



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

(21) **PI0614119-6 A2**

(22) Data de Depósito: 17/07/2006
(43) Data da Publicação: 09/03/2011
(RPI 2096)



(51) Int.Cl.:

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

(54) Título: **MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINA, CALICIVIROSES DE FELINO, E TRATAMENTOS PARA IMUNIZAR ANIMAIS CONTRA PARAOVÍRUS FELINO E HERPES VÍRUS DE FELINO**

(30) Prioridade Unionista: 28/07/2005 US 60/703,109

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

(72) Inventor(es): CASSIUS MCALLISTER TUCKER, DAVID EARL LOWERY, PAUL MARK GUIMOND, PAULA MUNNS CLARE, SING RONG, THOMAS JACK NEWBY

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006002018 de 17/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/012944 de 01/02/2007

(57) Resumo: MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINA, CALICIVIROSES DE FELINO, E TRATAMENTOS PARA IMUNIZAR ANIMAIS CONTRA PARAOVÍRUS FELINO E HERPES VÍRUS DE FELINO. A presente invenção refere-se a uma vacina para imunizar gatos contra vírus de felinos. A presente invenção também refere-se a um clone de ácido nucléico que codifica a proteína de capsídeo do calicivírus de felino isolado. A presente invenção também refere-se a uma vacina viva ou morta que compreende o calicivírus de felino isolado, uma vacina de subunidade que compreende a proteína de capsídeo do calicivírus de felino isolado, uma vacina de ácido nucléico que compreende um clone de ácido nucléico do calicivírus de felino isolado, e uma vacina de vetor de vírus recombinante que compreende ácido nucléico que codifica a proteína de capsídeo do calicivírus de felino isolado. A presente invenção também refere-se a um método para identificar um calicivírus de felino útil para produzir uma composição de vacina e a ensaios para diagnosticar gatos infectados com calicivírus de felino. Também descrito é um método para imunizar animais, especialmente gatos, contra doença, em particular contra calicivírus de felino (FCV). O método inclui administrar a um gato quantidades terapêuticamente eficazes da primeira e segunda vacina de FCV. A primeira vacina é administrada oralmente ou parenteralmente (por exemplo, subcutaneamente, intramuscularmente, e outros). A segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente N dias seguinte à administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive. Uma terceira administração de vacina também pode ser dada. A presente invenção também descreve métodos e materiais para tratar e imunizar animais com vacina, e em particular gatos contra ambos FPV ou Parvovírus de Felino que também foi chamado Panleucopenia ou FPL e contra outra doença, FHV ou HERPES VÍRUS de Felino que também foi chamado Vírus de Rinotraqueíte de Felino.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINA, CALICIVIROSES DE FELINO, E TRATAMENTOS PARA IMUNIZAR ANIMAIS CONTRA PARAOVÍRUS FELINO E HERPES VÍRUS DE FELINO".

5 CAMPO DE INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao fornecimento de modos para administrar várias vacinas a vários animais. Descrevem-se vários calicivírus de felino isolados (FCV). Descrevem-se métodos de apresentar vacinas de FCV para gatos. A presente invenção também refere-se aos clones de ácido nucléico que codificam calicivírus de felino. Refere-se às proteínas de capsídeo de FCV, vacinas mortas ou vivas, uma vacina de subunidade que compreende a proteína de capsídeo, uma vacina de ácido nucléico, e uma vacina de vetor de vírus recombinante que compreendem ácidos nucléicos que codificam a proteína de capsídeo do calicivírus de felino isolado. A presente invenção também refere-se a um método para identificar um calicivírus de felino útil para produzir uma composição de vacina e ensaios para diagnosticar gatos infectados com calicivírus de felino. A presente invenção também fornece modos para administrar vacinas de FCV novas e velhas a felinos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

20 Calicivírus são reportados ser uma causa importante de doença em gatos. Uma ampla variedade de sintomas é observada tal como febre, rinite, espirro, conjuntivite branda, escorrimento ocular, vesículas nas narinas externas, mucosa oral ou sobre a língua, pneumonia, bronquite traqueal, diarreia, sensibilidade muscular, *stiff gate*, e hiperestesia. As infecções bacterianas oportunistas acompanham freqüentemente infecções de FCV, o que complica o tratamento e a recuperação. As infecções de FCV severas podem levar à morte, especialmente em gatos juvenis. Deve-se notar que tais sinais, embora reportadamente comuns em casos naturais, nem sempre são proeminentes em infecções experimentais. Parece que várias cepas de campo de calicivírus de felino (FCV) ou diferem em seu potencial causador da doença, ou que a infecção concomitante com outros agentes influencia os sintomas da doença.

As vacinas contra calicivírus de felino estiveram disponíveis durante mais de duas décadas. Embora numerosos sorotipos de FCV existam, descobriu-se que certas cepas, tal como F9, induzem anticorpos contra uma ampla faixa de cepas de FCV. Veja J. L. Bittle & W. J. Rubic, *Am. J. Vet. Res.* 37:275-78 (1976). Como resultado, as vacinas mais antigas contra calicivírus de felino empregaram uma versão modificada ou atenuada da cepa de FCV-F9. Veja Patente dos Estados Unidos Nº 3.937.812 por J. L. Bittle & W. J. Rubic, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Ao mesmo tempo onde as vacinas de FCV-F9 e outras vacinas comercialmente disponíveis fornecem proteção de muitos isolados de campo, não é verdade que estas vacinas previnem infecção de todas as cepas. Além disso, como FCV continua evoluindo, a vacina com base em FCV-F9 fornece proteção contra cada vez menos isolados de campo (Lauritzen e outros, 1997, *Vet. Microbiology*, 56:55-63). Além disso, médicos veterinários expressaram preocupações sobre a eficácia de vacinas com base em um único sorotipo. Na realidade, estudos de campo sugerem vacinas derivadas da cepa de FCV-F9 fornecem imunidade insuficiente contra muitas cepas de calicivírus de felino. Veja, por exemplo, N. C. Pederson e outros, *Feline Pract.* 13(1):26-35 (1983); S. Dawson e outros, *Vet. Rec.* 132:346-50 (1993). Os médicos também aumentaram as preocupações sobre a administração de um vírus vivo modificado que pode, em algumas circunstâncias, causar doença em animais de outro modo saudáveis. Os pesquisadores reportaram que a dosagem oral inadvertida de uma vacina de FCV subcutaneamente administrada resultou em doença aguda. Veja, R. C. Povey, *Feline Pract.* 7(5):12-16 (1977). Há, portanto, interesse contínuo em desenvolver uma vacina que sozinha ou em combinação com outras vacinas, forneça a proteção desejada em vacinação de um gato. Foram descritos vários isolados que foram isolados de gatos e fornecem um meio de fornecer ampla proteção em gatos imunizados.

30 DESCRIÇÃO DE INFORMAÇÃO

DOCUMENTOS DE PATENTE DOS ESTADOS UNIDOS

3937812 Fev./1976 Bittle e outros, 3944469 Mar./1976 Bittle e outros,

- 4486530 Dez./1984 David e outros, 4786589 Nov./1988 Rounds e outros ,
 5169789 Dez./1992 Bernstein e outros, 5229293 Jul./1993 Matsuura e ou-
 tros, 5266313 Nov./1993 Esposito e outros, 5338683 Ago./1994 Paoletti e
 outros, 5494807 Fev./1996 Paoletti e outros, 5559041 Set./1996 Kang e ou-
 5 tros, 5561064 Out./1996 Marquet e outros, 5580859 Dez./1996 Felgner,
 5585100 Dez./1996 Mond e outros, 5589384 Dez./1996 Liscombe 5589466,
 Dez./1996 Felgner, 5620845 Ab./1997 Gould e outros, 5656448 Ago./1997
 Kang e outros, 5693761 Dez./1997 Queen e outros, 5693762 Dez./1997
 Queen e outros, 5695928 Dez./1997 Stewart e outros, 5703055 Dez./1997
 10 Felgner, 5716784 Fev./1998 DiCesare, 5716822 Fev./1998 Wardley,
 5718901 Fev./1998 Wardley, 5725863 Mar./1998 Daniels e outros, 5728587
 Mar./1998 Kang e outros, 5800821 Set./1998 Acheson e outros, 5977322
 Nov./1999 Marks e outros, 6010703 Jan./2000 Maes e outros, 6355246
 Mar/2002 Kruger e outros, 6.534.066 B1 Mar/2003 Poul e outros.
- 15 DOCUMENTOS DE PATENTE ESTRANGEIRA
 0484382 Mar./1995 EP, WO2004/083390.
- OUTRAS PUBLICAÇÕES
- Burroughs, J.N e Brown, F., J. Gen. Virol., 22, pp. 281-285 (1974).
 Clarke e Lambden in J. Gen. Virol. 78: 291-301 (1997).
- 20 Griest, N.R., 1979, Diagnostic methods in clinical virology (3rd ed.), pp. 84-
 85, Blackwell J. L. Bittle & W. J. Rubic, *Am. J. Vet. Res.* 37:275-78 (1976).
 Lauritzen e outros, *Vet Microbiology* 56: 55-63 (1997).
 Maky, Brian W.J. e Kangro, Hillar O. 1996, *Virology methods manual*, pp. 35-
 37, Academic Press, Nova York.
- 25 Motin e outros, *Infect. Immun.* 64: 4313-4318 (1996).
 N. C. Pederson e outros, *Feline Pract.* 13(1):26-35 (1983).
 Oglesby, A.S., e outros, *Virology* 44, pp. 329-341 (1971).
 Poulet e outros, *Veterinary Microbiology* 106: 17-31 (2005).
 Poulet e outros, *Archives of Virology* 145: 243-261 (2000).
- 30 R. C. Povey, *Feline Pract.* 7(5):12-16 (1977).
 S. Dawson e outros, *Vet. Rec.* 132:346-50 (1993).
 Scientific Publishers, Oxford, UK.

Soergel, M.E., e outros, Intervirology, 5, pp 239-244 (1975).

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

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece cepas e refere-se aos vários calicivírus de felino isolados (FCV). Também descreve métodos para apresentar vacinas a animais e particularmente, vacinas de FCV a gatos. A presente invenção também refere-se aos clones de ácido nucléico que codificam calicivírus de felino. Refere-se às proteínas de capsídeo de FCV, vacinas vivas e mortas, uma vacina de subunidade que compreende a proteína de capsídeo, uma vacina de ácido nucléico, e uma vacina de vetor de vírus recombinante que compreende ácidos nucléicos que codificam a proteína de capsídeo do calicivírus de felino isolada. A presente invenção também refere-se a um método para identificar um calicivírus de felino útil para produzir uma composição de vacina e ensaios para diagnosticar gatos infectados com calicivírus de felino. A presente invenção também fornece modos para administrar vacinas de FCV novas e velhas a felinos. Também descritos aqui são métodos e materiais para tratar e imunizar animais com vacina, e em particular gatos, contra ambos o FPV ou Parvovírus Felino que também foi chamado Panleukopenia ou FPL e contra outras doenças, FHV ou HERPES VÍRUS de Felino que também foram chamados Vírus de Rinotraqueíte de Felino. Descritas abaixo são as novas combinações de vacinas, que quando apresentadas a um felino da maneira descrita permite liberação oral/oral e subq/oral eficaz de ambos FPV e ou vacinas de FHV.

Em particular, a presente invenção descreve as seguintes vacinas para imunizar gatos contra calicivírus de felino. Uma proteína de capsídeo de FCV-21 ou uma proteína de capsídeo de FCV-21 isolada, (SEQ ID 13) e seqüências que têm pelo menos cerca de 91,2%, 95% e 99% de identidade. Uma vacina de DNA que compreende seqüências de ácido nucléico que codificam para uma proteína de capsídeo de FCV-21 ou uma proteína de capsídeo de FCV-21 isolada onde o referido DNA compreende uma seqüência (SEQ. ID 12) e seqüências que têm pelo menos cerca de 78,7%, e 79,2% de identidade de seqüência e permitindo substituições conservado-

ras.

Uma vacina que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-49 ou uma proteína de capsídeo de FCV-49 isolada onde a referida proteína de capsídeo compreende uma sequência de proteína de cepa FCV-49 (SEQ ID 15) e seqüências que têm pelo menos cerca de 92,7%, 95% e 99% de identidade; onde a referida proteína de capsídeo é fornecida em uma quantidade eficaz. Uma vacina de DNA que compreende seqüências de ácido nucléico que codificam para uma proteína de capsídeo de FCV-49 ou uma proteína de capsídeo de FCV-49 isolada onde o referido DNA compreende uma sequência (SEQ. ID 14) e seqüências que têm pelo menos cerca de 78,9%, isto é, 79,4% (78,9 + 0,5) identidade de sequência e permitindo substituições conservadoras.

Uma vacina que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4, ou uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4 isolada, onde a referida proteína de capsídeo compreende seqüências de proteína de cepa FCV-26391-4. Uma vacina que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4 onde a referida proteína de capsídeo compreende a sequência de proteína (SEQ ID 17) e seqüências que têm pelo menos cerca de 91,8%, 95% e 99% de identidade. Uma vacina de DNA que compreende seqüências de ácido nucléico que codificam para uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4 ou uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4 isolada onde o referido DNA compreende uma sequência (SEQ. ID 16) e seqüências que têm pelo menos cerca de 78,4%, isto é, 78,9% (78,4 + 0,5) de identidade de sequência.

Uma vacina onde o polinucleotídeo é selecionado do grupo que consiste essencialmente em SEQ ID NOs. 12, 14, 16. As vacinas ou podem estar sozinhas ou em qualquer combinação das seguintes: onde contém um adjuvante, onde o componente de FCV está vivo, onde o componente de FCV é atenuado, onde o componente de FCV é inativado, que pode incluir pelo menos uma outra cepa de calicivírus de felino selecionada do grupo que consiste em FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255, e FCV-2280.

Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino que

compreende uma seqüência de nucleotídeo de uma proteína de capsídeo de FCV selecionada do grupo que consiste em um polipeptídeo que tem 93% ou mais de identidade com SEQ ID NO. 13, 15, ou 17, onde o isolado de FCV não é cepa de 213-95, e onde a seqüência de ácido nucléico é operavelmente ligada a uma seqüência promotora heteróloga, em uma quantidade eficaz para produzir uma resposta imune, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende uma seqüência de nucleotídeo de uma proteína de capsídeo de FCV selecionada do grupo selecionado do grupo que consiste essencialmente em SEQ ID NOS. 12, 14 e 16. Uma vacina onde a seqüência de nucleotídeo está em qualquer dos seguintes: um plasmídeo, um vetor de vírus recombinante, ou qualquer outro vetor de nucleotídeo.

Uma vacina onde o vetor de vírus recombinante é selecionado do grupo que consiste em vírus de herpes de felino, poxvírus de guaxinim, poxvírus de canário, adenovírus, vírus de Semliki Forest, vírus de Sindbis, e vírus de vacínia.

Também há descrições de uma composição imunogênica que compreende um veículo veterinariamente aceitável de excipiente e uma cepa isolada de FCV que se liga a um anticorpo monoclonal selecionado dos anticorpos monoclonais descritos aqui como 23, 26, 41, 44 e 56. Em algumas versões da invenção, a composição imunogênica que compreende um veículo veterinariamente aceitável de excipiente e uma cepa isolada de FCV seletivamente de liga a um anticorpo monoclonal selecionado dos anticorpos monoclonais descritos aqui como 23, 26, 41, 44 e 56. Estas composições imunogênicas incluem composições onde a cepa de FCV é inativada, onde a referida cepa de FCV é uma vacina, e onde a composição compreende um adjuvante.

As vacinas descritas aqui podem incluir pelo menos um outro patógeno de felino, selecionado do grupo que consiste em vírus de herpes de felino, vírus de leucemia de felino, vírus de imunodeficiência de felino, *Chlamydia pssittaci*, e parvovírus de felino, vírus de raivas e *Bordetella bronchiseptica*. A vacina pode também compreender adicionalmente ou ser ad-

ministrada com um adjuvante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um regime de vacinação que significativamente reduz a mortalidade associada com calicivírus de felino (FCV) e realça o perfil de segurança de vacinas de FCV. Além disso, o regime de vacinação reivindicado induz um perfil de neutralização cruzada de soro mais amplo do que os protocolos de vacina de FCV-F9 existentes, que deveriam fornecer imunidade melhor através de cepas diferentes do calicivírus de felino.

Um aspecto da presente invenção fornece um método para imunizar animais com vacinas, em particular, um gato contra calicivírus de felino. Duas outras doenças de felino, FPV e FHV também têm novos tratamentos descritos aqui. O método compreende administrar ao gato quantidades terapêuticamente eficazes de uma primeira vacina, uma segunda vacina, e, opcionalmente a administração de uma terceira de vacina também pode ser dada ou dentro de 120 dias como acima, ou mais freqüentemente, depois de cerca de um ano como um reforço anual. A primeira vacina é administrada parenteralmente (por exemplo, subcutaneamente, intramuscularmente, etc.). A segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente cerca de N dias seguinte a administração da primeira vacina, e a terceira vacina é administrada parenteralmente, oralmente, ou oronasalmente cerca de M dias seguinte a administração da primeira ou segunda vacina. Aqui, N e M são independentemente números inteiros de 3 a 120, inclusive. Também preferido é onde N é cerca de 3 semanas e cerca de 2-4 semanas. Além disso, foi apresentado um aspecto da invenção onde certas vacinas identificadas podem ser administradas como duas doses orais, sem necessidade de uma primeira administração de parenteral. Reforços anuais também são aconselhados.

BREVE DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ ID NO. 1:

Iniciador de oligonucleotídeo, DEL-653

SEQ ID NO. 2:

- Iniciador de oligonucleotídeo, DEL-651
SEQ ID NO. 3:
- Iniciador de oligonucleotídeo, FCV-SR N2,
SEQ ID NO. 4:
- 5 Iniciador de oligonucleotídeo, FCV-SR N3,
SEQ ID NO. 5:
- Iniciador de oligonucleotídeo, FCV-SR N4,
SEQ ID NO. 6:
- 10 Iniciador de oligonucleotídeo, FCV-SR N5,
SEQ ID NO. 7:
- Iniciador de oligonucleotídeo, FCV-SR N6,
SEQ ID NO. 8:
- Iniciador de oligonucleotídeo, FCV-SR N9,
SEQ ID NO. 9:
- 15 Iniciador de oligonucleotídeo, iniciador 2,
SEQ ID NO. 10:
- Iniciador de oligonucleotídeo, FCV-SR C4,
SEQ ID NO. 11:
- Iniciador de oligonucleotídeo, FCV-SR C8,
20 SEQ ID NO. 12:
- Seqüência de DNA de gene de capsídeo de FCV-21
SEQ ID NO. 13:
- Seqüência de aminoácido codificada de gene de capsídeo de FCV-21
SEQ ID NO. 14:
- 25 Seqüência de DNA de gene de capsídeo de FCV-49
SEQ ID NO. 15:
- Seqüência de aminoácido codificada de gene de capsídeo de FCV-49
SEQ ID NO. 16:
- Seqüência de DNA de gene de capsídeo de FCV-26391-4
30 SEQ ID NO. 17:
- Seqüência de aminoácido codificada de gene de capsídeo de FCV-26391-4

DEFINIÇÕES E ABREVIACÕES

"Cerca de", quando empregado com relação a uma variável numérica mensurável, refere-se ao valor indicado da variável e a todos os valores da variável que estão dentro do erro experimental do valor indicado (por exemplo, dentro do intervalo de confiança de 95% pela média) ou dentro de 10 por cento do valor indicado, qualquer que seja o maior, a menos que aproximadamente seja empregado em referência aos intervalos de tempo em semanas onde "cerca de 3 semanas", é 17-25 dias, e cerca de 2-4 semanas é 10-40 dias.

"Imunidade ativa" inclui tanto imunidade humoral e/ou imunidade mediada por célula contra vírus de felino induzido por vacinação de um gato com a vacina da presente invenção.

"Anticorpo" refere-se a uma molécula de imunoglobulina que pode se ligar a um antígeno específico como o resultado de uma resposta imune àquele antígeno. As imunoglobulinas são proteínas de soro compostas de cadeias de polipeptídeo "leves" e "pesadas" tendo regiões "constantes" e "variáveis", e são divididas em classes (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM) com base na composição das regiões constantes. Um anticorpo que é "específico" para um determinado antígeno indica que as regiões variáveis do anticorpo reconhecem e ligam um antígeno específico exclusivamente - por exemplo, o anticorpo pode distinguir uma proteína de capsídeo particular de outras proteínas conhecidas em virtude de diferenças mensuráveis em afinidade de ligação, apesar da existência de identidade de sequência localizada, homologia, ou similaridade entre proteínas de capsídeo e outros polipeptídeos. Os anticorpos específicos também podem interagir com outras proteínas (por exemplo, proteína A de *Staphylococcus aureus*, ou outros anticorpos em técnicas de ELISA) por interações com seqüências fora da região variável dos anticorpos, e, em particular, nas regiões constantes da molécula. Os ensaios de avaliação para determinar a especificidade de ligação de um anticorpo são bem conhecidos. Para uma discussão inclusiva de tais ensaios, veja Harlow e outros (ed.), *Antibodies: A Laboratory Manual Capítulo 6 (1988)*. Os anticorpos também podem reconhecer e ligar fragmentos de proteínas de capsídeo de FCVs, contanto que os anticorpos sejam espe-

cíficos para proteína de capsídeo de FCVs. Os anticorpos podem ser produzidos empregando métodos conhecidos na técnica.

"Antígeno" ou "imunógeno", refere-se a uma molécula que contém um ou mais epítomos (linear, conformacional ou ambos) que em exposição a um indivíduo induzirá uma resposta imune que é específica para aquele antígeno. Um epítopo é o sítio específico do antígeno que se liga a um receptor de célula T ou anticorpo específico, e tipicamente compreende cerca de 3 resíduos de aminoácido a cerca de 20 resíduos de aminoácido. O termo antígeno refere-se aos antígenos de subunidade - antígenos separados e discretos de um organismo inteiro com o qual o antígeno é associado em natura - bem como bactérias, vírus, fungos, parasitas ou outros micróbios mortos, atenuados ou inativados. O termo antígeno também refere-se aos anticorpos, tal como anticorpos de antiidiotipo ou fragmentos destes, e aos mimótopos de peptídeo sintéticos que podem imitar um antígeno ou determinante antigênico (epítopo). O termo antígeno também refere-se a um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo que expressa um antígeno ou determinante antigênico *in vivo*, tal como em aplicações de imunização de DNA.

"Excipiente" refere-se a qualquer componente de uma vacina que não seja um antígeno.

FELOCELL 3 é FELOCELL 4 sem *Chlamydia psittaci*.

FELOCELL 4 contém vírus de riotraqueíte de felino vivo modificado [FHV], calicivírus [FCV-F9], vírus de panleucopênia [FPV] e *Chlamydia psittaci* [FCp]. FELOCELL 4 A contém vírus de riotraqueíte de felino vivo modificado [FHV], calicivírus [FCV-21], vírus de panleucopênia [FPV] e *Chlamydia psittaci* [FCP]. FELOCELL 4 A é FELOCELL 4 sem FCV-F9, porém com FCV-21. FELOCELL 3 A é FELOCELL 3 sem FCV-F9, porém com FCV-21. Felocell® 4, Felocell 4, ou FELOCELL 4 ou aquelas palavras seguidas pelo número "3" ou "4" são vacinas onde qualquer variação do nome Felocell é possuído por Pfizer.

