCA097. Os fragmentos B e D foram ligados ao vector pBS-SK⁺ digerido com BamHI-HindIII para produzir pJCA099. O plasmídeo pJCA097 foi digerido com PstI e SalI para obter um fragmento de 200 pb contendo o promotor H6 ligado à porção 5' de gC (fragmento E). O plasmídeo pFHVEcoRIF foi digerido com BamHI e SalI para obter um gramento gC de 600 pb (fragmento F). Os fragmentos E e F foram ligados ao vector pBS-SK⁺ digerido com BamHI-PstI para produzir pJCA098. O plasmídeo pJCA098 foi digerido com EcoRI e BamHI para se obter o fragmento de 820 pb contendo o promotor H6 ligado à porção 5' de gC (fragmento G). O plasmídeo pJCA099 foi digerido com BamHI e HindIII para obter o fragmento de 960 pb contendo a porção

3' de gC (fragmento H). Os fragmentos G e H foram então ligados ao vector pBS-SK⁺ digerido com EcoRI-HindIII para produzir pJCA100, o qual possui a cassete de expressão H6/gC (532 aa) em pBS-SK⁺.

pFHV_{EcoRI}F: O fragmento EcoRI "F" de 7500 pb de FHV-1 estirpe CO foi clonado em pBS-SK⁺ digerido com EcoRI para gerar o plasmídeo pFHV_{EcoRI}F. O gene gC de FHV-1 foi identificado deste fragmento através da comparação de sequências nucleotídicas com o gene gC de HSV-1.

pJAC080: O plasmídeo pJCA073 (USSN 08/105483, Exemplo 57) foi digerido com BamHI e XhoI para obter o fragmento de 960 pb contendo a porção 3' de gD do FHV (fragmento D). As sequências iniciadoras RG286 (SEQ ID NO:52) (5'TTTATATTGTAATTATA 3') e M13F (SEQ ID NO: 53) (5'GTAAAACGACGGCCAGT3') foram usadas para sintetizar por PCR um fragmento EcoRI-cerse de 130 pb contendo o promotor 42K (fragmento E) usando plasmídeo pJCA038 como matriz. As sequências iniciadoras JCA234 (SEQ ID NO:54) (5'ATGATGACACGTCTACATTTT 3') e JCA235 (SEQ ID NO.55) (5'TGTTACATAA CGTACTTCAGC 3') foram usadas para sintetizar um fragmento cerse-BamHI de 185 pb contendo a porção 5' de gD de FHV (fragmento F). Os fragmentos E e F foram digeridos respectivamente com EcoRI e BamHI, fosforilados e ligados ao vector pBS-SK⁺ digerido com BamHI-EcoRI para produzir o plasmídeo pJCA078. O plasmídeo pJCA078 foi digerido com HpaI e BamHI para obter um fragmento de 310 pb contendo o promotor 42K ligado à porção 5' do gene D

(fragmento G). Os fragmentos D e G foram ligados ao vector pBS-SK⁺ digerido com EcoRV e XhoI para produzir pJCA080.

Geração e caracterização de vCP243. Os genes gB, gC e gD de FHV-1 foram inseridos no genoma de ALVAC no local C6 através de recombinação *in vitro* entre o plasmídeo dador pJCA109 linearizado com NotI e DNA genómico de ALVAC. Um recombinante contendo os genes gB, gC e gD foi identificado por hibridação de placas, purificado de placas e amplificado. Este recombinante foi designado vCP243.

A expressão destas glicoproteínas em células CRFK, CEF e/ou Vero infectadas com vCP243 foi avaliada com anti-soros policlonais de carneiro, não específicos, contra gB, gC e gD por análise de transferência western e/ou imunoprecipitação. Através destes ensaios, foram expressas em células infectadas com vCP243 as seguintes proteínas de FHV-1: polipéptidos gB de 100, 60 e 55 KDa; um polipéptido gC de 110 KDa; um polipéptido gD de 60 KDa.

Geração de um recombinante baseado em NYVAC expressando as glicoproteínas gB, gC e gD de FHV-1 (vP1164). Os genes codificadores dos homólogos de FHV-1 de gB, gC e gD, sob o controlo dos promotores I3L, H6 e 42K, respectivamente, foram inseridos num único vector NYVAC no local ATI para gerar vP1164. O plasmídeo dador necessário para esta inserção, pJCA107, foi gerado como se segue.

Construção do plasmídeo dador pJCA107. Uma cassette de expressão promotor I3L/gene gB de FHV-1 foi

obtida como dois fragmentos a partir do plasmídeo pJCA079: um fragmento SmaI/EcoRI de 1740 pb contendo o promotor I3L ligado à porção 5' do gene gB (fragmento A) e um fragmento EcoRI/HindIII de 1255 pb contendo a porção 3' do gene gB (fragmento B).

Uma cassette de expressão, promotor H6/gene gC de FHV-1, foi obtida a partir do plasmídeo pJCA100 como um fragmento HindIII/PstI de 1755 pb (fragmento C).

Uma cassette de expressão, promotor 42K/gene gD de FHV-1, foi obtida a partir do plasmídeo pJCA080 como um fragmento PstI/XhoI (fragmento D).

Os fragmentos A, B, C e D foram subsequentemente ligados ao fragmento do vector pSD541VC digerido com SmaI/XhoI para gerar o plasmídeo pJCA107. o plasmídeo dador do local ATI de pJCA107 NYVAC contem as cassetes de expressão promotor IL3/gene gB, promotor H6/gene gC e promotor 42K/gene gD orientados da esquerda para a direita, respectivamente, entre os braços flanqueantes NYVAC ATI.

Geração e caracterização de vP1164. Os genes gB, gC e gD de FHV-1 foram inseridos no genoma de NYVAC, no local ATI, através de recombinação *in vitro* entre o plasmídeo dador pJCA107 linearizado com NotI e DNA genómico de NYVAC. Um recombinante contendo os genes gB, gC e gD foi identificado por hibridação de placas, purificado de placas e amplificado. Este recombinante foi designado vP1164.

A expressão destas glicoproteínas em células CRFK, CEF e/ou Vero infectadas com vP1164 foi avaliada com anti-soros policlonais de carneiro, não específicos, contra gBm gC e gD por análise de transferência western e/ou imunoprecipitação. Através destes ensaios, foram expressas em células infectadas com vCP243 as seguintes proteínas de FHV-1: polipéptidos gB de 100, 60 e 55 KDa; um polipéptido gC de 110 KDa; um polipéptido gD de 60 KDa.

Grupo 3 (ver Tabela 65): Gatos (n = 30) foram divididos em cinco grupos de dosagem (n=6/grupo). Gatos (n = 30) foram divididos em cinco grupos de dosagem (n=6/grupo). Três grupos receberam duas doses de vCP65 a $10^{4,0}$, $10^{5,0}$ ou $10^{6,0}$ TCID₅₀/dose. Um grupo (n=6) recebeu apenas uma injeção de CP65 a $10^{6,0}$ TCID₅₀/dose e um grupo (n=6) não foi vacinado e usado como controlo de contacto. Os gatos foram vacinados uma vez e depois receberam um reforço três semanas mais tarde. Colheram-se amostras de sangue de acordo com o esquema que se segue (Tabela 64):

TABELA 64

Dia	Actividade
0	Vacinação
20	Reforço/colheita de sangue
37	Colheita de sangue
50	Colheita de sangue

TABELA 65. RESUMO DOS GRUPOS DE VACINAÇÃO

Grupo	Gatos #	FeLVe	FeLV $\oplus$	Exposição prévia ao vector varíola dos canários	
				Sim #	Não #
1	10	10	0	10	0
2	18	7	11	0	18
3	30	29	1	20	10
Total	58	46	12	30	28

Os gatos foram ligeiramente sedados para a colheita de sangue usando cloreto de cetamina (100 mg/ml) ou cetamina em combinação com xilazina (5-10 mg/ml) administrada a 5-10 mg/Kg intramuscularmente. Administrou-se atropina (0,54 mg/ml) a 0,1-0,2 ml por gato, subcutaneamente, para baixar a salivação durante a anestesia. Os gatos foram observados relativamente a dor ou desconforto após injeção, observados diariamente e monitorizados cada duas semanas relativamente a sinais clínicos adversos.

As amostras de soro foram colhidas e avaliadas relativamente a anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva através do teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT). A partir das amostras, foram determinados os títulos e ajustados a um vírus de referência convencional. Os títulos foram descritos como

$\log_{10}$, antilog_{10} e unidades internacionais (UI). As Tabelas 67-71 descrevem dados como $\log_{10}$ e antilog_{10} .

Os gatos do Grupo 3 foram também vacinados com recombinantes contendo os genes do vírus herpes felino (FHV) vCP243 (n = 10) (Ver Tabelas 69 e 70). Os vírus foram administrados subcutaneamente duas vezes, usando aproximadamente $10^{7,0}$ TCID₅₀/dose, ao mesmo tempo mas num local diferente das injeções de CP65.

Vírus: Vírus recombinante varíola dos canários-raiva (vCP65), era de uma passagem X + 5 de vírus titulado para conter $10^{8,0}$ TCID₅₀/ml. Antes de usar, o vírus foi diluído em meio de cultura de tecidos F10-199.

Fibroblastos primários embrionários de galinha (CEF): Suspensões de células CEF adquiridas a Select Laboratories foram usadas para titular o vírus após administração.

As diluições virais foram tituladas, após administração, para os três grupos de gatos. Doze gatos no Grupo 2 receberam $10^{6,2}$ TCID₅₀/dose e seis gatos receberam $10^{5,8}$ TCID₅₀/dose em vez do pretendido $10^{6,0}$ e $10^{5,0}$ TCID₅₀/dose para a vacinação primária. Assim, para a vacinação de reforço, todos os gatos no Grupo 2 (n=18) receberam $10^{5,8}$ TCID₅₀/dose. Os títulos de cinco repetições/vacina são como se segue (Tabela 66).

TABELA 66

	Vax 1	Vax 2
Grupo 1 (n=5)	$10^{7,2}$	$10^{7,1}$
Grupo 1 (n=5)	$10^{6,1}$	$10^{6,1}$
Grupo 2 (n=12)	$10^{6,2}$	$10^{5,8}$
Grupo 2 (n=6)	$10^{5,8}$	$10^{5,8}$
Grupo 3 (n=6)	$10^{4,0}$	$10^{4,0}$
Grupo 3 (n=6)	$10^{4,7}$	$10^{4,7}$
Grupo 3 (n=6)	$10^{5,8}$	$10^{5,8}$
Grupo 3 (n=6)	$10^{5,8}$	Nenhum

Os títulos de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva de gatos individuais (Grupo 1, 2 e 3) estão apresentados nas Tabelas 67, 68 e 71, respectivamente.

Grupo 1: (Ver Tabela 67): Os gatos FeLve com exposição anterior ao vector varíola dos canários (n = 10) demonstraram uma forte resposta serológica contra vCP65. Após injeção de reforço, cinco de cinco gatos que receberam $10^{7,1}$ TCID₅₀/dose tinham títulos de anticorpos contra a raiva superiores a 3,0 log₁₀ (GMT = log₁₀ 3,68 ± 0,4; Antilog= 4786). Após o reforço, cinco de cinco gatos que receberam $10^{6,1}$ TCID₅₀/dose responderam, com três de cinco gatos tendo títulos de anticorpos superiores a 3,0 log₁₀ (GMT = log₁₀ 2,96 ± 0,8; Antilog= 912).

Grupo 2: (Ver Tabelas 68, 69 e 70): Os gatos FeLVe e FeLVe sem exposição anterior ao vector varíola dos canários (n = 18) demonstraram uma forte resposta serológica contra vCP65 (GMT) = $\log_{10} 2,10 \pm 0,5$; Antilog= 631).

Como se mostra na Tabela 69: Os gatos FeLVe deste grupo (n = 7) responderam à vacinação primária com bons títulos de anticorpos contra a raiva (GMT = $190 \pm 0,6$, Antilog = 79). Após o reforço, estes gatos apresentaram um bom aumento de anticorpos contra a raiva (GMT = $\log_{10} 2,96 \pm 0,4$; Antilog= 912).

Como se mostra Tabela 70, os gatos FeLVe deste grupo (n=11) também demonstraram uma boa resposta serológica a vCP65 após uma injeção (GMT = $2,24 \pm 0,4$, Média = 174). Após o reforço, a maioria dos gatos FeLVe apresentaram um aumento nos anticorpos contra a raiva (GMT = $\log_{10} 2,80 \pm 0,6$; Antilog= 630). Os gatos FeLVe #82 e #84 não responderam à vacinação de reforço anulando assim a GMT de gatos FeLVe após reforço. A análise dos gatos FeLV⊕ pós-reforço sem estes dois animais que não responderam é semelhante, senão ligeiramente melhor, do que para os gatos FeLVe do Grupo 2 (GMT = $\log_{10} 2,99 \pm 0,4$; Antilog = 977).

Não houve diferença significativa na resposta de anticorpos dos gatos do Grupo 2 que receberam $10^{6,2}$ TCID₅₀ versus $10^{5,8}$ TCID₅₀/dose para a vacinação primária. Assim,

estes dados foram considerados em conjunto (Ver GMT^a/Tabela 68; ver também a Tabela 69 e 70).

Grupo 3: (Ver Tabela 71): Os gatos neste grupo (n=30) demonstraram uma resposta serológica variável contra vCP65, dependendo do título do vírus administrado. Os gatos que receberam $10^{4,0}$ TCID₅₀/dose não responderam bem à vacinação primária ou de reforço (GMT = $0,83 \log_{10} \pm 0,5$; Antilog = 7), quer tenham sido ou não previamente vacinados com o vector varíola dos canários. Uma exceção, C5, respondeu bem à vacinação primária.

Os gatos que receberam $10^{4,7}$ TCID₅₀/dose também responderam de forma desigual à vacinação primária (GMT = $1,65 \log_{10} \pm 0,5$; Antilog = 45), mas os gatos responderam fortemente ao reforço (GMT = $2,48 \log_{10} \pm 0,5$; Antilog = 302).

Os gatos que receberam duas doses de $10^{5,8}$ TCID₅₀/dose demonstraram uma resposta ligeiramente superior à vacinação primária tal como o grupo de $10^{4,7}$ TCID₅₀/dose (GMT = $1,86 \log_{10} \pm 0,6$; Antilog = 72) e reforço (GMT = $2,74 \log_{10} \pm 0,4$; Antilog = 549).

Os gatos que receberam uma dose de CP65 ($10^{5,8}$ TCID₅₀/dose) responderam com títulos equivalentes aos do grupo de duas doses após vacinação primária (GMT = $1,92 \log_{10} \pm 0,4$; Antilog = 83).

Grupo 3: Os gatos controlo (n = 6) que não foram vacinados, mas que foram alojados em contacto com os vacinados, mantiveram-se serologicamente negativos relativamente aos anticorpos contra a raiva após vacinação.

Segurança: Cinquenta e sete dos cinquenta e oito gatos mantiveram-se clinicamente saudáveis ao longo da experiência. O vírus vCP65 foi administrado sem dor. Não houve inchaço ou inflamação após vacinação ou sinais de doença sistémica.

O gato K2 (Grupo 3) era FeLV $\oplus$ antes da vacinação. Este gato foi morto 37 dias após vacinação primária devido à perda de peso, anorexia e infecções bacterianas secundárias. A necrópsia foi realizada e observou-se lesão em ambos os membros traseiros e superfícies superiores da boca. Não se observou anormalidades internas. As amostras do tecido do lábio foram congeladas e guardadas. Teoriza-se que este gato apresentou sinais relacionados com infecção por FeLV; no entanto, foi o único gato FeLV $\oplus$ no modelo de infecção NVLS a apresentar sinais clínicos pós-infecção. Os gatos de controlo do contacto no Grupo 3 mantiveram-se clinicamente saudáveis ao longo do ensaio.

O vírus (vCP65) demonstrou excelente segurança em gatos infectados com FeLV. É interessante que nove dos onze gatos FeLV $\oplus$ responderam tão bem à vacinação com reforço

quanto os gatos FeLVe. Este resultado é surpreendente pelo facto da função imune suprimida ser por vezes uma sequela da infecção por FeVL. No entanto, como descrito na literatura, os gatos SPF alojados em condições "limpas" não estão sujeitas a infecções ambientais e assim podem não estar tão imunocomprometidos quantos os gatos da rua.

Partindo desta descrição, sem experimentação suplementar, os familiarizados com a área podem determinar a dose protectora mínima deste vírus (vCP65) em gatos, especialmente seguindo o regime da combinação canina atrás descrito. O produto de dose simples de vCP65 ou o produto monovalente de vCP65, caso se pretenda, pode ser preparado a partir desta descrição, sem experimentação suplementar.

O Exemplo também demonstra uma ausência de supressão da resposta imune à administração prévia do vector variola dos canários. A administração prévia de um vírus FeLV-variola dos canários não afectou negativamente a resposta imune dos gatos ao vírus da variola dos canários-raiva. A exposição prévia pode, de facto, estimular subsequente vacinação com o mesmo vector (*i.e.*, os gatos do grupo 1 que receberam $10^{6,0}$ TCID₅₀ responderam com uma GMT maior do que os gatos do grupo 2 que receberam a mesma dose de vírus). Assim, múltiplas vacinações de vírus recombinantes, tais como vCP65, ao longo do tempo, são igualmente possíveis, demonstrando assim a aplicabilidade dos vectores

TABELA 67. TÍTULOS NEUTRALIZANTES DO SORO (TÍTULOS RFFIT)
DOS GATOS DO GRUPO 1

Gato#	FeLV(+/-)	FeLV Vax (s/n)	Título da vacina vCP65		Títulos RFFIT ($\log_{10}$)		
			Vax 1	Vax 2	Dia 22-26*	Dia 36**	Dia 49***
1963	-	S			2,90	3,70	3,25
1965	-	S			3,34	4,16	4,88
1993	-	S	$10^{7,2}$	$10^{7,1}$	0,65	3,11	3,16
1997	-	S			2,46	3,34	3,29
1953	-	S			2,42	4,07	3,90
GMT					2,35±0,9	3,68±0,4	3,70±0,6
2050	-	S	$10^{6,1}$	$10^{6,1}$	2,76	3,16	3,25
2078	-	S			2,99	4,03	3,56
2048	-	S			X	3,03	3,16
1971	-	S			2,50	3,12	2,94
1999	-	S			X	1,49	2,11
GMT					2,75±0,2	2,96±0,8	3,00±0,5

* Três semanas pós-primeira vacinação

** Duas semanas pós-primeira vacinação

*** Quatro semanas pós-segunda vacinação

a Este Título é um título médio de duas leituras (3,56 e 3,81)

X Sem amostra

DOS GATOS DO GRUPO 2

Gato#	FeLV (+/-)	FeLV Vax (s/n)	Título da vacina vCP65		Títulos RFFIT (Log ₁₀)		
			Vax 1	Vax 2	Dia 22-26*	Dia 36**	Dia 49***
B1	-	N	10 ^{6,2}	10 ^{5,8}	2,68	3,69	
T2	-	N			1,25	3,38	
T1	+	N			2,42	1,63	
A2	+	N			1,63	3,34	
X2	+	N			2,64	3,03	
U3	+	N			1,85	2,94	
37	-	N			2,29	2,64	
39	-	N			1,23	2,64	
35	+	N			2,02	2,20	
23	+	N			2,72	3,47	
13	+	N			2,72	3,07	
15	+	N			2,07	2,9	
GMT					2,12±0,5	2,88±0,4	
88	-	N	10 ^{5,8}	10 ^{5,8}	1,67	2,64	
67	-	N			1,94	2,99	
86	-	N			2,37	2,72	
84	+	N			2,55	2,37	
85	+	N			2,20	3,29	
82	+	N			1,63	1,63	
GMT					2,16±0,3	2,61±0,5	
GMT ^a					2,10±0,5	2,80±0,5	

* Três semanas pós-primeira vacinação

** Duas semanas pós-primeira vacinação

*** Quatro semanas pós-segunda vacinação

^a Este título é um título médio de duas leituras (3,56 e 3,81)

X Sem amostra

Tabelas 69 e 70: Títulos neutralizantes do soro (títulos RFFIT) de gatos FeLV $\oplus$ versus FeLV $\ominus$.

TABELA 69: GATOS FELVE DO GRUPO 2

Gato #	RFFIT	
	Dia 22	Dia 36
B1	2,68	3,69
T2	1,15	3,38
37	2,29	2,64
39	1,23	2,64
88	1,67	2,64
67	1,94	2,99
86	2,37	2,72
GMT	1,90 $\pm$ 0,5	296 $\pm$ 0,4

TABELA 70: GATOS FELVE DO GRUPO 2

Gato #	RFFIT	
	Dia 22	Dia 36
T1	2,42	3,38
A1	1,63	3,34
X2	2,64	3,03
U3	1,85	2,94
35	2,02	2,20
23	2,72	3,47
13	2,72	3,07
15	2,07	2,59
84	2,55	2,37
85	2,20	3,29
82	1,63	1,63
K2	1,83	X
Total	2,24 $\pm$ 0,4	2,80 $\pm$ 0,6

TABELA 71. TÍTULOS NEUTRALIZANTES DO SORO (TÍTULOS RFFIT)
DOS GATOS DO GRUPO 3

Gato#	FeLV (+/-)	FeLV Vax (s/n)	Título da vacina vCP65		Títulos RFFIT (Log ₁₀)		
			Vax 1	Vax 2	Dia 22-26*	Dia 36**	Dia 49***
Y1 ^a	-	N	10 ^{4,0}	10 ^{4,0}	0,58	0,63	0,37
U1 ^c	-	N			0,41	0,48	0,48
M1 ^b	-	S			0,39	1,06	0,53
X1 ^b	-	S			0,37	0,56	0,67
R5 ^a	-	S			0,35	0,37	0,35
C5 ^a	-	S			1,85	1,89	2,20
GMT					0,65±0,5	0,83±0,5	0,77±0,6
R4 ^c	-	N	10 ^{4,7}	10 ^{4,7}	1,46	3,12	3,08
E3 ^c	-	N			1,11	2,20	2,59
F2 ^p	-	S			1,98	2,72	2,86
I2 ^b	-	S			1,76	2,37	2,59
K3 ^a	-	S			2,72	2,81	2,77
R2 ^a	-	S			0,89	1,67	1,81
GMT					1,65±0,6	2,48±0,5	2,62±0,4
C6 ^c	-	N	10 ^{5,6}	10 ^{5,6}	2,33	>3,25	>3,12
B1 ^a	-	N			1,37	>3,25	>3,25
J1 ^b	-	S			2,11	2,51	2,55
A1 ^c	-	S			1,32	2,11	2,03
C4 ^a	-	S			2,77	2,90	2,94
Q1 ^b	-	S			1,28	2,42	2,59
GMT					1,86±0,6	2,74±0,4	2,75±0,4
K2 ^a	+	N	10 ^{5,6}	nenhum	1,85	X	X
U2 ^a	-	N			1,37	1,37	1,54
Y3 ^c	-	S			2,51	2,16	2,64
Q2 ^c	-	S			2,29	2,29	2,38
D4 ^b		S			1,67	2,33	2,59
M2 ^b	-	S			1,85	1,85	2,20

(continuação)

Gato#	FeLV (+/-)	FeLV Vax (s/n)	Título da vacina vCP65		Títulos RFFIT (Log ₁₀)		
			Vax 1	Vax 2	Dia 22-26*	Dia 36**	Dia 49***
GMT					1,92±0,4	2,00±0,4	2,27±0,4
Q5 ^a	-	N	Controlo	Controlo	0,35	0,52	0,35
E4 ^a	-	N			0,58	0,60	0,35
I3 ^c	-	S			0,35	0,35	0,35
Q3 ^c	-	S			0,35	0,39	0,35
Q4 ^b	-	S			0,37	0,35	0,35
R1 ^b	-	S			0,35	0,35	0,35
GMT					0,39±0,1	0,43±0,1	0,35±0,0
* Três semanas pós-primeira vacinação ** Duas semanas pós-segunda vacinação *** Quatro semanas pós-segunda vacinação ^a Vacinado com CP243 - recombinante herpes felino/vector ALVAC ^b Vacinado com VP164 - recombinante herpes felino/vector NYVAC ^c Controlo							

EXEMPLO 19 - PROTECÇÃO DE CÃES COM ALVAC-CDVHF (VCP258)
CONTRA A INFECÇÃO POR CDV

vCP2S8 está discutido em USSN 08/416616, entregue em 5 de Abril, 1995. A eficácia protectora do vírus recombinante com HA e F de CDV, baseado em ALVAC, foi avaliada por exposição de cães à infecção com CDV vivo após vacinação. Nesta experiência, treze cães Beagle, seronegativos para CDV, foram divididos em dois grupos de vacinados (3 cães para a dose de vacina de 10⁷ ufp de vCP258 e 4 cães para a dose de vacina de 10^{5,5} ufp) e num grupo controlo não vacinado (6 cães). A vacinação consistiu

em duas inoculações subcutâneas com 10^7 TCID₅₀/dose (grupo 1) ou $10^{5,5}$ TCID₅₀/dose (grupo 2) de vCP258 com três semanas de intervalo. No dia 42, todos os cães foram infectados por administração intracraniana de 1:10 do stock de NVSL CDV para infecção. Os cães foram observados diariamente, durante 28 dias após infecção, para controlar a morbilidade/mortalidade.

