República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0611581-0 B1

(22) Data do Depósito: 23/06/2006

(45) Data de Concessão: 03/08/2021

(54) Título: FLAVIVÍRUS QUIMÉRICO INATIVADO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, E, VACINA

(51) Int.Cl.: A61K 39/12; A61K 39/193.

(30) Prioridade Unionista: 24/06/2005 US 60/693,629.

(73) Titular(es): INTERVET INTERNATIONAL B.V..

(72) Inventor(es): FRANK JAY STERNER; DANIEL GHISLENA EMIEL GOOOVAERTS; MELISSA ANNE LUM; MARK WILLIAM MELLENCAMP.

(86) Pedido PCT: PCT US2006024584 de 23/06/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/002470 de 04/01/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/12/2007

(57) Resumo: FLAVIVÍRUS QUIMÉRICO INATIVADO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, E, MÉTODO DE PREVENÇÃO OU DE TRATAMENTO DE UMA INFECÇÃO POR FLAVIVÍRUS EM UM ANIMAL. Modalidades da presente invenção geralmente proporcionam uma composição imunogênica e/ou vacina de vírus quimérico inativada para o tratamento ou a prevenção de infecção viral. Em adição, várias outras modalidades da presente invenção geralmente se referem aos métodos de prevenção e de tratamento de infecção viral em tais animais com a composição imunogênica e/ou vacina inativada. Outras modalidades compreendem métodos de preparação de uma vacina ou composição imunogênica para o tratamento ou a prevenção de infecção viral em tais animais.

FLAVIVÍRUS QUIMÉRICO INATIVADO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, E, VACINA

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício sob 35 U.S. C. § 119 do Pedido U.S. Provisório 60/693,629, depositado aos 24 de junho de 2005, que é por meio deste aqui incorporado em sua totalidade como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] Esta invenção é referida aos métodos novos e melhorados de prevenção e tratamento de flavivírus e outra infecção viral relacionada em animais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] Flavivírus são vírus de RNA de fita positiva, envelopados, pequenos, que são preocupantes em ambientes médico e veterinário em todo o mundo. Vírus do Nilo Ocidental (WN, ou WNV), por exemplo, que é um membro da família de flavivírus, é o agente causador de encefalite WN, uma doença viral proveniente de artrópode, não-contagiosa, infecciosa (In Virology, Fields (ed.), Raven-Lippincott, New York, 1996, pp. 961-1034). O vírus tem sido encontrado em África, Ásia Ocidental, Oriente Médio, e região do Mediterrâneo da Europa, e, recentemente, nos Estados Unidos. Mosquitos tornam-se infectados com o vírus após se alimentarem sobre aves selvagens infectadas, e então transmitem o vírus através de picadas em humanos, aves, e animais, tais como cavalos, ovelhas, gado bovino, e porcos.

[0004] Vírus do Nilo Ocidental é uma doença infecciosa emergente. Vírus do Nilo Ocidental foi primeiro isolado em Uganda em 1937. Hoje ele é mais comumente encontrado na África, Ásia Ocidental, Europa, e Oriente Médio. Contudo, ele fez seu primeiro surgimento reconhecido nos Estados Unidos em 1999. Em 2004, o vírus havia sido encontrado em aves e mosquitos em cada estado exceto Alaska e Hawaii.

[0005] Outras doenças bem conhecidas causadas pelos flavivírus

incluem febre amarela, encefalite japonesa, Dengue, e encefalite de São Luís. Infecções de flavivírus são comumente transmitidas por carrapatos e/ou mosquitos.

[0006] Os hospedeiros primários para o vírus do Nilo Ocidental são apenas mosquitos e aves. Outras espécies animais, tais como humanos, e animais, tais como cavalos, ovelhas, gado bovino, e porcos, e semelhantes são consideradas apenas hospedeiros incidentais que se tornam infectados quando um mosquito fêmea infectado pica o hospedeiro incidental.

[0007] Pessoas que contraem o vírus do Nilo Ocidental normalmente experimentam apenas sintomas brandos incluindo febre, dor de cabeça, dores corporais, erupção de pele, e glândulas linfáticas inchadas. Se o vírus do Nilo Ocidental entra no cérebro, contudo, ele pode causar meningite ou encefalite ameaçadora da vida. Caso ameaçadores da vida primariamente ocorrem em pessoas idosas. Estudos recentes têm mostrado que o vírus do Nilo Ocidental pode ser transmitido através de transfusões de sangue e de transplantes de órgão. Alguns peritos de saúde também crêem que é possível que o vírus do Nilo Ocidental seja transmitido de uma mãe para o seu filho não-nascido, e através do leite da mama.

[0008] Há muitos projetos em desenvolvimento para abordagens de vacina de vírus do Nilo Ocidental, incluindo vacinas quiméricas vivas (que combinam genes de mais do que um vírus em uma vacina única), vacinas de DNA nu, e vacinas contendo coquetéis de proteínas do Nilo Ocidental individuais, e semelhantes. Contudo, não há abordagem fazendo uso de uma vacina quimérica inativada.

[0009] Proteínas de flavivírus são produzidas por tradução de uma única matriz de leitura aberta longa para gerar uma poliproteína, que sofre uma série complexa de clivagens proteolíticas após tradução por uma combinação de proteases virais e de hospedeiro para gerar proteínas virais maduras. As proteínas estruturais de vírus estão arranjadas na poliproteína na ordem de C-

prM-E, onde "C" é capsídeo, "prM" é um precursor da proteína M (membrana) ligada em envelope viral, e "E" é a proteína de envelope. Estas proteínas estão presentes na região N-terminal da poliproteína, enquanto que proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) estão localizadas na região C-terminal do polipeptídeo.