"Primeira vacina", "segunda vacina", "terceira vacina", e similares, referem-se às vacinas separadamente administráveis que podem ser iguais ou diferentes, e que em geral podem ser administradas em qualquer ordem.

Desse modo, uma terceira vacina pode ser administrada a um indivíduo antes ou depois de uma segunda vacina.

"Identidade" com respeito ao percentual de "identidade" de sequência de aminoácido com respeito aos polipeptídeos, é aqui definida como o percentual de resíduos de aminoácido na sequência candidata que são idênticas com os resíduos nas seqüências alvos após alinhar tanto as seqüências quanto as entradas de introdução, se necessário, para obter o percentual máximo de identidade de seqüência. O percentual de identidade de seqüência é determinado através de métodos convencionais. Brevemente, as duas seqüências de aminoácido são alinhadas para otimizar as classificações de alinhamento empregando o algoritmo de Clustal W (Thompson e outros; Nuc. Ac. Res. 22:4673-4680; 1994) e matriz de peso PAM250 (Dayhoff e outros, "Atlas of Protein Sequence and Structure." National Biomedical Research Foundation. Washington, DC 5:345-358 (1978) e parâmetros *default* quando fornecidos pelo programa MegAlign (DNASTAR, Inc.; Madison, WI). A tabela de matriz de peso de PAM250 é apresentada como TABELA 1-1 (os aminoácidos são indicados pelos códigos de uma letra padrão).

TABELA 1-1

20	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W
	C	12																		
	S	0	2																	
	T	-2	1	3																
	P	-3	1	0	6															
25	A	-2	1	1	1	2														
	G	-3	1	0	-1	1	5													
	N	-4	1	0	-1	0	0	2												
	D	-5	0	0	-1	0	1	2	4											
	E	-5	0	0	-1	0	0	1	3	4										
30	Q	-5	-1	-1	0	0	-1	1	2	2	4									
	H	-3	-1	-1	0	-1	-2	2	1	1	3	6								
	R	-4	0	-1	0	-2	-3	0	-1	-1	1	2	6							

	K	-5	0	0	-1	-1	-2	1	0	0	1	0	3	5							
	M	-5	-2	-1	-2	-1	-3	-2	-3	-2	-1	-2	0	0	6						
	I	-2	-1	0	-2	-1	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	5						
	L	-6	-3	-2	-3	-2	-4	-3	-4	-3	-2	-2	-3	-3	4	2	6				
5	V	-2	-1	0	-1	0	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	4	2	4			
	F	-4	-3	-3	-5	-4	-5	-4	-6	-5	-5	-2	-4	-5	0	1	2	-1	9		
	Y	0	-3	-3	-5	-3	-5	-2	-4	-4	-4	0	-4	-4	-2	-1	-1	-2	7	10	
	W	-8	-2	-5	-6	-6	-7	-4	-7	-7	-5	-3	2	-3	-4	-5	-2	-6	0	0	17

O percentual de identidade é então calculado como:

10 Número total de pares idênticos _____ x 100

[comprimento da seqüência mais longa + número de aberturas
introduzido na seqüência mais longa para alinhar as duas seqüências]

"Resposta imune" em um indivíduo refere-se ao desenvolvimento de uma resposta imune humoral, uma resposta imune celular, ou uma resposta imune humoral e uma celular para um antígeno. Uma "resposta imune humoral" refere-se a uma que é mediada pelos anticorpos. Uma "resposta imune celular" é uma mediada por linfócitos T ou outros mastócitos ou ambos, e inclui a produção de citocinas, quimiocinas e moléculas similares produzidas por células T ativadas, mastócitos, ou ambos. As respostas imunes podem ser determinadas empregando imunoensaios padrão e ensaios de neutralização, que são conhecidos na técnica.

"Quantidade imunologicamente protetora" ou "quantidade eficaz para produzir uma resposta imune" de um antígeno é uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imunogênica no recipiente que é adequado para prevenir ou melhorar sinais ou sintomas de doença, inclusive efeitos de saúde adversos ou complicações destes, causados pela infecção com o agente de doença e em particular com calicivírus de felino. Ou imunidade humoral ou imunidades mediadas por célula, ou ambas podem ser induzidas. A resposta imunogênica de um animal a uma composição de vacina pode ser avaliada, por exemplo, indiretamente através da medição de títulos de anticorpo, ensaios de proliferação de linfócito, ou diretamente através do monitoramento de sinais e sintomas após o desafio com a cepa tipo silvestre. A

imunidade protetora concedida por uma vacina pode ser avaliada medindo, por exemplo, a redução nos sinais clínicos tal como mortalidade, morbidez, número de temperatura e condição física total e saúde total e desempenho do indivíduo. A resposta imune pode compreender, sem limitação, indução
5 de imunidade celular e/ou humoral. A quantidade de uma vacina que é terapeuticamente eficaz pode variar dependendo do vírus particular empregado, ou da condição do gato, e pode ser determinada por um médico veterinário.

A administração de "intranasal" refere-se à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através de ou
10 por via do nariz e envolve o transporte da substância principalmente pela mucosa nasal.

"Isolado", quando empregado para descrever qualquer substância particularmente definida, tal como um polinucleotídeo ou um polipeptídeo, refere-se à substância que é separada do ambiente celular original no
15 qual a substância tal como um polipeptídeo ou ácido nucléico normalmente é encontrada. Como empregado aqui então, por via de exemplo somente, uma cepa de célula recombinante construída com um polinucleotídeo da invenção faz uso do ácido nucléico "isolado". Alternativamente, a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico pode ser empregado como
20 uma vacina, desse modo seria considerada ser isolada porque foi identificada, separada e até certo ponto purificada quando comparada a como ela pode existir em natura. Se a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta é produzido em uma bactéria recombinante ou vetor de expressão de eucariota que produz o antígeno, ela é considerada existir
25 como uma proteína isolada ou como um ácido nucléico. Por exemplo, uma cepa de célula recombinante construída com um polinucleotídeo faz uso de um ácido nucléico "isolado".

"Anticorpo monoclonal" refere-se aos anticorpos produzidos por uma única cepa de células de hibridoma, todos voltados a um epítopo em
30 um antígeno particular. O antígeno empregado para preparar o anticorpo monoclonal pode ser fornecido como uma proteína isolada do patógeno ou o patógeno inteiro. Um hibridoma é uma cepa de célula clonal que consiste em

células híbridas formadas pela fusão de uma célula de mieloma e uma célula produtora de anticorpo específica. Em geral, os anticorpos monoclonais são de origem de camundongos; entretanto, o anticorpo monoclonal também refere-se a uma população clonal de um anticorpo feito contra um epítopo particular de um antígeno produzido por tecnologia de exibição de fago ou método que seja equivalente a exibição de fago ou células híbridas de origem de não camundongos.

"Dia N", período ou intervalo "N" de tempo ou "M dias" seguinte um evento refere-se, respectivamente, a qualquer hora no N^o ou M^o dia após o evento. Por exemplo, a vacinação de um indivíduo com uma segunda vacina 3 dias seguinte a administração de uma primeira vacina significa que a segunda vacina é administrada qualquer em qualquer hora a no 3^o dia após a primeira vacina. Esta descrição é frequentemente aplicada ao intervalo entre uma primeira e segunda vacinação. Tipicamente, o intervalo N preferido é cerca de 3 semanas, ou 17-25 dias, porém também comum é de cerca de 2, 4 semanas ou 10-40 dias, e as invenções aqui são eficazes com período "N" de tempo dentre 3 e 120 dias.

Administração "oral" ou "peroral" refere-se à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através de ou por via da boca e envolve engolir ou transportar pela mucosa oral (por exemplo, absorção bucal ou sublingual) ou ambos.

Administração "oronasal" refere-se à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através de ou por via do nariz e da boca, como ocorreria, por exemplo, colocando-se uma ou mais gotinhas no nariz. A administração oronasal envolve processos de transporte associados com administração oral e intranasal.

A "administração parenteral" refere-se à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através de ou por via de uma via que não inclua o trato digestivo. A administração parenteral inclui administração subcutânea, administração intramuscular, administração transcutânea, administração intradérmica, administração intraperitoneal, administração intra-ocular, e administração intravenosa. Com a finali-

dade desta descrição, a administração de parenteral exclui vias de administração que principalmente envolvam o transporte da substância por tecido mucoso na boca, nariz, traquéia, e pulmões.

5 "Imunidade passiva" refere-se à proteção contra calicivírus de felino fornecido a um gato como um resultado de vacinar o gato com uma vacina que compreende anticorpos contra a cepa de FCV ou um componente imunogênico ou fragmento de um componente deste.

10 "Farmaceuticamente aceitável" refere-se às substâncias, que incluem-se no escopo do julgamento médico preciso, adequadas para uso em contato com os tecidos de indivíduos sem toxicidade, irritação, resposta alérgica imprópria, e outros, comensuráveis com uma relação risco para benefício razoável, e eficazes para seu uso pretendido.

15 "Anticorpo policlonal" refere-se a uma população misturada de anticorpos feita contra um patógeno ou antígeno particular. Em geral, a população contém uma variedade de grupos de anticorpo, cada grupo voltado a um epítipo particular do patógeno ou antígeno. Para preparar anticorpos policlonais, o patógeno inteiro ou um antígeno isolado é introduzido por inoculação ou infecção em um hospedeiro o que induz o hospedeiro a preparar anticorpos contra o patógeno ou antígeno.

20 A administração "respiratória" refere-se à introdução de uma substância, tal como uma vacina, no corpo de um indivíduo através de ou por via de inalação de uma substância nebulizada (atomizada). Em administração respiratória, o mecanismo de transporte primário envolve absorção da substância atomizada pela mucosa na traquéia, brônquios, e pulmões e é
25 então diferente daquela administração intranasal ou peroral.

"Dosagem única administrativa" significa administrar em ou cerca do mesmo dia, isto é, todos os componentes administrados dentro de cerca de 1 dia. Os componentes podem ou não estar em um único recipiente.

30 "Específico para", quando empregado para descrever anticorpos da invenção, indica que as regiões variáveis dos anticorpos da invenção reconhecem e ligam uma cepa de vírus específica exclusivamente (isto é, são

capazes de distinguir uma proteína de capsídeo de FCV particular de outras proteínas conhecidas em virtude de diferenças mensuráveis na afinidade de ligação, apesar da existência de identidade, homologia, ou similaridade de sequência localizada entre a proteína de capsídeo de FCVs e tais polipeptídeos). Será entendido que anticorpos específicos também podem interagir com outras proteínas (por exemplo, proteína A *S. aureus* ou outros anticorpos em técnicas de ELISA) por interações com seqüências fora da região variável dos anticorpos, e, em particular, na região constante da molécula. Os ensaios de avaliação para determinar especificidade de ligação de um anticorpo da invenção são bem conhecidos e habitualmente praticados na técnica. Para uma discussão inclusiva de tal ensaio, veja Harlow e outros (Eds.), Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6. Os anticorpos que reconhecem e ligam fragmentos das proteínas de capsídeo de FCVs da invenção também são contemplados, contanto que os anticorpos sejam específicos para proteína de capsídeo de FCVs. Os anticorpos da invenção podem ser produzidos empregando qualquer método bem conhecido e habitualmente praticados na técnica.

O "fragmento imunogênico específico" é significado uma porção de uma seqüência que é reconhecível por um anticorpo que é específico para a seqüência, como definido em detalhes abaixo.

"Indivíduo" refere-se a qualquer animal tendo um sistema imune, que inclui mamífero tal como gatos.

"Vacina de subunidade" refere-se a um tipo de vacina que inclui um ou mais antígenos, porém nem todos os antígenos, que são derivados de ou homólogos a, antígenos de um patógeno de interesse, tal como um vírus, bactéria, parasita ou fungo. Uma tal composição é substancialmente livre de células de patógeno intactas ou partículas patogênicas, ou o lisado de tais células ou partículas. Desse modo, uma vacina de subunidade pode ser preparada de polipeptídeos pelo menos parcialmente purificados, ou substancialmente purificados, imunogênicos do patógeno ou seus análogos. Os métodos para obter um antígeno ou antígenos na vacina de subunidade

incluem técnicas de purificação padrão, produção recombinante, ou síntese química.

"TCID₅₀" refere-se à "dose infecciosa de cultura de tecido" e é definido como aquela diluição de um vírus requerido para infectar 50% de uma determinada batelada de culturas de célula inoculadas. Vários métodos podem ser empregados para calcular TCID₅₀, incluindo o método de Spearman-Kärber que é utilizado ao longo desta especificação. Para uma descrição do método de Spearman-Kärber, veja B. W. Mahy & H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).

"Quantidade terapeuticamente eficaz", no contexto desta descrição, refere-se a uma quantidade de um antígeno ou vacina que induziriam uma resposta imune em um indivíduo (por exemplo, gato) recebendo o antígeno ou vacina que seja adequado para prevenir ou melhorar os sinais ou sintomas da doença, incluindo efeitos de saúde adversos ou complicações destes, causados por infecção com um patógeno, tal como um vírus (por exemplo, FCV), bactéria, parasita ou fungo. Imunidade humoral ou imunidade mediada por célula ou tanto imunidade humoral quanto mediada por célula pode ser induzida. A resposta imunogênica de um animal a uma vacina pode ser avaliada, por exemplo, indiretamente através da medição de títulos de anticorpo, em saios de proliferação de linfócito, ou diretamente através do monitoramento dos sinais e sintomas após o desafio com cepa tipo silvestre. A imunidade protetora concedida por uma vacina pode ser avaliada medindo-se, por exemplo, a redução nos sinais clínicos tal como mortalidade, morbidez, número de temperatura e condição física total e desempenho e saúde total do indivíduo. A quantidade de uma vacina que é terapeuticamente eficaz pode variar dependendo do vírus particular empregado, ou da condição do indivíduo, e pode ser determinada por um médico.

"Tratar" refere-se à reverter, aliviar, inibir o progresso de, ou prevenir um distúrbio, condição ou doença às quais tal termo se aplica, ou a prevenir um ou mais sintomas de tal distúrbio, condição ou doença.

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

"Vacina" refere-se a uma composição que inclui um antígeno e abrange as então chamadas "vacinas de subunidades" como definido abaixo. A administração da vacina a um indivíduo resulta em uma resposta imune. A vacina pode ser introduzida diretamente no indivíduo por qualquer via conhecida de administração, incluindo parenteralmente, peroralmente, e outras.

PARTE 1

VACINAS, LINHAGENS DE VÍRUS, PROTEÍNAS DE CAPSÍDEO, E ANTICORPOS DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece vacinas que são com base em cepas de FCV vivas ou mortas selecionadas do grupo que consiste em FCV-21, FCV-49 e FCV26391-4. A invenção adicionalmente fornece vacinas de ácido nucléico que codificam uma proteína de capsídeo de FCV da cepa de FCV da invenção ou fragmentos imunogênicos específicos desta. A invenção adicionalmente fornece proteína de capsídeo isolada derivada das cepas de FCV da invenção ou fragmentos imunogênicos específicos destas.

Para cepas de FCV, uma boa resposta imune é induzida por elevação de determinante antigênico da proteína de capsídeo. Aqui são descritas e reivindicadas várias cepas de FCV que incluem proteínas de capsídeo intimamente relacionadas e variantes destes. Especificamente, são descritas a cepa FCV-21 e sequência de proteína (SEQ ID 13) e sequências que tenham 91,2%, 95% e 99% ou mais de identidade; cepa FCV-49 e sequência de proteína (SEQ ID 15) e sequências que têm 92,7%, 95% e 99% ou mais de identidade; cepa FCV-26391-4 e sequência de proteína (SEQ ID 17) e sequências que têm 91,8%, 95% e 99% ou mais de identidade.

A vacina da presente invenção é geralmente pretendida ser um tratamento profilático que imuniza gatos contra doença causada por cepas virulentas de calicivírus de felino. Entretanto, a vacina é também pretendida para o tratamento terapêutico de gatos infectados com uma cepa virulenta de calicivírus de felino. Por exemplo, uma vacina que compreende anticorpos, produzida imunizando-se um hospedeiro heterólogo deste com capsídeo de FCV ou componente imunogênico deste, é empregada para o trata-

mento terapêutico de um gato infectado com calicivírus de felino.

Entretanto, ainda vacinas que fornecem imunidade ativa, isto é, vacinas que compreendem cepas de FCV selecionadas do grupo que consiste em FCV-21, FCV-49 e FCV 26391-4, ou mutantes destes, ou proteínas de capsídeo derivadas das cepas de FCV da invenção, ou um fragmento imunogênico específico de suas proteínas de capsídeo, seriam esperadas serem eficazes quando determinadas como um tratamento terapêutico contra várias doenças. Desse modo, a imunidade que é fornecida pela presente invenção pode ser imunidade ativa ou imunidade passiva, e o uso pretendido da vacina pode ser profilático ou terapêutico.

A via de administração para qualquer uma das modalidades da vacina da presente invenção inclui, porém não está limitada a, oronasal, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intra-ocular, e oral como também transdérmica ou por inalação ou supositório. As vias preferidas de administração incluem oronasal, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, e injeção subcutânea. A vacina pode ser administrada por qualquer meio que inclua, porém que não esteja limitado a, seringas, nebulizadores, *mister*, dispositivos de injeção sem agulha, ou pistolas de gene de bombardeio de microprojétil (bombardeio Biolistic).

A vacina para qualquer uma das modalidades da presente invenção é formulada em um veículo farmacêuticamente aceito o de acordo com o modo de administração a ser empregado. Alguém versado na técnica pode facilmente formular uma vacina que compreenda um FCV-21, FCV-49 ou FCV 26391-4 vivo ou morto, uma proteína de capsídeo derivada de quaisquer das cepas de FCV da invenção, ou um fragmento imunogênico destes, um vetor de vírus recombinante que codifica a proteína de capsídeo de FCV-21, FCV-49 ou FCV-26391-4 ou um fragmento imunogênico específico desta, ou uma molécula de DNA que codifica a proteína de capsídeo derivada de FCV-21, FCV-49 ou FCV 26391-4 ou um fragmento imunogênico específico deste. Em casos onde a injeção intramuscular é preferida, uma formulação isotônica é preferida. Geralmente, os aditivos para isotonicidade podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol, e lactose. Em ca-

5 sos particulares, as soluções isotônicas tal como salina tamponada de fosfato são preferidas. As formulações podem também fornecer estabilizadores, tal como gelatina e albumina. Em algumas modalidades, um agente vasoconstritivo é adicionado à formulação. As preparações farmacêuticas de acordo com a presente invenção são fornecidas estéreis e livres de pirogênio. Entretanto, é bem conhecido por aqueles versados na técnica que as formulações preferidas para o veículo farmaceuticamente aceito que compreendem as vacinas da presente invenção são aqueles veículos farmacêuticos aprovados nos regulamentos promulgados pelo Departamento de Estados Unidos de Agricultura, ou agência de governo equivalente em um país estrangeiro tal como Canadá ou México ou qualquer uma das nações europeias, para vacinas de calicivírus de felino vivo, vacinas de calicivírus de felino mortas, vacinas de subunidade de polipeptídeo (antígeno), vacina de vetor de vírus recombinante, vacinas de anticorpo, e vacinas de DNA. Portanto, o

10 veículo farmaceuticamente aceito para produção comercial da vacina da presente invenção é um veículo que já é aprovado ou será aprovado pela agência de governo apropriada nos Estados Unidos da América ou país estrangeiro. A vacina pode também ser misturada com um adjuvante que é farmaceuticamente aceitável. Em certas formulações da vacina da presente

15 invenção, a vacina é combinada com outras vacinas de felino para produzir um produto de vacina polivalente que pode proteger gatos contra uma ampla variedade de doenças causadas por outros patógenos de felinos. Realmente, os fabricantes comerciais de vacinas de felino, como também usuários finais preferem produtos de vacina polivalente. Portanto, em uma modalidade preferida, a presente invenção fornece uma vacina polivalente que imuniza

20 gatos contra calicivírus de felino e pelo menos um outro patógeno de felino, preferivelmente selecionada do grupo que consiste em vírus de herpes felino, vírus de leucemia de felino, vírus de imunodeficiência de felino, Clamídia de felino, e vírus de panleucopenia de felino.

25 A inoculação de um gato é preferivelmente por uma única vacinação que produz uma resposta imunogênica completa, ampla. Em outra modalidade da presente invenção, o gato é submetido a uma série de vaci-

30

nações para produzir uma resposta imune completa, ampla. Quando as vacinações são fornecidas em uma série, as vacinações podem ser fornecidas entre cerca de um dia a quatro semanas ou por mais tempo separadamente. Em modalidades particulares, o gato é vacinado em diferentes sítios simultaneamente. Os detalhes adicionais sobre a via e administração são encontrados abaixo na seção intitulada "Métodos de Imunizar Gatos contra Calicivírus".

As composições de vacina opcionalmente podem incluir líquido, semi-sólido, ou diluentes sólidos (isto é, estéril e não tóxico) farmacologicamente aceitáveis compatíveis com vacina que servem como veículos farmacêuticos, excipientes, ou meios. Os diluentes podem incluir água, solução, salina, dextrose, etanol, glicerol, e similares. Os agentes isotônicos podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol, e lactose, entre outros. Os estabilizadores incluem albumina, entre outros. Qualquer adjuvante conhecido na técnica pode ser empregado na composição de vacina, incluindo adjuvantes com base em óleo tal como o Adjuvante Completo de Freund e o Adjuvant Incompleto de Freund, adjuvantes com base em micolato (por exemplo, dimicolato de trealose), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), peptidoglicanos (isto é, muteínas, mucopeptídeos, ou glicoproteínas, tal como N-Opaca, dipeptídeo de muramila [MDP], ou análogos de MDP), proteoglicanos (por exemplo, extraídos de *Klebsiella pneumoniae*), preparações estreptocócicas (por exemplo, OK432), Biostim[®] (por exemplo, 01K2), o "Iscoms" de EP 109 942, EP 180 564 e EP 231 039, hidróxido de alumínio, saponina, DEAE-dextrana, óleos neutros (tal como, migliol), óleos vegetais (tal como, óleos de amendoim), lipossomas, polióis de Pluronic[®]. Os adjuvantes incluem, porém não estão limitados ao, sistema de adjuvante RIBI (Ribi Inc.), a-lume, gel de hidróxido de alumínio, colesterol, emulsões de óleo em água, emulsões de água em óleo tal como, por exemplo, adjuvantes completos e incompletos de Freund, co-polímero de bloco (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adjuvante de AMPHIGEN[®], saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) ou outras frações de saponina, lipídio A de mo-

5 nofosforila, adjuvante de lipídio-amina Avridine, enterotoxina lábil ao calor de
E. coli (recombinante ou caso contrário), toxina de cólera, ou dipeptídeo de
muramila, entre muitos outros. As composições imunogênicas podem tam-
bém incluir um ou mais outros agentes imunomoduladores tal como, por e-
xemplo, interleucinas, interferons, ou outras citocinas. As composições imu-
nogênicas também podem incluir gentamicina e Mertiolato. Ao mesmo tempo
onde as quantidades e concentrações de adjuvantes e aditivos úteis no con-
texto da presente invenção podem facilmente ser determinadas pelo técnico
versado, a presente invenção contempla composições que compreendem de
10 cerca de 50 µg a cerca de 2000 µg de adjuvante preferivelmente de cerca de
500 µg/2 ml de dose da composição de vacina. Em outra modalidade prefe-
rida, a presente invenção contempla composições de vacina que compreen-
dem de cerca de 1 µg/ml a cerca de 60 µg/ml de antibiótico, e mais preferi-
velmente menos do que cerca de 30 µg/ml de antibiótico.