Não foram observadas reacções adversas locais ou sistémicas em cães vacinados com vCP258. Todos os cães controlos não vacinados desenvolveram sinais clínicos de infecção por CDV incluindo anorexia, conjuntivite, depressão, perda de peso e desidratação entre 6 e 17 dias pós-infecção. Quatro picos febris ($>103,5^{\circ}\text{F}$) foram observados nos dias 1, 3, 8 e 13 dias pós-infecção. Quatro dos 6 animais controlos tiveram manifestações clínicas mais graves. De facto, um destes cães morreu 12 dias após a infecção, enquanto os outros três foram mortos entre 13 e 17 dias pós infecção. Os dois animais controlos sobreviventes, que tinham sintomatologia mais suave, começaram a recuperar e, de facto, começaram a aumentar de peso 19 dias após infecção.

Significativamente, nenhum cão em qualquer um dos grupos de dose da vacina desenvolveu sinais clínicos de infecção por CDV. Todos aumentaram de peso e apresentaram comportamento normal durante o período de observação. Ainda, não foram observados quaisquer períodos febris.

A Tabela 72 apresenta as respostas serológicas específicas de CDV em cada grupo em vários tempos antes da infecção. Os títulos de anticorpos estão expressos como a diluição que confere 50% de neutralização e representam o título médio para cada grupo. É interessante que, apesar da dose de vacina de $10^{5,5}$ TCID₅₀ não induzir níveis equivalentes de actividade neutralizante do soro contra CDV, todos os cães vacinados com esta dose mais baixa ficaram totalmente protegidos contra a infecção com CDV virulento.

TABELA 72. RESPOSTAS SEROLÓGICAS ESPECÍFICAS DE CDV

Grupo vacinal	Dia 0	Dia 14	Dia 21	Dia 42
$10^{5,5}$	<1:3	1:16	1:21	1:50
$10^{7,0}$	<1:3	1:19	1:19	1:151
Controlo	<1:3	ND	ND	<1:3
ND = não determinado				

EXEMPLO 20 - EFICÁCIA EM CÃES DE ALVAC-CDV (VCP258) E ALVAC-RAIVA (VCP65) QUANDO USADAS NUMA FORMA DE COMBINAÇÃO COM OUTROS PATOGÉNIOS CANINOS

Para determinar se ALVAC-CDV (vCP258) confere eficácia protectora quando usado numa combinação de vacina com outros agentes patogénicos caninos foi realizado o

estudo que se segue. ALVAC-CDV (vCP258) foi diluído para doses de $10^{4,6}$, $10^{4,8}$ e $10^{5,5}$ TCID₅₀ por ml e misturado com doses de vacina de Adenovírus canino tipo 2 (CAV₂), Coronavírus canino (CCV), Parainfluenza canina (CPi), Parvovírus canino (CPV_{x1}), Bacterina de *Leptospira canicola-icterohaemorrhagiae* (LCI) e ALVAC-raiva (vCP65). Vinte e quatro cães seronegativos e dois cães seropositivos foram inoculados, como se mostra na Tabela 73, com ALVAC-CDV sozinho ou na combinação canina. Os cães receberam duas inoculações nos dias 0 e 21 pela via subcutânea. Colheu-se sangue para determinação dos títulos neutralizantes do soro contra CDV nos dias 0, 21 e antes da infecção. Os cães foram infectados em dois grupos, aos 24 ou aos 50 dias após a segunda inoculação pela via intracraniana, sendo o vírus CDV da infecção fornecido pela USDA. Após infecção, os cães foram observados até 5 meses para monitorizar os sinais de infecção por CDV. Os resultados de serologia e infecção estão apresentados na Tabela 74.

Os resultados indicam que os cães inoculados com $4,8 \log_{10}$ TCID₅₀ (vCP258) sozinho induziu um título médio de anticorpos neutralizantes específicos de 1,2, enquanto que doses de $5,5 \log_{10}$ e $4,8 \log_{10}$ na vacina de combinação canina induziram títulos médios de 1,0 e 0,7, respectivamente. Todos os cães nestes grupos de vacinação sobreviveram à infecção. Um cão no grupo que recebeu a combinação mais $5,5 \log_{10}$ TCID₅₀ não teve sintomas específicos após infecção, enquanto que um cão no grupo que

recebeu a combinação mais $4,8 \log_{10}$ TCID₅₀ desenvolveu sintomas específicos de infecção por CDV. As titulações de vírus, os títulos de anticorpos contra a raiva/morbilidade/mortalidade e perda/ganho de peso estão apresentados nas Tabelas 75 a 80.

Neste estudo, a resposta serológica à vacinação com a vacina de coronavírus canino e com a vacina ALVAC-raiva foi também monitorizada. Significativamente, a inclusão de ALVAC-CDV na vacina de combinação não interferiu com a resposta serológica aos outros componentes, especialmente aos componentes de coronavírus canino e raiva. E, o componente do vírus da raiva, vCP65 não interferiu com outros antígenos.

TABELA 73. ESQUEMA DE VACINAÇÃO DE CÃES INOCULADOS COM ALVAC-CDV (VCP258) SOZINHO OU EM COMBINAÇÃO COM OUTRAS VACINAS CANINA

Grupo de vacinação	Cães #	Infecção no dia 44	Infecção no dia 70
vCP258/dose $10^{4,8}$	6	5	1
Combinação + vCP258/ dose $10^{5,5}$	5	5	-
Apenas combinação	5	3	2
Combinação + vCP258/ dose $10^{4,8}$	4	1	3
Combinação + vCP258/ dose $10^{4,6}$	4	-	4
Cães seropositivos para CDV	2	-	2
Total	26	14	12

TABELA 74. RESULTADOS DE SEROLOGIA E INFECÇÃO DE CÃES INOCULADOS COM ALVAC-CDV (VCP258) SOZINHA OU EM COMBINAÇÃO COM OUTRAS VACINAS CANINAS

Grupo de vacinação	Cães #	Título neutralizante de CDV (título expresso como média)				Morbilidade	Mortalidade
		Dia 0	Dia 21	Dia 44 ^a	Dia 70 ^b		
Combinação + vCP258/ dose 10 ^{5,5}	5	≤0,3	1,0	1,0	-	1/5 ^c	0/5
Combinação + vCP258/ dose 10 ^{4,8}	4	≤0,3	0,8	0,7	-	1/4 ^d	0/4
Combinação + vCP258/ dose 10 ^{4,6}	4	≤0,3	≤0,3	0,6	0,5	4/4	4/4
vCP258/ dose 10 ^{4,8}	6	≤0,3	0,9	1,2	1,3	1/6	0/6
Apenas combinação	5	≤0,3	≤0,3	≤0,3	-	5/5	3/5
Cães seropositivos para CDV	2	Não feito	Não feito	Não feito	2,1	0/2	0/2

a: Infecção nos dias 44 e 24 após a segunda inoculação

b: Infecção nos dias 70 e 50 após a segunda inoculação

c: Um cão teve sintomas inespecíficos de anorexia e depressão

d: Um cão apresentou sinais específicos de CDV (sintomas entéricos/respiratórios/nervosos)

TABELA 75. TITULAÇÕES DO VÍRUS DAS VACINAS (TÍTULO MÉDIO GEOMÉTRICO DE CINCO REPETIÇÕES DO TESTE)

Componente	ACPiP _{XL} CP65/LCI (TCID ₅₀)	"10 ^{4,5} " TCID ₅₀)	"10 ^{5,0} " TCID ₅₀)	"10 ^{5,5} " TCID ₅₀)
CP258-CDV		10 ^{4,6}	10 ^{4,8}	10 ^{5,5}
CAV ₂	10 ^{6,0}			
CCV	10 ^{4,6}			
CPi	10 ^{5,5}			
CPV _{XL}	10 ^{4,6}			
CP65-raiva	10 ^{5,8}			

(continuação)

Componente	ACPiP _{XL} CP65/LCI (TCID ₅₀)	"10 ^{4,5} " TCID ₅₀)	"10 ^{5,0} " TCID ₅₀)	"10 ^{5,5} " TCID ₅₀)
Nota: Para fins de clarificação, são usadas as seguintes abreviaturas: Antigénio Esgana canina, Vector vivo da varíola dos canários (cCP258) Adenovírus canino tipo 2 (CAV ₂) Coronavírus canino (CCV) Parainfluenza canina (CPi) Parvovírus canino (CPV _{XL}) Raiva canina, Vector vivo de varíola dos canários (vCP65) Bacterina de Leptospira canicola-icterohaemorrhagiae (LCI)				

TABELA 76. TÍTULOS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES (LOG₁₀)
CONTRA O VÍRUS DA ESGANA CANINA

Grupo	Cão #	Dia 0 1 ^a vacinação	Dia 21 2 ^a vacinação	Dia 44 Infecção		Resultados da infecção
Combo 10 ^{5,5}	+ 00	≤0,3	0,9	0,8		P
	31	≤0,3	0,9	0,8		P
	37	≤0,3	0,8	1,0		S(U)
	38	≤0,3	1,2	1,1		P
	39	≤0,3	1,1	1,1		P
	GMT	≤0,3	1,0	1,0		
	STD	0,0	0,2	0,2		
Combo 10 ^{4,8}	+ 40	≤0,3	0,7	0,5		P
	42	≤0,3	0,6	0,9		P
	49	≤0,3	0,8	0,5		Sinais
	70	≤0,3	1,0	1,0		P
	GMT	≤0,3	0,8	0,7		
	STD	0,0	0,2	0,3		
Grupo	Cão #	Dia 0 1 ^a vacinação	Dia 21 2 ^a vacinação	Dia 44 (Dia 24 pós-2 ^a vacinação)	Dia 70 Infecção	Resultados da infecção
Combo 10 ^{4,6}	+ 29	≤0,3	≤0,3	0,6	0,6	D
	43	≤0,3	≤0,3	0,3	0,3	D
	8	≤0,3	≤0,3	0,6	0,6	D
	57	≤0,3	≤0,3	0,8	0,8	D

(continuação)

Grupo	Cão #	Dia 0 1ª vacinação	Dia 21 2ª vacinação	Dia 44 Infecção		Resultados da infecção
GMT		≤0,3	≤0,3	0,6	0,5	
STD		0,0	0,0	0,2	0,3	
Grupo	Cão #	Dia 0 1ª vacinação	Dia 21 2ª vacinação	Dia 44 (Dia 24 pós-2ª vacinação	Dia 70 Infecção	Resultados da infecção
Combo 10 ^{4,8}	+ 35	≤0,3	0,9	1,6	1,6	S(U)
	69	≤0,3	0,6	0,9	0,8	P
	71	≤0,3	0,5	0,5	1,3	P
	96	≤0,3	1,7	2,4	1,9	P
	97	≤0,3	0,9	1,5	1,5	P
	98	≤0,3	0,5	0,6	0,8	P
GMT		≤0,3	0,9	1,2	1,3	
STD		0,0	0,5	0,7	0,4	
Grupo	Cão #	Dia 0	Dia 21	Dia 44	Dia 70	Resultados da infecção
Controlos eCDV (Apenas Combo)	64 ^A	≤0,3	≤0,3	≤0,3	D	D
	94 ^A	≤0,3	≤0,3	≤0,3	D	D
	95 ^A	≤0,3	≤0,3	≤0,3	D	D
	66 ^B	≤0,3	≤0,3	≤0,3	≤0,3	Sinais
	74 ^B	≤0,3	≤0,3	0,5	0,8	Sinais
GMT		≤0,3	≤0,3	≤0,3	N/A	
STD		0,0	0,0	0,1	N/A	
⊕CDV	2010	N/A	N/A	N/A	≥2,1	P
Controlos	1976	N/A	N/A	N/A	≥2,1	P
GMT		N/A	N/A	N/A	≥2,1	
STD		N/A	N/A	N/A	0,0	

A = Infecção no Dia 44 (24 dias após a segunda vacinação)
B = Infecção no Dia 70 (50 dias após a segunda vacinação)
D = Morte
P = Protegido (sem morbilidade/mortalidade)
S(U) = Sinais inespecíficos (anorexia, depressão)
Sinais = Sinais CDV; entéricos e/ou respiratórios e/ou nervosos

TABELA 77. TÍTULOS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES (LOG_{10})
CONTRA CORONAVÍRUS CANINO

Grupo	Cão #	Dia 0 vacinação	Dia 21 vacinação	Dia 44 Infecção	
Combo + $10^{5,5}$	00	$\leq 0,3$	0,9	2,1	
	31	$\leq 0,3$	0,8	1,6	
	37	$\leq 0,3$	0,9	1,9	
	38	$\leq 0,3$	0,6	2,1	
	39	$\leq 0,3$	0,6	2,1	
<i>GMT</i>		$\leq 0,3$	0,8	2,0	
<i>DP</i>		0,0	0,2	0,2	
Combo + $10^{4,8}$	40	$\leq 0,3$	1,1	1,9	
	42	$\leq 0,3$	0,6	2,1	
	49	$\leq 0,3$	1,0	2,1	
	70	$\leq 0,3$	1,5	1,2	
<i>GMT</i>		$\leq 0,3$	1,0	1,9	
<i>DP</i>		0,0	0,4	0,4	
Combo + $10^{4,6}$	29	$\leq 0,3$	1,2	1,9	
	43	$\leq 0,3$	0,8	1,8	
	8	$\leq 0,3$	0,6	2,1	
	57	$\leq 0,3$	0,6	2,1	
<i>GMT</i>		$\leq 0,3$	0,8	2,0	
<i>STD</i>		0,0	0,2	0,2	
Grupo	Cão #	Dia 0	Dia 21	Dia 70	
Combo + $10^{4,8}$	35	$\leq 0,3$	0,6	0,6	
	69	$\leq 0,3$	0,6	$\leq 0,3$	
	71	$\leq 0,3$	0,6	$\leq 0,3$	
	96	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$	
	97	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$	
	98	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$	$\leq 0,3$	
<i>GMT</i>		$\leq 0,3$	0,5	0,4	
<i>DP</i>		0,0	0,2	0,1	
Grupo	Cão #	Dia 0	Dia 21	Dia 44	Dia 70
Controlos eCDV (Apenas Combo)	64	$\leq 0,3$	1,4	2,0	2,0
	94	$\leq 0,3$	0,4	2,1	2,1
	95	$\leq 0,3$	0,8	2,1	2,1
	66	$\leq 0,3$	0,9	1,5	2,1
	74	$\leq 0,3$	1,2	1,7	2,1
<i>GMT</i>		$\leq 0,3$	0,9	1,8	2,1
<i>DP</i>		0,0	0,3	0,3	0,1

TABELA 78. TÍTULOS DE ANTICORPOS RFFIT (LOG₁₀) CONTRA A
RAIVA

Grupo	Cão #	Dia 0 1 ^a vacinação	Dia 21 2 ^a vacinação	Dia 44 Infecção	
Combo + 10 ^{5,5}	00	≤1,0	2,2	2,8	
	31	≤1,0	2,1	3,1	
	37	≤1,0	1,8	2,8	
	38	≤1,0	1,9	3,0	
	39	≤1,0	2,0	3,0	
	GMT		≤1,0	2,0	2,9
	DP		0,0	0,3	0,1
Combo + 10 ^{4,8}	40	≤1,0	2,3	2,6	
	42	≤1,0	2,3	2,4	
	49	≤1,0	2,1	2,7	
	70	≤1,0	2,2	2,8	
	GMT		≤1,0	2,3	2,6
	DP		0,0	0,1	0,2
Combo + 10 ^{4,6}	29	≤1,0	2,2	2,9	
	43	≤1,0	2,5	2,8	
	8	≤1,0	2,6	2,8	
	57	≤1,0	1,5	2,4	
	GMT		≤1,0	2,2	2,7
	DP		0,0	0,4	0,2
Grupo	Cão #	Dia 0	Dia 21	Dia 44	Dia 70 Infecção
Combo + 10 ^{4,8}	35	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0
	69	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0
	71	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0
	96	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0
	97	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0
	98	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0
GMT		≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0
DP		0,0	0,0	0,0	0,0

(continuação)

Grupo	Cão #	Dia 0 1 ^a vacinação	Dia 21 2 ^a vacinação	Dia 44 Infecção	
Controlos eCDV (Apenas Combo)	64 ^A	≤1,0	1,3	1,5	D
	94 ^A	≤1,0	3,1	2,1	D
	95 ^A	≤1,0	3,2	2,4	D
	66 ^B	≤1,0	ND	1,9	2,3
	74 ^B	≤1,0	ND	2,1	2,6
GMT		≤1,0	2,2	2,0	2,5
DP		0,0	0,9	0,3	0,2
A = Infecção no Dia 44 (24 dias após a segunda vacinação) B = Infecção no Dia 70 (50 dias após a segunda vacinação) Nd = Não efectuado D = Morte					

TABELA 79. MORBILIDADE/MORTALIDADE NO DIA 28 PÓS-INFECÇÃO
COM VÍRUS DA ESGANA CANINA

Grupo	# Cães infectados	Morbilidade	Mortalidade	# Cães que sobreviveram	GMT de anticorpos contra CDV na infecção
CP258 10 ^{4,8}	6	1/6 ^I	0/6	6/6	1,30
Combo + CP258 10 ^{5,5}	5	1/5 ^I	0/5	5/5	0,98
Combo + CP258 10 ^{4,8}	4	1/4 ^{II}	0/4	4/4	0,74
Combo + CP258 10 ^{4,6}	4	4/4 ^{II,III}	4/4	0/4	0,47
⊕Controlos	2	0/2	0/2	2/2	>2,7
Controlos (Combo apenas)	5	3/3 ^{II,III} 2/2 ^{II}	3/5	2/5*	<0,4
I = Anorexia/depressão/febre três a quatro dias após infecção = "sinais inespecíficos" II = Anorexia/perda de peso/diarreia com sangue/febre = sinais entéricos de CDV III = Perda de peso/febre/espasmo/mioclonina/ataques epilépticos/parese/tenesmo = sinais nervosos de CDV * = Os sobreviventes apresentaram sinais entéricos					

TABELA 80. PERDA/GANHO DE PESO APÓS INFECÇÃO EXPRESSO EM
LIBRAS/PESO DE CORPO

Grupo	Cão N°	Peso do corpo individual/lbs (Dias pós infecção)				Média de ganho/perda no fim da observção
		0	7	14	21	
⊕Controlo	2010	25	26	29	29	+6,5lbs
	1976*	24	33	33	33	+6,5 lbs
⊖Controlo	66	35	32	30	30	-4,5 lbs
	74*	25	20	20	21	-4,5 lbs
Combo + CP158 10 ^{4,6}	29	12	D	D	D	-2,5 LBS
	43*	15	12	D	D	
	48	22	20	D	D	
	57	20	18	D	D	
Combo + CP158 10 ^{4,8}	40	22	20	26	26	+4,5 LS
	42	17	22	20	22	
	71	20	23	21	20	
	49**	25	23	17	20	

D = Cães que não sobreviveram à infecção.

* = Cães infectados pela via oronasal

** = Deste grupo, o cão #49 foi o único cão que não apresentou sinais entéricos de CDV e teve uma perda de peso de 5 lbs.

EXEMPLO 21 - VACINA CANINA DE COMBINAÇÃO DA RAIVA COM O
RECOMBINANTE VCP65: AUSÊNCIA DE INTERFERÊNCIA DE VCP65, CDV
ROCKBORN E CPV_{XL}, NA VACINA DACPiPCP65 + LCI

Este exemplo demonstra que CPV(P_{XL}) e CDV (Rockborn) podem ser usados indiscriminadamente com as estirpes CPV e CDV (Onderstepoort) respectivamente, sem causar qualquer interferência com outros componentes da vacina de combinação: DACPiPCP65 + LCI, que a adição de CP65 à vacina combo canina (DACPiP) não interfere com a

imunogenicidade dos outros componentes e que a vacina de combinação (DACPiPCP65) é segura em cães para se obter uma licença para a vacina de combinação + LCI e os seus produtos derivados.

Procedimento geral: Foram preparados sete lotes de vacinas com vários componentes antigénicos. Trinta e oito (38) cães foram divididos em diferentes grupos baseados na vacina que receberam e na resposta imune medida por serologia. A eficácia do coronavírus canino foi medida por vacinação/infecção. Os títulos de anticorpos neutralizantes (SN) foram usados para demonstrar se a interferência é ou não causada pela adição de diferentes antigénios vacinais. Todas as vacinas foram reconstituídas com LCI, autorizada pela USDA e testada satisfatoriamente (32010), e injectadas em cães.

ABREVIATURAS

Componente	Abreviatura
Vírus da esgana canina, Rockborn (CDV _R)	D _R
Vírus da esgana canina, Onderstepoort (CDV _O)	D _O
Adenovírus canino tipo 2 (CAV ₂)	A
Coronavírus canino, MLV (CCV _L)	C
Parainfluenza canina Tipo 2 (CPi)	Pi
Parvovírus canino, (CPV)	P
Parvovírus canino, (CPV _{XL})	P _{XL}
Variola dos canários recombinante (CP65)	CP65
Bacterina de <i>Leptospira</i> (<i>L. canicola</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i>)	LCI

MATERIAIS:

Animais. Fonte, idade: Dezassete (17) cães de várias idades foram adquiridos a Harlan Sprague Dawley (HSD). Cinco cães, 12-16 semanas de idade, adquiridos a James A. Baker Institute of Animal Health, Cornell University. Dezasseis cães, 8-10 semanas de idade, adquiridos a Liberty. Estes animais eram seronegativos para todos os componentes da vacina envolvidos nos seus respectivos estudos.

Vacinas:

Todas as vacinas foram preparadas com diferentes produções de antígeno saídas do mesmo lote de vírus de partida.

Foram preparados quatro lotes de vacinas:

- D_RAPiP (lote A)
- D_RAPiP_{XL} (lote B)
- D_OAPiPCP65 (lote C)
- D_RAPiP_{XL}CP65 (lote D)

As vacinas atrás referidas foram formuladas com os seguintes componentes:

Componente	Título/ml (Log_{10})
D _R	5,2
D _O	5,4
A	7,4
C	6,6
Pi	7,5
P	7,0
P _{XL}	5,3
CP65	7,9

Foram produzidas mais duas vacinas:

-- D_RAPiP_{XL}CP65

-- D_OAPiPCP65

Vacina D_RAPiP_{XL}CP65

Componente	Título/ml
D _R	5,2
A	7,4
C	6,6
Pi	6,9
P _{XL}	5,3
CP65	8,0

Vacina: D₀APiPCP65

Componente	Título/ml
D ₀	5,4
A	7,4
C	3,1
Pi	6,9
P	7,0
CP65	8,0

Uma vacina que não incluiu a fracção CDV foi igualmente preparada:

Vacina: ACPiP_{XL}CP65

Componente	Título/ml
A	7,4
C	6,2
Pi	6,8
P _{XL}	5,4
CP65	8,0

Titulação: Cada uma das fracções dos diferentes lotes de vacinas foi titulada no dia da primeira vacinação ou em ambos os dias da vacinação. A titulação foi realizada para três a cinco repetições.

Métodos: Vacinação: Todas as vacinas (1 dose = 1 ml) foram administradas duas vezes pela via subcutânea com intervalos de 21 dias. Uma produção (Nº 32010) de LCI foi usada como diluente para cada vacina.

Colheita de sangue: Colheu-se sangue dos cães aos 0, 21 e 35-42 dias pós-vacinação.

Avaliação dos resultados: Títulos de seroneutralização: Amostras de soro derivadas de cada cão e de cada data de colheita foram testadas relativamente à presença de títulos de anticorpos neutralizantes do vírus. A seroconversão interpretada pelo título de anticorpos foi usada como um parâmetro para medir a interferência. Diferentes grupos de cães foram usados por componente de vacina estudado devido a alguns grupos terem já sido expostos a determinados vírus e terem títulos de anticorpos elevados mesmo antes da vacinação: por exemplo, os cães HSD que receberam os primeiros quatro lotes de vacina (A-D) foram confirmados como tendo tido um surto de parvovírus canino nas suas colónias antes de terem sido comprados.