[0010] Em 2003, testes clínicos em humano de uma vacina de vírus atenuado, vivo do Nilo Ocidental foram iniciados por Acambis (Cambridge, MA). A vacina atenuada, viva de Acambis é baseada em uma vacina já usada para prevenir febre amarela, uma doença causada por um flavivírus diferente.

[0011] Uma vacina atenuada, viva de Acambis contém genes de dois vírus diferentes, vírus de febre amarela e vírus do Nilo Ocidental, e é um exemplo de um vírus quimérico. Esta vacina atenuada, viva de Acambis compreende vírus da Febre Amarela com uns poucos genes substituídos por genes para proteínas de superfície de vírus do Nilo Ocidental.

[0012] Detalhes de preparação desta vacina quimérica, atenuada, viva de Acambis são proporcionados, por exemplo, em Patentes U.S. de Nos. 6.962.708 e 6.696.281 e Chambers et al., J. Virol. 73:3095-3101, 1999, que são cada uma aqui inteiramente incorporadas em suas totalidades como referências. Outros métodos de uso e de diagnóstico para a vacina quimérica atenuada, viva de Acambis são proporcionados em Patentes US de Nos. 6.682.883 e 6.878.372, que são aqui incorporadas em suas totalidades como referências.

[0013] Os resultados de tais vacinas atenuadas, vivas têm se mostrado bem sucedidas e testes continuam. Contudo, certos riscos podem acompanhar o uso de uma vacina de vírus atenuada, viva. Estes riscos são até mesmo pronunciados para indivíduos imunocomprometidos, os indivíduos idosos, indivíduos grávidos, e outros indivíduos com um sistema imune estressado ou enfraquecido. Bastante freqüentemente, tem sido demonstrado que vacinas de vírus atenuadas, vivas estão quer infra-atenuadas (causam doença), quer

supra-atenuadas (falham em imunizar). Também é possível que uma vacina de vírus viva otimamente atenuada reverta para uma forma virulenta (causadora de doença) através de mutação. Contudo, o YF-WN de Acambis não tem mostrado indicação de reversão para virulência. Há preocupações adicionais com as vacinas vivas atenuadas. Por exemplo, os vírus vivos da Dengue também são sensíveis ao calor, tornando difícil e custoso manter a vacina em alguns países tropicais e subtropicais onde a vacina pode ser mais necessária. Conseqüentemente, uma vacina é necessária na técnica para tratar e/ou prevenir com segurança infecções de flavivírus, tal como vírus do Nilo Ocidental, em indivíduos com estes e outros riscos similares. Particularmente para aqueles que estão imune comprometidos ou outros indivíduos mais sob risco.

[0014] Contudo, o estado da técnica é que uma vacina de vírus quimérica inativada é indesejável e não seria efetiva. Patente US de No. 6.432.411 relatou que os esforços para preparar vacinas de flavivírus mortas têm encontrado sucesso limitado. Primariamente os estudos eram limitados pela incapacidade. Primariamente os estudos eram limitados pela incapacidade de obter rendimentos de vírus adequados dos sistemas de cultura celular. Rendimentos de vírus de células de inseto estão geralmente dentro da faixa de 10^4 a 10^5 pfu/mL, bem abaixo dos níveis necessários para gerar uma vacina morta custo-efetiva. Rendimentos de células de mamífero incluindo células Vero e LLC-MK2 foram mais altos, mas os rendimentos de pico, de aproximadamente 10^8 pfu/mL de uma linhagem de célula Vero única, ainda são muito menores do que o necessário para alcançar um produto de vacina verdadeiramente custo-efetiva.

[0015] Conseqüentemente, a técnica ensina modo de uso de flavivírus inativados como candidatos de vacinas viáveis. Além disso, não há ensinamento de uma vacina quimérica inativada para tratar ou prevenir qualquer infecção por flavivírus.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0016] Várias modalidades da invenção da presente invenção compreendem uma vacina ou composição imunogênica para o tratamento ou a prevenção de infecção por flavivírus em um animal.

[0017] A invenção também proporciona métodos para prevenir ou tratar infecções de flavivírus em animais suscetíveis, que envolvem administrar aos indivíduos flavivírus quiméricos inativados. A invenção também proporciona o uso de flavivírus quiméricos inativados na preparação de medicamentos para uso em tais métodos e vacinas e/ou composições imunogênicas. Em uma modalidade da invenção, os flavivírus quiméricos inativados pode incluir, por exemplo, as proteínas não-estruturais e de capsídeo de um primeiro flavivírus, e as proteínas prM e de envelope de um segundo flavivírus.

[0018] Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um flavivírus inativado, compreendendo um primeiro flavivírus no qual as seqüências de nucleotídeos codificadoras das proteínas de pré-membrana e de envelope são substituídas por seqüências de nucleotídeos codificadoras de proteínas de pré-membrana e de envelope de um segundo flavivírus. O primeiro flavivírus pode ser vírus de febre amarela, incluindo vírus de febre amarela derivado de cepa 17D. O vírus quimérico pode compreender uma seqüência de sinal na terminação de aminoácido da proteína de pré-membrana, e a seqüência de sinal pode ser aquela do vírus da febre amarela. O segundo flavivírus pode ser vírus do Nilo Ocidental.