15 As composições imunogênicas da presente invenção podem ser
feitas em várias formas dependendo da via de administração. Por exemplo,
as composições imunogênicas podem ser feitas na forma de soluções ou
dispersões aquosas estéreis adequadas para uso injetável, ou feitas em
formas liofilizadas empregando técnicas de liofilização. As composições i-
munogênicas liofilizadas são mantidas tipicamente a cerca de 4°C, e podem
20 ser reconstituídas em uma solução estabilizante, por exemplo, salina e/ou
HEPES, com ou sem adjuvante.

Além disso, as composições de vacina e imunogênicas da pre-
sente invenção podem incluir um ou mais veículos farmacêuticamente acei-
táveis. Como empregado aqui, "um veículo farmacêuticamente aceitável"
25 inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, ad-
juvantes, agentes estabilizantes, diluentes, preservativos, agentes antibacte-
rianos e antifúngicos, agentes isotônicos, agentes de retardamento de ad-
sorção, e similares. O veículo(s) deve ser "aceitável" no sentido de ser com-
30 patível com os componentes da invenção e não danoso para o indivíduo a
ser imunizado. Tipicamente, os veículos serão estéreis e livres de pirogênio.

VACINAS VIVAS

Em uma modalidade da vacina da presente invenção, a vacina compreende uma vacina de FCV viva, onde o componente de FCV é selecionado do grupo que consiste em FCV-21, FCV-49 e FCV 26391-4. Porque estas cepas foram isoladas em uma forma não virulenta, elas são particularmente preferidas para a preparação de uma vacina viva que estimula o sistema imune do gato sem causar doença.

Os métodos para atenuar os vírus também são bem conhecidos na técnica e incluem tais métodos como passagem consecutiva em cultura de célula em uma cepa de célula adequada, ou mutagênese ultravioleta ou química.

VACINAS INATIVADAS

Em outra modalidade da presente invenção, a vacina compreende um vacina de FCV inativada ou morta que compreende uma cepa de FCV selecionada do grupo que consiste em FCV-21, FCV-49 e FCV 26391-4. A vacina de inativada é feita por métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, uma vez o vírus é propagado a títulos elevados, seria facilmente evidente por aquele versado na técnica que a massa antigênica do vírus pode ser obtida por métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a massa antigênica do vírus pode ser obtida por diluição, concentração, ou extração. Todos estes métodos foram empregados para obter massa antigênica virótica apropriada para produzir vacinas. O calicivírus é inativado através de tratamento com formalina, betapropriolactona (BPL), ou com etileneimina binária (BEI), ou outros métodos conhecidos por aqueles versados na técnica.

A inativação através de formalina é realizada misturando-se a suspensão de calicivírus com 37% de formaldeído a uma concentração de formaldeído final de 0,05%. A mistura de calicivírus-formaldeído é misturada por agitação constante durante cerca de 24 horas a temperatura ambiente. A mistura de calicivírus inativado é então testada quanto ao vírus vivo residual ensaiando-se para crescimento em uma cepa de célula de felino adequada tal como células de CRFK.

A inativação por BEI é realizada misturando a suspensão de ca-

licivírus da presente invenção com 0,1 M de BEI (2-bromo-etilamina entre 0,175 N de NaOH) a uma concentração de BEI final de 1 mM. A mistura de calicivírus-BEI é misturada por agitação constante durante cerca de 48 horas a temperatura ambiente, seguido pela adição de 1,0 M de tiosulfato de sódio a uma concentração final de 0,1 mM. A mistura é continuada durante umas duas horas adicionais. A mistura de calicivírus inativada é testada quanto ao calicivírus vivo residual ensaiando-se para crescimento em uma cepa de célula de felino adequada tal como células de NLFK.

O calicivírus inativado acima mencionado da presente invenção é misturado com qualquer um dos veículos farmacêuticamente para formular vacinas de vírus inativado para o nível de dosagem apropriado. A vacina inativada também pode incluir, além de um componente de FCV selecionado do grupo que consiste em FCV-21, FCV-49 e FCV 26391-4 pelo menos uma outra cepa de calicivírus de felino, preferivelmente selecionada do grupo que consiste em FCV-F9, FCV-M8, FCV-255, e FCV-2280. Em uma modalidade preferida, a vacina também inclui uma vacina para imunizar um gato contra um ou mais outros patógenos de felino, preferivelmente selecionados do grupo que consiste em vírus de herpes de felino, vírus de leucemia de felino, vírus de imunodeficiência de felino, Clamídia de felino, e vírus de panleucopenia de felino.

VACINAS RECOMBINANTES

Em uma outra modalidade da presente invenção, a vacina compreende um vetor de vírus de recombinante que contém um ácido nucléico que codifica uma proteína de capsídeo de FCV descrita aqui ou um fragmento imunogênico específico desta.

Em uma modalidade particular, o vetor de vírus recombinante é um vírus de herpes de felino que imuniza um gato contra tanto calicivírus de felino quanto vírus de herpes de felino. Em outra modalidade, o vetor de vírus recombinante compreende um ou mais antígenos preferivelmente selecionados do grupo que consiste em vírus de herpes felino, vírus de leucemia de felino, vírus de imunodeficiência de felino, Clamídia de felino, e vírus de panleucopenia de felino, vírus de raivas e Bordetella bronchiseptica.

Para preparar um vetor de vírus recombinante que expressa uma proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, um cDNA que codifica a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta é inserido no genoma de um vetor de vírus tal como vírus de herpes, poxvírus, ou adenovírus. A Patente U.S. Nº 5.716.822 por Wardley e outros descreve um método para inserir DNA que codifica a proteína de capsídeo de CFI-68 FIV de cepa de calicivírus de felino no gene de timidina cinase de vírus de herpes de felino. Outras vacinas de vetor de vírus recombinantes abrangidas pela presente invenção, incluem, porém não estão limitadas aos adenovírus, vírus adenoassociado, parvovírus, e vários vetores de poxvírus para expressar a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta. Em particular, a presente invenção inclui vacinas de vetor de poxvírus recombinante que expressam a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta feita de acordo com os métodos ensinados em qualquer uma das Patentes dos Estados Unidos Nº 5.338.683 e 5.494.807 por Paoletti e outros, que ensinam vacinas de vírus recombinante que consistem em vírus de vacínia ou poxvírus de canário que expressam antígenos estrangeiros; Patente dos Estados Unidos Nº 5.266.313 por Esposito e outros, que ensina vetores de poxvírus de guaxinim recombinantes que expressam antígenos de vírus de raivas; e a Patente dos Estados Unidos Nº 6. 010.703 por Maes e outros, que ensina vetores de poxivírus racoon recombinantes que expressam o gD de vírus de herpes de felino ou antígenos de gB.

Para quaisquer dos vetores de vírus recombinante acima mencionados, o cDNA que codifica a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta é operavelmente ligado a um promotor de eucariota na terminação 5' do cDNA que codifica o antígeno e um sinal de terminação de eucariota e sinal poli (A) na terminação 3' do cDNA que codifica o antígeno. Como empregado aqui, o termo "operavelmente ligado" significa que o polinucleotídeo da presente invenção (tal como uma molécula de cDNA) e um polinucleotídeo (DNA) contendo uma sequência de controle de expressão, por exemplo, sequência de terminação e promotora de trans-

crição, são adequados em um vetor ou célula tal que a expressão do antígeno codificado pelo cDNA seja regulada pela sequência de controle de expressão. Os métodos para clonar DNA, tal como o cDNA que codifica a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, e operavelmente ligar o DNA que contém sequências de controle de expressão a este, são bem conhecidos na técnica. Os exemplos de promotores adequados para expressar a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, nos vetores de vírus recombinantes, são os promotores imediatamente precoces de citomegalovírus (CMV), o promotor de repetição terminal longa de vírus de sarcoma de Rous (RSV-LTR), o promotor imediatamente precoce de vírus símio 40 (SV40), e promotores induzíveis tal como o promotor de metalotioneína. Um exemplo de um DNA que tem uma terminação e sinal poli (A) é a região poli (A) tardia de SV40. Outro exemplo de um sistema de expressão viral adequado para produzir o antígeno é o Sistema de Expressão Sindbis disponível de Invitrogen. O uso destes vetores e sistemas de expressão comercialmente disponíveis é bem conhecido na técnica.

VACINA DE MOLÉCULA DE DNA OU ÁCIDO NUCLÉICO

Em uma modalidade adicional ainda da presente invenção, a vacina é fornecida como uma vacina de molécula de DNA ou ácido nucléico que extraem uma resposta imune ativa no gato. A vacina de molécula de DNA consiste em DNA que tem uma sequência de ácido nucléico que codifica a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta de uma proteína de capsídeo de FCV descrita aqui.

Em uma modalidade preferida, a vacina de molécula de DNA compreende a sequência de ácido nucléico de SEQ ID NOs: 12, 14, ou 16, ou um fragmento desta que codifica SEQ ID NOs: 13, 15 ou 17, ou um fragmento imunogênico específico de SEQ ID NOS: 13, 15 ou 17. O ácido nucléico que codifica a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta, é operavelmente ligado a ou está próximo de um promotor transcricional. Isto permite a transcrição da proteína de capsídeo, ou um fragmento imunogênico específico desta, do ácido nucléico quando o ácido

nucléico é inoculado nas células do gato. Preferivelmente, a molécula de DNA é um plasmídeo. Os promotores que são úteis para vacinas de DNA são bem conhecidos na técnica e incluem, porém não estão limitados, o promotor de RSV LTR, o promotor imediatamente precoce de CMV, e o promotor de antígeno de SV40 T. É também preferido que o ácido nucléico seja operavelmente ligado, a ou próximo do códon de terminação da sequência que codifica a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta, para um fragmento de ácido nucléico que compreende um sinal de terminação de transcrição e sinal de reconhecimento poli (A). A vacina de DNA é fornecida ao gato em um veículo farmacêutico aceito ou em um lipídio ou veículo de lipossoma similar àquele descrito na Patente dos Estados Unidos Nº 5.703.055 por Felgner. A vacina de DNA pode ser fornecida ao gato por uma variedade de métodos tal como injeção intramuscular, injeção por pistola de pressão, ou bombardeio de biolístico. A preparação de DNA e métodos para seu uso são fornecidos na Patente dos Estados Unidos Nºs 5.589. 466 e 5.580.859, ambas por Felgner. Finalmente, um método para produzir DNA de plasmídeo de grau farmacêutico é ensinado na Patente dos Estados Unidos Nº 5.561.064 por Marquet e outros.

Entretanto, ao usar os métodos supramencionados, as vacinas de DNA que expressam a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, são empregadas para imunizar gatos contra calicivírus de felino virulento. A vantagem da vacina de DNA é que a molécula de DNA é propagada convenientemente como um plasmídeo que é um meio simples e econômico de produzir uma vacina, e desde que a vacina não esteja viva, muitas das questões reguladoras associadas com vacinas de vetor de vírus recombinante vivas não são uma questão com as vacinas de DNA. Alguém versado na técnica apreciaria que a vacina de DNA da presente invenção pudesse compreender ácidos nucléicos sinteticamente produzidos que fossem feitos por métodos de síntese química bem conhecidos na técnica.

PROTEÍNA DE CAPSÍDEO DE FCV ISOLADA E PURIFICADA

Em uma modalidade ainda adicional da presente invenção, a

vacina consiste na proteína de capsídeo de FCV isolada e purificada ou um fragmento imunogênico específico desta. Em particular, uma vacina onde a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:13, 15, 17. Preferivelmente, a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta, é produzida em um vetor de expressão de eucariota ou bactéria recombinante, que produz o antígeno que pode ser isolado e pode ser purificado para preparar a vacina. Por exemplo, a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, é produzida em um microorganismo tal como bactéria, levedura, ou fungos, em uma célula eucariota tal como uma célula de mamífero ou uma célula de inseto, ou por um vetor de vírus recombinante tal como adenovírus, poxivírus, vírus de herpes, vírus de Semliki Forest, baculovírus, bacteriófago, vírus de Sindbis, ou vírus de Sendai. As bactérias adequadas para produzir a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, inclui *Escherichia coli.*, *Bacillus subtilis*, ou qualquer outra bactéria que seja capaz de expressar polipeptídeos heterólogos. Os tipos de levedura adequados para expressar a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, ou qualquer outra levedura capaz de expressar polipeptídeos heterólogos. Os métodos para usar as bactérias acima mencionadas, células eucarióticas ou vetores de vírus recombinante para produzir os antígenos para as vacinas, são bem conhecidos na técnica.

Para produzir a vacina que consiste na proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta, o ácido nucléico que codifica a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, é clonado em um plasmídeo, e o ácido nucléico é operavelmente ligado a um promotor que efetua a expressão da proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta em um microorganismo. Os promotores adequados incluem, porém não estão limitados, promotor de fago T7, promotor de fago T3, promotor de β -galactosidase, e o promotor de fago Sp6. A expressão da proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico

específico desta, em um microorganismo permite a proteína de capsídeo ser produzida empregando tecnologias de fermentação que são comercialmente empregadas para produzir quantidades grandes de polipeptídeos antigênicos recombinantes. Os métodos para isolar e purificar os antígenos são bem conhecidos na técnica e incluem métodos tal como filtração de gel, cromatografia de afinidade, cromatografia de permuta de íons, ou centrifugação.

Para facilitar o isolamento da proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, é feito um polipeptídeo de fusão onde a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta é ligada a outro polipeptídeo que permite o isolamento através de cromatografia de afinidade. Preferivelmente, um polipeptídeo de fusão é feito empregando sistemas *in vivo* de expressão. Por exemplo, a sequência de ácido nucléico de cDNA que codifica a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, é ligada na terminação 5' ou terminação 3' a um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo. Os ácidos nucléicos são ligados na própria estrutura de leitura de códon para permitir a produção de um polipeptídeo de fusão onde a terminação carboxila e/ou amino da proteína de capsídeo ou porção desta é fundida a um polipeptídeo que permite a recuperação simplificada do antígeno como um polipeptídeo de fusão. O polipeptídeo de fusão também pode prevenir o antígeno de ser degradado durante a purificação. Ao mesmo tempo onde uma vacina que compreende o polipeptídeo de fusão é eficaz, em alguns exemplos pode ser desejável remover o segundo polipeptídeo após a purificação. Portanto, também é contemplado que o polipeptídeo de fusão contenha um sítio de clivagem na junção entre o antígeno e o polipeptídeo. O sítio de clivagem consiste em uma sequência de aminoácido que é clivada com uma enzima específica para a sequência de aminoácido no sítio. Os exemplos de tais sítios de clivagem que são contemplados incluem o sítio de clivagem de enterocinase que é clivado por enterocinase, o sítio de clivagem do fator Xa que é clivado pelo fator Xa, e o sítio de clivagem de GENENASE que é clivado por GENENASE (GENENASE é uma marca registrada de New England Biolabs, Beverly, Massa). A seguir são métodos para produzir a prote-

ina de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta como um polipeptídeo de fusão ou como um antígeno isolado livre do polipeptídeo.

Um exemplo de um sistema de expressão de procariota para produzir a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta como um polipeptídeo de fusão para uso em vacinas é o Sistema de Fusão de Gene de S-transferase de Glutathione (GST) disponibilizado por Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J. que usa o plasmídeo de vetor de expressão pGEX-4T-1. O cDNA que codifica a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta, é fundido na própria estrutura de leitura de códon com o DNA que codifica GST. A parte do GST do polipeptídeo de fusão permite a purificação rápida do polipeptídeo de fusão empregando cromatografia de afinidade glutathione Sefarose 4B. Após a purificação, a porção de GST do polipeptídeo de fusão pode ser removida por clivagem com uma protease de sítio específico, tal como trombina ou fator Xa para produzir um antígeno livre do polipeptídeo de GST. A proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta, livre do polipeptídeo de GST, é produzida por uma segunda rodada de cromatografia de afinidade de glutathione Sefarose 4B.

Outro método para produzir uma vacina que compreende a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, é um método que liga na estrutura o cDNA que codifica o antígeno e os códons de DNA que codificam poli-histidina. A poli-histidina preferivelmente compreende seis resíduos de histidina que permitem purificação do polipeptídeo de fusão através de cromatografia de afinidade de metal, preferivelmente cromatografia de afinidade de níquel. Para produzir a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta livre da poli-histidina, um sítio de clivagem tal como um sítio de clivagem de enterocinase é fundido na própria estrutura de leitura entre os códons que codificam a poli-histidina e os códons que codificam o antígeno. O antígeno é liberado da poli-histidina através de clivagem com enterocinase, seguido por uma segunda rodada de cromatografia de afinidade de metal que liga a poli-histidina livre. Este método foi mostrado ser útil para preparar o antígeno LcrV de Y.

pestis que foi descrito em Motin e outros (Infecte. Immun. 64: 4313-4318 (1996)). O Sistema de Xpress, disponibilizado por Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, é um exemplo de um equipamento comercial que está disponível para preparar e então isolar a poli-histidina - proteína de fusão de polipeptídeo.

- 5 Ainda um outro método para produzir uma vacina que compreende a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, usa um método descrito por Motin e outros, Infecte. Immun. 64: 3021-3029 (1995). Motin e outros descrevem um DNA que codifica um polipeptídeo de fusão que consiste no DNA que codifica um antígeno ligado ao
- 10 DNA que codifica uma porção de proteína A onde o DNA que codifica um sítio de clivagem de enterocinase é interposto na própria estrutura de leitura de códon entre o DNA que codifica a proteína A e o antígeno. A proteína A permite o polipeptídeo de fusão ser isolado através de cromatografia de afinidade de IgG, e a proteína de capsídeo livre da proteína A, é produzida a-
- 15 través de clivagem com enterocinase. A proteína A é então removida por uma segunda rodada de cromatografia de afinidade de IgG.

- Outro método para produzir uma vacina que compreende a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta é com base nos métodos descritos na Patente dos Estados Unidos Nº
- 20 5.725.863 por Daniels e outros que está aqui incorporada através de referência em sua totalidade. Daniels e outros, método pode ser usado para preparar a Vacina de capsídeo de FCV que consiste em molécula de enterotoxina onde cada molécula tem inserido nela acima de 100 resíduos de aminoácido da proteína de capsídeo de FCV. Outros métodos para a prepara-
- 25 ção de vacinas de polipeptídeo de fusão que podem ser empregados para prepara as vacinas da presente invenção são descritos na Patente dos Estados Unidos Nº 5.585.100 por Mond e outros e na Patente dos Estados Unidos Nº 5.589.384 por Liscombe. Finalmente, o Sistema de Purificação e Fusão de pMAL disponível de New England Biolabs é outro exemplo de um
- 30 método para a preparação de um polipeptídeo de fusão onde uma proteína de ligação de maltose é fundida à proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta. A proteína de ligação de maltose facilita o

isolamento do polipeptídeo de fusão através de cromatografia de afinidade de amilose. A proteína de ligação de maltose pode ser ligada ao antígeno por um dos sítios de clivagem supracitados que possibilitam o antígeno ser feito livre da proteína de ligação de maltose.

5 Embora métodos bacterianos sejam empregados para produzir a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta para vacinas, pode ser desejável produzir a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta em um sistema de expressão de eucariota. Um sistema particularmente útil é o sistema de expressão de baculovírus que é descrito na Patente dos Estados Unidos Nº 5.229.293 por
10 Matsuura e outros, que está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Os vetores de expressão de baculovírus adequados para produzir a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta são os vetores de pPbac e pMbac de Stratagene; e o vetor de Bac-N-Blue, o vetor
15 de pBlueBac4.5, pBlueBacHis2-A,B,C, e o pMelBac disponível de Invitrogen, Carlsbad, Calif.

 Outro sistema de eucariota útil para expressar a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta para vacinas é um sistema de expressão de levedura tal como a Expressão de Proteína de Levedura ESP e Sistema de Purificação disponibilizado por Stratagene.
20 Outro sistema de expressão de levedura é qualquer um dos sistemas de expressão com base em Pichia de Invitrogen. Os sistemas de expressão de mamífero também são abrangidos pela presente invenção. Os exemplos de sistemas de expressão mamífero são o sistema LacSwitch II, pBK Phagemid, sistema de vetor pXT1, e o sistema de vetor de pSG5 de Stratagene; o
25 sistema de vetor de expressão de mamífero pTargetT, vetor de expressão mamífero pSI, vetor de expressão mamífero pCI, e vetores de pAdVantage disponibilizados por Promega Corporation, Madison, Wis.; e o Sistema de Expressão Mamífero Induzível por Ecdysone-, pCDM8, pcDNA1.1, e pcDNA1.1/Amp disponibilizado por Invitrogen.
30 A presente invenção também inclui uma modalidade que consiste em vacinas que compreendem a proteína de capsídeo de FCV ou epíto-

pos particulares da proteína de capsídeo como componentes de um sistema de liberação de esporo estável ao calor feito de acordo com o método ensinado na Patente dos Estados Unidos Nº 5. 800.821 por Acheson e outros, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade. Portanto, a presente invenção fornece uma célula bacteriana geneticamente criada que contém um ácido nucléico que codifica a proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta. Quando a vacina de esporo bacteriana recombinante é administrada oralmente ao gato, os esporos germinam no trato gastrointestinal do gato e as bactérias expressam a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta que entra em contato com o sistema imune do gato e elicia uma resposta imune. A vacina tem a vantagem de ser estável ao calor; portanto, pode ser armazenada a temperatura ambiente durante um período indefinido de tempo.

VACINAS DE IMUNIDADE PASSIVA

Embora as modalidades anteriores da presente invenção forneçam imunidade ativa contra calicivírus de felino, a presente invenção também compreende vacinas que fornecem imunidade passiva a calicivírus de felino. Uma vacina que elicia imunidade passiva contra calicivírus de felino consiste em anticorpos policlonais ou anticorpos monoclonais que são contra a proteína de capsídeo de FCV, um fragmento imunogênico específico desta, ou o vírus de FCV inteiro.

Para preparar uma vacina de imunidade passiva que compreende anticorpos de policlonais, a proteína de capsídeo de FCV desta, ou um fragmento imunogênico específico desta é injetada em um hospedeiro adequado para preparar os anticorpos, preferivelmente o hospedeiro é um cavalo, porco, coelho, ovelha, ou cabra. Os métodos para produzir as vacinas de anticorpo policlonal destes hospedeiros são bem conhecidos na técnica. Por via de exemplo, a proteína de capsídeo ou um fragmento imunogênico específico desta ou capsídeo de FCV de calicivírus inteiro é misturado com um adjuvante, tal como completo de Freund ou o TiterMax menos tóxico disponibilizado por CytRx Corp., Norcross, Ga., que foi administrado então ao hospedeiro por métodos bem conhecidos na técnica. A produção de anticor-

po é monitorada e quando anticorpo suficiente foi produzido, o soro é removido do hospedeiro e preferivelmente o anticorpo é recuperado do soro.