Vacinação/Infecção (CCV): Doze (12) cães vacinados com uma combinação de CP65 e CCV_L foram infectados com CCV virulento no Dia 35 pós-vacinação e mortos no Dia 41. Os resultados do re-isolamento do vírus nas fezes foram

usados para demonstrar não interferência de vCP65 na protecção conferida pela vacina CCV.

Avaliação da segurança: Após cada administração da vacina, cada um dos cães foi apalpado no local da inoculação e observado, durante pelo menos duas horas pós-vacinação, relativamente a qualquer reacção clínica adversa, local ou sistémica. A observação continuou ao longo do período do estudo.

Resultados: Os títulos de anticorpos (SN) induzidos por CP65 preparada em combinação com CDV (Rockborn ou Onderstepoort) e CPV (Old MSV ou P_{XL}) MSV são equivalentes. CP65 adicionado aos outros componentes (D, A, C, Pi, P) não interferiu com a resposta imune de qualquer um deles. O CCV (MLV) na vacina de combinação protegeu cães da infecção na presença de todos os outros componentes, incluindo CP65, independentemente dos MSVs de CDV ou CPV usados. Ao longo da experiência, não foram observados sinais clínicos, sistémicos ou locais nos cães.

Título dos componentes antigénicos presentes nas vacinas: O título de cada antigénio nos diferentes lotes de vacina testados na primeira vacinação e/ou segunda vacinação está nas Tabelas 81a, b e c abaixo:

TABELA 81A. TÍTULOS (LOG_{10}) DOS COMPONENTES VIRAIS:
TITULAÇÃO REALIZADA NOS DIAS DE VACINAÇÃO (V_1 E V_2^*)

Lote	Vacinas	Título/ml (Log_{10})							
		D _O	D _R	A	C	Pi	P	P _{XL}	CP65
A	D _R APiP	--	3,3-3,6*	5	--	5,8	6,0	--	--
B	D _R ACPiP _{XL}	--	3,5-3,6*	5,1	4,5	5,6	--	5,0	--
C	D _R ACPiPCP65	4,6.4,1*	--	5,1	4,5	5,5	6,0	--	6,0
D	D _R APiP _{XL} CP65	--	3,3-3,6*	53	4,4	5,4	--	3,8	5,8

TABELA 81B. TÍTULO (LOG_{10}) DOS COMPONENTES VIRAIS TESTADOS
NO DIA DA VACINAÇÃO

Vacinas	Título/ml (Log_{10})							
	D _O	D _R	A	C	Pi	P	P _{XL}	CP65
D _R APiP _{XL} CP65	--	4,5	5,9	3,1	3,7	--	4,7	6,4
D _O ACPiPCP65	4,5	--	5,2	3,1	4,3	7,0	--	6,4
ACPiP _{XL} CP65	--	--	6,0	4,6	5,5	--	4,6	6,1

Os resultados mostram que:

- Os títulos de CP65 estão, de um modo geral, entre MPD (5,6) e o título esperado na altura (6,3).
- Os títulos de D_R estão sempre acima do título administrado, 3,3 ($\text{Log}_{10}/\text{ml}$).
- Os títulos de PXL estão sempre acima do título administrado esperado, 3,3 ($\text{Log}_{10}/\text{ml}$).

Títulos de anticorpos seroneutralizantes (RFFIT) da raiva recombinante (CP65): Duas das vacinas em que as únicas diferenças foram uma alteração das estirpes CDV e

CPV deram os títulos de anticorpos neutralizantes para a raiva que se seguem (Tabela 82):

TABELA 82. TÍTULO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA O VÍRUS DA RAIVA (LOG_{10}):

Vacina	Cão #	Títulos/ml (log_{10}) (Dias pós-vacinação)		
		(D 0) V_1	(D 21) V_2	(D 42)
D ₂ ACPiP _{xII} CP65/LCI	4804	1,1	1,3	1,4
	4502	0,6	0,7	1,6
	4503	1,2	1,1	2,1
	4507	1,1	1,2	2,7
	4801	1,0	13	2,4
	4501	1,0	1,2	2,2
GMT		1,0	1,1	21
DP		±0,2	±0,2	±0,5
D ₂ ACPiPCP65/LCI	4401	0,7	1,0	2,4
	4803	1,2	1,2	2,0
	4806	1,1	1,1	2,0
	4901	1,2	ND	3,4
	4902	1,0	13	3,1
	4404	0,6	1,1	2,0
GMT		0,9	1,1	2,5
DP		±0,3	±0,2	±0,6

Os anticorpos SN contra a raiva apresentaram bom título de seroconversão comparável com os obtidos nos Exemplos atrás descritos.

A análise estatística (teste t) mostrou que os títulos de anticorpos neutralizantes contra a raiva nas vacinas atrás descritas (Tabela 82) não são significa-

tivamente diferentes: ambas as alterações no lote de partida do vírus da esgana e no lote de partida do parvovírus não têm interferência *in vivo* na eficácia de vCP65 em cães.

Influência respectiva de CDV e CPV nos títulos SN contra a raiva (CP65): Influência de CDV (Estirpe Rockborn) nos títulos SN contra a raiva (CP65).

TABELA 83. TÍTULOS DE ANTICORPOS INDIVIDUAIS CONTRA A RAIVA (RFFIT) EM DUAS VACINAS PRODUZIDAS COM E SEM CDV_R ESTÃO APRESENTADAS NA TABELA 83 (ABAIXO):

Vacina	Cão #	Títulos/ml (log ₁₀) (Dias pós-vacinação)		
		(D 0) V ₁	(D 21) V ₂ [*]	(D 42)
ACPiP _{XL} CP65	64	≤1,0	ND	1,5
	94	≤1,0	ND	2,1
	95	≤1,0	ND	2,4
	66	≤1,0	ND	1,9
	74	≤1,0	ND	2,1
GMT		≤1,0	ND	2,0
DP		±0,0	ND	±0,3
D _R ACPiP _{XL} CP65	4804	1,1	ND	1,4
	4502	0,6	ND	1,6
	4503	1,2	ND	2,1
	4507	1,1	ND	2,7
	4801	1,0	ND	2,4
	4501	1,0	ND	2,2
GMT		1,0	ND	2,1
DP		±0,2	ND	±0,5
ND = não realizado				
* = Titulação de anticorpos não realizada em V ₂ porque o soro disponível se esgotou				

Quando CDV (Rockborn) foi adicionado a uma vacina canina Combo (ACPiP_{XL}CP65), não foi induzida interferência relativamente ao título de anticorpos seroneutralizantes contra a raiva induzido por vCP65.

Influência de CPV(P_{XL}) nos títulos SN da raiva (CP65)

Mostrou-se que CP65 recombinante da raiva na vacina de combinação (D₀ACPiPCP65) é eficaz contra a infecção pela raiva (como demonstrado nos Exemplos atrás). A Tabela 82 mostra que a mudança da MSV da esgana de Onderstepoort para Rockborn não afecta o título de anticorpos SN contra a raiva induzido por vCP65. É necessário salientar que a dose de CP65 era muito baixa (abaixo do título estimado e perto de MPD). A ausência óbvia de interferência de CPV(P_{XL}) na vacina da raiva recombinante (vCP65) está apresentada na Tabela 84 e confirma os resultados apresentados na Tabela 82.

TABELA 84: TÍTULOS DE ANTICORPOS INDIVIDUAIS CONTRA A
RAIVA.

Vacina	Cão #	Títulos/ml (log ₁₀) (Dias pós-vacinação)		
		(D 0)V ₁	(D 21)V ₂	(D 42)
D ₃ ACPiPCP65 Lote C	H4B810	0,5	1,0	2,9
	H3B808	1,1	1,1	2,1
	H3L807	0,6	0,6	1,1
	H4B822	1,0	1,3	2,9
	(8513)*	(2,4)	(2,6)	(2,7)

(continuação)

Vacina	Cão #	Títulos/ml ($\log_{10}$) (Dias pós-vacinação)		
		(D 0)V ₁	(D 21)V ₂	(D 42)
GMT		0,8	1,0	225
SD		±0,3	±0,3	±0,9
D _R ACP _i P _{XL} CP65	H4B815	1,0	1,2	1,7
	H3L811	0,5	1,1	1,5
	H4B820	1,1	1,2	2,3
	8616032	1,2	1,2	1,3
GMT		1,0	1,2	1,7
SD		±0,3	±0,1	±0,4
* O cão #8513 foi excluído do estudo devido ao elevado título de anticorpos no Dia 0.				

A mudança da CPV para um novo lote de partida de CPV (P_{XL}) não resultou em qualquer diferença significativa no título de anticorpos SN para a raiva. Foi observada boa seroconversão em todos os cães, mesmo apesar da dose de CP65 ser próxima da Dose Mínima Protectora no grupo vacinado com o lote D que recebeu D_R e P_{XL}.

Influência da adição de raiva recombinante (vCP65) nas outras fracções da Vacina Canina.

Influência de CP65 no título SN de CDV (estirpe Rockborn).

TABELA 85: TÍTULOS SN CONTRA A ESGANA (LOG₁₀/ML) :

Vacina	Cão #	Títulos/ml (log ₁₀) (Dias pós-vacinação)		
		(D 0)V ₁	(D 21)V ₂	(D 35)
D _R APiP/LCI (Lote A)	H3B801	<0,3	2,3	2,7
	H3K837	<0,3	>2,9	>2,9
	H4B803	0,5	>2,9	>2,9
	8435	0,9	>2,9	>2,9
D _R ACP _i P _{xi} /LCI (Lote B)	H3B806	<0,3	>2,9	>2,9
	H4B813	<0,3	>2,9	2,7
	H4B818	<0,3	2,7	2,6
	1G1A	0,5	>2,9	>2,9
GMT (sem CP65)		0,4	2,8	2,8
SD		±0,2	±0,2	±0,1
D _R ACP _i P _{xi} CP65/LCI (Lote D)	H4B815	0,5	≥2,9	>2,9
	H3L811	0,3	>2,9	>2,9
	H4B820	<0,3	>2,9	>2,9
	8616032	0,9	2,7	2,9
	4804	<0,3	>2,1	3,0
	4502	<0,3	>2,1	2,6
	4503	<0,3	>2,1	2,4
	4507	<0,3	>2,1	2,7
	4801	<0,3	>2,1	2,7
	4501	<0,3	>2,1	2,7
	4302	<0,3	>2,1	2,8
	4601	<0,3	>2,1	2,6
	5003	<0,3	>2,1	2,9
	3901	0,5	>2,1	2,9
	3905	1,1	>2,1	2,7
	4103	1,2	>2,1	3,0
GMT (com CP65)		0,5	2,3	2,8
SD		±0,3	±0,3	±0,2

A vacina da raiva recombinante (vCP65) quando incorporada em diferentes vacinas combo caninas, não

interfere com a produção de anticorpos neutralizantes contra CDV. Mesmo em títulos baixos, D_R combinada induz excelentes seroconversões em todos os animais.

Influência da adição do recombinante da raiva (CP65) no título SN de CPV (P_{XL}).

TABELA 86. TÍTULOS INDIVIDUAIS DE CPV (P_{XL}) (LOG₁₀/ML)

Vacina	Cão#	Títulos/ml (log ₁₀) (Dias pós-vacinação)		
		(D ₀) V ₁	(D ₂₁) V ₂	(D ₃₅)
D _R APiP/LCI	4302	1,5	2,4	3,3
	4601	1,5	4,2	4,5
	5003	ND	3,6	4,5
GMT (sem CP65)		1,5	3,4	4,1
DP		±0,0	±0,9	±0,7
D _R ACP _i P _{XL} CP65/LCI	4502	1,5	2,7	3,6
	4503	1,8	2,4	4,5
	4804	1,8	2,4	3,9
	4501	1,8	4,5	4,5
	4507	1,5	3,0	4,2
	4801	1,8	2,4	3,6
ACP _i P _{XL} CP65/LCI	64	1,8	3,6	4,2
	66	1,5	4,2	4,2
	74	1,8	3,6	3,6
	94	1,5	3,9	4,5
	95	1,5	3,9	4,2
GMT (com CP65)		1,7	3,3	4,1
DP		±0,2	±0,8	±0,4
V1 = Dia da primeira vacinação				
V2 = Dia da segunda vacinação				

O recombinante da raiva (vCP65), quando adicionado à vacina Combo canina contendo DACPiP (P ou P_{XL}), não teve interferência na produção de anticorpos

seroneutralizantes (SN) contra CPV em animais naive relativamente a CPV.

Influência da adição de recombinante da raiva (CP65) no título SN de CAV-2.

TABELA 87. TÍTULOS INDIVIDUAIS DE ANTICORPOS CONTRA CAV-2 (LOG₁₀/ML)

Vacina	Cão#	Título/ml (log ₁₀) contra CAV-2 (Dias pós-vacinação)		
		(D 0) V ₁	(D 21) V ₂	(D 35)
D _R APiP/LCI (Lote A)	H3B801	0,6	1,8	2,3
	H3K837	<0,6	2,7	2,7
	H4B803	<0,6	>2,9	2,9
	8435*	(2,1)	(2,4)	(2,4)
D _R ACP _i P _{XL} /LCI (Lote B)	H3B806	<0,6	2,3	2,4
	H4B813	<0,6	2,7	>2,9
	H4B818	<0,6	2,1	2,6
	1G1A	<0,6	0,8	1,0
GMT (sem CP65)		0,6	22	24
SD		±0,5	±0,7	±0,7
D _R ACP _i P _{XL} CP65/LCI (Lote D)	H4B815	<0,6	1,7	>2,9
	H3L811	<0,6	2,0	>2,9
	H4B820	<0,6	1,7	>2,9
	8616032	0,6	<0,6	0,9
GMT (com CP65)		0,6	1,5	24
DP		±0,0	±0,6	±1,0
* O cão 8435 foi excluído dos cálculos devido ao elevado título SN pré-existente antes da vacinação.				

A adição de CP65 (vacina recombinante da raiva) às vacinas de combinação caninas que possuem CAV-2 não interfere com a resposta imune contra CAV-2 por métodos serológicos.

Influência da adição do recombinante da raiva (CP65) no título SN de CPi.

TABELA 88. TÍTULOS INDIVIDUAIS DE ANTICORPOS CONTRA CPI
(LOG₁₀/ML)

Vacina	Cão#	Título/ml (log ₁₀) contra CPi (Dias pós-vacinação)		
		(D 0) V ₁	(D 21) V ₂	(D 35)
D _R APiP/LCI (Lote A)	H3B801	<0,3	<0,3	1,2
	H3K837	<0,3	<0,3	1,7
	H4B803	<0,3	1,2	2,4
	8435*	0,8	1,4	1,9
D _R ACP _i P _{XL} /LCI (Lote B)	H3B806	<0,3	<0,3	0,9
	H4B813	<0,3	<0,3	2,0
	H4B818	<0,3	<0,3	1,2
	1G1A	<0,3	<0,3	<0,3
GMT (sem CP65)		0,4	0,6	1,5
DP		10,2	10,5	10,7
D _R ACP _i P _{XL} CP65/LCI (Lote D)	H4B815	<0,3	≥2,9	≥2,9
	H3L811	<0,3	≥2,9	≥2,9
	H4B820	<0,3	≥2,9	≥2,9
	8616032	<0,5	2,7	2,9
D _R ACP _i PCP65/LCI (Lote C)	H4B810	<0,3	1,0	2,0
	H3B808	<0,3	<0,3	1,2
	H3L807	<0,3	<0,3	1,0
	H4B822	<0,5	<0,3	2,3
	8513*	(1,5)	(2,4)	(2,1)
GMT (com CP65)		0,3	1,7	2,3
DP		10,1	1,3	10,8

* 8513 foi excluído do cálculo SN devido a título elevado no Dia 0

A adição de vCP65 à vacina existente com D_RP_{XL} não causa interferência nos títulos de anticorpos neutralizantes de CPi.

Influência da adição do recombinante da raiva (CP65) na imunogenicidade de CCV (por serologia):

TABELA 89. TÍTULOS INDIVIDUAIS DE ANTICORPOS CONTRA CCV EM LOG₁₀/ML

Vacina	Cão#	Título/ml (log ₁₀) contra CCV (Dias pós-vacinação)		
		(D 0)V ₁	(D 21)V ₂	(D 35)
D _R ACPiP _{XL} /LCI (Lote B)	H3B806	<0,3	1,7	>2,1
	H4B813	<0,3	>2,1	>2,1
	H4B818	<0,3	>2,1	>2,1
	1G1A	<0,3	0,5	2,0
GMT (com CP65)		0,4	1,6	2,1
DP		0,1	0,8	0,05
D _R ACPiP _{XL} CP65/LCI (Lote D)	H4B815	<0,3	>2,1	>2,1
	H3L811	<0,3	1,6	>2,1
	H4B820	<0,3	>2,1	>2,1
	8616032	<0,5	1,1	>2,1
GMT (com CP65)		<<	<	<
DP		0,0	0,5	0,0

A Tabela 89 demonstra que a vacina recombinante da raiva (CP65) quando adicionada aos componentes (DACPiP) da DrACPiP autorizada não interfere com a imunogenicidade conforme medido pelos títulos SN.

Infecção com Bv: A não interferência de CDV(D_R) e CPV_{XL} na eficácia de CCV na vacina D_RACPiP_{XL} foi demonstrada por vacinação/infecção nos Exemplos atrás apresentados.

Três grupos de cães foram vacinados com vacinas

contendo vCP65 ou não contendo CP65 como se mostra na Tabela 89 e discutido atrás. Todos os cães foram infectados com CCV seguindo o procedimento descrito nos Exemplos atrás.

A eficácia da vacina foi avaliada através do re-isolamento de vírus nas fezes dos cães seis dias após a infecção.

TABELA 90: PROTECÇÃO APÓS INFECÇÃO

Vacina	Cão #	Isolamento de CCV (+)	% de protecção após infecção
D _R APIP (controlo)	3901	+	0% (sem CCV, sem CP65)
	3905	+	
	4103	+	
	4302	+	
	4601	+	
	5003	+	
D _R ACPiP _{XL} CP65	4501	-	75% (CCV + CP65)
	4502	+	
	4503	-	
	4507	+	
	4801	-	
	4804	-	
D _R ACPiPCP65	4401	-	
	4404	+	
	4803	-	
	4806	-	
	4901	-	
	4902	-	

A Tabela 90 confirma que CP65 não interfere na vacinação por CCV conforme avaliado pela protecção após infecção. Todas as vacinas de coronavírus canino contendo CP65 protegem muito eficientemente os cães contra uma infecção muito grave que afectou todos os cães controlos.

Encontrou-se que todas as vacinas neste Exemplo são seguras para os cães seguidos de perto após vacinação. Não se observou reacção clínica, local ou sistémica, ao longo do período do teste.

Estas experiências demonstraram por métodos serológicos que a adição da fracção recombinante da raiva, vCP65, não causa qualquer interferência com qualquer um dos outros componentes, incluindo D_R e P_{XL} .

A comparação das duas vacinas de combinação completas liofilizadas $D_0ACPiP_{XL}CP65/LCI$ e $D_RACPiP_{XL}CP65/LCI$, em que D_0 é alterado para D_R , mostrou que não existe interferência na resposta de anticorpos contra a raiva. O nível de anticorpos contra a raiva com $D_RACPiP_{XL}CP65$ é ainda maior ou igual ao nível dos cães vacinados com $D_RACPiP_{XL}CP65$ e que sobreviveram à infecção.

Para melhor demonstrar que D_R não interfere com a resposta imune de vCP65, foi feita a comparação dos anticorpos SN das duas vacinas com e sem D_R . Os resultados em qualquer dos casos foram equivalentes indicando que a

estirpe D_R pode ser adicionada ao resto da fracção $ACP_iP_{XL}CP65$.

Quando Parvovírus canino (P_{XL}) foi adicionado a uma vacina de combinação completa ($D_RACP_iP_{XL}CP65$) e comparado com uma outra vacina de combinação ($D_0ACP_iP_{XL}CP65$), não foi observada interferência na serologia relativamente a CP65.

A resposta imune humoral de parvovírus canino nas vacinas de combinação ($DACP_iPCP65$) em que P e P_{XL} foram usados indiferentemente é equivalente em ambos os casos. Ainda, os resultados confirmaram que a mudança de um MSV de parvovírus canino para um outro não interfere com as respostas imunológicas dos cães às outras fracções.

A avaliação da não interferência de D_R , P_{XL} e CP65 na protecção conferida pela vacina CCV MLV foi realizada por vacinação/infecção. O reisolamento fecal de CCV mostra que a CPV (Rockborn) e CPV (P_{XL}) MSV pode ser usada na vacina de combinação $D_RACP_iP_{XL}CP65$. Ambas as vacinas de coronavírus canino contendo CP65 protegeram, muito eficientemente, cães contra a infecção por coronavírus que afectou 100% dos cães controlos não vacinados (Tabela 89).

A vacina recombinante do vector varíola dos canários e raiva (vCP65) combinada com os antígenos virais D, A, C, Pi, P é segura e eficaz em cães independentemente

do MSV de Parvovírus canino ou de vírus da esgana canina usado.

Conforme avaliado por métodos serológicos, a adição do recombinante da raiva vCP65 a DACPiP não causa qualquer interferência nas outras fracções de vírus caninos.

Conforme avaliado pela infecção, a presença do recombinante da raiva (vCP65), D_R, P_{XL} na vacina de combinação não causa qualquer interferência na eficácia do componente CCV.

A combinação de raiva canina re-hidratada induz excelentes respostas imunes protectoras relativamente a todos os componentes.

Exemplo 22 - Variola dos canários/raiva (CP65): estudo preliminar sobre a segurança e imunogenicidade em combinação com outros antigénios vacinais em gatos

Este exemplo demonstra a segurança e imunogenicidade de vacinas de combinação da raiva e mostra que os antigénios convencionais não interferem com a imunogenicidade de vCP65; e demonstra a segurança em gatos.

Procedimento geral: Vinte e cinco gatos (cinco gatos por grupo) foram vacinados com lotes experimentais de vacina contendo $10^{4,8}$ - $10^{5,3}$ TCID₅₀/dose de vCP65 em

combinação com antígenos convencionais (FVR-C-P-FPn + FeLV). Os cães receberam uma ou duas doses de vacina, subcutaneamente, e colheu-se sangue no Dia 0, Dia 18 e Dia 32 pós-vacinação primária.

Materiais: Animais: Foram usados vinte e cinco gatos em simultâneo no teste. Os gatos tinham aproximadamente 14-16 semanas de idade quando da vacinação primária. Tinham recentemente recuperado da infecção de herpesvírus felino adquirida no fornecedor antes da recepção.

Vacina: Prepararam-se vacinas felinas experimentais com cinco componentes (Lotes B e C; ver Tabela 92) contendo rinotraqueite felina (FVR); calicivírus felino (C); vírus da panleucopenia felina (P); Chlamydia psittici (FPn) e vírus recombinante da varíola dos canários e raiva (CP65).

As vacinas liofilizadas foram re-hidratadas antes da injeção usando uma vacina da leucemia felina convencional (Código do produto 1555.2; N° de Série 65026) ou água estéril. Esta série da vacina FeLV teve resultados de testes de potência relativa de 2,6, 2,8 e 2,6.

Os gatos foram vacinados como se mostra na Tabela 92.

TABELA 92

Grupo	Vacina	Lote#	# de doses	Número de cães
1	FVR-C-P-FPN+CP65/Felv	B	1	5
2	FVR-C-P-FPN+CP65/Felv	B	2	5
3	FVR-C-P-FPN+CP65/Água	B	1	4*
4	FVR-C-P-FPN+CP65/Água	B	2	5
5	FVR-C-P-FPN+CP65/FoLV	C	2	5

Os gatos foram vacinados, subcutaneamente na área escapular, uma ou duas vezes com dezoito dias de intervalo. Foi necessário um intervalo mais curto entre as injeções para se dispor do tempo adequado para analisar os títulos de anticorpos contra a raiva. Colheu-se sangue dos gatos antes da vacinação e aos dias 18 e 32 pós-vacinação primária. Os soros foram analisados relativamente à avaliação de anticorpos contra a raiva pelo teste rápido de inibição dos focos de fluorescência (RFFIT). Os gatos foram observados durante aproximadamente 15 minutos pós-injecção relativamente a reacções adversas à vacina (*i.e.*, dor ou comichão). Apalpou-se o local de vacinação 18 e 32 dias pós-injecção. Os vírus vivos modificados FVR-C-P-FPN foram titulados. O vírus recombinante vCP65 foi titulado. Durante a vacinação primária, o gato FXI recebeu duas injeções de $10^{4,8}$ TCID₅₀/dose; reduzindo assim o número de gatos no Grupo 3 para quatro animais.

Resultados: Estão apresentados de um modo geral na Tabela 93.