[0019] Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a uma composição imunogênica compreendendo um flavivírus quimérico inativado, compreendendo um primeiro flavivírus no qual as seqüências de nucleotídeos codificadoras das proteínas de pré-membrana e de envelope são substituídas por seqüências de nucleotídeos codificadoras de proteínas de pré-membrana e de envelope de um segundo flavivírus.

[0020] Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a uma

vacina compreendendo um flavivírus quimérico inativado, compreendendo um primeiro flavivírus no qual as seqüências de nucleotídeos codificadoras das proteínas de pré-membrana e de envelope são substituídas por seqüências de nucleotídeos codificadoras de proteínas de pré-membrana e de envelope de um segundo flavivírus. A vacina pode adicionalmente compreender i) um ou mais vírus vivos modificados; ii) um ou mais vírus inativados; ou iii) um ou mais antígenos bacterianos. A vacina pode adicionalmente compreender um ou mais de vírus inativado de encefalomielite oriental, vírus inativado de encefalomielite ocidental, vírus inativado de encefalomielite venezuelana, vírus de tipo 1 inativado do herpes eqüino, vírus de tipo 4 inativado do herpes eqüino, vírus inativado da influenza eqüina de cepa Kentucky 1993/A2, vírus inativado da influenza eqüina de cepa Kentucky 2002/A2, vírus inativado da influenza eqüina de cepa New Market/2/93/A2 e uma fração de toxóide do tétano.

[0021] Em outra modalidade, a presente invenção refere-se um método de prevenção ou de tratamento de uma infecção de uma infecção por flavivírus em um animal, o método compreendendo administrar ao animal um flavivírus quimérico inativado (ou sua vacina ou composição imunogênica) compreendendo um primeiro flavivírus no qual as seqüências de nucleotídeos codificadoras das proteínas de pré-membrana e de envelope são substituídas por seqüências de nucleotídeos codificadoras de proteínas de pré-membrana e de envelope de um segundo flavivírus. O primeiro flavivírus pode ser um vírus da febre amarela. O vírus da febre amarela pode ser derivado da cepa 17D. O segundo flavivírus pode ser vírus do Nilo Ocidental.

[0022] Em quaisquer modalidades da presente invenção, o vírus quimérico inativado pode estar presente em uma concentração variando entre 10^2 e 10^8 unidades formadoras de placa (pfu). Alternativamente, o flavivírus quimérico pode ser administrado em uma dose variando entre 10^6 e 10^7 pfu. Alternativamente, o flavivírus quimérico pode ser administrado em uma dose

variando entre 1 e 10 unidades de dose de antígeno relativas.

[0023] Em quaisquer modalidades da presente invenção, o vírus quimérico inativado pode ser administrado por uma rota subcutânea, intramuscular, submucosal, mucosal, ou intradermal. em uma modalidade da presente invenção, o flavivírus quimérico inativado é oralmente administrado.

[0024] Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0025] Como aqui usado, o termo “vacina(s)” significa e refere-se a um produto, cuja administração é intencionada para gerar uma resposta(s) imune(s) que pode prevenir e/ou minorar a severidade de uma ou mais doenças infecciosas. Vacinas podem incluir um ou mais dos seguintes: uma preparação de bactérias inativada ou atenuada viva, vírus ou parasitas, organismos inteiros inativados (mortos), células irradiadas vivas, frações brutas ou imunógenos purificados, incluindo aqueles derivados de DNA recombinante em uma célula hospedeira, conjugados formados por ligação covalente de componentes, antígenos sintéticos, polinucleotídeos (tais como vacinas de DNA plasmídeo), células vivas contendo vetor expressando imunógenos heterólogos específicos, ou células pulsadas com imunógeno.

[0026] Como aqui usado, “vírus quimérico” refere-se a um vírus possuindo um genoma contendo seqüências de dois ou mais vírus diferentes, incluindo cepas virais diferentes. A não ser que seja enunciado de outro modo, “quimera” refere-se a um vírus quimérico. Um exemplo não-limitante de um vírus quimérico é a quimera YF/WN, que é um flavivírus quimérico.

[0027] Como aqui usado, “flavivírus quimérico” refere-se a um vírus possuindo um genoma contendo seqüências de dois ou mais flavivírus diferentes, incluindo cepas diferentes de flavivírus. Como descrito acima, um exemplo não-limitante de um flavivírus quimérico é a quimera YF/WN.

[0028] Como aqui usado, "vírus quimérico do Nilo Ocidental”,

“quimera do Nilo Ocidental”, “vírus YF/WN” e “quimera YF/WN” referem-se a um vírus atenuado, vivo quimérico, compreendendo a cepa de vacina 17D de vírus da febre amarela (YFV) no qual a seqüência de nucleotídeos codificadora das proteínas de pré-membrana (prM) e de envelope (E) são substituídas pelas seqüências de nucleotídeos codificadoras de proteínas prM e E de Vírus do Nilo Ocidental (WNV), de modo que as proteínas prM e E do Vírus do Nilo Ocidental sejam expressadas, e a proteína de capsídeo do vírus quimérico seja do vírus da febre amarela. O técnico experiente prontamente reconhecerá que flavivírus quiméricos compreendendo componentes de vírus da febre amarela e do vírus do Nilo podem ser preparados de outros flavivírus quiméricos específicos descritos neste parágrafo.