A vacina de imunidade passiva pode compreender um ou mais anticorpos monoclonais contra um ou mais epítomos da proteína de capsídeo de FCV ou vírus de FCV inteiro. Os métodos e hibridomas para produzir anticorpos monoclonais são bem conhecidos na técnica. Ao mesmo tempo onde os anticorpos monoclonais podem ser feitos empregando tecnologias de hibridoma bem conhecidas na técnica, os anticorpos monoclonais contra o antígeno também podem ser feitos de acordo com os métodos de exibição de fago como descrito na Patente dos Estados Unidos Nº 5.977.322 por Marks e outros, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade. Os anticorpos felinizados contra a proteína de capsídeo ou porção desta podem ser feitos de acordo com os métodos que foram empregados para humanizar anticorpos como aqueles descritos nas Patentes dos Estados Unidos Nºs 5.693.762 e 5.693.761 ambas por Quenn e outros, que estão aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Um kit de exibição de fago que é útil para reparar anticorpos monoclonais é o Sistema de Anticorpo Fago Recombinante disponibilizado por Amersham Pharmacia Biotech.

ANTICORPOS, POLICLONAIIS E MONOCLONAIIS

Esta invenção também compreende, descreve e reivindica vários anticorpos monoclonais muito importantes. Estes anticorpos foram desenvolvidos aqui para identificar rapidamente e em alguns casos definir as cepas virais descritas aqui. Exemplos particulares de anticorpos monoclonais e suas descrições, podem ser encontrados nos seguintes exemplos. Em particular, veja EXEMPLO 1-2 e TABELA 1-2, e especialmente EXEMPLO 1-8, TABELA 1-4.

Os seguintes exemplos são pretendidos promover, porém não limitar um entendimento adicional da presente invenção

EXEMPLOS PARTE 1

EXEMPLO 1-1

ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE FCV-21

A cepa 21 de calicivírus de felino (FCV) (FCV-21) foi coletada

em junho de 1993 de uma exibição de gato Ann Arbor, Michigan. Foi diluído em microtubos de 96 cavidades contendo 1% de meio e diluições de 1:10 foram feitas. 100 ul da amostra diluída foram adicionados a 100 ul de células de CRFK em uma placa de 96 cavidades.

- 5 O vírus de FCV-21 foi purificado três vezes por diluição limitada em placas de 96 cavidades. O sobrenadante viral da purificação final foi removido e empregado para infectar células de CRFK crescidas a 75% de confluência em um frasco T25. Quando 100% de CPE foram observados, a suspensão era congelada/descongelada três vezes e aliqotada em frascos frios (1ml/frasco). O título desta matéria-prima viral foi determinado ser $1,5 \times 10^8$ de TCID₅₀/ml.

FCV-21 foi depositado com a American Type Culture Collection (ATCC), 10801 Blvd. University, Manassas, VA, 20110, E.U.A., e número de acessão de ATCC designado PTA_____.

15 EXEMPLO 1-2

IMUNOFLUORESCÊNCIA E ELISA DE FCV-21 USANDO VÁRIOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PREEXISTENTES OU COMERCIAIS

- Para o ensaio de imunofluorescência (IFA), uma matéria-prima viral de FCV-21 foi empregada para infectar uma placa de 24 cavidades semeada com células NLFK crescidas a aproximadamente 90% de confluência. Em aproximadamente 20 horas após a infecção, a placa foi lavada duas vezes com 1x PBS, e fixada com 80% de acetona. Vários anticorpos monoclonais foram diluídos a cerca de 2 ug/ul e adicionados às cavidades individuais da placa (0,2 ml/cavidade). Após uma incubação de 1 hora em temperatura ambiente (RT) com agitação, cada cavidade foi lavada duas vezes com 1x de PBS, e anticorpo secundário (anticamundongos FITC, 10 ug/ml) foi adicionado. Após cobrir a placa com folha de alumínio e incubar durante 30 minutos a RT com agitação, cada cavidade foi lavada duas vezes com 1x de PBS, e secada em ar. Cada cavidade foi observada então sob um microscópio de fluorescência quanto à sua intensidade de manchamento com FITC.

Para o ensaio de ELISA, uma placa de ELISA de 96 cavidades foi coberta com 200 ul de um anticorpo policlonal de coelho anti-FCV (Pfizer

- No.16), diluída 1:1500 em tampão de carbonato de sódio (1,59 g de Na_2CO_3 e 2,93 g de NaHCO_3 dissolvidos em 1 litro de água). A placa foi incubada durante a noite a 4°C. A placa foi lavada três vezes com 1x de PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de Tween-20 (PBST), então bloqueada com 200 ul de 1% de Caseína em PBST durante 1 hora a 37°C. Vários anticorpos monoclonais foram diluídos a cerca de 0,1 ug/ml e adicionados às cavidades individuais (100 ul/cavidade). Cada amostra foi feita em triplicata. Após a incubação a 37°C durante 1 hr, cada cavidade foi lavado 3 vezes com PBST, e incubada com 100 ul de IgG anticamundongo de Cabra AffiniPure conjugado por peroxidase diluído em 1:200 (H+L) (Jackson ImmunoResearch, cat. No.715-035-150) durante 1 hora a 37°C. Cada cavidade foi então lavada 3 vezes com PBST, seguido pela adição de 100 ul de substrate de peroxidase ABTS (K-PL, Gaithersburg, Maryland, cat. Nº 50-66-18) a cada cavidade. Após aproximadamente 10 minutos a RT a placa foi lida a 405-490 nm (comprimento de onda dual) com um leitor de ELISA. A atividade específica foi calculada com base na relação de sinal/ruído.

- Os conjuntos de dados dos ensaios de IFA e ELISA se correlacionaram bem entre si (TABELA 1-2), e indicou que FCV-21 é imunologicamente distinto de F9, uma cepa de vacina de FCV geralmente empregada.
- Dois anticorpos monoclonais (FCV 1-43 e MAB791P) reagiram com F9, porém não com FCV-21 (TABELA 1-2).

TABELA 1-2

SUMÁRIO DAS AFINIDADES DE VÁRIOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA FILAMENTOS DE FCV F9 E FCV-21

	fonte	Catálogo/ ID Nº	IFA		ELISA	
			F9	FCV-21	F9	FCV-21
1	Substância química exata	YVS7401	+++	++	17	16
2	Substância química exata	YVS7402	-	-	1	1
3	Substância química exata	MED-CLA309	++++	++++	8	3
4	Chemicon	MAB8962	++	++	23	24
5	Cortex Biochem	CR1260M	+	+	11	12
6	Custom Monoclonals, Int.	S1-9	+++	+++	27	24
7	Custom Monoclonals, Int.	FCV 1-43	+++	-	5	1
8	Custom Monoclonals, Int.	FCV8-1A	+++	+++	5	13
9	Maine Biotech	MAB790P	++++	++++	26	26
10	Maine Biotech	MAB791P	+++	-	4	1
11	Novocastra Lab	NCL-1G9	+++	+++	17	5
12	In-house (Pfizer)	1-4 mAb	-	-	1	1
13	In-house (Pfizer)	1-12 mAb	++++	+++	12	1
14	In-house (Pfizer)	3-3 mAb	++++	++++	22	25
15	In-house (Pfizer)	3-5 mAb	++++	++++	21	22
16	In-house (Pfizer)	Soro de coelho	++++	++++		
17	Biocor/Pfizer	S1.9AIA	++++	++++	29	33

EXEMPLO 1-3. ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE CAPSÍDEO DE FCV-21

5

RNA total foi isolado do sobrenadante de uma cultura e célula infectada com FCV-21 empregando reagente TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA). Uma preparação de cDNA da "primeira cepa" foi sintetizada empregando iniciadores aleatórios e transcriptase inversa Superscript II (Invitrogen). A

reação de PCR foi realizada empregando polimerase XL rTth (Applied Biosystem; Foster City, CA) e iniciadores de oligonucleotídeo DEL-653 (SEQ ID NO. 1) e DEL-651 (SEQ ID NO. 2). O produto de PCR resultante foi sequenciado empregando substância química de BigDye e um Analisador Genético ABI377. A sequência de capsídeo completa é listada como SEQ ID NO. 12 para sequência de nucleotídeo e SEQ ID NO. 13 para sequência de aminoácido codificada.

EXEMPLO 1-4. ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE FCV - 49

A cepa 49 de calicivírus de felino (FCV) (FCV-49, também chamado PHA-49) foi coletada em 1993 de uma amostra de gato da Filadélfia, PA. O espécime foi diluído em microtubos de 96 cavidades contendo 1% de mídia, e foram feitas 1:10 diluições. 100 ul da amostra diluída foram adicionados a 100 ul de células CRFK em uma placa de 96 cavidades. O vírus de FCV-49 foi purificado três vezes por diluição limitada em placas de 96 cavidades. O sobrenadante viral da purificação final foi removido e empregado para infectar células de CRFK crescidas a 75% de confluência em um frasco T25. Quando 100% de CPE foram observados, a suspensão foi congelada/descongelada três vezes e aliquoteada em frascos frios (1 ml/frasco). O título desta matéria-prima viral foi determinado ser $6,8 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

FCV-49 foi depositado com a American Type Culture Collection (ATCC), 10801 Blvd. University, Manassas, VA, 20110, E.U.A., e número acessão ATCC designado PTA _____.

EXEMPLO 1-5. ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE CAPSÍDEO DE FCV-49

RNA total foi isolado do sobrenadante de uma cultura de célula infectada por FCV-49 empregando reagente TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA). Uma preparação de cDNA da "primeira cepa" foi sintetizada empregando iniciadores aleatórios e transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen). A reação de PCR foi realizada empregando a polimerase XL rTth (Applied Biosystem; Foster City, CA) e iniciadores de oligonucleotídeo DEL-653 (SEQ ID NO:1) e DEL-651 (SEQ ID NO:2). O produto de PCR resultante foi sequenciado empregando substância química de BigDye e um Analisador Genético ABI377. A sequência de capsídeo completa é mostrada como SEQ ID

NO. 14 para sequência de nucleotídeo e SEQ ID NO. 15 para sequência de aminoácido codificada.

EXEMPLO 1-6. ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE FCV -26391-4

A cepa de calicivírus de felino (FCV) 26391-4 (FCV-26391-4) foi coletada em 2003 da Sociedade Humanitária de Município de Baía (Cidade de Panamá, Flórida). Foi purificada uma vez por diluição limitada em uma placa de 96 cavidades contendo meio de DMEM (Invitrogen) com 2% de soro bovino fetal. O vírus purificado foi então empregado para infectar um frasco de T150 contendo células NLFK (Norden Lab Feline Kidney). Uma vez que 100% de CPE foi alcançado, a suspensão foi congelada/descongelada e aliquoteada em frascos frios (0,85 ml/frasco). O título viral desta matéria-prima foi determinado ser $5,6 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

FCV-26391-4 foi depositado com a American Type Culture Collection(ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, USA, e número de acesso ATCC designado PTA _____.

EXEMPLO 1-7. ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE CAPSÍDEO DE FCV 26391-4

RNA total foi isolado do sobrenadante de uma cultura de célula infectada por FCV 26391-4 empregando um Kit de Isolamento de RNA Viral QIAamp (Qiagen; Valencia, CA). Aproximadamente 1 ug de RNA viral foi empregado em RT-PCR (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq; de Invitrogen). As condições de reação foram: 30 minutos a 50°C; 2 minutos a 94°C; seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, e 2 min a 70°C; seguido por uma incubação final a 72°C durante 10 min, e armazenamento a 4°C. Os iniciadores empregados foram FCV-N2 (SEQ ID NO. 3) e iniciador 2 FCV (SEQ ID NO. 9). O produto de PCR foi então sequenciado empregando vários iniciadores de oligonucleotídeo (SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e 11). A sequência do capsídeo inteira para FCV 26391-4 é mostrada como SEQ ID NO. 16 para sequência de nucleotídeo e SEQ ID NO. 17 para sequência de aminoácido codificada.

As sequências de aminoácido dos genes de capsídeo de FCV-21, FCV-49 e FCV-26391-4 foram alinhadas com todas as sequências de capsídeo FCV de tamanho natural disponíveis em GenBank. O alinhamento

foi criado empregando o algoritmo de ClustalW (Thompson e outros, 1994), a matriz de peso PAM250 (Dayhoff e outros, 1978), e parâmetros de programa *default* (MegAlign; DNASTAR, Inc; Madison, WI). A identidade entre as seqüências de proteína de capsídeo de FCV-21 e FCV 213-95, a mais elevada entre todas as entradas em GenBank, é 90,7%. As seqüências de cápside FCV-49 e FCV 213-95 são 92,2% idênticas. As seqüências de capsídeo FCV 26391-4 e FCV CFI-68 são 91,3% idênticas a cada outra.

Uma única seqüência de capsídeo é apresentada para FCV-21, FCV-49, e FCV 26391-4, e é com base no seqüenciamento direto dos produtos de PCR obtidos. Entretanto, cada uma destas seqüências representa a média, ou seqüência de consenso, entre uma população de quasispecies virais, que é conhecida por existir dentro das populações virais RNA (para uma revisão, veja Domingo e outros, Virus Res. 82:39-44; 2002). As quasispecies são um resultado direto de erros que ocorrem durante a reprodução de genoma de RNA, gerando progênie que tem mutações dentro de seu genoma. Portanto, é esperado que variantes menores das seqüências de capsídeo para estas e outras seqüências de gene de capsídeo de FCV existam naturalmente. Entretanto, a distribuição de mutações dentro de cada é tal que elas tenham pouco/nenhum efetuar sobre a identidade total entre as cepas, incluindo FCV-21, FCV-49, e FCV 26391-4.

EXEMPLOS 1-8. GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS PARA FCV-21.

A. Purificação de FCV-21. Cerca de 200 ml de sobrenadante de cultura de célula de células de NLFK infectadas com FCV-21, foram centrifugados a 3.000 rpm durante 30 minutos a 10°C. 25 ml do sobrenadante foram transferidos em tubos centrífugos Beckman Ultraclear, e 10 ml de uma solução de sacarose a 10% foram revestidos no fundo do tubo. Os tubos foram então centrifugados a 27.000 rpm durante 2 horas a 15°C. Seguinte a centrifugação, os sobrenadantes foram removidos e descartados, e os péletes foram ressuspensos em 250 ul de água estéril. A concentração de proteína foi determinada ser 7 mg/ml empregando o Kit de Ensaio de Proteína Micro BCA (Pierce Chemical Cia., Rockford,

IL).

IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS E GERAÇÃO DE CLONES DE CÉLULA DE HIBRIDOMA

Cerca de 100 ug de proteína de vírus FCV-21 purificada foram
 5 injetados em cada camundongo junto com o adjuvante de Freund. Oito camundongos foram vacinados. Duas imunizações de reforço foram realizadas com 100 ug de FCV-21 purificado com adjuvante de RIBI em intervalo de 4 semanas. As respostas imunes para esses oito camundongos foram determinadas ter título de 31250 ou acima de ELISA empregando FCV-21 purifi-
 10 cado. A fusão de célula foi realizada para criar clones de hibridoma. Sessenta e oito de tais clones de célula foram crescidos e o sobrenadante testado quanto a sua reatividade com FCV-21.

Para este ELISA, uma placa de 96 cavidades de ELISA foi revestida com 100 ul de FCV purificado a uma concentração de 5 ug/ml, diluída em 1xPBS. A placa foi secada durante a noite a 37°C descoberta em uma
 15 incubadora não umedecida. O vírus na placa foi fixo aplicando-se 0,1 ml de metanol e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. A placa foi então lavada 8 vezes com água destilada, em seguida bloqueada com 200 ul de 10% de soro caseiro em 1x PBS durante a noite a 4°C. A placa foi lavada
 20 novamente por 8 vezes com água destilada. Várias diluições de amostras de soro de camundongos foram adicionadas às cavidades individuais (100 ul/cavidade). Cada amostra foi feita em triplicata. Após incubação a 37°C durante 1 hr, cada cavidade foi lavado 3 vezes com PBST, e incubada com 100 ul de IgG anticamundongos de Cabra AffiniPure conjugado por peroxidase diluído 1:200 (H+L) (Jackson ImmunoResearch, cat. Nº 715-035-150)
 25 durante 1 hora a 37°C. Cada cavidade foi então lavada 3 vezes com PBST, seguido pela adição de 100 ul de substrato de peroxidase ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat. Nº 50-66-18) a cada cavidade. Após aproximadamente 10 min a RY, a placa foi lida a 405-490 nm (comprimento de onda dual) com um leitor de ELISA. Atividade específica foi calculada com base
 30 na relação de sinal/ruído.

REATIVIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS DE

FCV-21

Os sobrenadantes dos clones de célula de hibridoma acima foram empregados para testar quanto à sua reatividade a FCV-21 como também F9 em ensaio de ELISA sanduíche. Brevemente, uma placa ELISA de 96 cavidades foi coberta com 200 ul de um anticorpo policlonal de coelho anti-FCV (Pfizer No.16), diluído 1:1500 em tampão de carbonato de sódio (1,59 g de Na_2CO_3 e 2,93 g de NaHCO_3 dissolvido em 1 litro de água). A placa foi incubada durante a noite a 4°C. A placa foi lavada três vezes com 1x PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de Tween-20 (PBST), em seguida bloqueada com 200 ul de 1% de Caseína em PBST durante 1 hora a 37°C. Os sobrenadantes F-9 e FCV-21 e foram adicionados a cada cavidade em diluição de 1:10. Após incubação a 37°C durante 1 hora, as placas foram lavadas e vários sobrenadantes de hibridoma e sua várias diluições foram adicionadas às cavidades individuais (100 ul/cavidade) em triplicata. As placas foram então incubados a 37°C durante 1 hr, lavadas 3 vezes com PBST, e incubadas com 100 ul de IgG anticamundongo de Cabra AffiniPure conjugado por peroxidase diluído 1:200 (H+L) (Jackson ImmunoResearch, cat. Nº 715-035-150) durante 1 hora a 37°C. Após lavagem, 100 ul de substrato de peroxidase ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, cat. Nº 50-66-18) foram adicionados a cada cavidade. Após aproximadamente 10 min a RT a placa foi lida a 405-490 nm (comprimento de onda dual) com um leitor de ELISA. Atividade específica foi calculada com base na relação de sinal/ruído.

TABELA 1-3.

AVALIAÇÃO DE ELISA DE VÁRIOS SOBRENADANTES DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA QUANTO À SUA REATIVIDADE ESPECÍFICA PARA FCV-21 VS. F9.

	mAb não diluído		1:10 diluição de mAb		1:50 diluição de mAb	
mAb\Vírus	PHA-21	F9	PHA-21	F9	PHA-21	F9
1 sup	30	1	3	1	2	1
2A sup	2	1				
2B sup	3	1				

	mAb não diluído		1:10 diluição de mAb		1:50 diluição de mAb	
mAb\Vírus	PHA-21	F9	PHA-21	F9	PHA-21	F9
3 sup	29	3	21	1	16	1
4 sup	1	1				
5 sup	1	1				
6 sup	1	1				
7 sup	26	3	22	1	17	1
8 sup	9	8	3	1		
9A sup	1	1				
9B sup	1	1				
10 sup	15	13	10	6		
11 sup	1	1				
13 sup	27	22	19	14		
14A sup	2	2				
14B sup	5	3				
15 sup	1	1				
16 sup	21	2	5	1	2	1
17 sup	20	1	14	1	12	1
18 sup	27	22	25	11		
20 sup	1	1				
21 sup	17	9	7	2	2	1
22 sup	2	1				
23 sup	12	1	10	1	10	1
24 sup	14	14	1	1		
26 sup	1	1				
27 sup	15	7	8	3		
28 sup	1	2				
29 sup	24	8	23	1	29	1
30 sup	17	7	13	1	18	1
31 sup	19	19	16	11		
32 sup	28	16	21	12	18	10
33 sup	20	17	15	13		

	mAb não diluído		1:10 diluição de mAb		1:50 diluição de mAb	
mAb\Vírus	PHA-21	F9	PHA-21	F9	PHA-21	F9
34 sup	20	18	15	13		
35 sup	14	12	9	6		
36 sup	17	5	15	1	21	1
37 sup	12	4	3	1	1	1
38 sup	6	5				
39 sup	23	15	17	6		
40 sup	16	3	10	1	13	1
41 sup	19	7	14	1		
42 sup	13	1	15	1	17	1
43 sup	1	1				
44 sup	9	4	4	1		
45 sup	1	1				
46 sup	8	4	3	2		
47 sup	4	3				
48 sup	11	11	5	4		
49 sup	12	13	8	7		
50 sup	1	1				
51 sup	2	2				
52 sup	4	10				
53 sup	12	2	10	1	3	1
54 sup	1	1				
55 sup	19	18	25	15		
56 sup	8	4	6	1		
57 sup	1	1				
58 sup	2	8				
59 sup	18	1	20	1	16	1
60 sup	31	1	35	1	21	1
61 sup	18	4	33	1	29	1
62 sup	1	1				
63 sup	1	1				

	mAb não diluído		1:10 diluição de mAb		1:50 diluição de mAb	
mAb\Vírus	PHA-21	F9	PHA-21	F9	PHA-21	F9
64 sup	1	1				
65 sup	3	5				
66 sup	4	5				
67 sup	21	12	22	3		
69 sup	1	1				

B. Anticorpos monoclonais específicos para FCV-21 e não outras cepas de FCV. Dezoito clones de célula de hibridoma (3, 7, 17, 23, 27, 29, 30, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 53, 56, 59, 60 e 61) foram escolhidos para serem também testado quanto à sua especificidade para FCV-21. Onze vírus de FCV foram empregados no ensaio (FCV-21, 49, 26391-4, F9, CFI-68, 33585, 89391, 255, J-1, 2280 e H). Novamente, ELISA sanduíche foi empregado, como descrito acima. Os resultados são resumidos na TABELA 1-4.

TABELA 1-4.

10 REATIVIDADE DE SOBRENADANTES MONOCLONAIS CONTRA VÁRIAS
LINHAGENS DE FCV.

[illegible]

Yr de isolação	1993	1993	2003	1960	Não conhecido	2000	2000	1970	1984	1983	1990
mAb\Virus	21	49	26391-4	F9	CFI-68	33585	89391	255	J-1	2280	H
42 sup	15	21	1	1	1	1	1	1	1	1	2
44 sup	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
53 sup	10	20	2	1	21	1	1	1	17	1	14
56 sup	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
59 sup	20	4	1	1	1	1	1	1	1	1	2
60 sup	35	7	1	1	1	1	1	1	1	1	2
61 sup	33	21	12	1	25	1	1	1	3	1	8

Como demonstrado acima, as cepas de célula de hibridoma 23, 41, 44 e 56 são específicas para FCV-21, e não qualquer outro FCV testado. Portanto, esses anticorpos monoclonais podem ser empregados como uma ferramenta diagnóstica para FCV-21. Além disso, hibridoma 36 parece reagir com cepa de FCV de vacina somente (FCV-21, 49, 26391-4) e não qualquer outra cepa de FCV.

As cepas de célula de hibridoma 23, 36, 41, 44 e 56 foram todas depositadas com a American Type Culture Collection (ATCC), 10801 Blvd. University, Manassas, VA, 20110, E.U.A., e números de acesso ATCC designado:

PTA-7349 (23)

PTA-7350 (36)

PTA-7353 (41)

PTA-7351 (44)

PTA-7352 (56)

EXEMPLO 1-9.

ANÁLISE DA NEUTRALIZAÇÃO CRUZADA DE SORO DE SOROS DE FCV-21 E FCV-49 CONTRA VÍRUS DE FCV ISOLADOS EM 1993.