TABELA 93

Grupo	# de doses	Título de CP65 (TCID ₅₀ /dose)	(Dia 32) Título de anticorpos contra a raiva*
FVRCP FPn + CP65/FeLV	1	10 ^{4,6}	0,84 ± 0,51
FVRCP FPn + CP65/FeLV	2	10 ^{4,8}	0,77 ± 0,43
FVRCP FPn + CP65/H ₂ O	1	10 ^{4,8}	0,80 ± 0,49
FVRCP FPn + CP65/H ₂ O	2	10 ^{4,8}	1,56 ± 0,43
FVRCP FPn + CP65/FeLV	2	10 ^{5,3}	2,12 ± 1,03
* GMT = Título da média geométrica por grupo (log ₁₀) duas semanas pós-reforço			

As vacinas foram tituladas para conterem as seguintes quantidades de vírus (Tabela 94). Os valores da titulação de vCP65 estão descritos como títulos das médias geométricas de vírus (Tabela 94). Os valores da titulação de vCP65 estão descritos como títulos das médias geométricas de três repetições.

TABELA 94

Antigénio	Inoculação mínima do produto por dose	Título da vacina experimental por dose
FVR	10 ^{5,4} TCID ₅₀	10 ^{5,5} TCID ₅₀
FCV	10 ^{5,2} TCID ₅₀	10 ^{5,6} TCID ₅₀
FPL	10 ^{4,0} TCID ₅₀	10 ^{5,5} TCID ₅₀
FPn	10 ^{3,0} TCID ₅₀	10 ^{4,4} TCID ₅₀
CP65	Provavelmente entre 10 ^{4,5} e 10 ^{5,3} TCID ₅₀	Lote B = 10 ^{4,8} TCID ₅₀ Lote C = 10 ^{5,3} TCID ₅₀

Os títulos de anticorpos individuais e de grupo estão resumidos nas Tabelas 95. O título da média geométrica (GMT) foi calculado para cada grupo e cada data. O título de anticorpos contra a raiva do gato HB1 no Dia 0 foi erroneamente descrito como sendo de 1,58.

Não foram observadas reacções adversas às vacinas. Os locais de inoculação foram apalpados no Dia 18 e no Dia 32. Não foram observadas inchaços ou anormalidades. A maioria dos gatos vacinados pareceu asudável durante o ensaio. No entanto, nalguns gatos eram evidentes sinais respiratórios crónicos devido à infecção por Herpes.

Títulos de anticorpos contra a raiva $\geq 1,0 \log_{10}$ indicaram uma resposta às vacinas. Os gatos nos Grupos 1, 2 e 3 tinham alguns gatos (2-3 por grupo) que responderam fracamente após a vacinação. Estes gatos receberam uma ou duas doses de vacina ($10^{4,8}$ TCID₅₀/dose) re-hidratada com a vacina FeLV convencional; ou uma dose re-hidratada com água.

O grupo 4 teve dois gatos (FZ1 & HH3) que responderam fracamente à vacinação usando duas doses de vacina ($10^{4,8}$ TCID₅₀/dose) re-hidratada com água. Os restantes gatos neste grupo (FU2, GR3 e HG1) responderam bem com títulos individuais de anticorpos contra a raiva $\geq 1,8$ pós-segunda vacinação.

O grupo 5 recebeu duas doses de vacina ($10^{5,3}$ TCID₅₀/dose) re-hidratadas com FeLV. Este grupo teve a melhor resposta global à vacinação (GMT = $2,2 \pm 1,03$). No entanto, um gato GQ3 não respondeu à vacinação.

Este exemplo demonstra a imunogenicidade e segurança das vacinas de combinação recombinantes da raiva em gatos. Também mostra a resposta serológica de gatos naives para o vector varíola dos canários a uma ou duas doses de vCP65.

Este Exemplo também demonstra que de facto não existe interferência entre vCP65 e os componentes de vacinas convencionais. Quando da comparação dos Grupos 2 e 4, parece que em doses baixas de vCP65 (*i.e.*, $10^{4,8}$ TCID₅₀/dose) a vacina FeLV usada nesta experiência (Código do produto 1555.20) pareceu suprimir ligeiramente os títulos de anticorpos contra a raiva às duas semanas pós-vacinação secundária. Uma vez que não se colheram mais amostras depois do Dia 32, a resposta de anticorpos contra a raiva nestes gatos podia simplesmente estar retardada. No entanto, as vacinas contendo vCP65 a $10^{5,3}$ TCID₅₀/dose, re-hidratada com vacina FeLV convencional, foram imunogénicas em gatos, demonstrando assim a ausência de interferência.

Este exemplo indica que vCP65 ($10^{5,3}$ TCID₅₀/dose), em combinação com antigénios convencionais, é seguro e induzirá bons títulos de anticorpos contra a raiva após

duas doses em gatos (*i.e.*, Grupo 5 GMT = 2,12 ± 1,03). Assim, pode-se concluir que:

Os recombinantes poxvírus-raiva (vCP65), em combinação com antigénios convencionais são seguros em gatos;

Os antigénios convencionais não interferem com a imunogenicidade de recombinantes poxvírus-raiva (*e.g.*, vCP65), especialmente a $10^{5,3}$ TCID₅₀/dose;

E duas doses do recombinante poxvírus-raiva (*e.g.*, vCP65) ($10^{5,3}$ TCID₅₀/dose), combinadas com antigénios convencionais e re-hidratados com vacina FeLV, resultaram na resposta mais elevada de anticorpos contra a raiva.

TABELA 95. TÍTULOS DE ANTICORPOS CONTRA A RAIVA, INDIVIDUAIS E DE GRUPO, DE GATOS VACINADOS COM VACINAS DE COMBINAÇÃO EXPERIMENTAIS CONTRA A RAIVA (LOG₁₀)

Gato ID#	Grupo de vacinação	Dia 0 (VAX 1)	Dia 18 (VAX 2)	Dia 32 (2 semanas pós-VAX2)
GQ4	Grupo 1 Lote B $10^{4,8}$ + FeLV Uma dose	0,40	1,23	1,04
GR2		0,30	0,6	1,40
H14		0,60	1,31	0,30
H15		0,30	0,48	0,30
ED3		0,30	1,15	1,17
GMT		0,38 ± 0,13	0,95 ± 0,38	0,84 ± 0,51

(continuação)

Gato ID#	Grupo de vacinação	Dia 0 (VAX 1)	Dia 18 (VAX 2)	Dia 32 (2 semanas pós-VAX2)
GZ4	Grupo 2 Lote B 10 ^{4,8} + FeLV Duas doses	0,48	0,70	0,30
FY5		0,48	0,48	0,60
GH1		0,30	1,04	0,48
HJ1		0,30	0,93	1,15
FX1*		0,54	1,06	1,30
GMT		0,42 0,11	0,84 0,25	0,77 0,43
FZ3	Grupo 3 Lote B 10 ^{4,8} + Água Uma dose	0,30	1,04	0,48
HB1		a ser repetido	1,15	1,36
HH2		0,60	0,30	1,04
HI3		0,30	0,30	0,30
GMT			0,70 0,46	0,80 0,49
FU2	Grupo 4 Lote B 10 ^{4,8} + Água Duas doses	0,30	1,28	1,83
FZ1		0,48	0,95	1,0
GR3		0,48	0,60	1,94
HG1		0,70	1,15	1,84
HH3		0,74	1,20	1,18
GMT		0,54 0,18	1,04 0,27	1,56 0,43
GJ3	Grupo 5 Lote B 10 ^{5,3} + FeLV Duas doses	0,30	0,78	2,86
GQ3		0,30	0,70	0,78
GZ1		0,30	0,95	1,28
GZ5		0,30	1,94	3,12
HH1		0,60	1,89	2,55
GMT		0,36 0,13	1,25 0,61	2,12 1,03
* Recebeu duas doses de vacina (VAX ₁) erradamente				

REFERÊNCIAS

1. Abimiku, A., Franchini, G., Tartaglia, J., Aldrich, K., Myagikh, M., Markham, P.D., Chong, P., Klein, M., Kiery, M., Paoletti, E., Gallo, R.C., and Robert-Guroff, M., "Highly attenuated HIV-1 recombinant poxviruses induce cross-protection against HIV-2 challenge in rhesus macaques", Submitted.

2. Altenburger, W., C-P. Suter and J. Altenburger, *Archives Virol.* 105:15-27 (1989).
3. Arp, J., Ford, C.M., Falker, T.J., King, E.E., Dekaban, G.A., *J. Gen. Virol.* 74:211-220 (1993).
4. Avery, R.J., and J. Niven., *Infect. and Immun.* 28:795-801 (1979).
5. Barra-Sinoussi, F., Cherman, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Alexer-Blin, C., Velnet-Brun, F., Rouzioux, C., Rosenbaum, W., and Montagnier, L., *Science* 220:868-870 (1983).
6. Behbehani, A.M., *Microbiological Reviews* 47:455-509 (1983).
7. Benson, J., Tschachler, E., Gessain, A., Yanagihara, R., Gallo, R.C., and Franchini, G., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10:91-96 (1994).
8. Bergoin, M., and Dales, S., In *Comparative Virology*, eds. K. Maramorosch and E. Kurstak, (Academic Press, NY) pp. 169-205 (1971).
9. Berman, P., Gregory, T., Riddle, L., Nakamura, G., Champe, M., Porter, J., Wurm, F., Hershberg, R., Cobb, E. and Eichberg, J., *Nature* 345:622-625 (1996).
10. Bertholet, C., Drillien, R., and Wittek, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2096-2100 (1985).
11. Boursnell, M.E.G., P.F. Green, J.I.A. Campbell, A. Deuter, R.W. Peters., F.M. Tomley, A.C.R. Samson, P. Chambers, P.T. Emmerson, and M.M. Binns, *J. Gen. Virol.* 71:621-628 (1990a).
12. Boursnell, M.E.G., P.F. Green, J.I.A. Campbell, A. Deuter, R.W. Peters, F.M. Tomley, A.C.R. Samson, P.T. Emmerson, and M.M. Binns, *Veterinary Microbiology* 23:305-316 (1990b).
13. Boursnell, M.E.G., P.F. Green, A.C.R. Samson, J.I.A. Campbell, A. Deuter, R.W. Peters, N.S. Millar, P.T. Emmerson, and M.M. Binns, *Virology* 178:297-300. (1990C).
14. Buller, R.M.L., G.L. Smith, Cremer, K., Notkins, A.L., and Moss, B., *Nature* 317:813-815 (1985).
15. Buller, R.M.L., Chakrabarti, S., Cooper, J.A., Twardzik, D.F., and Moss, B., *J.Virol.* 62:866-874 (1988).
16. Cadoz, M., A. Strady, B. Maignier, J. Taylor, J. Tartaglia, E. Paoletti and S. Plotkin, *The Lancet*, 339:1429 (1992).
17. Cardoso, E.A., Robert-Guroff, M., Franchini, G., Gartner, S., Moura-Nunes, J.F., Gallo, R.C., and Terrinha, A.M., *Int. J. Cancer* 43:195-200 (1989).
18. Chambers, P., N.S. Millar, and P.T. Emmerson, *J. Gen. Virol.* 67:2685-2694 (1986).
19. Child, S.J., Palumbo, G.J., Buller, R.M.L., and Hruby, D.E. *Virology* 174:625-629 (1990).
20. Clark, N., Kushner, N., Barrett, C.B., Kensil, C.R., Salisbury, D., and Cotter, J., *Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 1433-1443 (1991).
21. Clewell, D.B. and D.R. Helinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62:1159-1166 (1969).
22. Clewell, D.B., *J. Bacteriol* 110:667-676 (1972).
23. Colinas, R.J., R.C. Condit and E. Paoletti, *Virus Research* 18:49-70 (1990).
24. Cooney, E.L., Corrier, A.C., Greenberg, P.D., et al., *Lancet* 337:567-572 (1991).
25. Cox, W.I., Tartaglia, J., and E. Paoletti, *Virology* 195:845-850 (1993).
26. Daglish, A., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercent, T., Gluckman, J.C., Montagnier,

L., *Nature* 312:767-770 (1984).

27. De Rossi, A., Aldovini, A., Franchini, G., Mann, D., Gallo, R.C., Wong-Staal, F., *Virology* 163:640-645 (1985).

28. Dreyfuss, G., Adam, S.A., and Choi, Y.D., *Mol. Cell. Biol.* 4:415-423 (1984).

29. Drillien, R., Kochen, F., and Kim, A., *Virology* 111:488-499 (1981).

30. Earl, P.L., Moss, B., Morrison, R.P., Wehrly, K., Nishio, J., and Chesebro, B., *Science* 234:728-731 (1986).

31. Edbauer, C., R. Weinberg, J. Taylor, A. Rey-Senelonge, J.F. Bouquet, P. Desmetre, E. Paoletti, *Virology* 179: 901-904 (1990).

32. Emini, E., Schleif, W., Nunberg, J., Conley, A., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, S., Matsushita, S., Cobb, K., Jett, C., Eichberg, J., and K. Murthy, *Nature* 355:728-730 (1992).

33. Engelke, D.R., Hoener, P.A., Collins, F.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:544-548 (1988).

34. Espion, D., S. de Henau, C. Letellier, C.-D. Wemmers, R. Brasseur, J.F. Young, M. Gross, M. Rosenberg, G. Meulemans and A. Burny, *Arch. Virol.* 95:79-95 (1987).

35. Fenner, F., *Virology* 5:502-529 (1958).

36. Flexner, C., Hugen, A., and Moss, B., *Nature* 330:259-262 (1987).

37. Franchini, G., Robert-Guroff, M., Tartaglia, J., Aggarwal, A., Abimiku, A., Benson, J., Markham, P., Limbach, K., Hurteau, G., Fullen, J., Aldrich, K., Miller, N., Sasoff, J., Paoletti, E., and Gallo, R.C., Highly attenuated HIV-2 recombinant poxviruses, but not HIV-2 recombinant salmonella vaccines, induce long lasting protection in rhesus macaques. Submitted.

38. Fries et al., 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, CA (October 1992).

39. Fultz, P., Nara, P., Barre-Sinoussi, F., Chaput, A., Greenberg, M., Muchmore, E., Kiery, M.-P. and Girard, M. *Science* 256:1687-1689 (1992).

40. Funahashi, S., T. Sato and H. Shida, *J. Gen. virol.* 69:35-47 (1988).

41. Gallo, R.C., *Sci. Am.* 256:47-56 (1987).

42. Gallo, R.C., *Sci. Am.* 255:88-98 (1986).

43. Garten, W., Kohama, T., and H-D. Klenk, *J. Gen. Virol.* 51:207-211 (1980).

44. Gessain, A., Gallo, R.C., and Franchini, G., *J. Virol.* 66:2288-2295 (1992).

45. Gessain, A., Boeri, E., Yanagihara, R., Gallo, R.C., and Franchini, G., *J. Virol.* 67:1015-1023 (1993).

46. Ghendon, Y.Z., and Chemos, V.I., *Acta Virol.* 8:359-368 (1964).

47. Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R., and Kim, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5573-5577 (1986).

48. Girard, M., Kiery, M.-P., Pinter, A., Barre-Sinoussi, F., Nara, P., Kolbe, H., Kusui, K., Chaput, A., Reinhart, T., Muchmore, E., Ronco, J., Kaczorek, M., Gomard, E., Gluckman, J.-C. and Fultz, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 542-546 (1991).

49. Goebel, S.J., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P., Paoletti, E., *Virology* 179:247-266 (1990a).

50. Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow and E. Paoletti, *Virology* 179:517-563 (1990b).
51. Golding, H., Robey, F., Gates, F., Linder, W., Beining, P., Hoffman, T. and Golding, B., *J. Exp. Med.* 167:914-923 (1988).
52. Golding, H., Shearer, G., Hillman, K., Lucas, P., Manischewitz, J., Zajac, R., Clerici, M., Gress, R., Boswell, R. and Golding, B., *J. Clin. Invest.* 83:1430-1435 (1989).
53. Goldstein, D.J. and S.K. Weller, *Virology* 166:41-51 (1988).
54. Guo, P., Goebel, S., Davis, S., Perkus, M.E., Languet, B., Desmetre, P., Allen, G., and Paoletti, E., *J. Virol.* 63: 4189-4198 (1989).
55. Guo et al., *J. Virol.* 64:2399-2406 (1990).
56. Hammond, S., Bollinger, R., Stanhope, P., Quinn, T., Schwartz, D., Clements, M. and Siliciano, R., *J. Exp. Med.* 176:1531-1542 (1992).
57. Haseltine, W., Terwilliger, E.F., Rosen, C.A., and Sodrowski, J.G., In *Retrovirus Biology Human Disease*, eds. Gallo R.C. and Wong-Staal F., (Marcel Dekker, NY) pp. 241-270 (1989).
58. Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S., and Miyoshi, I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6476-6480 (1981).
59. Homma, M., and M. Ohuchi, *J. Virol.* 12:1457-1465 (1973).
60. Hruby, D.E., R.A. Maki, D.B. Miller and L.A. Ball, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3411-3415 (1983).
61. Hruby, D.E. and L.A. Ball, *J. Virol.* 43:403-409 (1982).
62. Hu, S.-L., Abrams, K., Barber, G., Morn, P., Zarling, J., Langlois, A., Kuller, L., Morton, W. and Benveniste, R., *Science* 255:456-459 (1992).
63. Ichihashi, Y. and Dales, S., *Virology* 46:533-543 (1971).
64. Issel, C.J., Horohov, D.W., Lea, D.F., Adams, Jr., W.V., Haglus, S.D., McManus, J.M., Allison, A.C., and Montelaro, R.C., *J. Virol.* 66:3398-3408 (1992).
65. Itamura, S., H. Iinuma, H. Shida, Y. Morikawa, K. Nerome and A. Oya, *J. Gen. Virol.* 71:2859-2865 (1990).
66. Jacobson, J.G., D.A. Leib, D.J. Goldstein, C.L. Bogard, P.A. Schaffer, S.K. Weller and D.M. Coen, *Virology* 173: 276-283 (1989).
67. Jamieson, A.T., G.A. Gentry and J.H. Subak-Sharpe, *J. Gen. Virol.* 24:465-480 (1974).
68. Kalyanaraman V.S., Samgadharan M.G., Robert-Guroff M., Miyoshi I., Blayney D., Golde D., and Gallo R.C., *Science* 218:571-573 (1982).
69. Kato, S., M. Takahashi, S. Kameyama and J. Kamahara, *Biken's* 2:353-363 (1959).
70. Kiery, M.P., Lathe, R., Drillean, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H., and Lecocq, J.P., *Nature (London)* 312:163-166 (1984).
71. Kiyokawa T., Seki M., Iwashita S., Imagawa K., Shimizu F., and Yoshida M., *Proc. Acad. Sci. USA* 82:8359-8363 (1985).
72. Klasse, P., Pipkorn, R. and Blomberg, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5225-5229 (1988).

73. Knauf, V.C., and Nester, E.W., *Plasmid* 8:45-54 (1982).
74. Komourian, F., Pelloquin, F., and de The, G., *J. Virol.* 65:3770-3778 (1991).
75. Koralnik, L.J., Fullen, J., and Franchini, G., *J. Virol.* 67:2360-2366 (1993).
76. Konishi et al., *Virology* 190:454-458 (1992).
77. Kotwal, G.J. and Moss, B., *Nature (London)* 335:176-178 (1988a).
78. Kotwal, G.J. and Moss, B., *Virology* 167:524-537 (1988b).
79. Kotwal, G.J., S.N. Isaacs, R. McKenzie, M.M. Frank and B. Moss, *Science* 250:827-830 (1990).
80. Kotwal, G.J., A.W. Hugin and B. Moss, *Virology* 171:579-587 (1989a).
81. Kotwal, G.J. and B. Moss, *J. Virol.* 63:600-606 (1989b).
82. Lal, C.K. and B.G. Pogo, *Virus Res.* 12:239-250 (1989).
83. LaRosa, G.L., Davide, J.P., Weinhold, K., Waterbury, J.A., Profy, A.T., Lewis, J.A., Langlois, A.J., Dreesman, G.R., Boswell, R.N., Shaddock, P., Holley, L.H., Karplus, M., Epologneis, D.P., Matthews, T.J., Emini, E.A., and Putney, S.D., *Science* 249:932-935 (1990).
84. Le, L., R. Brasseur, C. Wemers, G. Meulemans, and A. Burny, *Virus Genes* 1:333-350 (1989).
85. Mandeck, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7177-7182 (1986).
86. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., in *Molecular cloning: a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) (1982).
87. Matthews, R.E.F., *Intervirology* 17:42-44 (1982).
88. McGinnes, L.W., and T.G. Morrison, *Virus Research* 5:343-356 (1986).
89. Merz, D.C., A. Scheld, and P. Chopin, *J. Exper. Med.* 151:275-286 (1980).
90. Miller, M., Warmerdam, M., Gaston, I., Greene, W. and Feinberg, M., *J. Exp. Med.* 179:101-113 (1994).
91. Miyazawa, M., Nishio, J., and Cheesbro, B., *J. Virol.* 66:4497-4507 (1992).
92. Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtsuki, Y., Shiraiishi, Y., Nagata, K., and Hiruma, Y., *Nature* 294:770-771 (1981).
93. Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Kubonishi, I., Fujishita, M., Ohtsuki, Y., Yamashita, M., Yamato, K., Hirose, S., Taguchi, H., Niya, K., and Kobayashi, M., *Int. J. Canc.* 35:81-85 (1985).
94. Morgan, A.J., M. Mackett, S. Finerty, J.R. Arrand, F.T. Scullion and M.A. Epstein, *J. Med. Virol.* 25:189-195 (1988).
95. Moss, B., E. Winters and J.A. Cooper, *J. Virol.* 40:387-395 (1981).
96. Nagai, Y., H.D. Klenk, and R. Rott, *Virology* 72:494-508 (1976).
97. Nagai, Y., T. Yoshida, M. Hamaguchi, H. Naruse, M. Inuma, K. Maeno, and T. Matsumoto, *Microbiol. Immunol.* 24:173-177 (1980).
98. Nakamura S., Hayami M., Ohta Y., Ishikawa K., Tsujimoto H., Kiyokawa T., Yoshida M., Sasagawa A., and Honjo S., *Int. J. Cancer* 40:403-408 (1987).

99. Norrby, E., and Y. Gollmar, *Infect. and Immun.* 11:231-239 (1975).
100. Ogawa, R., N. Yanagida, S. Saeki, S. Saito, S. Ohkawa, H. Gotoh, K. Kodama, K. Kamogawa, K. Sawaguchi and Y. Iritani, *Vaccine* 8:486-490 (1990).
101. Paez, E., Dallo, S., and Esteban, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3365-3369 (1985).
102. Paine, E., Garcia, J., Philipott, T.C., Shaw, G., and Ratner, L., *Virology* 192:111-123 (1991).
103. Palumbo, G.J., Pickup, D.J., Fredrickson, T.N., McIntyre, L.J., and Butler, R.M.L., *Virology* 172:262-273 (1989).
104. Panicali, D. and E. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4927-4931 (1982).
105. Panicali, D., Davis, S.W., Mercer, S.R., and Paoletti, E., *J. Virol.* 37:1000-1010 (1981).
106. Patel, D.D. and Pickup, D.J., *EMBO* 6:3787-3794 (1987).
107. Patel, D.D., Ray, C.A., Drucker, R.P., and Pickup, D.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9431-9435 (1988).
108. Pedersen, N.C., Johnson, L., Birch, D., and Theilen, G.H., *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11:123-148 (1986).
109. Perkus, M.E., Goebel, S.J., Davis, S.W., Johnson, G.P., Limbach, K., Norton, E.K., and Paoletti, E., *Virology* 179:276-286 (1990).
110. Perkus, M.E., S.J. Goebel, S.W. Davis, G.P. Johnson, E.K. Norton and E. Paoletti, *Virology* 180:406-410 (1991).
111. Perkus, M.E., Limbach, K., and Paoletti, E., *J. Virol.* 63:3829-3836 (1989).
112. Perkus, M.E., A. Piccini, B.R. Lipinskas and E. Paoletti, *Science* 229:981-984 (1985).
113. Perkus, M.E., D. Panicali, S. Mercer and E. Paoletti, *Virology* 152:285-297 (1986).
114. Piccini, A., M.E. Perkus, and E. Paoletti, *Methods in Enzymology* 153:545-563 (1987).
115. Pickup, D.J., B.S. Ink, B.L. Parsons, W. Hu and W.K. Joklik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6817-6821 (1984).
116. Pickup, D.J., B.S. Ink, W. Hu, C.A. Ray and W.K. Joklik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7698-7702 (1986).
117. Polesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7415-7419 (1980).
118. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., and Gallo, R.C., *Science* 224:497-500 (1984).
119. Reed, J. and Muench, H., *Am. J. Hyg.* 27:493-497 (1938).
120. Rickinson, A.B., Rowe, M., Hart, I.J., Yao, Q.Y., Henderson, L.E., Rabin, H., and Epstein, M.A., *Cell Immunol.* 87:649-658 (1984).
121. Robinson, W., Kawamura, T., Gorny, M., Lake, D., Xu, J.-Y., Matsumoto, Y., Sugano, T., Masuho, Y., Mitchell, W., Hersh, E. and Zolla-Pazner, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3185-3189 (1990).
122. Rusche, J.R., Javaherian, K., McDonald, C., Petro, J., Lynn, D.L., Grimaldi, R., Langlois, A., Gallo, R.C., Arthur, L.O., Fischinger, P.J., Bolognesi, D.P., Putney S.D., Matthews, T.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3198-3202 (1988).
123. Sanger, F., Nickel, S. Coulson, A.R., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467 (1977).
124. Schmidt, J.F.C. and H.G. Stunnenberg, *J. Virol.* 62:1889-1897 (1988).