[0029] Vírus quimérico do Nilo Ocidental (ou, vírus YF/WN) pode ser inativado usando técnicas bem conhecidas pelo técnico experiente. Por exemplo, o vírus quimérico do Nilo Ocidental (ou, vírus YF/WN) pode ser inativado com agentes químicos inativadores ou outro meio físico tal como calor. Exemplos não limitantes de agentes químicos inativadores incluem etileno-imina binária (BEI) ou formalina (uma solução 37% de formaldeído).

[0030] Vírus vivo pode ser inativado usando BEI primeiro por misturação de pó de etileno-amina binária (BEA) com uma solução de hidróxido de sódio. Após geração de BEI no ambiente básico, a solução de BEI é adicionada em uma solução contendo o vírus vivo para dar uma concentração final de BEI de 0,5 mM a 10 mM. Esta solução pode ser então incubada a de 4-37ºC por 24-96 horas. Tiossulfeto de sódio pode ser então adicionado após o vírus ser inativado para neutralizar qualquer BEI remanescente.

[0031] Vírus vivo também pode ser inativado com formalina (solução 37% de formaldeído). Aqui, formalina é adicionada em uma solução contendo vírus vivo para dar uma concentração final de formalina de 0,05 - 2% v:v (formalina: solução viral viva). Esta solução pode ser então incubada a de 4-

37ºC por 24-96 horas.

[0032] Como aqui usado, o termo “antígeno” significa e refere-se a um vírus, uma bactéria, partes de um vírus ou de uma bactéria ou uma proteína estranha que atua para estimular o sistema imune em um animal. O sistema imune pode ser estimulado para fazer com que células brancas do sangue ataquem e destruam o antígeno ou para produzir uma molécula de proteína, que ataca o antígeno e quer mata o antígeno quer torna-o inativo. Como aqui usado o termo “anticorpo” significa e refere-se a uma molécula contendo proteína que um sistema imune de animal produz que reage com um antígeno para torná-lo inativo.

[0033] Como aqui usado, o termo “animal” significa e refere-se a ambos animais humano e não-humano.

[0034] Como aqui usado, o termo “cepa de vacina” significa e refere-se a uma cepa viral adequada para uso em uma vacina ou composição imunogênica. Uma “cepa de vacina” pode compreender, mas não é necessariamente limitada a, uma cepa não-patogênica ou cepa relativamente não-patogênica, uma cepa morta, e/ou uma cepa atenuada.

[0035] Como aqui usado, o termo "liofilizar," e suas conjugações, significa e refere-se à secagem por congelamento. Como aqui usado, o termo "origem animal " significa e refere-se à origem de animais. Igualmente, o termo “origem não-animal” significa e refere-se à não-origem direta ou indiretamente de animais.

[0036] Como aqui usado, o termo "estabilizar," e suas conjugações, significa e refere-se a tornar ou manter estável, firme, constante, e manter à cerca de um dado nível ou nível substancialmente não flutuante, à cerca de uma dada qualidade ou qualidade substancialmente não-flutuante e à cerca de uma dada quantidade ou quantidade substancialmente não-flutuante. Contudo, é entendido que alguma flutuação no nível, na qualidade, e/ou na quantidade da composição estabilizada pode se encontrada. Modalidades da presente

invenção são intencionadas para incluírem estabilizadores que permitem tais flutuações. Sem limitação, estabilizadores incluem estabilizadores secos, estabilizadores volumosos, crioprotetores, termoestabilizadores, osmoprotetores, protetores de dessecação, e semelhantes. Tais termos especialmente significam estarem incluídos dentro de estabilizadores da presente invenção.

[0037] Como aqui usado, o termo "proteína" significa e refere-se a uma cadeia molecular de aminoácidos. Uma proteína não é de um comprimento específico e pode, ser requerido, ser modificada *in vivo* ou *in vitro*, por, e.g. glicosilação, amidação, carboxilação ou fosforilação. Inter alia, peptídeos, oligopeptídeos e polipeptídeos estão incluídos dentro da definição de proteína. Uma proteína ou um peptídeo pode ser de origem biológica e/ou sintética.

[0038] Como aqui usado, o termo "ácido nucleico" significa e refere-se a uma cadeia molecular de ácidos ribonucleicos ou ácidos desoxirribonucleicos. Um ácido nucleico não é de um comprimento específico, portanto polinucleotídeos, genes, matrizes de leitura aberta (ORF's), sondas, iniciadores, ligantes, espaçadores e adaptadores estão incluídos dentro da definição. Um ácido nucleico pode ser de origem biológica e/ou sintética. O ácido nucleico pode estar na forma de fita única ou de fita dupla. A fita única pode estar na orientação de senso ou de anti-senso. Também estão incluídos dentro da definição DNAs ou RNAs modificados. Modificações nas bases do ácido nucleico podem ser feitas, e bases tal como inosina podem ser incorporadas. Outras modificações podem envolver, por exemplo, modificações da estrutura principal.

[0039] Como aqui usado, um veículo farmaceuticamente aceitável é entendido para ser um composto que não afeta adversamente a saúde do animal ou organismo a ser vacinado, pelo menos não na extensão na qual o efeito adverso é pior do que os efeitos vistos quando o animal não está vacinado. Exemplos não limitantes de veículos farmaceuticamente aceitáveis

incluem água estéril ou uma solução salina fisiológica estéril. Em uma forma mais complexa o veículo pode ser um tampão.

[0040] Como aqui usado, o termo "carboidrato" significa e refere-se a mono-, di-, oligo-, e polissacarídeos.