A. Titulação de anti-soro homólogo. Anti-soro convalescente contra doze isolados de FCV foi elevado em gatos livres de patógeno específico (SPF), e coletado após uma inoculação primária e secundária. O inóculo de vírus variou de acordo com os títulos de matéria-prima, variando de 10^4 a 10^8 TCID₅₀/gato. Os gatos foram inoculados inicialmente, re-

forçados 3 semanas depois, e então foram sangrados para soro que 2
semanas após o reforço. Os doze isolados incluíram F9, CFI-68,
LSO12, JOK63, JOK92, e isolados de campo 18, 21, 49, 50, 54, 27, e
11. Os isolados de campo foram selecionados com base em uma aná-
5 lise filogenética das seqüências da região hipervariável de cada se-
qüência de proteína de capsídeo da cepa. O isolados mais divergentes
foram escolhidos para o estudo.

Os soros foram inativados por calor a 56°C durante 30 minutos,
e titulados contra seu vírus homólogo empregando um vírus constante stan-
10 dard - técnica de soro variante (Griest 1979, Mahy 1996). Brevemente, os
meios (100-150 µl) foram adicionados a cada cavidade de uma placa de cul-
tura de tecido de 96 cavidades. O soro (100-150 µl) foi adicionado a cada
cavidade da fila de topo (1:2 ou 1:4 diluição de soro inicial; F9 e LSO12 em
1:4), e 100 µl foram transferidos para placa após a misturar (1:2 diluições)
15 com um pipetador de multicanal. O último em 100 µl foi descartado. 50 µl de
vírus homólogo titulado (diluído a 200 TCID₅₀/50 µl) foi adicionado a cada
cavidade, e as placas foram incubadas durante 2 h a 37°C em uma incuba-
dora de CO₂. Após incubação, 50 µl de uma diluição de 1:10 de células
CRFK em suspensão foram adicionados a cada cavidade. Uma placa de
20 título de vírus foi montada empregando o vírus diluído para garantir que um
inóculo apropriado foi adicionado a cada cavidade. 50 µl de vírus foram em-
pregados na fila de topo contendo 150 µl de meio; o resto da placa conteve
180 µl/cavidade, e diluições de 10-dobras foram realizadas abaixo da placa
com 20 µl. As placas foram incubadas durante 4 dias, e a fórmula de Kärber
25 foi empregada para calcular o soro e títulos virais (no caso de títulos de soro,
a proporção de cavidades protegidas para desprotegidas foi empregada na
equação).

Quando titulando o soro, o TCID₅₀ foi definido como os 50% de
diluição de finalidade neutralizante (Griest 1979). Uma unidade de anticorpo
30 (AU) foi definida como a diluição mais elevada daquele anti-soro capaz de
neutralizar 32-320 TCID₅₀ do vírus homólogo em 50% das culturas de teste.
Portanto, o TCID₅₀ obtido é igual a 1 AU. As neutralizações cruzadas de ví-

rus foram realizadas contra as concentrações de soro de 2,5, 5, 10 e 20 AU.

B. Ensaio de neutralização cruzada de vírus.

Cada campo viral isolado, como também cepas F9, LSO12, JOK63, JOK92, SA113 e CFI-68, foi testado contra cada dos doze anti-soros de FCV em um ensaio de neutralização cruzada. Cada vírus requereu cinco placas de 96 cavidades. Cada soro foi diluído a 2,5, 5, 10 e 20 AU e semeado em réplicas de oito abaixo da placa (três seros/placa para um total de quatro placas), e uma placa de título de vírus (ajustada do mesmo modo como para titulações de soro). As diluições de anti-soros foram preparadas em DMEM primeiro diluindo-se o soro a 20 AU, e em seguida realizando diluições de 2 dobras até 2,5 AU. Uma alíquota de cada diluição (100 µl) foi então adicionada a cada coluna de cavidades na placa. Os vírus foram rapidamente descongelados a 37°C, colocados em gelo, e então diluídos a 200 TCID₅₀/cavidade (mantidos no gelo). Para manter a consistência, um processo de diluição de três etapas foi usado para a maioria das matérias-primas virais, nunca indo mais elevado do que uns 1:100 em qualquer etapa. A matéria-prima de vírus diluída (50 µl) foi adicionada a todas as cavidades das placas de soro e tituladas como descrito previamente. As placas foram incubadas a 37°C em uma incubadora de CO₂ durante 2 hr após o que 50 µl de diluição 1:10 de uma suspensão de célula CRFK previamente crescida para confluência foram adicionados a cada cavidade. As extremidades das pipetas e cubas do reservatório foram alteradas após cada série de cinco placas. As placas foram classificadas após 4 dias. Em alguns casos, o vírus pré-titulado, pré-diluído foi empregado.

25 TABELA 1-5.

RESULTADOS DA NEUTRALIZAÇÃO CRUZADA DE SORO

Soro	JOK63	JOK92	CFI68	LSO12	F9	11
vírus	2,5/5/10/ 20*	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20
LSO12	-- n n	----	n N N N	n N N N	N N N	----
F9	----	----	--- n	----	n N N *	----
JOK92	----	- n N N	----	--- n	N N N	----

Soro	JOK63	JOK92	CFI68	LSO12	F9	11
vírus	2,5/5/10/ 20*	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20
CFI68	-----	-----	NNNN	nNNN	NNN	-----
JOK63	nnnN	-----	-----	-----	nNn	-----
SA113	-----	-----	--nN	-----	NNN	-----
3	-----	-----	-----	-----	-	-----
4	-----	-----	-----	-----	-nN	-----
6	-----	-----	-----	-----	-	-----
7	---n	-----	-----	---n	N	-----
8	-----	-----	-----	---n	-	-----
9	-----	-----	---n	--n-	N	-----
10	-----	-----	-----	-----	--N	-----
11	-----	-----	-----	-----	---	nnn
12	-----	-----	-----	---n	--n	-----
13	-----	-----	--nn	-----	nNN	-----
14	-----	-----	-----	-----	-	-----
15	-----	-----	-----	-----	--N	-----
16	-----	-----	-----	-----	-	-----
17	--nn	-----	nnnN	--nn	n	-----
18	-----	-----	-----	-----	-	-----
19	-----	-----	-----	-----	-Nn	-----
20	-----	-----	-----	-----	--n	-----
21	-----	-----	-----	-----	-nn	-----
22	-----	-----	-----	-----	-nn	-----
23	--nN	-----	---n	-----	NNN	-----
24	-----	-----	-----	-----	nnN	-----
25	-----	-----	-----	-----	---	-----
27	-----	-----	-----	-----	---	---n
28	-----	-----	-----	-----	NNN	-----
29	-----	-----	-----	-----	nnN	-----
30	-----	-----	-----	--nN	N	-----
34	-----	-----	-----	-----	--n	-----
36	-----	-----	-----	-----	-nn	-----

Soro	JOK63	JOK92	CFI68	LSO12	F9	11
vírus	2,5/5/10/ 20*	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20	2,5/5/10/ 20
38	----	----	----	----	-	----
39	----	----	----	----	---	----
41	----	----	----	----	-- n	----
42	----	----	----	----	n n n	----
47	----	----	----	----	-- N	----
48	----	----	----	----	N N N	----
49	----	----	----	----	n N N	----
50	-- n N	----	-- n N	-- n N	N	----
51	----	----	----	----	-	----
52	----	----	----	----	-	----
53	----	----	----	----	N	----
54	----	----	----	----	N	----
55	----	----	----	----	-	----
56	----	----	n - n n	-- n n	N	----

* 2,5, 5, 10, 20 unidades de anticorpo empregadas em SN N= 8/8 cavidades protegidas

n= 4-7/8 cavidades protegidas = 0-3/8 cavidades protegidas

vazio= soro insuficiente/não feito

5 TABELA 1-5 (CONTINUAÇÃO)

soro	18	21	27	49	50	54
vírus	2,5/10/20*	2,5/10/20	2,5/10/20	2,5/0/20	2,5/10/20	2,5/5/10/20
LSO12	--- n	N N N	----	N N N	----	-- n N
F9	----	N N N	----	n N N	--- n	----
JOK92	----	-- n	----	n n N	----	----
CFI68	----	N N N	----	N N N	----	----
JOK63	----	---		N N N	-- n n	----
SA113	N N N N	- n N		N N N	----	- n n n
3	----	---	----	N N N	----	- N N N
4	----	-- n	----	- N N	N N N N	--- n
6	----	---	----	- n n	----	----

soro	18	21	27	49	50	54
vírus	2,5/10/20*	2,5/10/20	2,5/10/20	2,5/0/20	2,5/10/20	2,5/5/10/20
7	----	- n n	----	NNN	----	-- n N
8	----	- n -	----	-- N	----	----
9	----	-- n	----	n N N	----	----
10	----	---	----	---	----	----
11	----	---	--- N	---	----	----
12	----	---	----	n N N	----	----
13	----	- n -		NNN	----	n n n n
14	----	---	-- n n	n N N	----	- n n N
15	----	NNN	----	n N N	----	- n n n
16	----	---	----	-- n	----	----
17	-- n n	n n n	-- n n	NNN	----	- n n N
18	n N N N	-- n	----	- N N	----	----
19	----	n - n	----	- n n	----	----
20	----	---	----	-- N	NNNN	----
21	----	NNN	----	- n N	----	----
22	----	---	----	- n n	----	----
23	----	NNN	--- n	NNN	-- n N	- n n N
24	----	n n N	----	---	----	--- n
25	----	---	----	-- n	--- n	----
27	----	---	NNNN	-- n	----	----
28	----	- n n		NNN	----	----
29	----	---	----	---	----	----
30	----	n n N	----	NNN	----	----
34	----	---	----	-- N	----	----
36	----	---	----	- n N	----	----
38	----	---	----	---	----	----
39	----	---	----	---	----	----
41	----	---	----	- n N	----	----
42	----	---	----	n n N	----	----
47	----	n n n	----	- n N	----	----
48	----	n n N		NNN	--- n	----
49	----	- n n	----	NNN	--- n	----

soro	18	21	27	49	50	54
vírus	2,5/10/20*	2,5/10/20	2,5/10/20	2,5/0/20	2,5/10/20	2,5/5/10/20
50	----	N N N	----	N N N	N N N N	-- n N
51	----	N N N	----	-- n	----	----
52	----	---	----	N N N	----	----
53	----	n N N	----	n n N	----	--- n
54	----	-- n	----	- n N	----	n N N N
55	----	N N N	----	- N N	----	----
56	-- n N	n n N	----	N N N	----	--- n

* 2,, 5, 10, 20 unidades de anticorpo empregadas em SN

N= 8/8 cavidades protegidas

n= 4-7/8 cavidades protegidas

--= 0-3/8 cavidades protegidas

5 vazio = soro insuficiente/não feito

Os dados de neutralização cruzada são resumidos na TABELA 1-5. Cada ponto de dados representa oito cavidades de réplica ensaiadas. "N", "n", ou "--" represente a proporção de cavidades protegidas para não protegidas, que é uma indicação da extensão de neutralização cruzada. Os resultados da neutralização de soro correspondendo a cada soro monoespecífico testado contra seu vírus homólogo é realçado na TABELA. Estes soros deveriam neutralizar completamente; a maior parte deles neutraliza. As poucas exceções, notavelmente JOK63, JOK92 e 11, mostram neutralização completa a valores AU mais altos, porém não a 2,5 AU. Isto é provável devido a erros de diluição. O resultado mais significante desta série de dados é o grau elevado de neutralização cruzada exibida por soros FCV-21 e FCV-49, particularmente o último. Os padrões de neutralização cruzada destes soros parecem ser semelhantes àqueles de F9. (Deveria ser notado que a série de dados para F9, e para FCV-21 e FCV-49 a 20 AU, é incompleto devido a quantidades insuficientes de soros). Embora existam algumas diferenças em padrões de neutralização entre os três soros (FCV-21, FCV-49, e F9), os isolados 11, 38 e 39 não foram neutralizados consistentemente por quaisquer dos três.

EXEMPLO 1-10.ANÁLISE DE NEUTRALIZAÇÃO CRUZADA DE ANTI-SOROS FCV-21 E E FCV-49 CONTRA VÍRUS DE FCV ISOLADOS EM 2003.

Os anti-soros de FCV neste estudo foram gerados inoculando
 5 10^5 a 10^6 dCID₅₀/ml de FCV intranasalmente em gatos (4-5 gatos/grupo). Uma inoculação de reforço foi realizada 3 semanas após empregar a mesma quantidade de vírus. Os soros foram coletados 2 semanas pós-reforço e tratados com calor a 56°C durante 30 minutos.

As amostras de soro de cada dos gatos vacinados foram empregadas no ensaio de neutralização de soro contra cada das 26 cepas de FCV (TABELA 1-6). As amostras de soro foram diluídas a 1:8 e seguidas por diluições seriais de 2 dobras consecutivas para 1:16384 (total de 12 diluições) em 600 ul de volume. FCV com faixa de título entre 50-500 TCID₅₀/ml em 600 ul foram misturados com amostras de soro diluídas juntas e incubados a
 15 temperatura ambiente durante 45 minutos. Em seguida, 200 ul de amostra foram transferidos em cada cavidade da placa de 96 cavidades semeada com células de CRFK em quadruplicação. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 6 dias e o título de neutralização de finalidade foi determinado. Tanto o título de neutralização de soro (SN) quanto o título-reverso de vírus de desafio foram calculados pelo método de Spearman-Kärber (Spearman C, 1908, Brit J Psychol 2:227-242; Karber G, 1931, Arch exp Path Pharmacol 162: 480-487).
 20

Os dados de neutralização de soro foram analisados com títulos de corte de >23 e >15 e >10. Os resultados são mostrados na TABELA 1-7.
 25 Os dados sugerem FCV-21, FCV-49 e FCV 26391-4 tenham perfis de neutralização cruzada mais amplos, e são então melhores candidatos de vacina do que a cepa de vacina de FCV real, F9.

TABELA 1-6.

26 LINHAGENS DE FCV EMPREGADAS NOS ESTUDOS DE NEUTRALI-
 30 ZAÇÃO CRUZADA

Linhagem	Ano	Local
12217-02	2002	NY

Linhagem	Ano	Local
19306	2003	FL
26391-4	2003	FL
27086-2	2003	FL
32561-1	2003	EM
32561-14	2003	EM
32561-15	2003	EM
32561-7	2003	EM
36069-2	2003	MT
84883-02	2002	NY
F9	1960	Não Conhecido
J-1	1984	CT
H	1990	AZ
2280	1983	Não Conhecido
255NVSL	1970	Não Conhecido
94580	2000	NY
100869-1	2000	Ontário
33585	2000	MA
88287	2000	PA
89391	2000	PA
101920-1	2002	NY
17932-17	2003	RI
30101-2	2003	MT
41927-8	2003	CO
FCV-21	1993	MI
FCV-49	1993	PA

TABELA 1-7.

ANÁLISE DE NEUTRALIZAÇÃO CRUZADA DE FCV-21, FCV-49, E FCV 26391-4 COMPARADO COM F9

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

B,		Candidato sobre F9
	% (título SN >15)	% de aumento (IN)
FCV-21 IN	51,5	62,5
FCV-49 IN	37,7	18,9
FCV 26391-4 IN	39,4	24,3
F9 IN	31,7	

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

EXEMPLO 1-11.

5 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E MORTALIDADE PARA GATOS VACINADOS COM COMPONENTES DE FELOCELL 4 COM E SEM FCV-21.

Gatos de pêlo curto domésticos, cerca de 8 semanas de idade, foram vacinados com componentes de FELOCELL® 4 que contêm vírus de rinotraqueíte de felino vivo modificado [FHV], calicivírus [FCV-F9], vírus de panleucopenia [FP] e *Chlamydia psittaci*, com ou sem outra cepa de FCV, FCV-21. Os regimes de vacinação avaliados incluíram: uma vacinação subcutânea inicial seguida por reforços subcutâneos no dia 21 (SQ/SQ); uma

10

vacinação subcutânea inicial seguida por uma imunização de reforço oral no dia 21 (SQ/Oral); ou uma vacinação oral inicial seguida por uma segunda vacinação oral no dia 21. A vacinação oral foi obtida por administração da vacina na boca. No dia 42, todos os gatos foram desafiados com aproximadamente 1 mL de FCV-33585 sistêmico virulento (3 log de TCID₅₀/mL). Todos os gatos foram monitorados para sinais clínicos (temperatura, escorrimento soroso de conjuntivite, escorrimento mucopurulento de conjuntivite, escorrimento soroso de rinite, escorrimento mucopurulento de rinite, espirro, ronqueiras audíveis, respiração de boca aberta com tosse, anorexia, desidratação, uma úlcera oral < 4 mm, úlceras orais múltiplas, úlceras orais > 4 mm, salivação, úlcera externa sem sangramento, úlceras externas com sangramento) da doença durante 14 dias após o desafio. Os gatos que exibem sinais clínicos severos pós-desafio que foram consistentes com patogênese de calicivírus foram eutanizados.

Como mostrado na TABELA 1-8, a adição da nova cepa FCV-21 significativamente aumenta a eficácia de FELOCELL 4, com ou sem a presença de FCV-F9. A vacinação de SQ/SQ e vacinação de SQ/Oral parece ser eficaz para prevenir infecção de FCV. Além disso, é demonstrada a eficácia até mesmo contra infecção de FCV com vacinação Oral/Oral com adição de FCV-21 e ausência de F9 em FELOCELL 4 e FELOCELL 3 (FELOCELL 3 é FELOCELL 4 sem *Chlamydia psittaci*).

Para TABELA 1-9, os regimes de vacinação avaliados incluíram uma vacinação subcutânea inicial seguida por duas imunizações de reforço orais no dia 21 e dia 42 (SQ/Oral/Oral). É demonstrado que a adição de FCV-21, com ou sem FCV-F9 em FELOCELL 4, significativamente diminuiu as classificações clínicas e mortalidade.

TABELA 1-8												
Tratamento	Vacinação					Desafio			Classificação Clínica			
	Nº de animais	Dias	Dose	Rotina	Dias	Linagem de FCV	Nº deanimais	Mortalidade	Média	Mínima	Máxima	
Control Negativo	10	0	1 ml	SQ	42	33585	9	78%	24	2	35	
		21	1 ml	SQ								
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	33585	9	44%	12	3	18	
		21	1 ml	SQ								
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	2.5	0	11	
		21	1 ml	SQ								
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	1.5	0	13	
		21	1 ml	SQ								
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	10%	5.5	0	30	
		21	1 ml	Oral								
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	3.5	0	13	
		21	1 ml	Oral								
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	10%	5	1	22	
		21	1 ml	Oral								
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral	42	33585	10	0%	3	0	10	
		21	1 ml	Oral								
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	33585	10	0%	2	0	8	
		21	1 ml	SQ								
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	Oral	42	33585	10	0%	4	0	10	
		21	1 ml	Oral								
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral	42	33585	10	0%	5	1	18	
		21	1 ml	Oral								

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sem FCV-F9, porém com FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sem FCV-F9, porém com FCV-21

TABELA 1-9												
Grupo	Tratamento	Vacinação				Desafio			Classificação Clínica			
		Nº de animais	Dias	Dose	Rotina	Dias	Linhagem de FCV	Nº de animais	Mortalidade	Média	Mínima	Máxima
T01	Controle Negativo	10	0	1 ml	SQ	63	33585	10	100%	25	21	31
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T02	Felocell 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	63	33585	10	0%	5,5	0	17
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T03	Felocell 4A*+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	63	33585	9	0%	4	0	10
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						
T04	Felocell 4	10	0	1 ml	SQ	63	33585	10	30%	10,5	1	30
			21	1 ml	Oral	63						
			42	1 ml	Oral	63						

*Felocell 4A: Felocell 4 sem FCV-F9

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

EXEMPLO 1-12.ANÁLISE DE NEUTRALIZAÇÃO CRUZADA DE SOROS DE GATOS VACINADOS COM COMPONENTES DE FELOCELL 4 COM E SEM FCV-21

- As amostras de soro de cada gato no estudo descritas em EXEMPLO 1-11, foram coletadas seguinte a segunda vacinação, porém antes de 85 desafios. As amostras foram tratadas com aquecimento a 56°C durante 30 minutos, e avaliados no ensaio de neutralização de soro contra cada das 26 cepas de FCV como previamente descrito no EXEMPLO 1-10 (TABELA 1-6).
- Os dados de neutralização de soro foram analisados com títulos de corte de >23 e >15, e uma média dos dois títulos de corte foi calculada (Ave.). Os resultados são mostrados na TABELA 1-10. Os dados indicam que todas as formulações de vacina que contêm FCV-21 tiveram perfis de neutralização cruzada mais amplos do que as vacinas contendo a cepa de FCV-F9 tradicional (~60% vs. 40%). Isto resultou em um aumento aproximado de 50% no número das cepas de FCV neutralizadas.

TABELA 1-10											
Tratamento	Vacinação						Coleta de Soro		Neutralização Cruzada		
	Nº de animais	Dias	Dose	Rotina	Dias	Nº de animais			% (>23)	% (>15)	% (Ave)
Controle negativo	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	SQ	42	9			10,8	13,9	12,4
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	SQ	42	9			38,5	42,3	40,4
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	SQ	42	10			58,9	64,6	61,8
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	SQ	42	10			56,5	62,3	59,4
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	Oral	42	10			39,2	42,7	41,0
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	Oral	42	10			56,2	60	58,1
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	Oral	42	10			49,6	59,2	54,4

(continuação)

TABELA 1-10											
Tratamento	Vacinação					Coleta de Soro		Neutralização Cruzada			
	Nº de animais	Dias	Dose	Rotina	Dias	Nº de animais		% (>23)	% (>15)	% (Ave)	
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral							
		21	1 ml	Oral	42	10		51,2	54.6	52.9	
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	SQ	42	10		53,9	62.7	58.3	
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ							
		21	1 ml	Oral	42	10		55,8	63.9	59.9	
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral							
		21	1 ml	Oral	42	10		60,8	68.1	64.5	

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sem FCV-F9, porém com FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sem FCV-F9, porém com FCV-21

Como também mostrado na TABELA 1-10, a adição das novas cepas de FCV-21 significativamente aumentou o perfil de neutralização cruzada de FELOCELL 4, com ou sem a presença de FCV-F9. Os perfis de neutralização cruzada mais amplos foram observados com vacinação de SQ/SQ e vacinação de SQ/Oral. Além disso, são demonstrados os perfis de neutralização cruzada realçados com vacinação de Oral/Oral com a presença de FCV-21, porém não F9, em FELOCELL 4 e FELOCELL 3.

Na TABELA 1-11, os regimes de vacinação avaliados incluíram uma vacinação subcutânea inicial seguida por duas imunizações de reforço orais no dia 21 e dia 42 (SQ/Oral/Oral). Os resultados indicam que a adição de FCV-21, com ou sem FCV-F9 em FELOCELL 4, resultou em perfis de neutralização cruzada significativamente mais amplos (40% de aumento aproximado).