125. Schultz, T.F., Calabro, M.L., Hoad, J.G., Carrington, C.V.F., Matulas, E., Catovsky D., Weiss R., *Virology* 184: 483-491 (1991).
126. Seligmann, E.B., in *Laboratory Techniques in Rabies*, eds. M.M. Kaplan and H. Koprowski, (World Health Organization, Geneva) pp. 279-285 (1973).
127. Shaffer, A., Lennox, J., Grosfeld, H., Sadoff, J., Redfield, R. and Burke, D., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5:33-39 (1989).
128. Shapira, S.K., Chou, J., Richaud, F.V. and Casadaban, M.J., *Gene* 25:71-82 (1983).
129. Sherman, M.P., Saksena, N.K., Dube, D.K., Yanagihara, R., Polesz, B.J., *J. Virol.* 66:2556-2563 (1992).
130. Shida, H., Hinuma, Y., Hatanaka, M., Morita, M., Kidokoro, M., Suzuki, K., Maruyama, T., Takahashi-Nishimaki, F., Sugimoto, M., Kitamura, R., Miyazawa, T., and Hayami, M., *J. Virol.* 62:4474-4480 (1988).
131. Shida, H., *Virology* 150:451-462 (1986).
132. Shida, H., T. Tochikura, T. Sato, T. Konno, K. Hirayoshi, M. Seki, Y. Ito, M. Hatanaka, Y. Hinuma, M. Sugimoto, F. Takahashi-Nishimaki, T. Maruyama, K. Miki, K. Suzuki, M. Morita, H. Sashiyama and M. Hayami, *EMBO* 6: 3379-3384 (1987).
133. Slabaugh, M., N. Roseman, R. Davis and C. Mathews, *J. Virol.* 62:519-527 (1988).
134. Smith, J.S., P.A. Yager and G.M. Baer, in *Laboratory Techniques in Rabies*, eds. M. M. Kaplan and H. Koprowski (WHO Geneva) pp. 354-357 (1973).
135. Spina, C., Kwok, T., Chow, M., Guatelli, J. and Richman, D., *J. Exp. Med.* 179:115-123 (1994).
136. Stanberry, L.R., Kit, S., Myers, M.G., *J. Virol.* 55:322-328 (1985).
137. Tabor, S. and C. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4767-4771 (1987).
138. Tartaglia, J., Jarrett, O., Neil, J.C., Desmetre, P., Paoletti, E., *J. Virol.* 67:2370-2375 (1993).
139. Tartaglia, J. and Paoletti, E., in *Immunochemistry of Viruses, II*, eds. M.H.V. van Regenmortel & A.R. Neurath, (Elsevier Science Publishers, Amsterdam) pp. 125-151 (1990b).
140. Tartaglia, J., R. Gettig & E. Paoletti, *Virology* (In press).
141. Tartaglia, J., Perkus, M.E., Taylor, J., Norton, E.K., Audonnet, J.-C., Cox, W.I., Davis, S.W., Van Der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., Languet, B., Paoletti, E., *Virology* 188:217-232 (1992).
142. Tartaglia, J., Perkus, M.E., Taylor, J., Norton, E.K., Audonnet, J.-C., Cox, W.I., Davis, S.W., Van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., Languet, B., Paoletti, E., *Virology* 188:217-232 (1992).
143. Tartaglia, J., J. Taylor, W.I. Cox, J.-C. Audonnet, M.E. Perkus, A. Radaelli, C. de Giuli Morghen, B. Meignier, M. Riviere, K. Weinhold & E. Paoletti, in *AIDS Research Reviews*, eds. W. Koff, F. Wong-Staal & R.C. Kennedy, Vol. 3, (Marcel Dekker, NY) pp. 361-378 (1993a).
144. Tartaglia, J., Jarrett, O., Desmetre, P., Paoletti, E. (1993b) *J. Virol.* 67:2370-2375 (1993b).
145. Tartaglia, J., Pincus, S., Paoletti, E., *Critical Reviews in Immunology* 10:13-30 (1990a).
146. Taylor, G., E.J. Stott, G. Wertz and A. Ball, *J. Gen. Virol.* 72:125-130 (1991a).
147. Taylor, J., C. Trimarchi, R. Weinberg, B. Languet, F. Guillemain, P. Desmetre and E. Paoletti, *Vaccine* 9:190-193 (1991b).

148. Taylor, J., Weinberg, R., Kawacka, Y., Webster, R.G., and Paoletti, E., Vaccine 6:504-508 (1988a).
149. Taylor, J., R. Weinberg, B. Lanquet, P. Desmettre, and E. Paoletti, Vaccine 6:497-503 (1988b).
150. Taylor, J., R. Weinberg, J. Tartaglia, C. Richardson, G. Alkhatib, D. Briedis, M. Appel, E. Norton & E. Paoletti, Virology 187:321-328 (1992).
151. Taylor, J., Edbauer, C., Rey-Senelange, A., Bouquet, J.-F., Norton, E., Goebel, S., Desmettre, P., Paoletti, E., J. Virol. 64:1441-1450 (1990).
152. Toyoda, T., T. Sakaguchi, K. Imal, N. M. Inocencio, B. Gotoh, M. Hamaguchi, and Y. Nagai, Virology 156: 242-247 (1987).
153. Weir, J.P. and B. Moss, J. Virol. 46:530-537 (1983).
154. Yuen, L., and Moss, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6417-6421 (1987).
155. Zhou, J., L. Crawford, L. McLean, X. Sun, M. Stanley, N. Almond and G.L. Smith, J. Gen. Virol. 71:2185-2190 (1990).

ANEXO

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

i) REQUERENTE: Paoletti, Enzo
Maki, Joanne

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Composições recombinantes de poxvirus-raiva e composições de combinação e suas utilizações

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 55

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) DESTINATÁRIO: Curtis, Morris & Safford, P.C.
(B) RUA: 530 Fifth Avenue, 25th Floor
(C) CIDADE: Nova Iorque
(D) ESTADO: Nova Iorque
(E) PAÍS: Estados Unidos da América
(F) CÓDIGO POSTAL: 10036

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: disquete
(B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versão #1.30

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO: US 08/486969
(B) DATA DE PEDIDO: 7 de Junho de 1995
(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE PROCURADOR/AGENTE:

- (A) NOME: Frommer, William S
- (B) NÚMERO DE REGISTO: 25506
- (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/RESUMO: 454310-2600

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

- (A) TELEFONE: (212) 840-3333
- (B) TELEFAX: (212) 840-0712

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

TAATTAAGTACCCGGG 20

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 28 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

GTACATTAAATGATCGATGGGCCCTAA 28

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 73 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

AGCTTCCCGG GTAAGTAATA CGTCAAGGAG AAAACGAAAC GATCTGTAGT TAGCGCCCGC 60
CTAATTAACT AAT 73

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 69 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

AGGGCCCAAT CATATGCAG TTCTCTTTT GCTTGTCTAG ACATCAATCG CCGGCGGATT 60
AATGATTA 69

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

TTAGTTAATTAGGCGGCGGC 20

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

CGATTACTATGAAGGATCGTT 22

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

TAATGATACTTCCTAGGCAA 20

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 41 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

CGATTACTAGATCTGAGCTCCCGGGCTCGAGGGATCCGT 41

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

TAATGATCTAGACTCGAGGGGCCGAGCTCCCTAGGCAA 39

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 16 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:

GATCCGAATTCTAGCT 16

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 12 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:

GCTTAAGATCGA t2

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 75 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12:

TATGAGTAAC TTAACCTCTT TGTATATTA AAGTATATTC AAAAATAAG TTATATAAT 60
AGATCTGAAT TCGTT 75

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 73 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:13:

ACTCATTCGA TTGAGAAAC AATTAATTT CATATACTT TTTATTCGA TATATTATC 60
TAGACTTAAG CAA 73

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 49 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:14:

AAAATGGGCG TGGATTGTTA ACTTTATATA ACTTATTTT TGAATATAC 48

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 67 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:15:

ACACGAATGA TTTCTAAG TATTGGAAA GTTTTATAGG TAGTTGATAG AACAAATAC 60
ATAATTT 67

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 51 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:16:

TGTGCTTACT AAAAGATTTC ATAAAOCTTT CAAAATATCC ATCAACTATC T 51

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 46 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:17:

TGTAAAAATA AATCACTTTT TAFAC TAAGA TCTCCCGGGC TGCAGC 48

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 66 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:18:

```
TGTTTATGT ATTAAACAT TTTTATTAG TGAATAAT GATTCTAGAG GGCCGACGT 60
OGCORG 66
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 50 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:19:

```
TTTCTGTATA TTTCACCAA TTTAGATCTT ACTCAAAATA TGTAACAATA 50
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:20:

```
TGTCATTAA CACTATACTC ATATTAAATA AAATAATATT TATT 44
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:21:

GATCCTGAGT ACTTTGTAAT ATAATGATAT ATATTTTCAC TTTATCCAT TTGAGAATAA 60
AAAGATCTTA GG 72

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:22:

GATCCATGAA ACATTATATT ACTATATATA AAAGTGAAAT AGAGTAACT CTTATTTTTC 60
TAGAATCCTT AA 72

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:23:

GATCCAGATC TCCCGGAAAA AAAATTATTT AACTTTTCAT TAATAGGAT TTGACGTATG 60
TAGCGTACTA GG 72

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 72 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:24:

GTCTAGAGGG CCGTTTTTTT AATAAATGGA AAAGTAATTA TCCCTAAACT GCATACTACG 60
CATGATCCTT AA 72

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:25:

GGGAGATCTC TCGAGCTGCA GGGGCGCGGA TCTTTTTCT 40

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:26:

CCCTCTAGAG AGCTCGACGT CCGCGGGCCT AGGAAAAAGA 40

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 3209 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:27:

TGAATGTAA ATGTTATCT TGGATGAG CTATAATAT GCATTGGAAA AATAATCCAT 60
TTAAAGAAAG GATTCAAATA CTACAAAAC TACCGATAA TATGTTACT AAGCTTATC 120
TTACGACGC TTAAATATA CACAAATAA CATAATTTT GTATAACCTA ACAATTAAT 180

AAAACATAAA AATAATAAAA GGAAATGTAA TATCGTAATT ATTTTACTCA GGAATGGGGT	240
TAAATATTTA TATCAGCTGT ATATCTATAC TGTATCGTA TACTCTTAC AATTACTAT	300
ACGAATATGC AAGAGATAAT AAGATTACCT ATTTAAGAGA ATCTTGTCAI GATAATGGG	360
TACGACATAG TGTAAATGC TATTTCGCT GTTACATTA AGTCAGTTGG AAGATGGAT	420
TTGACAGATG TAACCTTAATA GGTGCAAAA TGTAAATTA CAGCATTCTA TCGAAGATA	480
GGATACCACT TATATTATC AAAAATCACT GGTTCGATAA AACAGATTCT GCAATATTC	540
TAAAGATGA AGATTACTGC GAATTTGTAA ACTATGACAA TAAAGGCCA TTATCTCAA	600
CGACATCGTG TAATCTTCC ATGTTTATG TATGTTTC AGATATTATG AGATTACTAT	660
AAACTTTTTG TATACTATA TTCCGTAAAC TATATTAATC ATGAAGAAA TGAAGATA	720
TAGAAGCTGT TCACGAGCGG TTGTTGAAA CACAAAATT ATACATTCAA GATGGCTTAC	780
ATATACCTCT GTGAGGCTAT CATGGATAAT GACAATGCAT CTTAAATAG GTTTTGGAC	840
AATGGATTGG ACCCTAACAC GGAATATGGT ACTCTACAAI CTCTCTTGA AATGGCTGA	900
ATGTTCAAGA ATACCGAGGC TATAAAATC TTGATGAGGT ATGGAGCTAA ACCTGTAGTT	960
ACTGAATGCA CAACTTCTG TCTGCATGAT GCGGTGTTGA GAGACGACTA CAAATAGTG	1020
AAAGATCTGT TGAAGATAA CTAATTAAC AATGTTCTTT ACAGCGGAGG CTTTACTCT	1080
TTGTTTGGG CAGCTTACCT TAACAAAGTT AATTGGTTA AACTCTATT GGCTCATTC	1140
GCGATGTAG ATATTTCAA CACGATCGG TTAACCTCT TACTATAGC GATATCAAT	1200
AAAAATTIAA CATGCTTAA ACTTCTATG AACAAAGGTG CAGATACGA CTTGCTGAT	1260
AACATGGGAC GTACTCCTTT AATGATCGCT GTACATCTG GAATATTGA AATATGTAGC	1320
ACACTACTTA AAAAAATAA AATGTCCAGA ACTGGGAAA ATTGATCTTG CCAGCTGTAA	1380
TTCATGCTAG AAAAGAAAG CTGAGGCTAC TTTTCAACAA AGGAGCAGAT GTAACTACA	1440
TCCTTGAAAG AAATGGAAA TCATATACTG TTTTGGAAIT GATTAAAGAA AGTTACTCTG	1500
AGACACAAA GAGGTAGCTG AAGTGGTACT CTCAAATGC AGAAGATGA CTGCGAAGCA	1560
AGAAGTAGAG AAATAACACT TTATGACTTT CTTAGTTGA GAAAGATAG AGATATAATG	1620
ATGGTCATAA ATAACCTGTA TATTGCAAGT AATGCAATA ATAGGTAGA TTTATTTAA	1680
ACGATAGTTA AAAATAGAAA AAAAGATTA AATTGTAGG TTAATATAT ACATAGATC	1740
TTAAATTTA TAAATACGCA TAATAATAA AATGATTAT ACTTATTACC TTCAGAGATA	1800
AAATTTAGA TATTACTTA TTAACTTAT AAGATCTAA AATGCATAAT TTCTAATTA	1860
TGAAGAAAAA GTACATCTG AGCAACCGGT TAGTATATTT TACATGGAG ATTAACGCTC	1920
TATACCGTTC TATGTTTAT GATTCAGATG ATGTTTTAGA AAAGAACTT ATTGAATATG	1980
AAAACTTTA TGAAGATGA GATGACGAG ATGATTATG TTGTAATCT GTTTTAGATG	2040
AAGAAGATGA CCGCTAAAG TATACTATGG TTACAAAGTA TAAGTCTATA CTACTAATGG	2100
CGACTGTGC AAGAAGGTAT AGTATAGTGA AATGTTTGT AGATTATGAT TATGAAAAAC	2160

```

CAAATAAATC AGATCCATAT CTAAGGTAT CTCCTTTCGA CATAATTTC TCTATTCCTA 2220
GTTTAGAATA CTTTTCATTA TATTTGTTA CAGCTGAAGA CGAAAAAAT ATATCGATAA 2280
TAGAAGATTA TGTTAACTCT GCTAATAAGA TGAATTGAA TGAGTCTGTG ATAATAGCTA 2340
TAATCAGAGA AGTTCTAAAA GGAATAAAA ATCTAACTGA TCAGGATATA AAAACATTGG 2400
CTGATGAAT CAACAAGGAG GAAGTGAATA TAGCTAACT ATTGTTAGAT AGAGGGGCCA 2460
AAGTAAATTA CAAGGATGTT TACGGTTCCT CAGCTCTCCA TAGAGCTGCT ATTGGTAGGA 2520
AACAGGATAT GATAAGCTG TTAATCGATC ATGAGGCTGA TGTAACTCT TTAACATTG 2580
CTAAGATAA TCTTATTAA AAAAATAAT ATCAGCTTA GTATATTAA AATATATTAA 2640
TAATCTATT ACTAATACT CCAGTGGATA TGAACATAAT ACGAAGTTA TACTTCTCA 2700
TCAAAATCTT ATTGACATCA AGTTAGATTG TGAAGTGAAG ATTATGAAT TAAGGAATAC 2760
AAAAATAGGA TGTAAGAACT TACTAGAATG TTTTATCAAT AATGATATGA ATACAGTATC 2820
TAGGGCTATA AACATGAA CGATTAAAA TTATAAAAT CATTTCCCTA TATATAATAC 2880
GCTCATAGAA AAATTCATTT CTGAAGTAT ACTAAGACAC GAATTATTGG ATGGAGTTAT 2940
AAATTCCTTT CAAGGATTC AATAAATTT GCCTACGAG ATTCACTACA TTATACTGGA 3000
GAATCTTAAT AACCATGAAC TAAAAAAT TTAGATAAT ATACATTAAA AAGGTAAATA 3060
GATCATCTGT TATTATAAGC AAAGATGCTT GTTCCCAATA ATATACAACA GGTATTTGTT 3120
TTTATTTTAA ACTACATATT TGATGTCAT TCTCTTTATA TAGTATACAC AGAAATTC 3180
TAATCCACTT AGAATTTCTA GTTATCTAG 3209

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 29 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:28:

GCCTCCCGGG AATCTAGCT AGCTAGTT 29

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 46 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:29:

ACTCTCAAAA GCTTCCCGGG AATTCTAGCT AGCTAGTTTT TATAAA 48

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 50 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:30:

GATCTTTATA AAAACTAGCT AGCTAGAATT CCGGGGAAGC TTTTGAGAGT 50

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 71 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:31:

CTGAAATTAT TTCATTATCG CAGTATCGGT TAAGTTGTA TCGTAATGGT TCGTCAGGCT 60
CTCTGTTTG T 71

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:32:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 48 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:32:

CATTACGATA CAAACTTAAC GGATATCGCG ATAATGAAAT AATTTCAG 48

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:33:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 73 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:73:

```
ACCCCTCTG GTTTTCCGT TGTGTTTGG GAAATCCCT ATTACACGA TCCAGACAA 50
OCTTAGATCT CAG 73
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 51 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:34:

```
CTGAGATCTA AGCTGTCTG GGATCGTGTA AATAGGGAAI TTCCAAAAC A 51
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:35:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:35:

```
CAACGGAAAA ADCAGAAGGG GTACAAACAG GAGAGCCTGA GGAAC 45
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:36:

GGATCCCCGG G 11

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 42 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:37:

TTTCTAGACTGCAGCCCG GGACATCATG CAGTGGTTAA AC 42

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:38:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:38:

CACCTTCAGG ATCTACTGTC G 21

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:39:

GGGTTTCAGA GGCAGTTC 18

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:40:

GATTAAACCTAAATAATTGT 20

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:41:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 42 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:41:

TTTTCTAGACTGCAGCCCG GGACATCATG CAGTGGTTAA AC 42

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:42:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:42:

GGGTTTCAGAGGCAGTTC 18

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:43:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:43:

ATGTCGACTC GTGGCGATCT T 21

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:44:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:44:

ACGCATGATG ACAAGATTAT TATC 24

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:45:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:45:

CTGTGGAATT CGCAATGC 18

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:46:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 53 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:46:

AAAAC TGCA G CCGGGAAGC TTACAAAAAT TAGACAAGAT TTGTTTCAGT ATC 53

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:47:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:47:

GGTATGECAA ATTTCITTCAGGGACTCGGG GATGTG 38

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 55 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:48:

CATTATCGCG ATATODETTA AGTTTGTATCGTAATGAGAC GATATAGGAT GGGAC 55

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:49:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:49:

ACTATTTTCAATACTGAC 18

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:50:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:50:

AAATGTGTAC CAOGGGAC 18

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:51:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 54 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:51:

AAGAAGCTTC TGCAGATTTC GTTAACAAAA ATCATTATAA TCGCCGGGGA TGAG 54

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:52:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:52:

TTTATATTGT AATTATA 17

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:53:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:53:

GTAAAACGAC GGCCAGT 17

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:54:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:54:

ATGATGACAC GTCTACATTT T 21

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:55:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:55:

TGTTACATAACGTACTTCAGC 21

Lisboa, 6 de Novembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Composição destinada a induzir uma resposta imunológica compreendendo:

(i) um vírus recombinante da varíola dos canários, que foi modificado de forma a ter uma virulência atenuada no hospedeiro; e que contém um DNA exógeno numa região não essencial do genoma viral, o referido DNA exógeno codificando e expressando pelo menos um epitopo da glicoproteína G da raiva; e

(ii) pelo menos um antígeno suplementar, em que o antígeno suplementar é qualquer um de entre: o antígeno da doença do vírus da esgana canina, antígeno de adenovírus canino tipo 2, antígeno de coronavírus canino, antígeno da parainfluenza canina, antígeno de parvovírus canino ou antígeno da bacterina de *Leptospira canicola-icterohaemorrhagiae*; ou qualquer combinação destes antígenos.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, na qual o vírus da varíola dos canários é uma estirpe de vacina Rentschler que foi atenuada através de mais de 200 passagens seriadas em fibroblastos de embriões de galinha, um lote de partida principal derivado deste foi submetido a quatro purificações de placas sucessivas em agar, a partir das quais um clone de placa foi amplificado por cinco passagens suplementares.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, na qual o vírus da varíola dos canários é um vírus ALVAC recombinante.

4. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, na qual o antígeno do vírus da esgana canina é HA e/ou glicoproteínas de CDV.

5. Composição de acordo com a reivindicação 1, na qual o antígeno suplementar é fornecido a partir de uma composição liofilizada.

6. Composição de acordo com a reivindicação 1, na qual o antígeno suplementar é fornecido por um outro vírus recombinante da composição.

7. Composição de acordo com a reivindicação 1, na qual o antígeno suplementar é fornecido pelo DNA codificador do antígeno suplementar presente no vírus recombinante, o DNA codificando ainda pelo menos um epitopo da glicoproteína G da raiva, que é igualmente expresso.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo qualquer um de entre vírus da esgana canina, antígeno do adenovírus canino tipo 2, antígeno de coronavírus canino, antígeno de parainfluenza canina e antígeno de parvovírus canino.

9. Utilização de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, na preparação de um medicamento para o tratamento imunológico de um indivíduo ou animal ou para induzir uma resposta imunológica num indivíduo ou animal.

10. Utilização de um vírus recombinante da varíola dos canários modificado (i) como definido nas reivindicações 1 a 8 para a preparação de um medicamento compreendendo pelo menos um antigénio suplementar (ii) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, para o tratamento imunológico de um indivíduo ou animal ou para induzir uma resposta imunológica num indivíduo ou animal.

11. Produtos compreendendo um vírus recombinante da varíola dos canários (i) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e pelo menos um antigénio suplementar (ii), como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 para co-administração ou administração sequencial.

Lisboa, 6 de Novembro de 2008

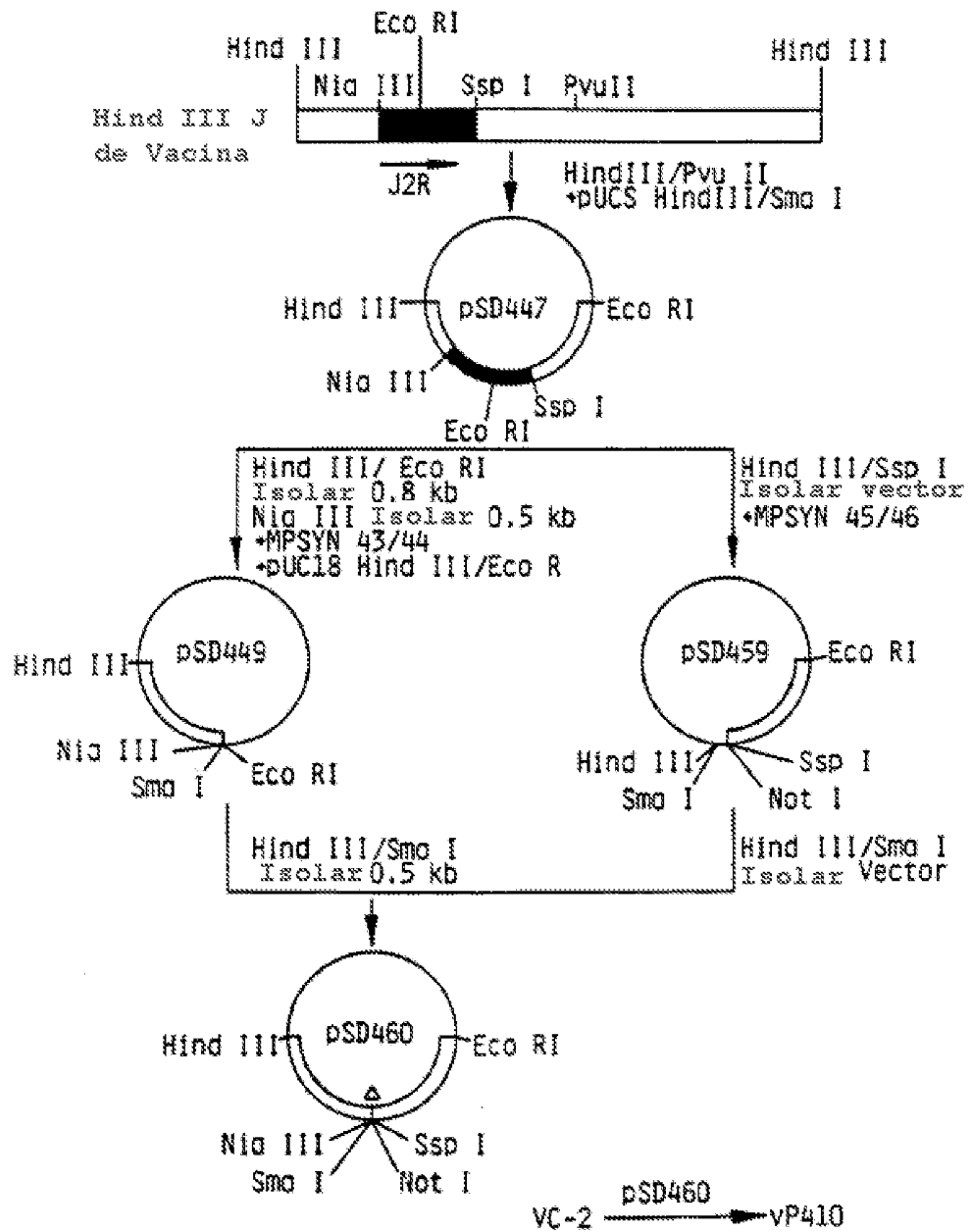


FIG. 1

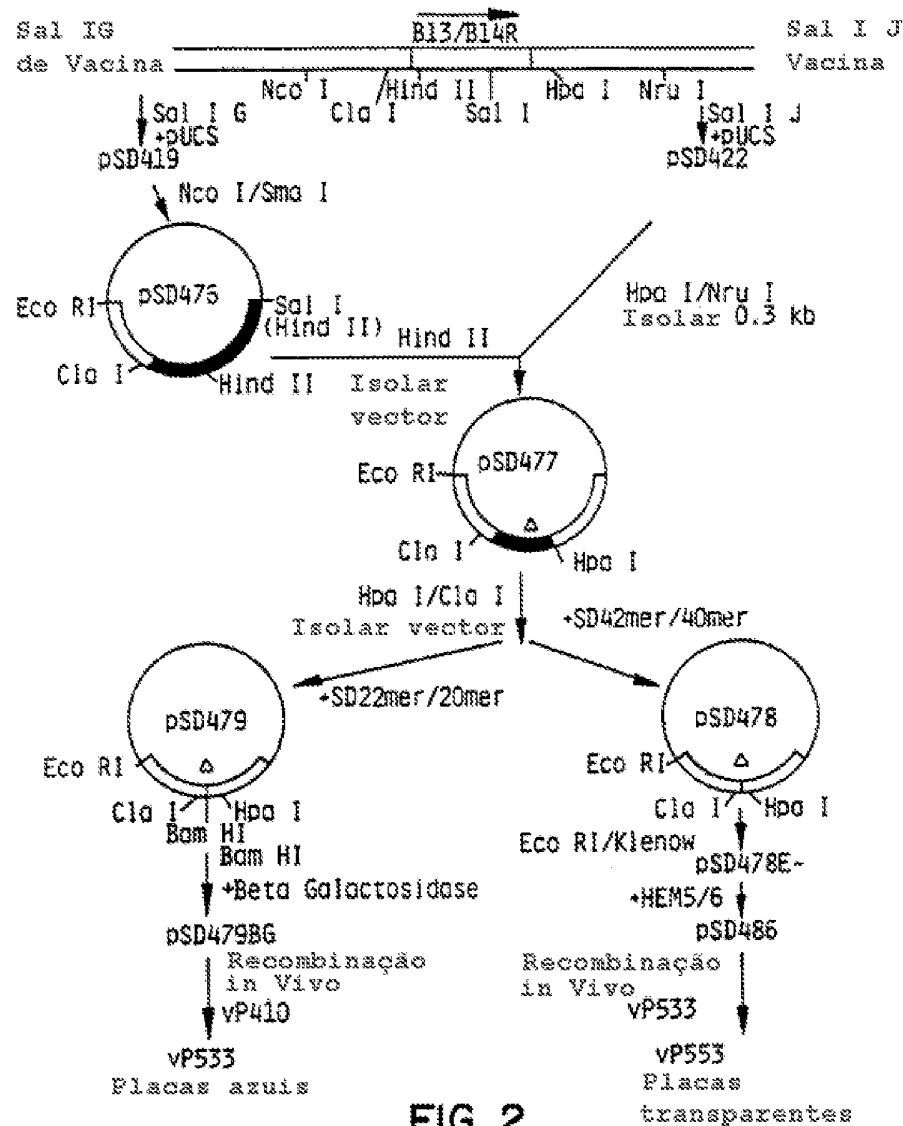


FIG. 2

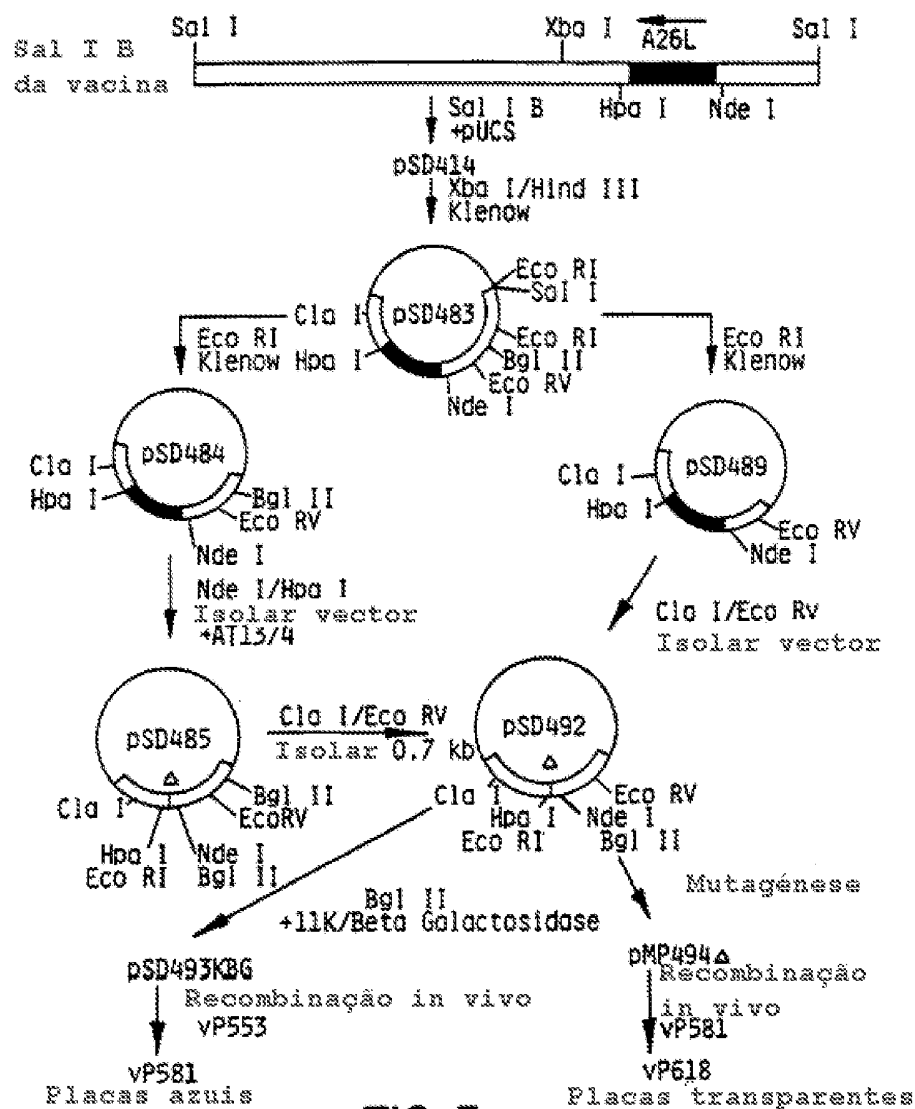


FIG. 3

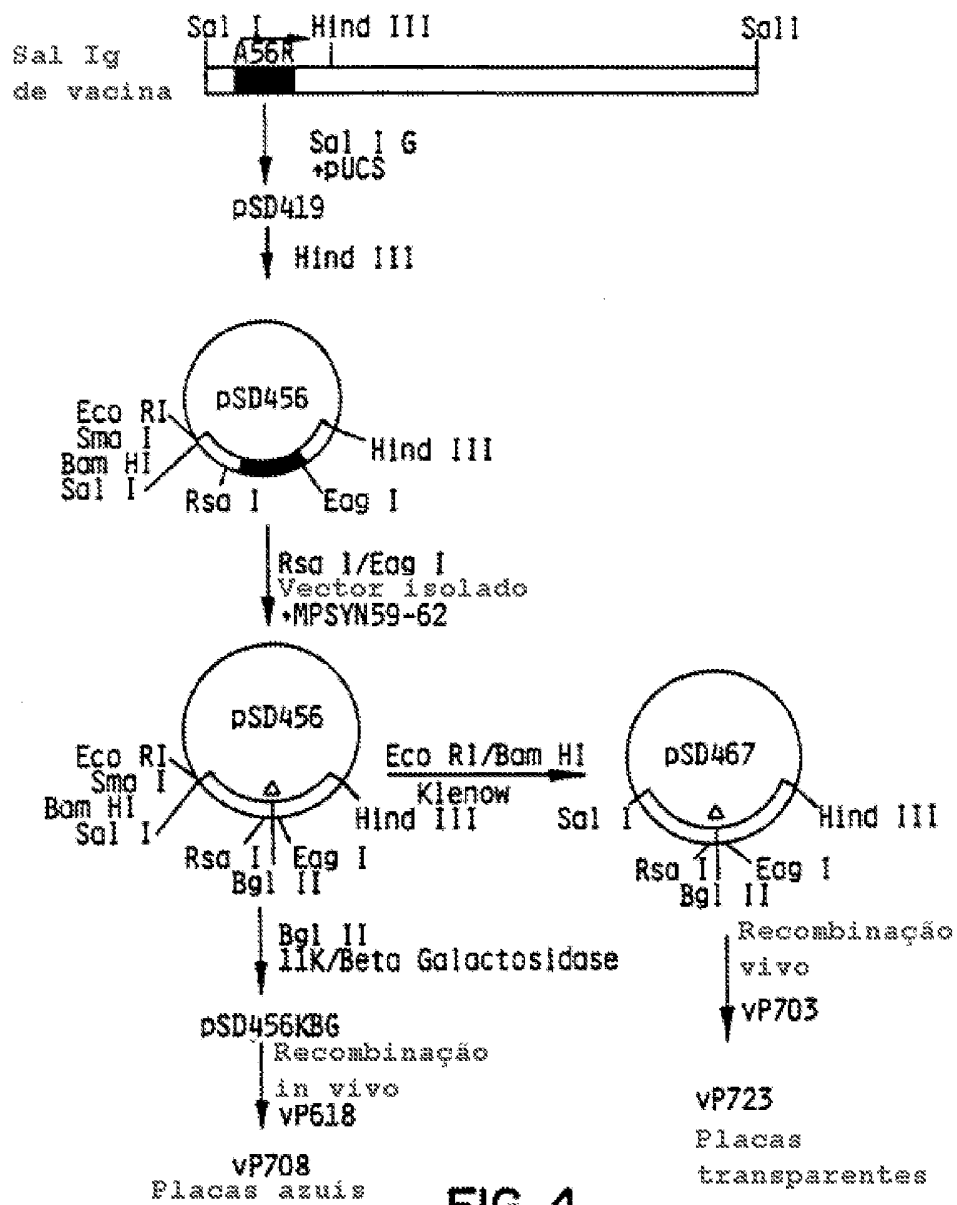
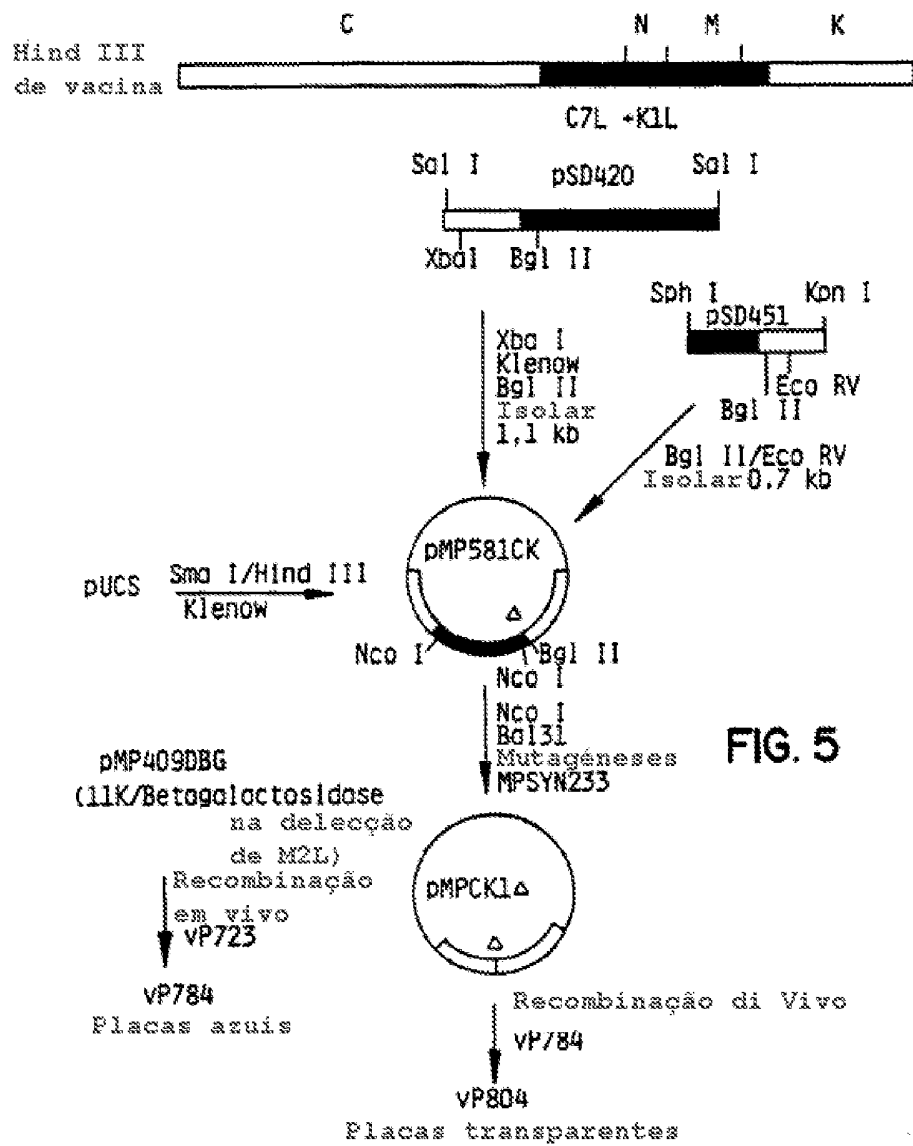


FIG. 4



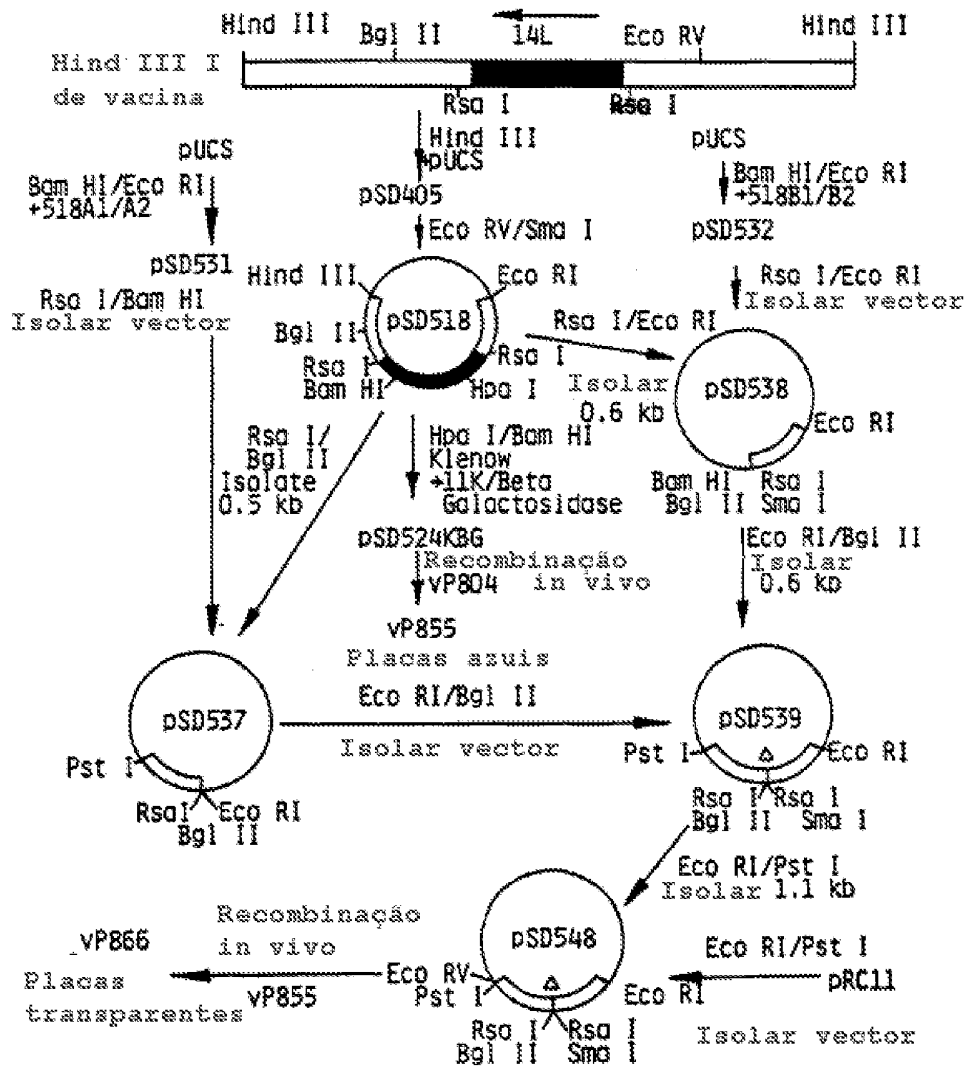
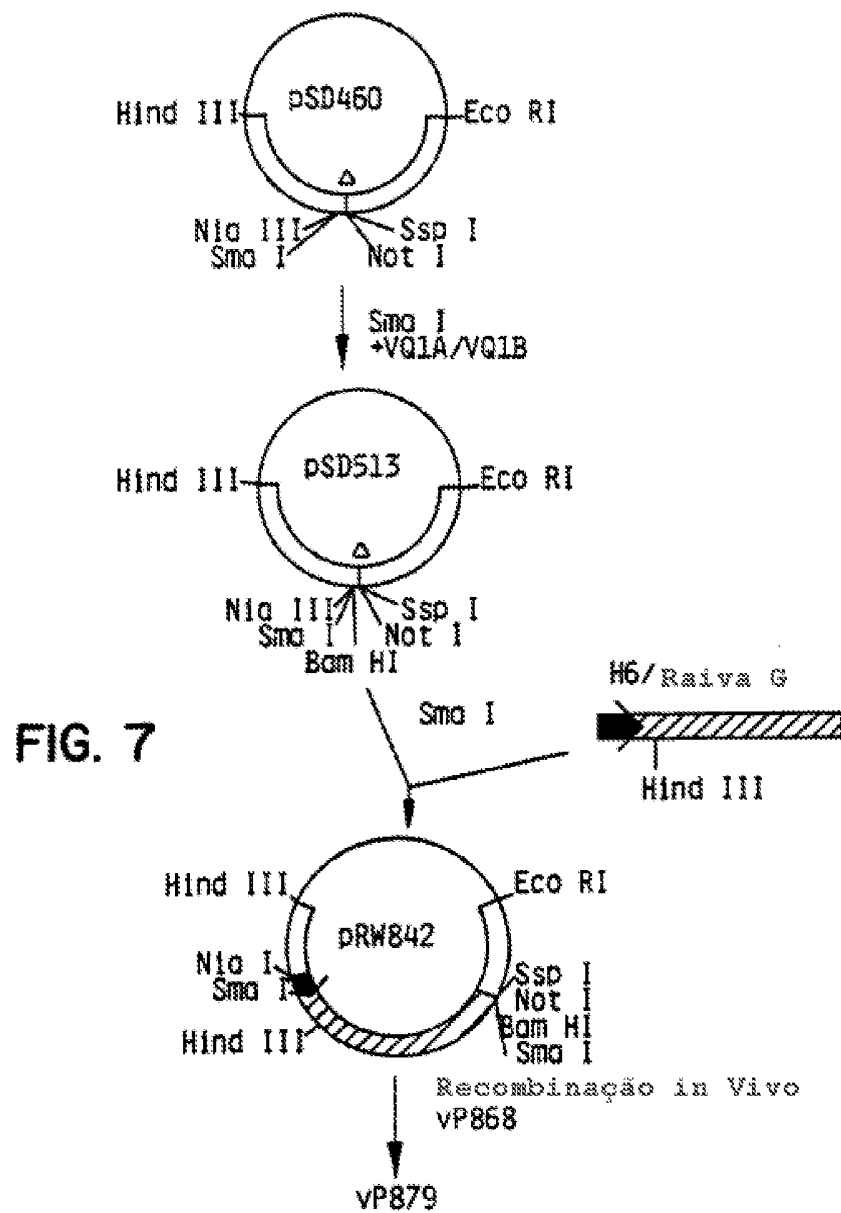


FIG. 6

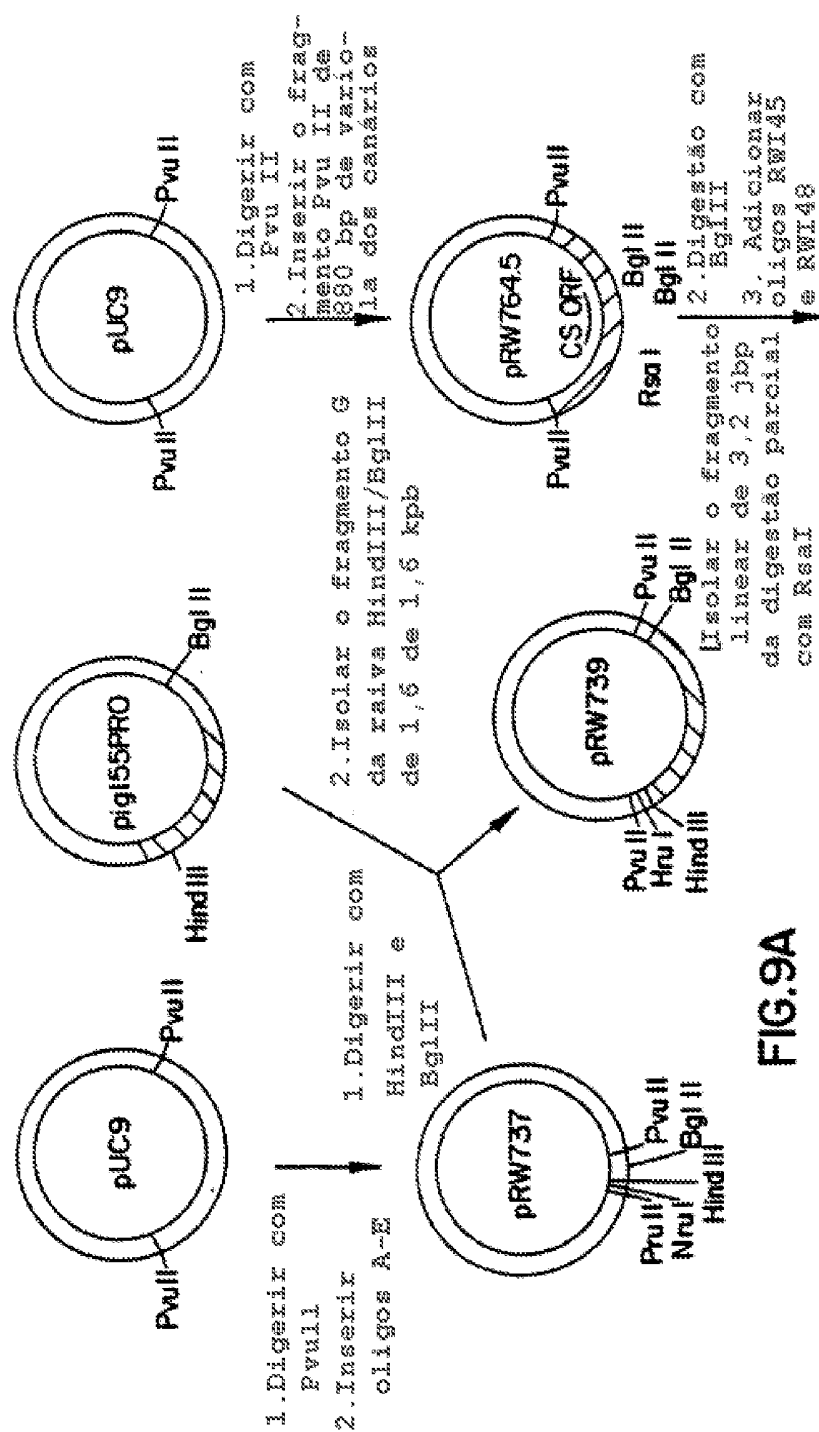


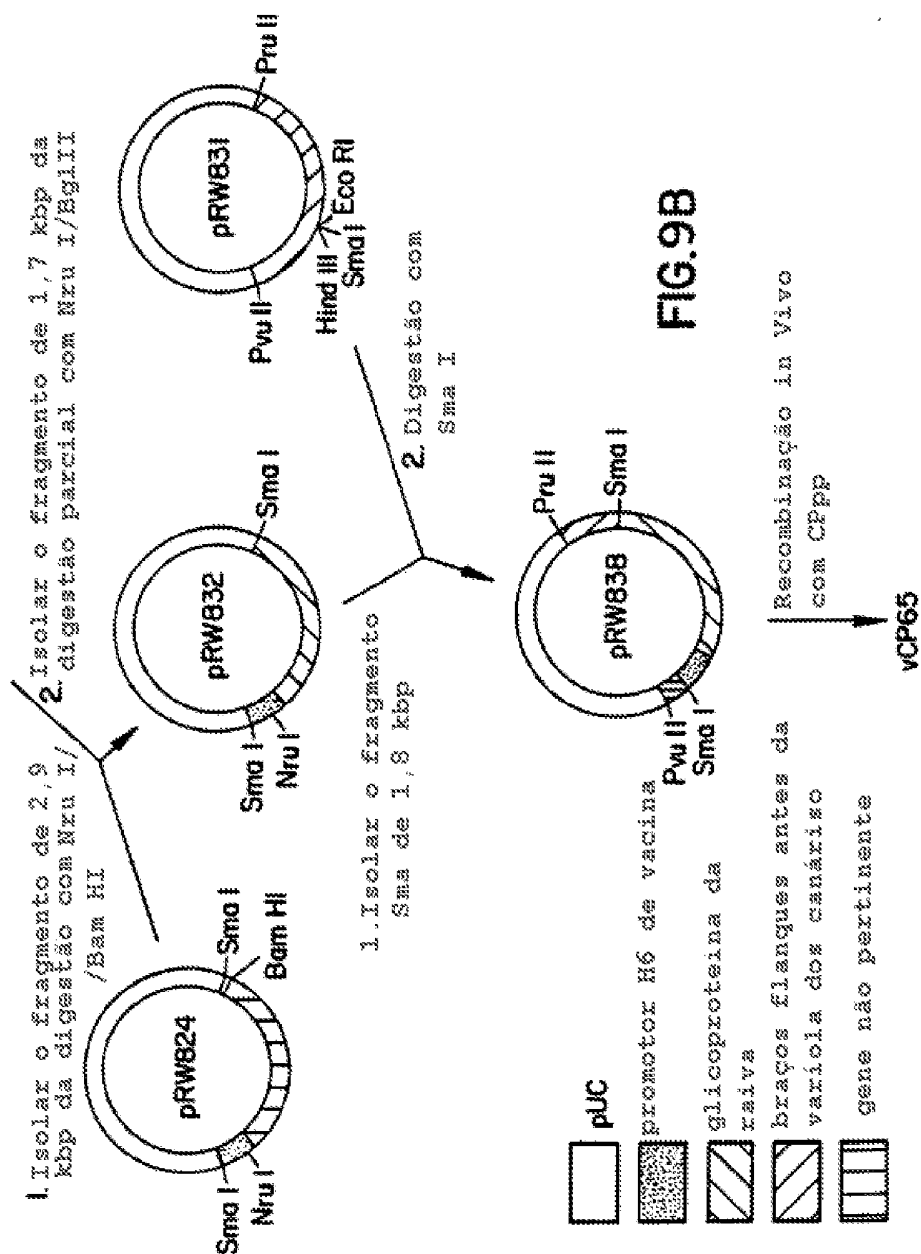
```