[0041] Como aqui usado, o termo "felino" significa e refere-se a qualquer animal de ou pertencente ao gênero *Felis*, ou à família *Felidae*, família de gatos, tais como, mas não limitados a, um gato, um leão, um tigre, um leão da montanha, um puma, um jaguar, um lince, um ocelote e semelhante.

[0042] Como aqui usado, o termo "canino" significa e refere-se a qualquer animal de ou pertencente ao gênero *Canis*, família de cães, tal como, mas não limitados a, um cão, um lobo, e semelhantes.

[0043] Como aqui usado, o termo "eqüino" significa e refere-se a qualquer animal de ou pertencente ao gênero *Equis*, ou à família *Equidae*, família de cavalos, tais como, mas não limitados a, um cavalo, uma mula, um jumento, uma zebra, e semelhantes.

[0044] A presente invenção geralmente refere-se às composições para e aos métodos de prevenção e tratamento de infecção por flavivírus em animais. Os métodos da invenção envolvem vacinação de animais que estão sob risco de desenvolvimento de ou possuem infecção por flavivírus com um flavivírus quimérico inativado. Outros aspectos da invenção são direcionados aos métodos de preparação de uma vacina ou composição imunogênica compreendendo um flavivírus quimérico inativado para o tratamento ou a prevenção de infecção por flavivírus em animais.

[0045] O técnico experiente prontamente reconhecerá, contudo, que há outros flavivírus e vírus bem caracterizados proximamente relacionados com os flavivírus que podem ser tratados ou prevenidos usando vírus quiméricos inativados descritos pela presente invenção. Aqui, a invenção também é direcionada aos vírus quiméricos inativados descritos pela presente invenção.

Conseqüentemente, a invenção também é direcionada aos vírus quiméricos inativados para tratamento ou prevenção de doenças ou enfermidades associadas com ou causadas por vírus da família *Flaviviridae* ou *Togaviridae*. Exemplos não limitantes de gêneros de vírus caindo dentro destas famílias incluem vírus pertencentes aos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* ou *Alphavirus*. Exemplos não limitantes de vírus ou doenças causadas por vírus pertencentes a estas famílias ou gêneros incluem vírus da encefalite, Encefalite Eqüina Oriental, Encefalite Eqüina Ocidental, Encefalite Eqüina Venezuelana, Kunjin, Encefalite do Vale Murray, vírus da doença Louping, encefalite japonesa, Dengue (sorotipos 1-4), Febre Amarela, Encefalite do Vale Murray, Encefalite de São Luis, Encefalite de Rocio, Wesselsbron, vírus de Ilhéus; flavivírus de carrapatos, tais como encefalite de Europa Central, encefalite siberiana, encefalite russa da primavera-verão, Doença da Floresta de Kyasanur, Febre hemorrágica de Omsk, vírus Powassan, Negishi, Absettarov, Hansalova, Apoi, e Hypr; bem como vírus do gênero *Hepacivirus* (e.g., vírus da Hepatite C). Vírus adicionais que podem ser tratados ou prevenidos usando vírus quiméricos inativados da presente invenção incluem aqueles pertencentes ao gênero *Pestivirus* (e.g., vírus da diarréia Bovina), e outros vírus, tais como vírus Lassa, Ebola, e Marburg ou outros vírus de RNA com uma construção genômica que seria compatível com a incorporação na quimera.

[0046] Infecção por qualquer um dos vírus acima descritos (ou doenças causadas pelos mesmos) pode ser prevenida ou tratada com os vírus quiméricos inativados aqui descritos. Em particular, com vírus quiméricos inativados que compreendem um primeiro vírus no qual uma ou mais proteína(s) estrutural(ais) do primeiro vírus têm sido substituída(s) por uma proteína (ou proteínas) estrutural correspondente de um segundo vírus contra o qual é almejada(o) proteção ou tratamento.

[0047] Um aspecto preferido da invenção é direcionado aos flavivírus

quiméricos inativados, métodos de preparação de flavivírus quiméricos inativados, vacinas compreendendo flavivírus quiméricos inativados, e métodos usando tais vacinas. Este aspecto da invenção é direcionado aos flavivírus quiméricos inativados que compreendem um flavivírus no qual uma ou mais proteínas estruturais de um primeiro flavivírus têm sido substituídas por uma ou mais proteínas estruturais correspondentes de um segundo flavivírus, ao qual imunidade é desejada. Em uma modalidade da presente invenção, quimeras consistem da estrutura principal de um primeiro flavivírus na qual as proteínas prM e E têm sido substituídas por proteínas prM e E do segundo flavivírus.

[0048] Os vírus quiméricos inativados que são usados na invenção podem consistir de qualquer combinação de vírus, desde que, como é mencionado acima, o vírus contra o qual imunidade é desejada seja a fonte da(s) proteína(s) estrutural(ais) mencionada(s). Por exemplo, para vacinar um animal, tal como um cavalo, contra infecção do vírus do Nilo Ocidental, um flavivírus quimérico consistindo de uma estrutura principal de flavivírus, tal como o vírus da febre amarela (YF), no qual as proteínas estruturais do vírus do Nilo Ocidental, tais como as proteínas prM e E, são inseridas pode ser usado. Nesta quimera, as proteínas YF prM e E são substituídas por aquelas de WN. Similarmente, se imunidade contra o vírus da encefalite japonesa (JE) for desejada, então as proteínas prM e E do vírus JE podem ser inseridas em um flavivírus de estrutura principal, tal como vírus da febre amarela, no lugar das proteínas de estrutura principal correspondentes. Outros flavivírus que causam doença em cavalos, e para os quais vírus quiméricos podem ser usados para induzir proteção, incluem vírus Kunjin, de encefalite do Vale Murray, e de doença Louping. Em todas as modalidades da presente invenção, o vírus quimérico é então inativado. Exemplos de animais que podem ser vacinados e/ou tratados com os vírus quiméricos inativados da presente invenção compreendem humanos, cavalos, porcos, ovelhas, gado bovino,

animais domésticos, tais como cães e gatos, e aves domésticas. Contudo, em geral qualquer animal suscetível à infecção do flavivírus para a qual proteção é almejada pode ser vacinado.