TABELA 1-11												
	Vacinação						Coleta de Soro		Neutralização Cruzada			
Tratamento	Nº de Animais	Dias	Data	Dose	Rotina		Dias	Nº de animais	% (>23)	% (>15)	% (Ave)	
Controle Negativo	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ		63	10	5,8	10,4	8,1	
		21	3/8/2005	1 ml	Oral							
		42	3/29/2005	1 ml	Oral							
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ		63	10	72,5	77,1	74,8	
		21	3/8/2005	1 ml	Oral							
		42	3/29/2005	1 ml	Oral							
FELOCELL 4A*	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ		63	9	72,5	76,7	74,6	
		21	3/8/2005	1 ml	Oral							
		42	3/29/2005	1 ml	Oral							
FELOCELL 4	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ		63	10	49,6	57,9	53,8	
		21	3/8/2005	1 ml	Oral							
		42	3/29/2005	1 ml	Oral							

* FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sem FCV-F9, porém com FCV-21

Descrição numerada da invenção. Descrição adicional das invenções e exemplos. 1. Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-21 ou uma proteína de capsídeo de FCV-21 isolada. 2. Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-21 ou uma proteína de capsídeo de FCV-21 isolada onde a referida proteína de capsídeo compreende seqüência de proteína (SEQ ID 13) e seqüências que têm pelo menos cerca de 91,2%, 95% e 99% de identidade; onde a referida proteína de capsídeo é fornecida em uma quantidade eficaz para produzir uma resposta imune, e um veículo farmacologicamente aceitável. 3. Uma vacina de DNA para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende seqüências de ácido nucléico que codificam para uma proteína de capsídeo de FCV-21 ou uma proteína de capsídeo de FCV-21 isolada onde o referido DNA compreende uma seqüência (SEQ. ID 12) e seqüências que têm pelo menos cerca de 78,7%, e 79,2% de identidade de seqüência e permitindo substituições conservadoras. 4. Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-49 ou uma proteína de capsídeo de FCV-49 isolada, onde a referida proteína de capsídeo compreende uma seqüência de proteína de cepa FCV-49. 5. Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-49, ou uma proteína de capsídeo de FCV-49 isolada, onde a referida proteína de capsídeo compreende seqüência de proteína (SEQ ID 15) e seqüências que têm pelo menos cerca de 92,7%, 95% e 99% de identidade; onde a referida proteína de capsídeo é fornecida em uma quantidade eficaz para produzir uma resposta imune, e um veículo farmacologicamente aceitável. 6. Uma vacina de DNA para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende seqüências de ácido nucléico que codificam para uma proteína de capsídeo de FCV-49 ou uma proteína de capsídeo de FCV-49 isolada, onde o referido ADN compreende uma seqüência (SEQ. ID 14) e seqüências que têm pelo menos cerca de 78,9%, isto é, 79,4% (78,9 + 0,5) de identidade de seqüência e permitindo substituições conservadoras. 7. Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de

felino que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4, ou uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4 isolada, onde a referida proteína de capsídeo compreende seqüências de proteína de cepa FCV-26391-4. 8. Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende

5 uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4 onde a referida proteína de capsídeo compreende seqüência de proteína (SEQ ID 17) e seqüências que têm pelo menos cerca de 91,8%, 95% e 99% de identidade onde a referida proteína de capsídeo é fornecida em uma quantidade eficaz para produzir uma resposta imune, e um veículo farmacologicamente aceitável. 9. Uma vacina

10 de DNA para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende seqüências de ácido nucléico que codificam para uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4 ou uma proteína de capsídeo de FCV-26391-4 isolada, onde o referido DNA compreende uma seqüência (SEQ. ID 16) e seqüências que têm pelo menos cerca de 78,4%, isto é, 78,9% (78,4 + 0,5) de identidade de

15 seqüência. 10. A vacina de quaisquer das reivindicações 1-3, onde o polinucleotídeo é selecionado do grupo que consiste essencialmente em SEQ ID NOS. 12, 14, 16. 11. A vacina de quaisquer das reivindicações 1-3, também compreendendo ou sozinho ou em qualquer combinação os seguintes: onde contém um adjuvante, onde o componente de FCV está vivo, onde o com-

20 ponente de FCV é inativado, onde o componente de FCV é inativado, que pode incluir pelo menos uma outra cepa de calicivírus de felino selecionada do grupo que consiste em FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255, e FCV-2280. 12. A vacina das reivindicações, 1, 4, e 7, onde a vacina inclui pelo menos um outro patógeno de felino, selecionado do grupo que consiste em

25 vírus de herpes felino, vírus de leucemia felino, vírus de imunodeficiência felino, *Chlamydia psittaci*, e parvovírus de felino, vírus de raiva e *Bordetella bronchiseptica*. 13. Uma vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino que compreende uma seqüência de nucleotídeo de uma proteína de capsídeo de FCV selecionada do grupo que consiste em um polipeptídeo que

30 tem 93% ou mais de identidade com SEQ ID NO.13, 15, ou 17, onde o isolado de FCV não é a cepa 213-95, e onde a seqüência de ácido nucléico é operavelmente ligada a uma seqüência promotora heteróloga, em uma

- quantidade eficaz para produzir uma resposta imune, e um veículo farmacêuticamente aceitável. 14. A vacina da reivindicação 13, onde a sequência de nucleotídeo é selecionada do grupo que consiste essencialmente em SEQ ID NOS. 12, 14 e 16. 15. A vacina da reivindicação 13, onde a sequência de nucleotídeo está em qualquer dos seguintes: um plasmídeo, um vetor de vírus recombinante. 16. A vacina da reivindicação 13, onde o vetor de vírus recombinante é selecionado do grupo que consiste em vírus de herpes felino, poxivírus de guaxinim, poxivírus de canário, adenovírus, vírus de Semliki Forest, vírus de Sindbis, e vírus de vacínia. 17. Uma composição imunogênica que compreende um veículo veterinariamente aceitável de excipiente e uma cepa isolada de FCV que se liga a um anticorpo monoclonal selecionado dos anticorpos monoclonais descritos aqui, tal como 23, 26, 41, 44 e 56. 18. Uma composição imunogênica que compreende um veículo veterinariamente aceitável de excipiente e uma cepa isolada de FCV que seletivamente se liga a um anticorpo monoclonal selecionado dos anticorpos monoclonais descritos aqui, tal como 23, 26, 41, 44 e 56. 19. As composições imunogênicas da reivindicação 17 e 18, onde a cepa de FCV é inativada, onde a referida cepa de FCV é uma vacina, e onde a composição compreende um adjuvante. 20. Um método por imunizar um gato contra calicivírus de felino que compreende: administrar ao gato uma dose eficaz de uma vacina de quaisquer das reivindicações 1-14, onde a vacina adicionalmente compreende um adjuvante.

PARTE 2

ESTA SEÇÃO ABAIXO FORNECE INFORMAÇÃO DETALHADA SOBRE OS MÉTODOS DE IMUNIZAR ANIMAIS CONTRA VÍRUS E EM PARTICULAR GATOS CONTRA CALICIVÍRUS

A menos que de outro modo indicado, as descrições abaixo usam as definições fornecidas acima e abaixo.

Descritos aqui são métodos e materiais para tratar e imunizar animais com vacina e em particular gatos contra calicivírus de felino (FCV). O método inclui administrar ao gato, quantidades terapeuticamente eficazes de primeiras e segundas vacinas que são capazes de induzir uma resposta

imune, e em particular no gato contra FCV. A primeira vacina é tipicamente administrada parenteralmente, porém em algumas situações pode ser administrada oralmente, ao mesmo tempo onde a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente N dias seguinte à administração da primeira vacina. Estas vacinas são tipicamente administradas parenteralmente primeiro porque elas tipicamente causam lesões orais se inicialmente administradas oralmente. Surpreendentemente, são descritas cepas FCV-21, FCV-49 e FCV 26391-4 que são tão seguras e eficazes que elas podem ser administradas como uma primeira administração oral seguida por uma segunda administração oral. Aqui, N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, porém é tipicamente um número inteiro de 7 a 42, inclusive, ou de 14 a 28, inclusive, preferido é cerca de 3 semanas e também cerca de 2-4 semanas. Alternativamente, a segunda vacina pode ser administrada após o gato ter desenvolvido um título de neutralização de soro de FCV de cerca de 1:6, 1:9, 1:12, 1:15, 1:18, ou maior.

O método também pode incluir uma ou mais administrações parenterais, orais ou oronasais adicionais de uma vacina de FCV M dias de administração seguinte a primeira vacina ou a segunda vacina onde M é um número inteiro de 1 a 120, inclusive. Desse modo, os regimes de vacinação representativos incluem (1) administração subcutânea de uma primeira vacina de FCV, seguido por administração oral de uma segunda vacina de FCV; (2) administrações subcutâneas sucessivas de primeiras e terceiras vacinas de FCV, seguido por administração oral de uma segunda vacina de FCV; e (3) administração subcutânea de uma primeira vacina de FCV, seguida por administrações orais sucessivas das segundas e terceiras vacinas de FCV.

Como descrito acima, a primeira vacina é administrada parenteralmente (por exemplo, subcutaneamente), a Segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, e uma terceira vacina opcional pode ser administrada parenteralmente, oralmente ou oronasalmente. Qualquer dispositivo pode ser empregado para administrar as vacinas, incluindo seringas, contagotas, dispositivos de injeção sem agulha, e outros. Para administração oronasal, uma seringa carregada com uma cânula pode ser empregada para

colocar gotas da vacina no nariz e boca do gato.

O método pode empregar qualquer vacina que seja capaz de induzir uma resposta imune no gato contra FCV, contanto que a primeira vacina seja adaptada para ser administrada parenteralmente e a segunda
5 vacina seja adaptada para ser administrada oralmente ou oronasalmente. Como notado acima, a terceira vacina opcional é adaptada para ser administrada parenteralmente, peroralmente, ou oronasalmente. As primeira, segunda, e terceira vacinas opcionais podem ser iguais ou diferentes e cada compreende, independentemente, um antígeno ou antígenos derivados de
10 uma ou mais cepas de FCV. As vacinas úteis desse modo incluem vacinas de vírus vivo, vacinas de vírus vivo modificado, e vacinas de vírus inativado. As vacinas de FCV vivo e vivo modificado contêm cepas de FCV que não causam doença em gatos e foram isolados na forma não virulenta ou foram atenuadas empregando métodos bem conhecidos, incluindo passagem em
15 série em uma cepa de célula adequada ou exposição a luz ultravioleta ou um mutágeno químico. As vacinas de FCV inativado ou morto contêm cepa de FCV que foi inativada através de métodos conhecidos, incluindo tratamento com formalina, betapropriolactona, etilenoimina binário, e outros. As vacinas exemplares incluem aquelas contendo cepas não virulentas selecionadas de
20 FCV-F9, FCV-M8, FCV-255, FCV-2280, FCV-21, FCV-49, FCV 26391-4, etc., ou sozinha ou em combinação.

Outras vacinas úteis derivadas de uma ou mais cepas de FCV incluem vacinas recombinantes e vacinas DNA (isto é, vacinas de subunidade). As vacinas recombinantes incluem vetores de vírus recombinante, cada
25 contendo um ácido nucléico que codifica um antígeno derivado de uma cepa de FCV. Tais vetores podem ser preparados inserindo um cDNA que codifica um antígeno derivado de uma cepa de FCV (por exemplo, uma proteína de capsídeo) no genoma de um vírus não virulento, incluindo cepas de vírus de herpes, poxívirus, adenovírus, e similares. Para vetores de vírus, o cDNA é
30 operavelmente ligado a um promotor de transcrição de eucariota na terminação 5' do antígeno que codifica a seqüência e é operavelmente ligado a um sinal de terminação de eucariota e sinal de poli(A) na terminação 3' do anti-

geno que codifica a seqüência, de forma que o promotor de transcrição e seqüências de terminação regulem a expressão do antígeno. Os promotores de transcrição úteis incluem promotor de repetição terminal longa de vírus de Rous sarcoma (RSV-LTR), promotor de imediatamente precoce Citomegalovírus (CMV), promotor de antígeno T do vírus vacuolizante dos símios 40 (SV40), e promotores induzíveis, tal como promotor de metalotioneína. Para uma descrição de vacinas recombinantes de FCV, veja Patente dos Estados Unidos Nº 5.716.822 por Wardley e outros, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade.

10 As vacinas de DNA incluem moléculas de DNA (por exemplo, plasmídeos) tendo uma seqüência de ácido nucléico que codifica um antígeno de FCV, tal como uma proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico específico desta, que elicia uma resposta imune no gato contra FCV. O ácido nucléico que codifica seqüência é operavelmente ligado a um
15 promotor transcriptional que permite a expressão do DNA quando é inoculado nas células do gato. Os promotores úteis incluem o promotor de RSV-LTR, o promotor imediatamente precoce principal de CMV, e o promotor de antígeno T de SV40. Adicionalmente, o ácido nucléico pode ser operavelmente ligado, em ou próximo do códon de terminação da seqüência que co-
20 difica o antígeno de FCV, a um fragmento de ácido nucléico que compreende um sinal de terminação de transcrição e sinal de reconhecimento de poli(A). Para uma descrição das vacinas de DNA, a Patente dos Estados Unidos Nº 5.580.859, Patente dos Estados Unidos Nº 5.589.466, e Patente dos Estados Unidos Nº 5.703.055, por Felgner e outros

25 Outras vacinas úteis incluem aquelas contendo um ou mais antígenos de subunidade, tal como uma proteína de capsídeo de FCV ou um fragmento imunogênico da proteína de capsídeo, que foi isolada e purificada. O antígeno de subunidade pode ser produzido em um vetor de expressão recombinante que produz o antígeno *in vitro* empregando os métodos descritos
30 acima. O antígeno resultante é subsequente isolado e purificado. Os vetores de expressão úteis incluem vários microorganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, como também eucariotas, tal como células de

inseto e mamífero. Outros vetores de expressão úteis incluem vírus, tal como adenovírus, poxivírus, vírus de herpes, vírus de Semliki Forest, baculovírus, bacteriófagos, vírus de Sindbis, vírus de Sendai, e similares. A expressão do antígeno de subunidade de FCV em um microorganismo permite a

5 produção da proteína antigênica que usa tecnologias de fermentação de escala comercial. Vários métodos podem ser empregados para isolar e purificar os antígenos, incluindo filtração de gel, cromatografia de afinidade, cromatografia de permuta de íons, centrifugação, e similares.

Uma ou mais das vacinas também pode conter antígenos para

10 imunizar gatos contra um ou mais patógenos, além de FCV, incluindo vírus de herpes de felino, vírus de leucemia de felino, vírus de imunodeficiência de felino, vírus de panleucopenia de felino, e Clamídia de felino.

Outros componentes de vacinas podem incluir excipientes farmacologicamente aceitáveis, incluindo veículos, solventes, e diluentes, agentes isotônicos, agentes de proteção, estabilizadores, conservantes, os agentes

15 imunomoduladores (por exemplo, interleucinas, interferons, e outras citocinas), agentes vaso-construtores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, e outros. Os veículos, solventes, e diluentes típicos incluem água, salina, dextrose, etanol, glicerol, e similares. Os agentes isotônicos representativos incluem cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol, lactose, e outros.

20 Os estabilizadores úteis incluem gelatina, albumina, e similares.

As vacinas também podem incluir um ou mais adjuvantes que aumentam a resposta imune ao antígeno. Os adjuvantes representativos incluem adjuvantes com base em óleo, tal como o Adjuvante Completo de

25 Freund e o Adjuvante Incompleto de Freund, adjuvantes com base em micolato (por exemplo, dimicolato de trealose), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), peptidoglicanos (isto é, mureínas, mucopeptídeos, ou glicoproteínas, tal como N-Opaca, dipeptídeo de muramila, ou análogos deste), proteoglicanos (por exemplo, extraídos de *Klebsiella pneumoniae*), preparações estreptocócicas (por exemplo, OK432), Biostim[®] (por exemplo, 01K2), Iscoms (por

30 exemplo, veja Pedido de Patente Europeu N^{os} EP 109942, EP 180564 e EP 231039), hidróxido de alumínio, saponina, dietilaminoetil-dextrana, óleos

neutros (por exemplo, migliol), óleos vegetais (por exemplo, óleos de amendoim), lipossomas, polióis de Pluronic®. Outros adjuvantes incluem, porém não estão limitados ao, sistema de adjuvante RIBI (Ribi Inc.), alume, gel de hidróxido de alumínio, colesterol, emulsões de óleo em água, emulsões de água em óleo, co-polímero de bloco (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adjuvante de AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) ou outras frações de saponina, lipídio A de monofosforila, adjuvante de lipídio-amina Avridine, enterotoxina lábil ao calor de *E. coli* (recombinante ou caso contrário), toxina de cólera, ou dipeptídeo de muramila, entre outros.

Os tamanhos de dose das vacinas de FCV tipicamente variam de cerca de 1 mL a cerca de 2 mL, inclusive. Cada dose contém uma quantidade terapeuticamente eficaz do antígeno de FCV ou antígenos que podem variar, dependendo da idade e condição geral do gato, da via de administração, da natureza do antígeno de FCV, e outros fatores. Para vacinas que contêm vírus vivo modificado ou vírus atenuados, uma dose terapeuticamente eficaz geralmente varia de cerca de 10^6 TCID₅₀ a cerca de 10^8 TCID₅₀, inclusive. Para vacinas que contêm antígenos de subunidade, tal como proteína de capsídeo de FCVs, uma dose terapeuticamente eficaz geralmente varia de cerca de 10 µg a cerca de 100 µg, inclusive. Os outros componentes das vacinas podem ser ajustados para modificar as propriedades físicas e químicas das vacinas. Por exemplo, os adjuvantes compreendem tipicamente de cerca de 25 µg a cerca de 1000 µg, inclusive, de uma dose de 1 mL. Similarmente, os antibióticos compreendem tipicamente de cerca de 1 µg a cerca de 60 µg, inclusive, de uma dose de 1 mL.

As vacinas de FCV são fornecidas em várias formas que dependem da via de administração, exigências de armazenamento, e outros. Por exemplo, as vacinas podem ser preparadas como soluções ou dispersões aquosas adequadas para uso em seringas, conta-gotas, etc. ou podem ser preparadas como pós liofilizados que são reconstituídos em salina, tampão de HEPES, e outros, antes do uso.

PARTE 2

EXEMPLOS E TABELAS

Os seguintes exemplos são pretendidos serem ilustrativos e não limitantes, e representam algumas modalidades específicas da presente invenção.

EXEMPLO 2-1. REGIME DE VACINAÇÃO SUBCUTÂNEA/ORAL COM FELOCELL® 4 E FEL-O-VAX®

Gatos pêlo curto domésticos, 4-5 meses de idade, foram vacinados com FELOCELL® 4 (Pfizer Inc.; vírus de rinotraqueíte de felino vivo modificado [FHV], calicivírus [FCV], vírus de panleucopenia [FP] e *Chlamydia psittaci*), com FEL-O-VAX® (Fort Dodge; FHV morto, FCV, FP, e *C. psittaci*), ou com diluente estéril (grupo de controle). Os regimes de vacinação avaliados incluíram: uma vacinação subcutânea inicial seguida por reforços subcutâneos nos dias 21 e 42 (SQ/SQ/SQ); uma vacinação subcutânea inicial seguida por duas imunizações de reforço orais nos dias 21 e 42 (SQ/Oral/Oral); ou uma vacinação subcutânea inicial seguida por uma segunda vacinação subcutânea no dia 21, e um aumento oral no dia 42. Todas as doses foram 1 mL. A vacinação oral foi obtida por administração da vacina na boca. No dia 99, todos os gatos foram desafiados com aproximadamente 3,5 mL de FCV-33585 sistêmico virulento (4,8 log de TCID₅₀/mL). O desafio foi realizado administrando-se aproximadamente 3 mL da dose em comida de gato enlatada, e 0,05 mL por instilação nasal. Todos os gatos foram monitorados quanto aos sinais clínicos da doença durante 14 dias pós-desafio. Os gatos que exibem sinais clínicos severos pós-desafio que estavam de acordo com a patogênese de calicivírus foram eutanizados.

Como mostrado na TABELA 2-1, o grupo vacinado pelo regime SQ/Oral/Oral teve uma taxa de mortalidade de somente 10%, ao mesmo tempo onde o grupo de controle teve uma taxa de mortalidade de 90%. O grupo vacinado pelo regime SQ/SQ/SQ teve uma taxa de mortalidade de 50%, ao mesmo tempo onde o grupo vacinado pelo regime SQ/SQ/Oral teve taxa de mortalidade de 20%. Estes resultados sugerem que vacinação de SQ seguida por um reforço Oral significativamente aumenta a efetividade da

- vacinação de FELOCELL® 4 contra desafio de FCV virulento. Não somente as taxas de mortalidade diminuem de 50% (SQ/SQ/SQ) para 10% (SQ/Oral/Oral) ou 20% (SQ/SQ/Oral) quando a vacinação oral foi uma parte do regime, porém como mostrado na TABELA 2-2, a severidade dos sinais clínicos, tal como lesões de pele (SL), inapetência (IA), depressão (DP), úlceras orais (OU), deficiência física (LN), espirro (SZ), escorrimento nasal (ND) e olhos aguados (WE), diminuiu também.

TABELA 2-1.

- 10 MORTALIDADE DE GATOS DESAFIADOS COM FCV-33585 VIRULENTO SEGUINTE A VACINAÇÃO (EXEMPLO 2-1)

TABELA 2-1					
Grupo	Vacinação			Desafio	
	Tratamento	Nº de animais	Rotina	Nº de animais	Mortalidade, %
T1	Controle	10	SQ/SQ/SQ	10	90
T2	FELOCELL® 4	5	SQ/SQ/SQ	4	50
T3	FELOCELL® 4	10	SQ/SQ/Oral	10	20
T4	FELOCELL® 4	10	SQ/Oral/Oral	10	10
T5	FEL-O-VAX®	5	SQ/SQ/SQ	5	60

TABELA 2-2.

- SINTOMAS CLÍNICOS (% DE ANIMAIS) SEGUINTE A VACINAÇÃO E SUBSEQÜENTE AO DESAFIO DE FCV-33585 (EXEMPLO 2-1)

TABELA 2-2									
Grupo	Rotina	SL	IA	EP	OU	LN	SZ	ND	WE
T1	SQ/SQ/SQ	50	100	100	70	100	30	90	70
T2	SQ/SQ/SQ	100	100	100	100	100	25	100	25

TABELA 2-2									
Grupo	Rotina	SL	IA	EP	OU	LN	SZ	ND	WE
T3	SQ/SQ/Oral	70	70	50	60	70	20	30	10
T4	SQ/Oral/Oral	10	40	20	40	50	10	30	0
T5	SQ/SQ/SQ	40	80	60	60	60	40	60	20

EXEMPLO 2-2.

TÍTULOS DE NEUTRALIZAÇÃO DE SORO DE FCV MÉDIOS SEGUINTE À VACINAÇÃO SQ/ORAL

- As amostras de sangue tomadas dos gatos do EXEMPLO 2-1,
- 5 foram coletadas nos dias de estudo 0, 21, 42, 63, 98 e 113, e avaliadas em um ensaio de neutralização de soro (SN) quanto a sua capacidade de neutralizar FCV. As amostras de soro foram diluídas 1:8, seguido por 2 vezes de diluições em séries para 1:16384 (total de 12 diluições) em 600 µL de volumes. O calicivírus de felino com um título de 50-500 TCID₅₀/mL em 600 µL
- 10 foi misturado com as amostras de soro diluídas e incubado à temperatura ambiente durante 45 minutos. Em seguida, 200 µL de cada amostra diluída foram transferidos em cavidades separadas de placas de 96 cavidades semeadas com células de Rim Felino Crandel (CrFK) em quadruplicação. As placas foram incubadas a 37°C, sob 5% de CO₂ durante 6 dias em cujo tempo os títulos de neutralização de finalidade foram determinados. Tanto o título de neutralização de soro (SN) quanto ao título reverso de vírus de desafio foram calculados empregando o método de Spearman-Kärber. Veja, C., Spearman, *Brit. J. Psychol.* 2:227-242 (1908) e G. Karber, *Arco. Exp.Path. Pharmak.* 162:480-487 (1931). Como mostrado na TABELA 2-3, FELO-
- 15 CELL[®] 4 administrado através dos regimes de vacinação SQ/Oral/Oral ou SQ/SQ/Oral, teve títulos de SN de FCV significativamente mais elevados. Estes dados se correlacionam com a redução significativa nas taxas de mortalidade descritas no EXEMPLO 2-1
- 20

TABELA 2-3.