1 TGAATGTTAA ATGTTATAC TTGGATGAAG CTATAAATAT GCATTGGAAA AATAATCCAT
61 TTAAGGAAAG GATTCAAATA CTACAAAACC TAAGCGATAA TATGTTAACT AAGCTTATTC
121 TTAACGACGC TTTAAATATA CACAAATAAA CATAAATTTT GTATAACCTA ACAATAAAT
181 AAAACATAAA AATAATAAAA GGAATGTAA TATCGTAATT ATTTTACTCA GGAATGGGGT
241 TAAATATTTA TATCAGGTGT ATATCTATAC TGTTATCGTA TACTCTTTAC AATTACTATT
301 ACCGAATATGC AAGAGATAAT AAGATTACGT ATTTAAGAGA ATCTTGTCAI GATAATTGGG
361 TACGACATAG TGATAAATGC TATTTGSCAT CGTTACATAA AGTCAGTTGG AAAGATGGAT
421 TTGACAGATG TAACCTAATA GGTGCAAAAA TGTTAAATAA CAGCATTCTA TCGGAAGATA
481 GGATACCGAG TATATTATAC AAAAATCACT GGTGGATAA AACAGATTCT GCAATATTGG
541 TAAAAGATGA AGATTACTGC GAATTTGTAA ACTATGACAA TAAAAAGCCA TTTATCTCAA
601 CGACATCGTG TAATTTCTTC ATGTTTTATG TATGTGTTTC AGATATTATG AGATTACTAT
661 AAACCTTTTTG TATACTTATA TTCCGTAAAC TATATTAATC ATGAAGAAAA TGAAAAAGTA
721 TAGAAGCTGT TCACGAGCGG TTGTTGAAAA CAACAAAATT ATACATTCAA GATGGCTTAC
781 ATATACGCTG GTGAGGCTAT CATGGATAAT GACAATGCAT CTCTAAATAG GTTTTGGAC
841 AATGGATTTCG ACCCTAACAC GGAATATGGT ACTCTACAAT CTCCTCTTGA AATGGCTGTA
901 ATGTTCAAGA ATACCGAGGC TATAAAAAATC TTGATGAGGT ATGGAGCTAA ACCTGTAGTT
961 ACTGAATGCA CAACCTCTTG TCTGCATGAT GCGGTGTTGA GAGACGACTA CAAAATAGTG
1021 AAAGATCTGT TGAAGAATAA CTATGTA AACATGTTCTTT ACAGCGGAGG CTTTACTCT
1081 TTGTGTTTGG CAGCTTACCT TAACAAAGTT AATTGGTTA AACTTCTATT GGCTCATTCT
1141 GCGGATGTAG ATATTTCAAA CACGGATCGG TTAACCTCTC TACATATAGC CGTATCAAT
1201 AAAAATTTAA CAATGGTTAA ACTTCTATTG AACAAAGGTG CTGATACTGA CTTGCTGGAT
1261 AACATGGGAC GTACTCCITT AATGATCGCT GTACAATCTG GAAATATTGA AATATGTAGC
1321 ACATCTACTA AAAAAAATAA AATGTCCAGA ACTGGGAAAA ATTGATCTTG CCAGCTGTAA
1381 TTCATGGTAG AAAAGAAGTG CTCAGGCTAC TTTTCAACAA AGGAGCAGAT GTAAACTACA
1441 TCTTTGAAG AAATGGAAAA TCATATACTG TTTTGAATT GATTAAAGAA AGTTACTCTG
1501 AGACACAAAA GAGGTAGCTG AAGTGGTACT CTCAAAATGC AGAACGATGA CTGCGAAGCA
1561 AGAAGTAGAG AAATAACACT TTATGACTTT CTTAGTTGTA GAAAGAGATG AGATATAATG
1621 ATGGTCATAA ATAACTCTGA TATTGCAAGT AAATGCAATA ATAAGTTAGA TTTATTTAAA
1681 AGGATAGTTA AAAATAGAAA AAAAGAGTTA ATTTGTAGGG TTAATAATAC ACATAAGATC
1741 TTAATAATTA TAAATACGCA TAATAATAAA AATAGATTAT ACTTATTACC TTCAGAGATA
1801 AAATTTAAGA TATTACTTA TTTAACTTAT AAAGATCTAA AATGCATAAT TTCTAAATAA
1861 TGAAAAAATA GTACATCATG AGCAACGCGT TAGTATATTT TACAATGGAG ATTAACGCTC
1921 TATACCGTTC TATGTTTATT GATTAGATG ATGTTTTAGA AAAGAAAGTT ATTTGAATATG
1981 AAAACTTTAA TGAAGATGAA GATGACGACG ATGATTATTG TTGTAATCT GTTTTAGATG
2041 AAGAAGATGA CGCGCTAAGG TATACTATGG TTACAAAGTA TAAGTCTATA CTACTAATGG
2101 CGACTTGTGC AAGAAGGTAT AGTATAGTGA AAATGTTGTT AGATTATGAT TATGAAAAAC
2161 CAAATAAATC AGATCCATAT CTAAAGGTAT CTCCTTTGCA CATAAATTTCA TCTATTCTTA
2221 GTTTAGAATA CTTTTCATTA TATTGTTTA CAGCTGAAGA CGAAAAAAT ATATCGATAA
2281 TAGAAGATTA TGTTAACTCT GCTAATAAGA TGAAATTGAA TGAGTCTGTG ATAATAGCTA
2341 TAATCAGAGA AGTTCTAAAA GGAATAAATA ATCTAACTGA TCAGGATATA AAAACATTGG
2401 CTGATGAAT CAACAAGGAG GAACCTGAATA TAGCTAAACT ATTTGTAGAT AGAGGGGCCA
2461 AAGTAAATTA CAAGGATGTT TACGGTTCCT CAGCTCTCCA TAGAGCTGCT ATTTGGTAGGA
2521 AACAGGATAT GATAAAGCTG TTAATCGATC ATGGAGCTGA TGTAACTCT TTAACATTATG
2581 CTAAGAGATA TCTTATTAAA AAAAAATAT ATCAGCTTTA GTAATATTAA AATATATTAA
2641 TAACTCTATT ACTAATAACT CCAGTGGATA TGAACATAAT ACGAAGTTTA TACATTCTCA
2701 TCAAAATCTT ATTGACATCA AGTTAGATTG TGAAATGAG ATTTATGAAAT TAAGGAATAC
2761 AAAAAATAGGA TGTAAGAAGT TACTAGAATG TTTTATCAAT AATGATATGA ATACAGTATC
2821 TAGGGCTATA AACAATGAAA CGATTAAAAA TTATAAAAAAT CATTCCCTA TATATAATAC
2881 GCTCATAGAA AAATTCATTT CTGAAAGTAT ACTAAGACAC GAATTTATGG ATGGAGTTAT
2941 AAATCTTTT CAAGGATTCA ATAATAAAT GCCTTACGAG ATTCAGTACA TTACTGGA
3001 GAACTTTAAT AACCATGAAC TAAAAAAT TTTAGATAAT ATACATTAAA AAGGTAAATA
3061 GATCATCTGT TATTATAAGC AAAGATGCTT GTTGCCAATA ATATACAACA GGTATTGTG
3121 TTTATTTTAA ACTACATATT TGATGTTTCT TCTCTTTATA TAGTATACAC AGAAATTTCA
3181 TAATCCACTT AGAATTTCTA GTTATCTAG

```

FIG.8





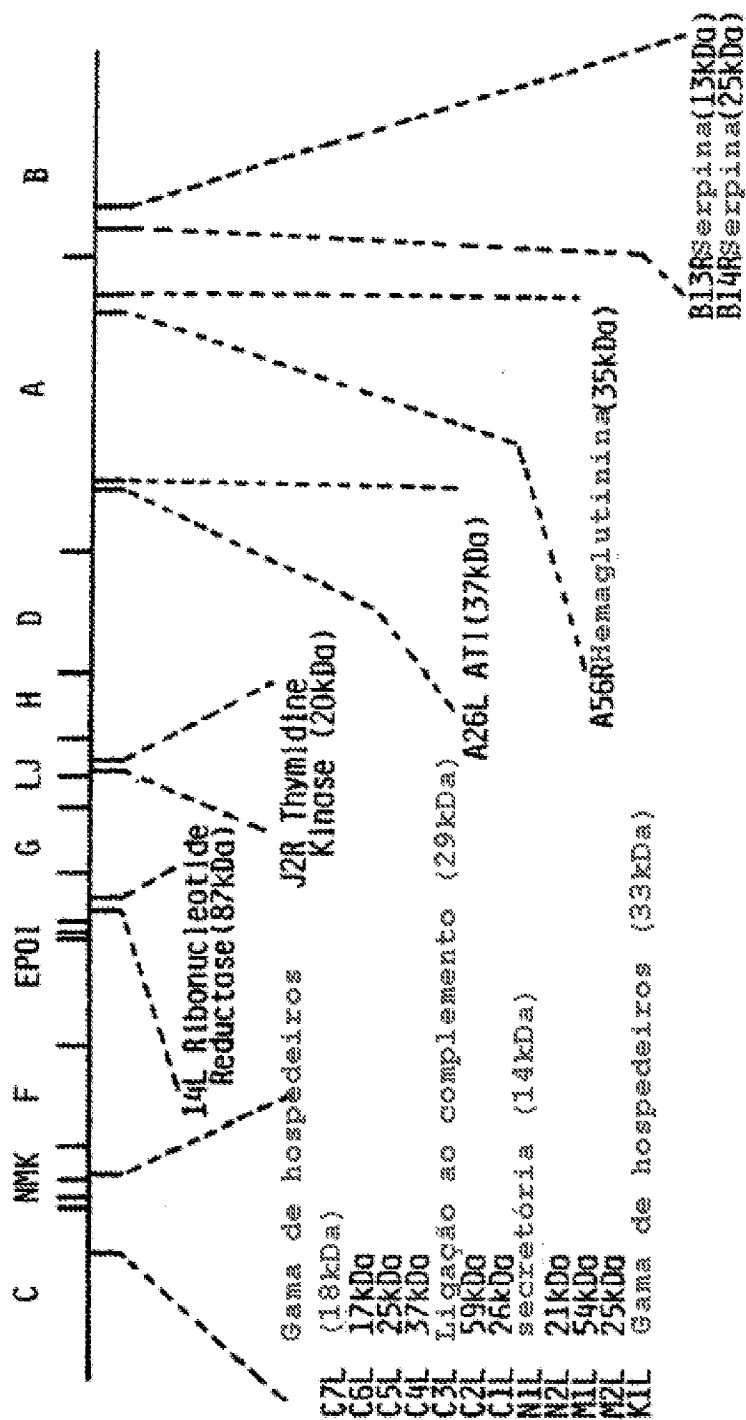


FIG.10

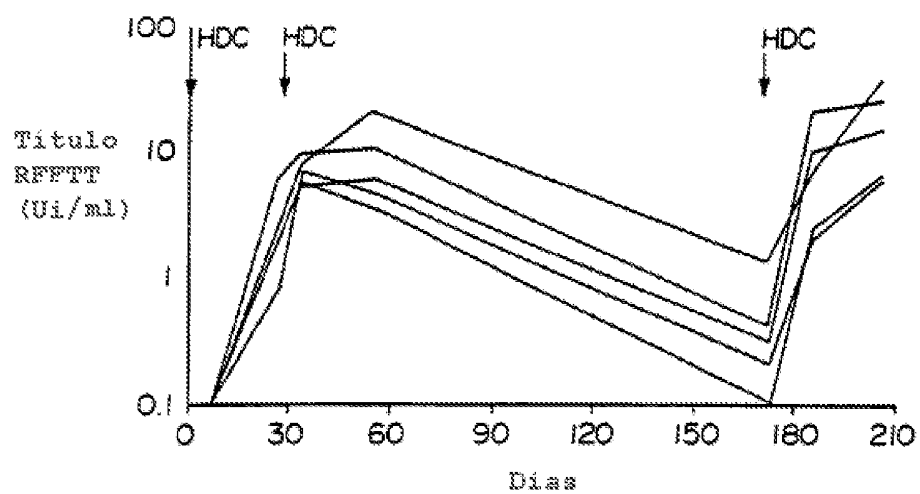


FIG. IIA

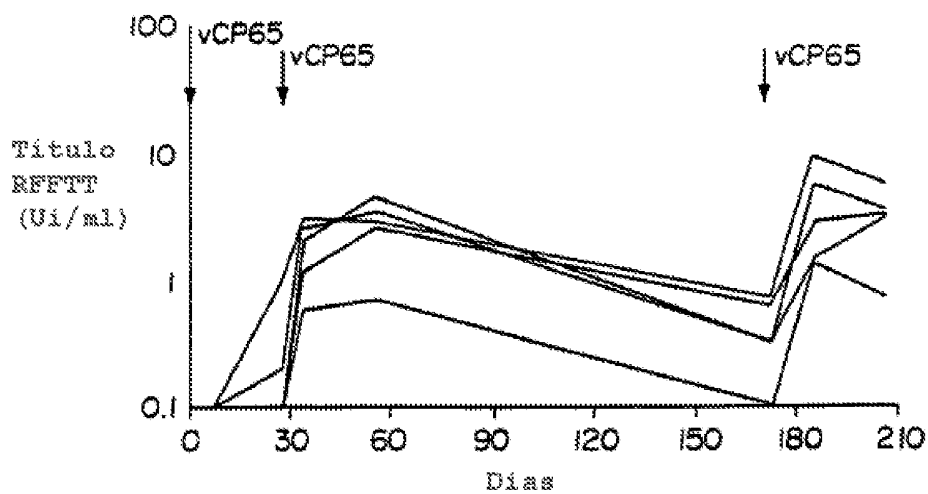


FIG. IIC

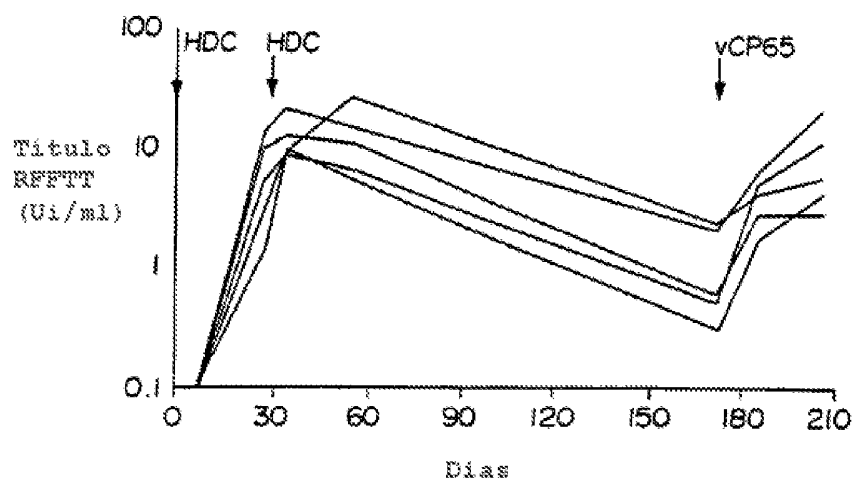


FIG.IIB

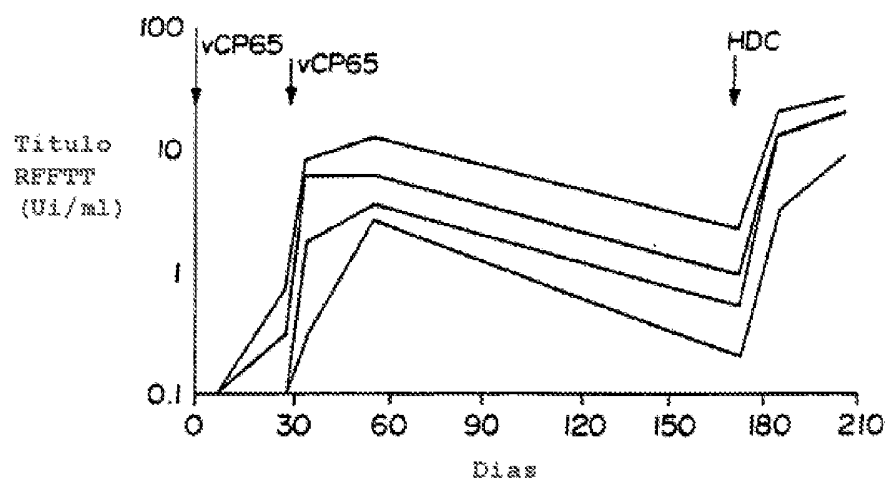


FIG.IID

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * US 4769330 A
- * US 4603112 A
- * US 5338683 A
- * WO 9526751 A
- * WO 9527780 A
- * US 4196265 A, Koprowski, H.
- * US 4376110 A, David, G. and Greene, H.
- * US 5364773 A
- * US SN08105483 A
- * US SN07502834 A
- * US SN08416616 A
- * US 08486969 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 1985
- MILSTEIN, C. *Scientific American*, 1990, vol. 243 (66), 70
- ABIMIKU, A.; FRANCHINI, G.; TARTAGLIA, J.; ALDRICH, K.; MYAGKIKH, M.; MARKHAM, PD.; CHONG, P.; KLEIN, M.; KIENY, M.; PAOLETTI, E. *Highly attenuated HIV-1 recombinant poxviruses induce cross-protection against HIV-2 challenge in rhesus macaques*
- ALTENBURGER, W.; C-P. SUTER; J. ALTENBURGER. *Archives Viro.*, 1989, vol. 105, 15-27
- ARP, J.; FORD, C.M.; FALKER, T.J.; KING, E.E.; DEKABAN, G.A. *J. Gen. Virol.*, 1993, vol. 74, 211-220
- AVERY, R.J.; J. NIVEN. *Infect. and Immun.*, 1979, vol. 26, 795-801
- BARRE-SIUNOUSSI, F.; CHERMAN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GREUST, J.; DAUGUET, C.; ALEXER-BLIN, C.; VEINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C. *Science*, 1983, vol. 220, 868-870
- BEHBEHANI, A.M. *Microbiological Reviews*, 1983, vol. 47, 455-509
- BENSON, J.; TSCHACHLER, E.; GESSAIN, A.; YANAGIHARA, R.; GALLO, R.C.; FRANCHINI, G. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1994, vol. 10, 91-96
- BERGON, M.; DALES, S. *Comparative Virology*. Academic Press, 1971, 169-205
- BERMAN, P.; GREGORY, T.; RIDDLE, L.; NAKAMURA, G.; CHAMPE, M.; PORTER, J.; WURM, F.; HERSHBERG, R.; COBB, E.; EICHBERG, J. *Nature*, 1990, vol. 345, 622-625
- BERTHOLET, C.; DRILLIEN, R.; WITTEK, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 2096-2100
- BOURSNEILL, M.E.G.; P.F. GREEN; J.I.A. CAMPBELL; A. DEUTER; R.W. PETERS.; F.M. TOMLEY; A.C.R. SAMSON; P. CHAMBERS; P.T. EMMERSON; M.M. BINNS. *J. Gen. Virol.*, 1990, vol. 71, 621-628
- BOURSNEILL, M.E.G.; P.F. GREEN; J.I.A. CAMPBELL; A. DEUTER; R.W. PETERS; F.M. TOMLEY; A.C.R. SAMSON; P.T. EMMERSON; M.M. BINNS. *Veterinary Microbiology*, 1990, vol. 23, 305-316
- BOURSNEILL, M.E.G.; P.F. GREEN; A.C.R. SAMSON; J.I.A. CAMPBELL; A. DEUTER; R.W. PETERS; N.S. MILLAR; P.T. EMMERSON; M.M. BINNS. *Virology*, 1990, vol. 178, 297-300
- BULLER, R.M.L.; G.L. SMITH; CREMER, K.; NOTKINS, A.L.; MOSS, B. *Nature*, 1985, vol. 317, 813-815
- BULLER, R.M.L.; CHAKRABARTI, S.; COOPER, J.A.; TWARDZIK, D.R.; MOSS, B. *J. Virol.*, 1988, vol. 62, 866-874
- CADOZ, M.; A. STRADY; B. MEIGNIER; J. TAYLOR; J. TARTAGLIA; E. PAOLETTI; S. PLOTKIN. *The Lancet*, 1992, vol. 339, 1429
- CARDOSO, E.A.; ROBERT-GUROFF, M.; FRANCHINI, G.; GARTNER, S.; MOURA-NUNES, J.F.; GALLO, R.C.; TERRINHA, A.M. *Int. J. Cancer*, 1989, vol. 43, 195-200
- CHAMBERS, P.; N.S. MILLAR; P.T. EMMERSON. *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 67, 2685-2694
- CHILD, S.J.; PALUMBO, G.J.; BULLER, R.M.L.; HRUBY, D.E. *Virology*, 1990, vol. 174, 625-629
- CLARK, N.; KUSHNER, N.; BARRETT, C.B.; KENSIL, C.R.; SALSBURY, D.; COTTER, J. *Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, vol. 199, 1433-1443
- CLEWELL, D.B.; D.R. HELINSKI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, vol. 62, 1159-1166

- CLEWELL, D.B. *J. Bacteriol.*, 1972, vol. 110, 667-676
- COLINAS, R.J. ; R.C. CONDIT ; E. PAOLETTI. *Virus Research*, 1990, vol. 18, 49-70
- COONEY, E.L. ; CORRIER, A.C. ; GREENBERG, P.D. et al. *Lancet*, 1991, vol. 337, 567-572
- COX, W.I. ; TARTAGLIA, J. ; E. PAOLETTI. *Virology*, 1993, vol. 195, 845-850
- DAGLESH, A. ; CHAMPAGNE, E. ; CHAMARET, S. ; GRUEST, J. ; GUETARD, D. ; HERCENT, T. ; GLUCKMAN, J.C. ; MONTAGNIER, L. *Nature*, 1984, vol. 312, 767-770
- DE ROSSI, A. ; ALDOVINI, A. ; FRANCHINI, G. ; MANN, D. ; GALLO, R.C. ; WONG-STAAI, F. *Virology*, 1985, vol. 163, 640-645
- DREYFUSS, G. ; ADAM, S.A. ; CHOI, Y.D. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, vol. 4, 415-423
- DRILLIEN, R. ; KOCHREN, F. ; KIRN, A. *Virology*, 1981, vol. 111, 488-499
- EARL, P.L. ; MOSS, B. ; MORRISON, R.P. ; WEHRLY, K. ; NISHLO, J. ; CHESEBRO, B. *Science*, 1986, vol. 234, 728-731
- EDBAUER, C. ; R. WEINBERG ; J. TAYLOR ; A. REY-SENELONGE ; J.F. BOUQUET ; P. DESMETTRE ; E. PAOLETTI. *Virology*, 1990, vol. 179, 901-904
- EMINI, E. ; SCHLEIF, W. ; NUNBERG, J. ; CONLEY, A. ; EDA, Y. ; TOKIYOSHI, S. ; PUTNEY, S. ; MATSUSHITA, S. ; COBB, K. ; JETT, C. *Nature*, 1992, vol. 355, 728-730
- ENGELKE, D.R. ; HOENER, P.A. ; COLLINS, F.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 544-548
- ESPION, D. ; S. DEHENAU ; C. LETELLIER ; C.-D. WEMERS ; R. BRASSEUR ; J.F. YOUNG ; M. GROSS ; M. ROSENBERG ; G. MEULEMANS ; A. BURNY. *Arch. Virol.*, 1987, vol. 95, 79-95
- FENNER, F. *Virology*, 1958, vol. 5, 502-529
- FLEXNER, C. ; HUGEN, A. ; MOSS, B. *Nature*, 1987, vol. 330, 259-262
- FRANCHINI, G. ; ROBERT-GUROFF, M. ; TARTAGLIA, J. ; AGGARWAL, A. ; ABIMIKU, A. ; BENSON, J. ; MARKHAM, P. ; LIMBACH, K. ; HURTEAU, G. ; FULLEN, J. *Highly attenuated HIV-2 recombinant poxviruses, but not HIV-2 recombinant salmonella vaccines, induce long lasting protection in rhesus macaques*
- FRIES et al. *32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, October 1992
- FULTZ, P. ; NARA, P. ; BARRE-SINOUSSE, F. ; CHAPUT, A. ; GREENBERG, M. ; MUCHMORE, E. ; KIENY, M.-P. ; GIRARD, M. *Science*, 1992, vol. 258, 1687-1689
- FUNAHASHI, S. ; T. SATO ; H. SHIDA. *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69, 35-47
- GALLO, R.C. *Sci. Am.*, 1987, vol. 256, 47-56
- GALLO, R.C. *Sci. Am.*, 1986, vol. 255, 88-99 [0451]
- GARTEN, W. ; KOHAMA, T. ; H.-D. KLENK. *J. Gen. Virol.*, 1980, vol. 51, 207-211
- GESSAIN, A. ; GALLO, R.C. ; FRANCHINI, G. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, 2286-2295
- GESSAIN, A. ; BOERI, E. ; YANAGIHARA, R. ; GALLO, R.C. ; FRANCHINI, G. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 1015-1023
- GHENDON, Y.Z. ; CHERNOS, V.I. *Acta Virol.*, 1984, vol. 8, 359-368
- GILLARD, S. ; SPEHNER, D. ; DRILLIEN, R. ; KIRN, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 5573-5577
- GIRARD, M. ; KIENY, M.-P. ; PINTER, A. ; BARRE-SINOUSSE, F. ; NARA, P. ; KOLBE, R. ; KUSUL, K. ; CHAPUT, A. ; REINHART, T. ; MUCHMORE, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 542-546
- GOEBEL, S.J. ; JOHNSON, G.P. ; PERKUS, M.E. ; DAVIS, S.W. ; WINSLOW, J.P. ; PAOLETTI, E. *Virology*, 1990, vol. 179, 247-266
- GOEBEL, S.J. ; G.P. JOHNSON ; M.E. PERKUS ; S.W. DAVIS ; J.P. WINSLOW ; E. PAOLETTI. *Virology*, 1990, vol. 179, 517-563
- GOLDING, H. ; ROBEY, F. ; GATES, F. ; LINDER, W. ; BENING, P. ; HOFFMAN, T. ; GOLDING, B. *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 167, 914-923
- GOLDING, H. ; SHEARER, G. ; HILLMAN, K. ; LUCAS, P. ; MANISCHEWITZ, J. ; ZAJAC, R. ; CLERICI, M. ; GRESS, R. ; BOSWELL, R. ; GOLDING, B. *J. Clin. Invest.*, 1989, vol. 83, 1430-1435
- GOLDSTEIN, D.J. ; S.K. WELLER. *Virology*, 1988, vol. 166, 41-51
- GUO, P. ; GOEBEL, S. ; DAVIS, S. ; PERKUS, M.E. ; LANGUET, B. ; DESMETTRE, P. ; ALLEN, G. ; PAOLETTI, E. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 4189-4198
- GUO et al. *J. Virol.*, 1990, vol. 64, 2398-2406 [0451]
- HAMMOND, S. ; BOLLINGER, R. ; STANHOPE, P. ; QUINN, T. ; SCHWARTZ, D. ; CLEMENTS, M. ; SILICIANO, R. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 176, 1531-1542