[0049] Assim, exemplos não limitantes de flavivírus que podem ser usados na invenção, como fontes de vírus de estrutura principal ou insertos de proteína estrutural, incluem flavivírus provenientes de mosquito, tais como vírus de encefalite japonesa, Dengue (sorotipos 1-4), Febre Amarela, Encefalite do Vale Murray, Encefalite de São Luis,, Nilo Ocidental, Kunjin, Encefalite de Rocio, Wesselsbron, vírus de Ilhéus; flavivírus de carrapatos, tais como encefalite de encefalite de Europa Central, encefalite siberiana, encefalite russa da primavera-verão, Doença da Floresta de Kyasanur, Febre hemorrágica de Omsk, doença Louping, Powassan, Negishi, Absettarov, Hansalova, Apoi, e Hypr; bem como vírus do gênero *Hepacivirus* (e.g., vírus da Hepatite C). Vírus adicionais que podem ser usados como a fonte de proteínas estruturais inseridas incluem os vírus do gênero *Pestivirus* (e.g., vírus da diarréia Bovina), e outros vírus, tais como vírus Lassa, Ebola, e Marburg.

[0050] Em geral, como descrito nas Patentes U.S. de Nos. 6.962.708 e 6.696.281, em uma modalidade para a prevenção ou o tratamento de infecção por flavivírus do Nilo Ocidental, tais métodos requerem substituição de genes codificadores de duas proteínas estruturais [prM e E e vírus da vacina 17D de febre amarela com os genes correspondentes do vírus do Nilo Ocidental e inativação do vírus quimérico. O virion inativado resultante possui o envelope do Nilo Ocidental, contendo estruturas envolvidas em fixação de vírus-célula e internalização de vírus, todos os determinantes antigênicos para neutralização, e epítopo(s) para linfócitos T citotóxicos. A proteína de nucleocapsídeo (C), proteínas não estruturais, e terminações não traduzidas responsáveis pela replicação de vírus permanecem aquelas do vírus 17D de febre amarela original.

[0051] Uma modalidade preferida da presente invenção refere-se a uma composição imunogênica e/ou vacina quimérica inativada para o tratamento ou a prevenção de infecção do Nilo Ocidental, em um animal suscetível à infecção do Nilo Ocidental. Detalhes de preparação de vírus quiméricos incluindo o vírus quimérico WN/YF que pode ser então inativado e usado em várias modalidades da invenção são proporcionados, por exemplo, em Patentes U.S. de Nos. 6.962.708 e 6.696.281 e Chambers *et al*., *J. Virol.* 73:3095-3101, 1999, que são por meio deste aqui incorporados em sua totalidade como referências. Patentes U.S. de Nos. 6.962.708 e 6.696.281 são limitadas, contudo, aos vírus quiméricos atenuados, às vacinas e aos métodos de uso relacionados. Não há ensinamento ou sugestão de uso de um vírus quimérico inativado, de uso de um vírus quimérico inativado em uma vacina, ou de uso de um vírus quimérico inativado em qualquer método relacionado. Em contraste a estas patentes, todas as modalidades da presente invenção são direcionadas para os vírus quiméricos inativados.

[0052] Vacina e composições imunogênicas de acordo com as várias modalidades da presente invenção podem ser preparadas e/ou comercializadas na forma de um líquido, uma suspensão congelada ou uma forma liofilizada. Tipicamente, vacinas e/ou composições imunogênicas preparadas de acordo com a presente invenção contêm um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável costumeiramente usados para tais composições. Veículos incluem, mas não são limitados a, estabilizadores, conservantes e tampões. Estabilizadores adequados são, por exemplo SPGA, composições Tween (tais como as disponíveis em A.G. Scientific, Inc., San Diego, CA), carboidratos (tais como sorbitol, manitol, amido, sacarose, dextrana, glutamato ou glicose), proteínas (tais como soro de leite em pó, albumina ou caseína) ou seus produtos de degradação. Exemplos não limitantes de tampões adequados incluem fosfatos de metal alcalino. Conservantes adequados são timerosal, mertiolato e gentamicina. Diluentes incluem água, tampão aquoso (tal como

solução salina tamponada), alcoóis e polióis (tal como glicerol).

[0053] Se desejado, as vacinas inativadas de acordo com a invenção podem conter um adjuvante. Compostos ou composições adequados para este propósito incluem HAVLOGEN® (um adjuvante baseado em polímero de ácido acrílico, Intervet Inc., Millsboro, DE), poli(ácidos acrílicos), hidróxido, fosfato e óxido de alumínio, emulsão de óleo-em-água ou de água-em-óleo baseada em, por exemplo um óleo mineral, tal como BAYOL™ ou MARCOL™ (Esso Imperial Oil Limited, Canadá), ou um óleo vegetal tal como acetato de vitamina E, e saponinas. Entretanto, componentes com atividade adjuvante são amplamente conhecidos e, geralmente, pode ser utilizado qualquer adjuvante que não interfira com a eficácia ou a segurança da vacina e/ou composição imunogênica.