TÍTULOS DE SN DE FCV MÉDIOS (NEUTRALIZAÇÃO DE SORO) EM VÁRIOS DIAS DE ESTUDO (EXEMPLO 2-2)

TABELA 2-3								
Grupo	Vacinação Rotina	Títulos de SN de FCV Médios *						Nº de animais Dia 113
		0	21	42	63	98	113	
T1	SQ/SQ/SQ	3	2	4	3	4	7340	1
T2	SQ/SQ/SQ	3	18	17	24	29	5986	2
T3	SQ/SQ/Oral	3	27	36	310	1032	5783	8
T4	SQ/Oral/Oral	3	18	431	877	1980	5787	9
T5	SQ/SQ/SQ	4	3	6	8	15	3563	2

* Medido no dia 0, dia 21, dia 42, dia 63, dia 98, e dia 133 pós-vacinação.

5 **EXEMPLO 2-3.**

EFETIVIDADE DA ADMINISTRAÇÃO SQ/ORAL DE FELOCELL® 4 E FELLO-VAX® CONTRA VÍRUS DE PANLEUCOPENIA DE FELINO

As amostras de soro dos gatos do EXEMPLO 2-1 também foram analisadas quanto aos seus títulos de FP médios. Como mostrado na TABELA 2-4, todos os gatos eram soronegativos no começo do estudo. Subseqüentemente, os títulos médios do grupo de controle permaneceram em 1 durante a duração dos intervalos da amostragem (dias 21 e 42). Entretanto, os títulos médios dos outros quatro grupos de vacinação aumentaram significativamente.

15 **TABELA 2-4.**

TÍTULOS MÉDIOS DE ANTICORPO DE SORO PARA VÍRUS DE PANLEUCOPENIA DE FELINO (EXEMPLO 2-3)

TABELA 2-4				
Grupo	Vacinação Rotina	Título de FP de Soro Médio *		
		0	21	42
T1	SQ/SQ/SQ	1	1	1
T2	SQ/SQ/SQ	1	5782	5782
T3	SQ/SQ/Oral	1	5595	5793

TABELA 2-4

Grupo	Vacinação Rotina	Título de FP de Soro Médio *		
		0	21	42
T4	SQ/Oral/Oral	1	5499	5693
T5	SQ/SQ/SQ	1	2360	4887

- Medido no dia 0, dia 21, e dia 42 pós-vacinação.

EXEMPLO 2-4.**SINTOMAS CLÍNICOS PARA GATOS VACINADOS COM FELOCELL® 4 POR VÁRIAS ROTINAS DE ADMINISTRAÇÃO**

- 5 A administração oronasal (ON) de FELOCELL® 4 foi obtida por instilação de gotas nas narinas do animal. Como indicado na TABELA 2-5, grupos de 10 gatos (T1, T2, T3), 6-7 meses de idade, foram vacinados e reforçados no dia 21 de acordo com os regimes mostrados na TABELA 2-5: vacinação subcutânea e reforço (SQ/SQ); vacinação subcutânea e reforço oronasal (SQ/ON); ou vacinação oronasal e reforço (ON/ON). A vacina foi subcutaneamente administrada no lado direito do pescoço (1 mL); a administração oronasal foi liberada por 0,5 mL de vacina em cada narina. Começando no dia 1, todos os gatos foram observados diariamente para condições de saúde gerais.

15 TABELA 2-5.**SINTOMAS CLÍNICOS PARA GATOS VACINADOS COM FELOCELL® 4 POR ROTINAS DIFERENTES DE ADMINISTRAÇÃO (EXEMPLO 2-4)**

TABELA 2-5

Grupo	Vacinação Rotina	Sintomas Clínicos, %					
		NU	OU	SZ	ND	WE	IA
T1	SQ/SQ	0	0	0	0	0	50
T2	SQ/ON	0	0	20	0	0	20
T3	ON/ON	10	30	90	50	60	20

- 20 Como mostrado na TABELA 2-5, os gatos que receberam ambas vacinações oronasalmente tiveram níveis elevados de sintomas clínicos, incluindo úlceras nasais (NU), úlceras orais (OU), espirros persistentes (SZ), escorrimento nasal (o ND), olhos aguados (WE) e inapetência passageira

- (IA). Os gatos vacinaram pelo regime SQ/ON, entretanto, exibiram menos sintomas clínicos do que gatos vacinados com ON/ON-, sem indicação de úlceras nasais, úlceras orais, escorrimento nasal, ou olhos aguados. Além disso, os indivíduos no grupo SQ/ON exibiram menos espirros do que os gatos no grupo de ON/ON. O perfil de segurança do grupo de SQ/ON foi similar àquele do grupo de SQ/SQ.

EXEMPLO 2-5.

O EFEITO DE ROTINAS DE VACINAÇÃO DIFERENTES EM RESPOSTAS SOROLÓGICAS AOS ANTÍGENOS DE FELOCELL® 4

- As amostras de soro de gatos matriculados no estudo descritos no EXEMPLO 2-4, foram ensaiadas quanto à reatividade sorológica aos vários antígenos virais presentes na vacina de FELOCELL® 4. Os títulos de anticorpos de neutralização de soro médios para FCV, FHV e FP foram determinados para os dias de estudo 0, 21 e 42. Como mostrado na TABELA 2-6, todos os três regimes de vacinação resultaram em uma resposta imune forte a FP. A resposta imune a FHV foi apenas detectavelmente devido às dificuldades com o ensaio. Entretanto, os títulos de neutralização de soro contra FCV foram significativamente mais elevados nos grupos ON/ON e SQ/ON, quando comparado ao grupo de SQ/SQ. Estes resultados sugerem que os gatos nos grupos ON/ON e SQ/ON fossem protegidos contra um desafio de FCV virulento, porém que o grupo de SQ/SQ pode não ser.

TABELA 2-6.

RESPOSTAS SOROLÓGICAS DE GATOS VACINADOS COM FELOCELL® 4 POR ROTINAS DIFERENTES (EXEMPLO 2-5)

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

- * Medido no dia 0, dia 21, e dia 42 pós-vacinação.

EXEMPLO 2-6.

TÍTULOS DE NEUTRALIZAÇÃO DE SORO CONTRA FCV-F9 ADMINISTRADO POR UMA ROTINA SQ OU ON

- Seis gatos por grupo foram vacinados com o antígeno de FCV-F9 presente na vacina de FELOCELL® 4, SQ ou ON. Três semanas seguintes à vacinação inicial, todos os gatos foram reforçados com o mesmo antígeno pela mesma via como previamente. Todas as doses eram de 1 mL. As amostras de soro foram coletadas três semanas após a imunização do reforço. Como mostrado na TABELA 2-7, os títulos de neutralização de soro foram determinados para estas amostras contra um painel de 26 cepas de FCV. As cepas de FCV escolhidas para o painel foram selecionadas com base na diversidade genética (como determinado pela sequência da sua região hipervariável de capsídeo), como também distribuição geográfica. Além disso, o fenótipo de virulência de cada cepa também foi considerado. As amostras de soro de gatos vacinados ON com F9 neutralizaram mais cepas de FCV nos 26 painéis do membro, quando comparadas com as amostras de gatos vacinados com SQ. Ao empregar 23 como o valor de corte para títulos de neutralização, a vacinação ON resultou em títulos em ou acima do corte para 26% dos membros do painel, ao mesmo tempo onde a vacinação SQ resultou em somente 16% atendendo aos critérios. Para um corte de título de 15, a vacinação ON produziu 32% de membros de painel em ou acima do corte, SQ produziu somente 17%.

TABELA 2-7.

- TÍTULOS DE NEUTRALIZAÇÃO CRUZADA DE SORO PARA SORO GERADO SQ VS. ON PARA FCV-F9 CONTRA 26 PAINÉIS VIRAIS DE FCV (EXEMPLO 2-6)

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

* Título de neutralização ≥ 23 como valor de corte; ou título de neutralização de ≥ 15 como valor de corte.

EXEMPLO 2-7.

CLASSIFICAÇÕES CLÍNICAS E MORTALIDADE PARA GATOS VACINADOS COM DUAS DOSES DE FELOCELL® 4 OU COMPONENTES DE FELOCELL® 3 E FCV-21 VIVO MODIFICADO.

Gatos pêlo curto domésticos, cerca de 8 semanas de idade, foram administrados com vacinas contendo vírus de rinotraqueíte de felino vivo modificado (FHV), vírus de panleucopenia (FP), *Chlamydia psittaci*, e (1) FCV-F9 (FELOCELL® 4 ou FELOCELL® 3), (2) FCV-F9 e FCV-21 (FELOCELL® 4 mais FCV-21, ou FELOCELL® 3 mais FCV-21), ou (3) FCV-21 (FELOCELL® 4A ou FELOCELL® 3A). Os regimes de vacinação incluíram: uma vacinação subcutânea inicial seguida por reforços subcutâneos no dia 21 (SQ/SQ); uma vacinação subcutânea inicial seguida por uma imunização de reforço oral em dia 21 (SQ/Oral); ou uma vacinação oral inicial seguida por uma segunda vacinação oral no dia 21 (Oral/Oral). Cada gato dentro dos regimes dosando diferentes (grupos T1 a T10, 10 gatos por grupo) recebeu 1 mL de vacina. A vacinação oral foi obtida por administração da vacina na boca. No dia 42, todos os gatos foram desafiados com aproximadamente 1 mL de FCV-33585 sistêmico virulento (3 long de TCID₅₀/mL). Durante 14 dias pós-desafio, todos os gatos foram monitorados quanto aos sinais clínicos da doença, incluindo temperatura elevada, escorrimento soroso de conjuntivite, escorrimento mucopurulenta de conjuntivite, escorrimento soroso de rinite, escorrimento mucopurulenta de rinite, espirro, ronqueiras audíveis, tosse, respiração de boca aberta, anorexia, desidratação, úlcera oral única < 4 mm, úlceras orais múltiplas, úlceras orais > 4 mm, salivamento, úlcera externa sem sangramento, e externas úlceras com sangramento. Os gatos que exibem sinais clínicos severos pós-desafio que estavam de acordo com patogênese de calicivírus, foram eutanizados.

Como mostrado na TABELA 2-8, quando comparado com a vacinação SQ/SQ, um regime de vacinação SQ/Oral diminuiu a mortalidade de 44% para 10% e melhorou a classificação clínica média de 12 para 5,5 para

- gatos vacinados com FELOCELL® 4. Além disso, a adição da cepa de FCV-21 ao FELOCELL® 3 e ao FELOCELL® 4, resultou em nenhuma mortalidade pós-desafio. A substituição da cepa de FCV-F9 de FELOCELL® 3 e FELOCELL® 4 com cepa de FCV-21 resultou na eficácia similar às vacinas
- 5 que contêm FCV-F9 e FCV-21, até mesmo para um regime de vacinação Oral/Oral.

TABELA 2-8.

MORTALIDADE DE GATOS DESAFIADOS COM FCV-33585 VIRULENTO SEGUINTE A VACINAÇÃO DE 2 DOSES COM FELOCELL 3 OU 4, COM

10 OU SEM FCV-F9 E/OU FCV-F21 (EXEMPLO 2-7)

TABELA 2-8							
Grupo	Vacinação		Desafio		Classificação Clínica		
	Tratamento	Rotina	Nº de Animais	Mortalidade %	Média	Min	Max
T1	Controle	SQ/SQ	9	78	24	2	35
T2	FELOCELL 4	SQ/SQ	9	44	12	3	38
T3	FELOCELL 4	SQ/Oral	10	10	5.5	0	30
T4	FELOCELL 4 + FCV-21	SQ/SQ	10	0	1.5	0	13
T5	FELOCELL 4 + FCV-21	SQ/Oral	10	0	3.5	0	13
T6	FELOCELL 4A	SQ/SQ	10	0	2.5	0	11
T7	FELOCELL 4A	SQ/Oral	10	10	5	1	22
T8	FELOCELL 4A	Oral/Oral	10	0	3	0	10
T9	FELOCELL 3 + FCV-21	SQ/SQ	10	0	2	0	8
T10	FELOCELL 3 + FCV-21	SQ/Oral	10	0	4	0	10
T11	FELOCELL 3A	Oral/Oral	10	0	5	1	18

FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sem FCV-F9, porém com FCV-21

FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sem FCV-F9, porém com FCV-21

EXEMPLO 2-8. MORTALIDADE E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA PARA GATOS VACINADOS COM TRÊS DOSES DE COMPONENTES DE FELOCELL® 4 E FCV-21 VIVO MODIFICADO

15

Aos gatos pêlo curto domésticos, aproximadamente 8 semanas de idade, foram administradas vacinas que contêm vírus de rinotraqueíte de felino vivo modificado (FHV), vírus de panleucopenia (FP), *Chlamydia psittaci*, e (1) FCV-F9 (FELOCELL® 4), (2) FCV-F9 e FCV-21 (FELOCELL® 4A), ou (3) FCV-21 (FELOCELL® 4B). Em cada caso, os gatos foram administrados com uma vacinação subcutânea inicial seguida por administrações orais sucessivas no dia 21 e dia 42 (SQ/Oral/Oral). Cada gato dentro dos regimes de dosagem diferentes (grupos T1 a T4, 10 gatos por grupo) recebeu 1 mL de vacina. A vacinação oral foi obtida por administração da vacina na boca. No dia 63, todos os gatos foram desafiados com aproximadamente 1 mL de FCV-33585 sistêmico virulento (3 log de TCID₅₀/mL). Durante 14 dias pós-desafio, todos os gatos foram monitorados quanto aos sinais clínicos da doença como no EXEMPLO 2-7. Os gatos que exibem sinais clínicos severos pós-desafio de estavam de acordo com a patogênese de calicivírus foram eutanizados. Como mostrado na TABLE 2-9, a eficácia do regime de dose tripla, como medido por mortalidade pós-desafio e classificações clínicas, é comparável com a eficácia do regime de dosagem dupla descrito no EXEMPLO 2-7.

TABELA 2-9.

20 MORTALIDADE DE GATOS DESAFIADOS COM FCV-33585 VIRULENTO SEGUINTE À VACINAÇÃO DE 3 DOSES COM FCV-F9 E/OU FCV-F21 (EXEMPLO 2-8)

TABELA 2-9							
Grupo	Vacinação		Desafio		Classificação Clínica		
	Tratamento	Rotina	Nº de animais	Mortalidade	Média	Min	Max
T1	Control	SQ/Oral/Oral	10	100%	25	21	31
T2	FELOCELL 4 + FCV-21	SQ/Oral/Oral	10	0%	5.5	0	17
T3	FELOCELL 4A	SQ/Oral/Oral	9	0%	4	0	10
T4	Felocell® 4	SQ/Oral/Oral	10	30%	10.5	1	30

FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sem FCV-F9, porém com FCV-21

EXEMPLO 2-9.

ANÁLISE DE NEUTRALIZAÇÃO CRUZADA DE SOROS DE GATOS VACINADOS COM COMPONENTES DE FELOCELL 4 COM E SEM FCV-21

As amostras de soro de cada gato no estudo descrito no EXEMPLO 2-7 foram coletadas seguinte à segunda vacinação, porém antes do desafio. As amostras foram tratadas com calor a 56°C durante 30 minutos, e avaliadas no ensaio de neutralização de soro contra cada das 26 cepas de FCV como previamente descrito no EXEMPLO 1-10 (TABELA 1-6).

Os dados de neutralização de soro foram analisados com títulos de corte de >23 e >15, e uma média do dois títulos de corte foi calculada (Ave). Os resultados são mostrados na TABELA 2-10. Os dados indicam que o perfil de neutralização cruzada de FELOCELL 4 (contendo FCV-F9) permanece constante se a via de administração for SQ/SQ ou SQ/Oral. Com a adição de FCV-21, entretanto, o perfil de neutralização cruzada é grandemente realçado quando a vacina é administrada SQ/SQ ou SQ/Oral. Além disso, para FELOCELL 4A (contendo FCV-21, porém nenhum FCV-F9), o perfil de neutralização cruzada é realçado para vias de vacinação SQ/SQ, SQ/Oral e ainda Oral/Oral.

TABELA 2-10									
Tratamento	Vacinação				Coleta de Soro		Neutralização Cruzada		
	Nº de Animais	Dias	Dose	Rotina	Dias	Nº de animais	% (>23)	% (>15)	% (Ave)
Controle negativo	10	0	1 ml	SQ	42	9	10,8	13,9	12,4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	9	38,5	42,3	40,4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4	10	0	1 ml	SQ	42	10	39,2	42,7	41,0
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	56,5	62,3	59,4
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	56,2	60	58,1
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	10	58,9	64,6	61,8
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	SQ	42	10	49,6	59,2	54,4

TABELA 2-10									
Tratamento	Vacinação				Coleta de Soro		Neutralização Cruzada		
	Nº de Animais	Dias	Dose	Rotina	Dias	Nº de animais	% (>23)	% (>15)	% (Ave)
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	1 ml	Oral	42	10	51,2	54,6	52,9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	53,9	62,7	58,3
		21	1 ml	SQ					
FELOCELL 3+FCV-21	10	0	1 ml	SQ	42	10	55,8	63,9	59,9
		21	1 ml	Oral					
FELOCELL 3A**	10	0	1 ml	Oral	42	10	60,8	68,1	64,5
		21	1 ml	Oral					

*FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sem FCV-F9, porém com FCV-21

**FELOCELL 3A: FELOCELL 3 sem FCV-F9, porém com FCV-21

Na TABELA 2-11, os regimes de vacinação avaliados incluíram uma vacinação subcutânea inicial seguida por duas imunizações de reforço orais no dia 21 e dia 42 (SQ/Oral/Oral). Os resultados indicam que a adição de FCV-21, com ou sem FCV-F9 em FELOCELL 4, resultou em perfis de neutralização cruzada significativamente mais amplos (40% de aumento aproximado).

TABELA 2-11										
Tratamento	Vacinação					Coleta de Soro		Neutralização Cruzada		
	Nº de animais	Dias	Data	Dose	Rotina	Dias	Nº de animais	% (>23)	% (>15)	% (Ave)
Controle negativo	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	5,8	10,4	8,1
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4+FCV-21	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	72,5	77,1	74,8
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4A*	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	9	72,5	76,7	74,6
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					

TABELA 2-11										
Tratamento	Vacinação					Coleta de Soro		Neutralização Cruzada		
	Nº de ani- mais	Dias	Data	Do- se	Ro- tina	Di as	Nº de ani- mais	% (>23)	% (>15)	% (Ave)
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					
FELOCELL 4	10	0	2/15/2005	1 ml	SQ	63	10	49,6	57,9	53,8
		21	3/8/2005	1 ml	Oral					
		42	3/29/2005	1 ml	Oral					

* FELOCELL 4A: FELOCELL 4 sem FCV-F9, porém com FCV-21

Também foram descritas descobertas que com as vacinas descritas aqui como peptídeos, proteínas, e DNA relacionados com as cepas de FCV, a administração de FCV-21, FCV-49 e FCV 26391-4, oral ou oronasal (ON) pode ser realizada no primeiro caso seguido por uma segunda administração oral ou oronasal sem os efeitos colaterais previamente descritos mencionados acima no EXEMPLO 2-4 e TABELA 2-5.

Deveria ser notado que, como empregado neste relatório e nas reivindicações anexas, os artigos singulares tal como "um", "uma", e "o", "a" podem se referir a um objeto ou a uma pluralidade de objetos a menos que o contexto indique claramente o contrário. Desse modo, por exemplo, referência a uma composição que contém "um composto" pode incluir um único composto ou dois ou mais compostos.

Será entendido que os exemplos e descrições acima são pretendidos serem ilustrativos e não restritivos. Muitas modalidades serão evidentes àqueles versados na técnica ao ler a descrição acima. O escopo da invenção deve, portanto, ser determinado com referência às reivindicações anexas, junto com o escopo total de equivalentes aos quais são intituladas tais reivindicações. As descrições de todos os artigos e referências, incluindo patentes, pedidos de patente e publicações, estão aqui incorporadas por referência em sua totalidade e para todos os propósitos.

Nas TABELAS 2-1 até 2-9, Felocell[®] 4, Felocell 4, ou FELOCELL

4 ou aquelas palavras seguidas pelo número "3" são vacinas onde qualquer variação do nome Felocell é possuída por Pfizer. Referência a Felocell 4 A é Felocell 4 sem FCV-F9, referência a Felocell 3 A é Felocell 3 sem FCV-F9. Note, antígenos atuais empregados nestes estudos não eram do produto comercial, de preferência os antígenos foram preparados em bateladas pequenas para propósitos de pesquisa somente, porém da mesma maneira como o produto comercial.

Todos os métodos e/ou composições descritos e reivindicados aqui podem ser feito e realizado sem experimentação imprópria levando em conta a presente descrição. Ao mesmo tempo onde as composições e métodos desta invenção foram descritos em termos de modalidades preferidas, será evidente para aqueles de experiência na técnica que variações podem ser aplicadas aos métodos e/ou composições e nas etapas ou nas seqüências de etapas do método descrito aqui sem afastar-se do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será evidente que certos agentes que são tanto quimicamente quanto fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes descritos aqui ao mesmo tempo onde resultados iguais ou similares seriam obtidos. Todos tais substitutos e modificações similares evidentes para aqueles versados na técnica, são julgados estar dentro do espírito, escopo e conceito da invenção como definido pelas reivindicações anexas.

Descrição Numerada da Invenção. Descrições adicionais e exemplos. 1. Um método para imunizar gatos contra calicivírus de felino (FCV), o método compreendendo administrar a um gato quantidades terapêuticamente eficazes de primeiras e segundas vacinas, onde as primeiras e segundas vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FCV, a primeira vacina é administrada parenteralmente e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, e a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120 dias, inclusive, também descrito é N de cerca de 3 semanas e cerca de 2-4 semanas. 2. O método de reivindicação 1, onde as vacinas compreendem uma vacina de vírus vivo, uma vacina

de vírus vivo modificado, uma vacina de vírus inativado, uma vacina recombinante, uma vacina de DNA, ou uma vacina de antígeno de subunidade, ou sozinhas ou em combinação. 3. O método de reivindicação 1, onde pelo menos uma das vacinas inclui uma ou mais cepas de FCV. 4. O método de reivindicação 3, onde a uma ou mais cepas de FCV compreende F9 ou FCV-21 ou F9 e FCV-21. 5. O método de reivindicação 1, onde as vacinas são as mesmas. 6. O método de reivindicação 1, onde pelo menos uma das vacinas também é adaptada para induzir uma resposta imune contra um ou mais patógenos selecionados de vírus de herpes felino, vírus de leucemia felino, vírus de imunodeficiência felino, vírus de panleucopenia de felino, e Clamídia felina. 7. O método de reivindicação 1, onde a primeira vacina é administrada subcutaneamente. 8. O método de reivindicação 1, onde a segunda vacina é administrada peroralmente ou oronasalmente. 9. O método de reivindicação 1, onde a segunda vacina ou uma vacina subsequente é administrada após o gato ter desenvolvido um título de neutralização de soro de FCV de cerca de 1:6 ou maior. 10. Um método como em quaisquer das reivindicações 1 a 9, também compreendendo administrar ao gato uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma terceira vacina, onde a terceira vacina é adaptada para induzir uma resposta imune no gato contra FCV e é administrada parenteralmente, oralmente, ou oronasalmente, M dias seguinte à administração da primeira ou segunda vacina, onde M é um número inteiro de 1 a 120, inclusive. 11. O método de reivindicação 10, onde a terceira vacina é administrada subcutaneamente. 12. Um método para imunizar gatos contra calicivírus de felino (FCV), o método compreendendo administrar a um gato quantidades terapêuticamente eficazes das primeiras e segundas vacinas, onde as primeiras e segundas vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FCV, onde a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, e a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, também especificado é N cerca de 3 semanas e cerca de 2-4 semanas. 13. O método de reivindicação 12 onde a cepa de FCV é sele-

- cionada do grupo que consiste em FCV-21, FCV-49, FCV 26391-4. 14. Um método para imunizar animais compreendendo administrar a um animal uma quantidade terapeuticamente eficaz de primeira e segunda vacina, com uma terceira vacina opcional, onde as primeira e segunda e terceira opcional va-
- 5 cinas são adaptadas para induzir uma resposta imune e a primeira vacina é administrada parenteralmente ou oralmente, a segunda vacina é administra-
- da oralmente ou oronasalmente, e a segunda e terceira vacina opcional é administrada N dias seguinte à administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, também especificado é N cerca de 3
- 10 semanas e cerca de 2-4 semanas, e o método pode incluir administrações de reforço anuais opcionais da vacina, incluindo um M período de cerca de um ano.