- HASELTINE, W. ; TERWILLIGER, E.F. ; ROSEN, C.A. ; SODROWSKI, J.G. *Retrovirus Biology Human Disease*. Marcel Dekker, 1989, 241-270
- HINUMA, Y. ; NAGATA, K. ; HANAOKA, M. ; NAKAI, M. ; MATSUMOTO, T. ; KINOSHITA, K. ; SHIRAKAWA, S. ; MIYOSHI, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 6478-6480
- HOMMA, M. ; M. OHUCHI. *J. Virol.*, 1973, vol. 12, 1457-1465
- HRUBY, D.E. ; R.A. MAKI ; D.B. MILLER ; L.A. BALL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 3411-3415
- HRUBY, D.E. ; L.A. BALL. *J. Virol.*, 1982, vol. 43, 403-409

- * HU, S.-L. ; ABRAMS, K. ; BARBER, G. ; MORN, P. ; ZARLING, J. ; LANGLOIS, A. ; KULLER, L. ; MORTON, W. ; BENVENISTE, R. *Science*, 1992, vol. 255, 458-459
- * ICHIHASHI, Y. ; DALES, S. *Virology*, 1971, vol. 46, 533-543
- * ISSEL, C.J. ; HOROHOF, D.W. ; LEA, D.F. ; ADAMS, JR., W.V. ; HAGLUS, S.D. ; MCMANUS, J.M. ; ALLISON, A.C. ; MONTELARO, R.C. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, 3398-3408
- * ITAMURA, S. ; H. INUMA ; H. SHIDA ; Y. MORIKAWA ; K. NEROME ; A. OYA. *J. Gen. Virol.*, 1990, vol. 71, 2859-2865
- * JACOBSON, J.G. ; D.A. LEIB ; D.J. GOLDSTEIN ; C.L. BOGARD ; P.A. SCHAFER ; S.K. WELLER ; D.M. COEN. *Virology*, 1989, vol. 173, 276-283
- * JAMIESON, A.T. ; G.A. GENTRY ; J.H. SUBAK-SHARPE. *J. Gen. Virol.*, 1974, vol. 24, 465-490
- * KALYANARAMAN V.S. ; SARNGADHARAN M.G. ; ROBERT-GUROFF M. ; MIYOSHI I. ; BLAYNEY D. ; GOLDE D. ; GALLO R.C. *Science*, 1982, vol. 218, 571-573
- * KATO, S. ; M. TAKAHASHI ; S. KANEYAMA ; J. KAMAHARA. *Eiken's*, 1959, vol. 2, 353-363
- * KIENY, M.P. ; LATHE, R. ; DRILLIEN, R. ; SPEHNER, D. ; SKORY, S. ; SCHMITT, D. ; WIKTOR, T. ; KOPROWSKI, H. ; LECOCQ, J.P. *Nature (London)*, 1984, vol. 312, 163-166
- * KIYOKAWA T. ; SEKI M. ; IWASHITA S. ; IMAGAWA K. ; SHIMIZU F. ; YOSHIDA M. *Proc. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 8369-8363
- * KLASSE, P. ; PIPOKORN, R. ; BLONBERG, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5225-5229
- * KNAUF, V.C. ; NESTER, E.W. *Plasmid*, 1982, vol. 8, 45-54
- * KOMOURIAN, F. ; PELLOQUIN, F. ; THE, G. *J. Virol.*, 1991, vol. 65, 3770-3778
- * KORALNIK, I.J. ; FULLEN, J. ; FRANCHINI, G. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 2360-2366
- * KONISHI et al. *Virology*, 1992, vol. 190, 454-458
- * KOTWAL, G.J. ; MOSS, B. *Nature (London)*, 1988, vol. 335, 176-178
- * KOTWAL, G.J. ; MOSS, B. *Virology*, 1988, vol. 167, 524-537
- * KOTWAL, G.J. ; S.N. ISAACS ; R. MCKENZIE ; M.M. FRANK ; B. MOSS. *Science*, 1990, vol. 250, 827-830
- * KOTWAL, G.J. ; A.W. HUGIN ; B. MOSS. *Virology*, 1989, vol. 171, 579-587
- * KOTWAL, G.J. ; B. MOSS. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 600-606
- * LAI, C.K. ; B.G. POGO. *Virus Res.*, 1989, vol. 12, 239-250
- * LAROSA, G.L. ; DAVIDE, J.P. ; WEINHOLD, K. ; WATERBURY, J.A. ; PROFY, A.T. ; LEWIS, J.A. ; LANGLOIS, A.J. ; DREESMAN, G.R. ; BOSWELL, R.N. ; SHADDUCK, P. *Science*, 1990, vol. 249, 932-935
- * LE, L. ; R. BRASSEUR ; C. WEMERS ; G. MEULEMANS ; A. BURNY. *Virus Genes*, 1988, vol. 1, 333-350
- * MANDECKI, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 7177-7182
- * MANIATIS, T. ; FRITSCH, E.F. ; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982
- * MATTHEWS, R.E.F. *Intervirology*, 1982, vol. 17, 42-44
- * MCGINNIS, L.W. ; T.G. MORRISON. *Virus Research*, 1986, vol. 5, 343-356
- * MERZ, D.C. ; A. SCHEID ; P. CHÖPPIN. *J. Exper. Med.*, 1980, vol. 151, 275-288
- * MILLER, M. ; WARMERDAM, M. ; GASTON, I. ; GREENE, W. ; FEINBERG, M. *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 179, 101-113
- * MIYAZAWA, M. ; NISHIO, J. ; CHEESEBRO, B. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, 4497-4507
- * MIYOSHI, I. ; KUBONISHI, I. ; YOSHIMOTO, S. ; AKAGI, T. ; OHTSUKI, Y. ; SHIRAISHI, Y. ; NAGATA, K. ; HINUMA, Y. *Nature*, 1981, vol. 294, 770-771
- * MIYOSHI, I. ; YOSHIMOTO, S. ; KUBONISHI, I. ; FUJISHITA, M. ; OHTSUKI, Y. ; YAMASHITA, M. ; YAMATO, K. ; HIROSE, S. ; TAGUCHI, H. ; NIITYA, K. *Int. J. Canc.*, 1985, vol. 35, 81-85
- * MORGAN, A.J. ; M. MACKETT ; S. FINERTY ; J.R. ARRAND ; F.T. SCULLION ; M.A. EPSTEIN. *J. Med. Virol.*, 1988, vol. 25, 189-195
- * MOSS, B. ; E. WINTERS ; J.A. COOPER. *J. Virol.*, 1981, vol. 40, 387-395
- * NAGAI, Y. ; H.D. KLENK ; R. ROTT. *Virology*, 1976, vol. 72, 494-508
- * NAGAI, Y. ; T. YOSHIDA ; M. HAMAGUCHI ; H. NARUSE ; M. HNUMA ; K. MAENO ; T. MATSUMOTO. *Microbiol. Immunol.*, 1980, vol. 24, 173-177
- * NAKAMURA S. ; HAYAMI M. ; OHTA Y. ; ISHIKAWA K. ; TSUJIMOTO H. ; KIWOKAWA T. ; YOSHIDA M. ; SASAGAWA A. ; HONJO S. *Int. J. Cancer*, 1987, vol. 40, 403-408
- * NORRBY, E. ; Y. GOLLMAR. *Infect. and Immun.*, 1975, vol. 11, 231-239
- * OGAWA, R. ; N. YANAGIDA ; S. SAEKI ; S. SAITO ; S. OHKAWA ; H. GOTOH ; K. KOBAMA ; K. KANOGAWA ; K. SAWAGUCHI ; Y. IRITANI. *Vaccine*, 1990, vol. 8, 486-490
- * PAEZ, E. ; DALLO, S. ; ESTEBAN, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3365-3369
- * PAINE, E. ; GARCIA, J. ; PHILPOTT, T.C. ; SHAW, G. ; RATNER, L. *Virology*, 1991, vol. 182, 111-123

- PALUMBO, G.J. ; PICKUP, D.J. ; FREDRICKSON, T.N. ; MCINTYRE, L.J. ; BULLER, R.M.L. *Virology*, 1989, vol. 172, 262-273
- PANICALI, D. ; E. PAOLETTI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 79, 4927-4931
- * PANICALI, D. ; DAVIS, S.W. ; MERCER, S.R. ; PAOLETTI, E. *J. Virol.*, 1991, vol. 37, 1000-1010
- * PATEL, D.D. ; PICKUP, D.J. *EMBO*, 1987, vol. 6, 3787-3794
- * PATEL, D.D. ; RAY, C.A. ; BRUCKER, R.P. ; PICKUP, D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 9431-9435
- PEDERSEN, N.C. ; JOHNSON, L. ; BIRCH, D. ; THEILEN, G.H. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1986, vol. 11, 123-148
- PERKUS, M.E. ; GOEBEL, S.J. ; DAVIS, S.W. ; JOHNSON, G.P. ; LIMBACH, K. ; NORTON, E.K. ; PAOLETTI, E. *Virology*, 1990, vol. 179, 276-286
- * PERKUS, M.E. ; S.J. GOEBEL ; S.W. DAVIS ; G.P. JOHNSON ; E.K. NORTON ; E. PAOLETTI. *Virology*, 1991, vol. 180, 406-410
- * PERKUS, M.E. ; LIMBACH, K. ; PAOLETTI, E. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 3829-3836
- * PERKUS, M.E. ; A. PICCINI ; B.R. LIPINSKAS ; E. PAOLETTI. *Science*, 1985, vol. 229, 981-984
- PERKUS, M.E. ; D. PANICALI ; S. MERCER ; E. PAOLETTI. *Virology*, 1986, vol. 152, 285-297
- PICCINI, A. ; M.E. PERKUS ; E. PAOLETTI. *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 153, 545-563
- PICKUP, D.J. ; B.S. INK ; B.L. PARSONS ; W. HU ; W.K. JOKLIK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6817-6821
- PICKUP, D.J. ; B.S. INK ; W. HU ; C.A. RAY ; W.K. JOKLIK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 7698-7702
- * POIESZ, B.J. ; RUSCETTI, F.W. ; GAZDAR, A.F. ; BUNN, P.A. ; MINNA, J.D. ; GALLO, R.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 7415-7419
- * POPOVIC, M. ; SARNGADHARAN, M.G. ; READ, E. ; GALLO, R.C. *Science*, 1984, vol. 224, 497-500
- REED, J. ; MUENCH, H. *Am. J. Hyg.*, 1938, vol. 27, 493-497
- RICKINSON, A.B. ; ROWE, M. ; HART, I.J. ; YAO, O.Y. ; HENDERSON, L.E. ; RABIN, H. ; EPSTEIN, M.A. *Cell Immunol.*, 1984, vol. 87, 649-658
- ROBINSON, W. ; KAWAMURA, T. ; GORNY, M. ; LAKE, D. ; XU, J.-Y. ; MATSUMOTO, Y. ; SUGANO, T. ; MASUHO, Y. ; MITCHELL, W. ; HERSH, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3185-3189
- * RUSCHE, J.R. ; JAVAHERIAN, K. ; MCDANAL, C. ; PETRO, J. ; LYNN, D.L. ; GRIMAILA, R. ; LANGLOIS, A. ; GALLO, R.C. ; ARTHUR, L.O. ; FISCHINGER, P.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 3199-3202
- SANGER, F. ; NICKEL, S. ; COULSON, A.R. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, vol. 74, 5463-5467
- SCHMIDT, J.F.C. ; H.G. STUNNENBERG. *J. Virol.*, 1988, vol. 62, 1889-1897
- SCHULTZ, T.F. ; CALABRO, M.L. ; HSAB, J.G. ; CARRINGTON, C.V.F. ; MATUTES, E. ; CATOVSKY D. ; WEISS R. *Virology*, 1991, vol. 184, 483-491
- * SELIGMANN, E.B. *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization, 1973, 279-285
- * SHAFFERMAN, A. ; LENNOX, J. ; GROSFELD, H. ; SADOFF, J. ; REDFIELD, R. ; BURKE, D. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1989, vol. 5, 33-39
- SHAPIRA, S.K. ; CHOU, J. ; RICHAUD, F.V. ; CASADABAN, M.J. *Gene*, 1983, vol. 25, 71-82
- SHEHMAN, M.P. ; SAKSANA, N.K. ; DUBE, D.K. ; YANAGIHARA, R. ; POIESZ, B.J. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, 2556-2563
- SHIDA, H. ; HINUMA, Y. ; HATANAKA, M. ; MORITA, M. ; KIDOKORO, M. ; SUZUKI, K. ; MARUYAMA, T. ; TAKAHASHI-NISHIMAKI, F. ; SUGIMOTO, M. ; KITAMURA, R. *J. Virol.*, 1988, vol. 62, 4474-4480
- * SHIDA, H. *Virology*, 1986, vol. 150, 451-462
- * SHIDA, H. ; T. TOCHIKURA ; T. SATO ; T. KONNO ; K. HIRAYOSHI ; M. SEKI ; Y. ITO ; M. HATANAKA ; Y. HINUMA ; M. SUGIMOTO. *EMBO*, 1987, vol. 6, 3379-3384
- SLABAUGH, M. ; N. ROSEMAN ; R. DAVIS ; C. MATHEWS. *J. Virol.*, 1988, vol. 62, 519-527
- SMITH, J.S. ; P.A. YAGER ; G.M. BAER. *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO Geneva, 1973, 354-357
- SPINA, C. ; KWON, T. ; CHOWERS, M. ; GUATELLI, J. ; RICHMAN, D. *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 179, 115-123
- * STANBERRY, L.R. ; KIT, S. ; MYERS, M.G. *J. Virol.*, 1985, vol. 55, 322-328
- * TABOR, S. ; C. C. RICHARDSON. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 4767-4771
- * TARTAGLIA, J. ; JARRETT, O. ; NEIL, J.C. ; DESMETTRE, P. ; PAOLETTI, E. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 2370-2375
- TARTAGLIA, J. ; PAOLETTI, E. *Immunochimistry of Viruses*. Elsevier Science Publishers, 1990, 125-151
- TARTAGLIA, J. ; R. GETTIG ; E. PAOLETTI. *Virology*

- * TARTAGLIA, J. ; PERKUS, M.E. ; TAYLOR, J. ; NORTON, E.K. ; AUDONNET, J.-C. ; COX, W.I. ; DAVIS, S.W. ; VANDERHOEVEN, J. ; MEIGNIER, B. ; RIVIERE, M. *Virology*, 1992, vol. 188, 217-232
- * TARTAGLIA, J. ; PERKUS, M.E. ; TAYLOR, J. ; NORTON, E.K. ; AUDONNET, J.-C. ; COX, W.I. ; DAVIS, S.W. ; VANDERHOEVEN, J. ; MEIGNIER, B. ; RIVIERE, M. *Virology*, 1992, vol. 188, 217-232
- * TARTAGLIA, J. ; J. TAYLOR ; W.I. COX ; J.-C. AUDONNET ; M.E. PERKUS ; A. RADAELLI ; C. DE GRULI MORGHEN ; B. MEIGNIER ; M. RIVIERE ; K. WEINHOLD. *AIDS Research Reviews*. Marcel Dekker, 1993, vol. 3, 361-378
- * TARTAGLIA, J. ; JARRETT, O. ; DESMETTRE, P. ; PAOLETTI, E. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 2370-2375
- * TARTAGLIA, J. ; PINCUS, S. ; PAOLETTI, E. *Critical Reviews in Immunology*, 1990, vol. 10, 13-30
- * TAYLOR, G. ; E.J. STOTT ; G. WERTZ ; A. BALL. *J. Gen. Virol.*, 1991, vol. 72, 125-130
- * TAYLOR, J. ; C. TRIMARCHI ; R. WEINBERG ; B. LANGUET ; F. GUILLEMIN ; P. DESMETTRE ; E. PAOLETTI. *Vaccine*, 1991, vol. 9, 190-193
- * TAYLOR, J. ; WEINBERG, R. ; KAWAOKA, Y. ; WEBSTER, R.G. ; PAOLETTI, E. *Vaccine*, 1988, vol. 6, 504-508
- * TAYLOR, J. ; R. WEINBERG ; B. LANGUET ; P. DESMETTRE ; E. PAOLETTI. *Vaccine*, 1988, vol. 6, 497-503
- * TAYLOR, J. ; R. WEINBERG ; J. TARTAGLIA ; C. RICHARDSON ; G. ALKHATIB ; D. BRIEDIS ; M. APPEL ; E. NORTON ; E. PAOLETTI. *Virology*, 1992, vol. 187, 321-328
- * TAYLOR, J. ; EDBAUER, C. ; REY-SENELONGE, A. ; BOUQUET, J.-F. ; NORTON, E. ; GOEBEL, S. ; DESMETTRE, P. ; PAOLETTI, E. *J. Virol.*, 1990, vol. 64, 1441-1450
- * TOYODA, T. ; T. SAKAGUCHI ; K. INAI ; N. M. INOCENCIO ; B. GOTOH ; M. HAMAGUCHI ; Y. NAGAI. *Virology*, 1987, vol. 158, 242-247
- * WEIR, J.P. ; B. MOSS. *J. Virol.*, 1983, vol. 46, 530-537
- * YUEN, L. ; MOSS, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 6417-6421
- * ZHOU, J. ; L. CRAWFORD ; L. MCLEAN ; X. SUN ; M. STANLEY ; N. ALMOND ; G.L. SMITH. *J. Gen. Virol.*, 1990, vol. 71, 2185-2190