[0054] Geralmente, a vacina pode ser administrada subcutânea, intradermal, submucosal, ou intramuscularmente em uma quantidade efetiva para prevenir infecção do flavivírus de interesse e/ou tratar uma infecção do flavivírus. Uma quantidade efetiva é definida como uma quantidade de material quimérico inativado imunizador que induzirá imunidade nos animais vacinados, contra desafio por um vírus virulento. Em várias outras modalidades, uma quantidade efetiva induzirá imunidade nos animais vacinados ou em sua progênie, contra desafio por um vírus virulento. Imunidade é aqui definida como a introdução de um nível mais alto significativo de proteção em uma população do animal após vacinação comparado com um grupo não vacinado.

[0055] Além disso, em várias formulações das composições imunogênicas e/ou vacinas inativadas da presente invenção, excipientes, estabilizadores e semelhantes adequados podem ser igualmente adicionados.

[0056] O vírus quimérico inativado pode ser formulado como uma solução aquosa estéril contendo entre 10^2 e 10^{12} de unidades infecciosas (como determinado antes da inativação). Em uma modalidade, o vírus

quimérico inativado pode ser formulado como uma solução aquosa estéril contendo entre 10^7 e 10^{10} unidades infecciosas (conforme determinado antes da inativação). Unidades infecciosas incluem unidades formadoras de placa (pfu) ou doses infecciosas de cultura de tecido (tcid). Alternativamente, o vírus quimérico inativado pode ser formulado como uma solução aquosa estéril contendo entre 1 e 10 unidades de dose de antígeno relativas. O vírus quimérico inativado formulado pode ser proporcionado em um volume de dose de 0,1 a 1,0 ml, a ser administrado, por exemplo, por rotas subcutânea, intramuscular, submucosal ou intradermal. Outras modalidades podem ser administradas por uma rota mucosal, tal como uma rota oral. Seleção de uma quantidade apropriada de quimera a administrar pode ser determinada por aquelas pessoas experientes na técnica, e esta quantidade pode variar devido a numerosos fatores, incluindo sem limitação o tamanho, o tipo, e a saúde geral do animal no qual a quimera é para ser administrada.

[0057] Para um entendimento maior da invenção, referência deve ser feita aos seguintes exemplos e reivindicações.

Exemplo 1

Planejamento experimental

Animais:

[0058] Seis (6) cavalos mestiços de um ano de idade, ambos machos e fêmeas, e soronegativos para o vírus do Nilo Ocidental (WNV) foram vacinados com uma vacina de combinação contendo os componentes virais inativados de vacina PRESTIGE® V+VEE (disponível na Intervet Inc, Millsboro, DE) e quimera inativada de Febre Amarela - Nilo Ocidental (YF-WN), todas combinadas com um adjuvante de poli(ácido acrílico). A vacina PRESTIGE® V+VEE contém vírus inativado da Encefalomielite Oriental, vírus inativado da Encefalomielite Ocidental, vírus inativado da Encefalomielite Venezuelana, vírus inativado do Herpes Eqüino de tipos 1 e 4 (Rinopneumonite), vírus inativado da Influenza (cepa Kentucky 1993, cepa

Kentucky 2002, e New Market-2-93), e frações de toxicóide do tétano.

[0059] A quimera atenuada viva YF-WN foi obtida de Acambis em Cambridge, MA, e inativada com etileno-imina binária (BEI). Inativação foi realizada primeiro por misturação do pó de etileno-amina binária (BEA) com uma solução de hidróxido de sódio. Sob misturação, a BEA se converte em BEI. Esta solução líquida de BEI é adicionada em uma solução de vírus quimérico vivo para dar uma concentração final de BEI de 2 mM. A solução de quimera / BEI foi incubada a cerca de 18-25ºC por cerca de 3 dias.

[0060] Outros seis (6) cavalos mestiços de um ano de idade, ambos machos e fêmeas, e soronegativos para o vírus do Nilo Ocidental (WNV) foram vacinados com uma vacina de combinação contendo os componentes virais inativados de vacina PRESTIGE® V+VEE (disponível na Intervet Inc, Millsboro, DE) e quimera Febre Amarela - Nilo Ocidental (YF-WN) inativada com formalina.

[0061] A quimera YF-WN viva atenuada foi obtida de Acambis em Cambridge, MA, e inativada com formalina (solução 37% de formaldeído). Inativação foi realizada por misturação de solução de formalina com uma solução de vírus quimérico vivo para dar uma concentração final de formalina de 0,1% v:v com respeito à solução de vírus quimérico vivo. A solução de quimera / formalina foi incubada a cerca de 18-25ºC por cerca de 3 dias.

[0062] Outros seis (6) cavados mestiços de um ano de idade, ambos machos e fêmeas, e soronegativos para o vírus do Nilo Ocidental (WNV) não foram vacinados mas usados como controle.

Vacinação:

[0063] Cavalos receberam 2 x dose de 1 mL de vacina, intramuscular, administradas 3-4 semanas à parte.