PARTE 3

- ESTA PARTE FORNECE MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA IMUNIZAR
- 15 ANIMAIS CONTRA PARVOVÍRUS DE FELINO (FPV) E HERPES VÍRUS DE FELINO (FHV)

- Descritos aqui são métodos e materiais para tratar e imunizar animais com vacina, e em particular gatos contra doença das vias respiratórias de felino, causadas por calicivírus de felino (FCV), panleucopenia de
- 20 felino causado por Parvovírus de Felino (FPV), rinotraqueíte viral de felino causada por vírus de herpes de felino (FHV) que também foi chamado Vírus de Rinotraqueíte de Felino. Descritas abaixo são combinações de vacinas, que quando apresentadas a um felino da maneira descrita, permite liberações eficazes orais únicas e oral/oral e subq/oral de ambas vacinas FPV e
- 25 FHV.

- Oral única significa uma liberação oral única que concede proteção eficaz a um animal vacinado. Por oral/oral é entendida uma liberação oral dada duas vezes, semelhante à descrição acima na parte 2, isto é, qualquer oral seguida por algum período de tempo e em seguida outra dose
- 30 é dada pela via oral, e subq/oral é uma primeira dose dada subq seguido por algum período de tempo e então outra dose é dada por via oral.

O que é descrito aqui é a liberação da combinação de FPV vivo

- modificado e/ou FHV vivo modificado em combinação com vacina de Clamí-
dia viva modificada, ou qualquer componente de vacina de Clamídia viva
modificada, por exemplo, meio de crescimento, lisado de célula, ou células
inteiras, qualquer componente de Clamídia propriamente dita. Clamídia tam-
bém é chamada Clamídia de Felino, ou *Chlamydia psittaci* de Felino ou FCp.

- Quando FPV vivo modificado é dado sozinho ou em combinação
com FCV vivo modificado, ou vacinas de FHV ao vivo modificado, o FPV não
é efetivo quando liberado de uma maneira oral/oral, e mostra um título de SN
diminuído com via SQ/oral de administração. Similarmente, quando FHV vivo
modificado é dado sozinho ou em combinação com FCV vivo modificado, ou
com vacina de FPV vivo modificado, FHV não é efetivo quando liberado de
uma maneira oral/oral, e com sinais de uma eficácia diminuída com via
SQ/oral de administração. Somente quando ou FPV e/ou FHV é dado em
combinação com uma vacina de Clamídia viva modificada, uma proteção
adequada contra FPV e/ou FHV é fornecida, quando a liberação das vacinas
de combinação é ou por uma via subq/oral ou via oral/oral.

De acordo com o anterior os seguintes Exemplos são fornecidos.
Os seguintes exemplos são pretendidos serem ilustrativos e não limitantes, e
representam algumas modalidades específicas da presente invenção.

20 EXEMPLO 3-1 (teórico).

REGIME DE VACINAÇÃO SUBQ/ORAL COM FPV E CLAMÍDIA. FPV e
Clamídia (ou qualquer componente de vacina de Chlamydia viva modificada)
são fornecidos em uma vacina de combinação com ou sem outros compo-
nentes. As vacinas vivas modificadas podem ser liberadas subq/oral.

25 EXEMPLO 3-2 (teórico).

REGIME DE VACINAÇÃO ORAL/ORAL COM FPV E CLAMÍDIA. FPV e
Clamídia (ou qualquer componente de vacina de Clamídia viva modificada)
são fornecidos em uma vacina de combinação com ou sem outros compo-
nentes. As vacinas vivas modificadas podem ser liberadas oral/oral.

30 EXEMPLO 3-3 (teórico).

REGIME DE VACINAÇÃO SUBQ/ORAL COM FPV, FHV E CLAMÍDIA. FPV,
FHV e Clamídia (ou qualquer componente de vacina de Clamídia viva modi-

ficada) são fornecidos em uma vacina de combinação com ou sem outros componentes. As vacinas vivas modificadas podem ser liberadas subq/oral.

EXEMPLO 3-4 (teórico).

REGIME DE VACINAÇÃO ORAL/ORAL COM FPV, FHV E CLAMÍDIA. FPV,

- 5 FHV e Clamídia (ou qualquer componente de vacina de Clamídia viva modificada) são fornecidos em uma vacina de combinação com ou sem outros componentes. As vacinas vivas modificadas podem ser liberadas oral/oral.

EXEMPLO 3-5 (real).

REGIME DE VACINAÇÃO SUBQ/ORAL COM FPV, FHV, FCV E CLAMÍDIA.

- 10 FPV, FHV, FCV e Clamídia (ou qualquer componente de vacina de Clamídia viva modificada) são fornecidos em uma vacina de combinação com ou sem outros componentes. As vacinas vivas modificadas podem ser liberadas oral/oral (Tabela 3-1).

EXEMPLO 3-6 (real).

- 15 REGIME DE VACINAÇÃO ORAL/ORAL COM FPV, FHV, FCV E CLAMÍDIA. FPV, FHV, FCV e Clamídia (ou qualquer componente de vacina de Clamídia viva modificada) são fornecidos em uma vacina de combinação com ou sem outros componentes. As vacinas vivas modificadas podem ser liberadas oral/oral. Veja Tabela 3-1.

- 20 Gatos pêlo curto domésticos, aproximadamente 8 semanas de idade, foram vacinados com componentes de FELOCELL 4A e 3A que contêm vírus de riotraqueíte de felino vivo modificado [FHV], calicivírus [FCV-21], vírus de panleucopenia [FPV] e *Chlamydia psittaci* [FCp]. Os regimes de vacinação avaliados incluíram: uma vacinação subcutânea inicial seguida
25 por reforços subcutâneos nos dias 21 (SQ/SQ); uma vacinação subcutânea inicial seguida por uma imunização de reforço oral no dia 21 (SQ/Oral); ou uma vacinação oral inicial seguida por uma segunda vacinação oral no dia 21. A vacinação oral foi obtida por administração da vacina na boca. As amostras de soro de cada gato foram coletadas após a segunda vacinação, e
30 tratadas com calor a 56°C durante 30 minutos. As amostras foram avaliadas no ensaio de neutralização de soro contra FPV.

TABELA 3-1		
Vaccina	Rotina	Título de FPV SN
FELOCELL 4A	SQ/SQ	4096
FELOCELL 4A	SQ/Oral	7276
FELOCELL 4A	Oral/Oral	5793
FELOCELL 3A	Oral/Oral	7

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

FELOCELL 3A: FPV/FHV/FCV-21

- Os resultados da TABELA 3-1 sugerem que gatos responderam minimamente ao antígeno de FPV, como previamente reportado na literatura. (Ausência de uma resposta imune após a administração oral de vírus de panleucopenia de felino atenuado. Schults RD, Scott FW, Infect Immun. 1973, 7 de abril (4): 547-9). Com a presença de Clamídia, entretanto, ou qualquer componente associado com uma vacina de Clamídia, os títulos de FPV SN foram muito mais elevados, sugerindo eficácia *in vivo* contra desafio de FPV. Além disso, é observada a imunogenicidade de FPV realçada com SQ/SQ, SQ/Oral, porém também com grupo Oral/Oral.

EXEMPLO 3-7 (real).

REGIME DE VACINAÇÃO ORAL/ORAL COM FPV, FHV, FCV.

- São fornecidos FPV, FHV e FCV em uma vacina de combinação com ou sem outros componentes. As vacinas vivas modificadas podem ser liberadas oral/oral. Veja Tabela 3-2.

- Gatos pêlo curto domésticos, aproximadamente 8 semanas de idade, foram vacinados com FELOCELL 3A, que contém vírus de riotraqueíte de felino vivo modificado [FHV], calicivírus [FCV-21] e vírus de panleucopenia [FPV]. Os regimes de vacinação avaliados incluíram: uma vacinação subcutânea inicial seguida por reforços subcutâneos nos dias 21 (SQ/SQ); uma vacinação subcutânea inicial seguida por uma imunização de reforço oral no dia 21 (SQ/Oral); ou uma vacinação oral inicial seguida por uma segunda vacinação oral no dia 21. A vacinação oral foi obtida por administração da vacina na boca. As amostras de soro de cada gato foram coletadas após a primeira e segunda vacinação e tratadas com calor a 56°C durante

30 minutos. As amostras foram analisadas no ensaio de neutralização de soro contra FPV.

TABELA 3-2				
Grupo	Tratamento	Rotina	Título FPV-FPN SN	
			Pós 1º vax	Pós 2º vax
T01	Não vacinado	N/A	1	1
T02	FELOCELL 3A	SQ/SQ	16618	54319
T03	FELOCELL 3A	SQ/Oral	20346	28771
T04	FELOCELL 3A	Oral/Oral	1	4

Os resultados da TABELA 3-2 sugerem que o antígeno de FPV presente na vacina de FELOCELL 3A induziu resposta imune mínima quando dado Oral/Oral (de acordo com os resultados da TABELA 3-1). Quando as vacinas foram dadas SQ/SQ ou SQ/Oral, entretanto, títulos de FPV SN elevados foram observados, uma indicação de eficácia *in vivo*.

Descrição numerada da invenção. Descrições adicionais e exemplos. Nota-se abaixo, FCV é Calicivírus de felino, FPV é Parvovírus de Felino que também foi chamado Panleucopenia ou FPL e finalmente, FHV é HERPES VÍRUS de Felino¹. Uma composição imunogênica, compreendendo FPV vivo modificado e Clamídia viva modificada administradas em uma única dosagem administrativa. 2. Uma vacina, compreendendo FPV vivo modificado e Clamídia viva modificada liberados a um felino em duas dosagens administrativas únicas separadas, as dosagens administrativas únicas ambas liberadas por vias orais ou oronasais e separadas em tempo por 3 a 120 dias, ou cerca de 3 semanas ou cerca de 2 semanas. 3. Um método para imunizar gatos contra FPV, o método compreendendo administrar a um gato quantidades terapeuticamente eficazes de primeira e segunda vacinas, onde as primeira e segunda vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FPV, a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, a segunda vacina é administrada durante N dias seguintes à administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, ou onde N é cerca de 3 semanas ou onde N é cerca de 2 semanas. Onde as

- referida primeira e segunda vacinas são compreendidas de um FPV vivo modificado e Clamídia viva modificada. 4. Uma composição imunogênica, compreendendo FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada, administrada em uma dosagem única administrativa. 5. Uma vacina, compreendendo
- 5 do FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada liberada a um felino em duas dosagens administrativas únicas separadas, as dosagens administrativas únicas ambas liberadas por via oral ou oronasal e separadas em tempo por 3 a 120 dias, ou cerca de 3 semanas ou cerca de 2 semanas. 6. Um método para imunizar gatos FHV o método compreendendo administrar a um
- 10 gato quantidades terapeuticamente eficazes da primeira e segunda vacinas, onde as primeira e segunda vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FHV, a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive,
- 15 ou onde N é cerca de 3 semanas ou onde N é cerca de 2 semanas, onde as referidas primeira e segunda vacinas são compreendidas de um FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada. 7. Uma composição imunogênica, compreendendo FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada, administrada em uma dosagem administrativa única. 8. Uma vacina, compreendendo
- 20 do FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada liberados a um felino em duas dosagens únicas administrativas separadas, as dosagens únicas administrativas ambas liberadas por via oral ou oronasal e separadas em tempo por 3 a 120 dias, ou cerca de 3 semanas ou cerca de 2 semanas. 9. Um método para imunizar gatos contra FCV o método compreendendo administrar a um gato quantidades terapeuticamente eficazes de primeira e segunda vacinas, onde as primeira e segunda vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FCV, a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente e a segunda vacina é administrada oralmente
- 25 ou oronasalmente, a segunda vacina é administrada durante N dias de administração seguinte a primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, ou onde N é cerca de 3 semanas ou onde N é cerca de 2 se-
- 30

- manas, onde as referida primeira e segunda vacinas são compreendidas de um FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada. 10. Uma composição imunogênica, compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada administrados em uma dosagem única administrativa. 11. Uma vacina, compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada liberados a um felino em duas dosagens únicas administrativas separadas, as dosagens administrativas únicas ambas liberadas por via oral ou oronasal e separadas em tempo por 3 a 120 dias, ou cerca de 3 semanas ou cerca de 2 semanas. 12. Um método para imunizar gatos simultaneamente contra FPV e FHV, o método compreendendo administrar a um gato quantidades terapeuticamente eficazes da primeira e segunda vacinas, onde as primeira e segunda vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FPV e FHV, a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, ou onde N é cerca de 3 semanas ou onde N é cerca de 2 semanas, onde as referida primeira e segunda vacina compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada. 13. Uma composição imunogênica, compreendendo FPV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada administrada em uma dosagem única administrativa.

14. Uma vacina, compreendendo FPV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada liberados a um felino em duas dosagens únicas administrativas separadas, as dosagens únicas administrativas ambas liberadas por via oral ou oronasal e separadas em tempo por 3 a 120 dias, ou cerca de 3 semanas ou cerca de 2 semanas. 15. Um método para imunizar gatos simultaneamente contra FPV e FCV, o método compreendendo administrar a um gato quantidades terapeuticamente eficazes das primeira e segunda vacinas, onde as primeira e segunda vacina são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FPV e FHV, a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente e a segunda vacina é

- administrada oralmente ou oronasalmente, a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, ou onde N é cerca de 3 semanas ou onde N é cerca de 2 semanas, onde as referidas primeira e segunda vacinas
- 5 compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada. 16. Uma composição imunogênica, compreendendo FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada administrada, em uma dosagem única administrativa. 17. Uma vacina, compreendendo FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada libe-
- 10 rada a um felino em duas dosagens únicas administrativas separadas, as dosagens únicas administrativas ambas liberadas por via oral ou oronasal e separadas em tempo por 3 a 120 dias, ou cerca de 3 semanas ou cerca de 2 semanas. 18. Um método para imunizar gatos simultaneamente contra FHV e FCV, o método compreendendo administrar a um gato quantidades tera-
- 15 peuticamente eficazes das primeira e segunda vacinas, onde as primeira e segunda vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FHV e FCV, a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da
- 20 primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, ou onde N é cerca de 3 semanas ou onde N é cerca de 2 semanas, onde as referida primeira e segunda vacina compreendem FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada. 19. Uma composição imunogênica, compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modi-
- 25 ficado e Clamídia viva modificada administrada em uma dosagem única administrativa. 20. Uma vacina, compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada liberada a um felino em duas dosagens únicas administrativas separadas, as dosagens únicas administrativas ambas liberadas por via oral ou oronasal e separada
- 30 em tempo por 3 a 120 dias, ou cerca de 3 semanas ou cerca de 2 semanas. 21. Um método para imunizar gatos simultaneamente contra FPV, FHV e FCV, o método compreendendo administrar a um gato quantidades terapeu-

- ticamente eficazes da primeira e segunda vacinas, onde as primeira e segunda vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FPV, a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 1 a 120, inclusive, ou onde N é cerca de 3 semanas ou onde N é cerca de 2 semanas, onde as referida primeira e segunda vacina compreende FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada.
- 5

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-21 ou uma proteína de capsídeo de FCV-21 isolada.

5 2. Vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-21 ou uma proteína de capsídeo de FCV-21 isolada, onde a referida proteína de capsídeo compreende seqüência de proteína (SEQ ID 13) e seqüências que têm pelo menos cerca de 91,2%, 95% e 99% de identidade; onde a referida
10 proteína de capsídeo é fornecida em uma quantidade eficaz para produzir uma resposta imune, e um veículo farmacologicamente aceitável.

3. Vacina de DNA para imunizar gatos contra calicivírus de felino, caracterizada pelo fato de que compreende seqüências de ácido nucléico que codificam para uma proteína de capsídeo de FCV-21 ou uma proteí-
15 na de capsídeo de FCV-21 isolada onde o referido DN Acompreende uma seqüência (SEQ. ID 12) e seqüências que têm pelo menos cerca de 78,7%, e 79,2% de identidade de seqüência e permitindo substituições conservado-
ras.

4. Vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino, caracterizada pelo fato de que compreende uma Proteína de capsídeo de FCV-49
20 ou uma Proteína de capsídeo de FCV-49 isolada onde a referida proteína de capsídeo compreende uma seqüência de proteína de tensão FCV-49.

5. Vacina para imunizar gatos contra calicivírus de felino, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína de capsídeo de FCV-49,
25 ou uma proteína de capsídeo de FCV-49 isolada, onde a referida proteína de capsídeo compreende seqüência de proteína (SEQ ID 15) e seqüências que têm pelo menos cerca de 92,7%, 95% e 99% de identidade; onde a referida proteína de capsídeo é fornecida em uma quantidade eficaz para produzir uma resposta imune, e um veículo farmacologicamente aceitável.

30 6. Vacina de DNA, para imunizar gatos contra calicivírus de felino, caracterizada pelo fato de que compreende seqüências de ácido nucléico que codificam para uma proteína de capsídeo de FCV-49 ou uma proteí

na de capsídeo de FCV-49 isolada onde o referido DNA compreende uma seqüência (SEQ. ID 14) e seqüências que têm pelo menos cerca de 78,9%, isto é, 79,4% (78,9 + 0,5) de identidade de seqüência e permitindo substituições conservadoras.

- 5 7. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende ou sozinho ou em combinação, o seguinte: em que contém um adjuvante, em que o componente de FCV está vivo, em que o componente de FCV é atenuado, onde o componente de FCV é inativado, pode incluir pelo menos uma outra cepa
10 de calicivírus de felino selecionado do grupo que consiste em FCV-F9, FCV-LLK, FCV-M8, FCV-255, e FCV-2280.

8. Método para imunizar gatos contra calicivírus de felino (FCV), caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um gato quantida-
des terapêuticamente eficazes das primeira e segundas vacinas, onde as
15 primeira e segunda vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FCV, a primeira vacina é administrada parenteralmente e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, e a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive.

- 20 9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as vacinas independentemente compreendem uma vacina de vírus vivo, uma vacina de vírus modificado vivo, uma vacina de vírus inativado, uma vacina recombinante, uma vacina de DNA, ou uma vacina de antígeno de subunidade, ou sozinha ou em combinação.

- 25 10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das vacinas inclui uma ou mais cepas de FCV.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais cepas de FCV compreende F9 ou FCV-21 ou F9 e FCV-21.

- 30 12. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende FPV vivo modificado e Clamídia viva modificada, e ou compreendendo ambos FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou com-

preendendo FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FPV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada administrados em uma dosagem única administrativa.

13. Vacina, caracterizado pelo fato de que compreende FPV vivo modificado e Clamídia viva modificada, e ou compreendendo FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FPV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada e ou compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada liberados a um felino em duas dosagens únicas administrativas separadas, as dosagens únicas administrativas ambas liberadas por via oral ou oronasal e separadas em tempo por 3 a 120 dias.

14. Método para imunizar gatos contra FPV, FCV e ou FHV, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um gato quantidades terapêuticamente eficazes das primeira e segunda vacinas, onde as primeira e segunda vacinas são adaptadas para induzir uma resposta imune no gato contra FPV, e ou FCV e ou FHV, a primeira vacina é administrada oralmente ou oronasalmente e a segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente, a segunda vacina é administrada durante N dias seguinte a administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive, onde se as referidas primeira e segunda vacinas é compreendida de uma composição:

a) compreendendo ambos FPV vivo modificado e Clamídia viva modificada; e ou

b) compreendendo ambos FHV vivo modificado e Clamídia viva

modificada; e ou

c) compreendendo ambos FCV vivo modificado e Clamídia vivo modificada; e ou

d) compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado e

5 Clamídia viva modificada; e ou

e) compreendendo FPV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada; e ou

f) compreendendo FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada; e ou

10 g) compreendendo FPV vivo modificado, FHV vivo modificado, FCV vivo modificado e Clamídia viva modificada, ou qualquer combinação destes.

15 15. Composição imunogênica, vacina, e métodos para tratar animais, especialmente gatos, caracterizados pelo fato de que são como descritos aqui.

PI 0014119-6

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINA, CALICIVIROSES DE FELINO, E TRATAMENTOS PARA IMUNIZAR ANIMAIS CONTRA PARAOVÍRUS FELINO E HERPES VÍRUS DE FELINO".

5 A presente invenção refere-se a uma vacina para imunizar gatos contra vírus de felinos. A presente invenção também refere-se a um clone de ácido nucléico que codifica a proteína de capsídeo do calicivírus de felino isolado. A presente invenção também refere-se a uma vacina viva ou morta que compreende o calicivírus de felino isolado, uma vacina de subunidade
10 que compreende a proteína de capsídeo do calicivírus de felino isolado, uma vacina de ácido nucléico que compreende um clone de ácido nucléico do calicivírus de felino isolado, e uma vacina de vetor de vírus recombinante que compreende ácido nucléico que codifica a proteína de capsídeo do calicivírus de felino isolado. A presente invenção também refere-se a um método
15 para identificar um calicivírus de felino útil para produzir uma composição de vacina e a ensaios para diagnosticar gatos infectados com calicivírus de felino. Também descrito é um método para imunizar animais, especialmente gatos, contra doença, em particular contra calicivírus de felino (FCV). O método inclui administrar a um gato quantidades terapeuticamente eficazes da
20 primeira e segunda vacina de FCV. A primeira vacina é administrada oralmente ou parenteralmente (por exemplo, subcutaneamente, intramuscularmente, e outros). A segunda vacina é administrada oralmente ou oronasalmente N dias seguinte à administração da primeira vacina, onde N é um número inteiro de 3 a 120, inclusive. Uma terceira administração de vacina
25 também pode ser dada. A presente invenção também descreve métodos e materiais para tratar e imunizar animais com vacina, e em particular gatos contra ambos FPV ou Parvovírus de Felino que também foi chamado Panleucopenia ou FPL e contra outra doença, FHV ou HERPES VÍRUS de Felino que também foi chamado Vírus de Rinotraqueíte de Felino.