Vírus de desafio:

[0064] Vírus do Nilo Ocidental (WNV), 5 $\log_{10}$ PFU/dose de 1 mL, administrado por cavalo pela rota intratecal em 4 semanas após segunda

vacinação.

Resultados:

Vacina[b]	No. Cavalos/ grupo	Resultados após desafio com WNV:			
		≥39,2ºC	Sinais Clínicos	Viremia	Histo.
Vírus YF/WN inativado por BE	6	0/6	0/6	0/6	0/6
Vírus YF/WN inativado por formalina	6	0/6	0/6	0/6	1/6
Controles não vacinados	6	4/6	5/6	5/6	5/6

[0065] Os resultados sorológicos do Exemplo #1 seguem:

[0066] Títulos de anticorpo neutralizador de vírus (VN) para WNV em cavalos vacinados com duas doses de YF-WN inativado e uma dose de quimera YF-WN viva (de Acambis, Cambridge, MA)

	Títulos de VN (redução de placa de 50%) nos dias após a vacinação e os desafios					
	Pós-Vacinação			Pós-desafio (dias)		
Vacina[b]	PréVac	Pós 1º	Pós 2º	7	14	21
Vírus YF-WN inativado por BEI	Negativo	80	80	160	>1280	1280
	Negativo	40	40	80	640	640
	Negativo	5	20	80	>1280	>2560
	Negativo	5	5	5	1280	1280
	Negativo	5	80	160	10240	2560
	Negativo	5	5	320	5120	2560
Vírus YF-WN inativado por formalina	Negativo	160	160	640	>1280	1280
	Negativo	160	160	>1280	640	1280
	Negativo	160	160	320	>1280	1280
	Negativo	Neg	40	320	5120	2560
	Negativo	5	20	20	640	320
	Negativo	40	40	320	2560	2560
Vírus YF-WN vivo	Negativo	160	N/A	320	>1208	1280
	Negativo	160	N/A	80	>1280	640
	Negativo	160	N/A	80	>1280	320
	Negativo	40	N/A	1280	5120	2560
	Negativo	5	N/A	80	5120	2560
	Negativo	640	N/A	1280	20480	5120
Controle	Negativo	Negativo	Negativo	320	Morto	Morto
	Negativo	Negativo	Negativo	80	>1280	>2560
	Negativo	Negativo	Negativo	5	640	640
	Negativo	Negativo	Negativo	320	2560	1280
	Negativo	Negativo	Negativo	320	Morto	Morto
	Negativo	Negativo	Negativo	320	Morto	Morto

[a] Valores de título são diluição de número de vezes representando a diluição mais alta de soro na qual redução de placa de 50% é observada em relação ao controle. “Negativo” indica que não foi observada redução de placa; “80” representa uma diluição de 80 vezes, “160” representa uma diluição de 160 vezes, etc., “N/A” é indicado onde não foi administrada segunda vacinação; “Morto” refere-se aos cavalos.

[b] Quimera YF-WN inativada por BEI ou por formalina foi em combinação com vacina PRESTIGE® V + VEE.

Resultados:

[0067] Os resultados sorológicos do Exemplo #1 ilustram os resultados inesperados da vacina de quimera de Nilo Ocidental inativada da presente invenção. É sabido que vírus vivos, tal como quimera YF-WN atenuada viva de Acambis, produzem ambas repostas humorais (resposta de anticorpo) e respostas mediadas por célula. Contudo, é geralmente considerado que vírus inativados apenas produzem respostas humorais. Aqui, YF-WN inativado produz uma resposta humoral alta, como é evidenciado dos dados sorológicos. Conseqüentemente, e inesperadamente, YF-WN inativado desempenha tão bem quando YF-WN vivo na geração de uma resposta humoral. Em adição às vantagens descritas acima de uso de uma vacina inativada em vez de uma vacina viva, as vantagens das vacinas inativadas da presente invenção são inesperadas.

Exemplo 2

Planejamento experimental:

Animais: cavalos

[0068] Seis (6) cavalos mestiços de um ano de idade, ambos machos e fêmeas, e soronegativos para o vírus do Nilo Ocidental (WNV) foram vacinados com uma vacina de combinação contendo os componentes virais da vacina PRESTIGE® V+VEE (disponível na Intervet Inc, Millsboro, DE) e quimera inativada de Febre Amarela - Nilo Ocidental (YF-WN). A vacina também continha um adjuvante de poli(ácido acrílico). Vacina PRESTIGE® V+VEE contém vírus inativado da Encefalomielite Oriental, vírus inativado da Encefalomielite Ocidental, vírus inativado da Encefalomielite Venezuelana, vírus inativado do Herpes Eqüino de tipos 1 e 4 (Rinopneumonite), vírus inativado da Influenza (cepa Kentucky 1993, cepa Kentucky 2002, e New Market-2-93), e frações de toxicóide do tétano.

[0069] A quimera YF-WN atenuada viva foi obtida de Acambis em Cambridge, MA. O vírus quimérico foi inativado com BEI e adicionado na vacina PRESTIGE® V+VEE como descrito acima em Exemplo 1.

[0070] Outros seis (6) cavalos mestiços de um ano de idade, ambos machos e fêmeas, e soronegativos para o vírus do Nilo Ocidental (WNV) não foram vacinados mas usados como controle.

Vacinação

[0071] Cavalos receberam 2 x dose de 1 mL de vacina, intramuscular, administradas 3-4 semanas à parte.

Vírus de desafio

[0072] Cavalos foram desafiados pelo posicionamento de 8-17 mosquitos infectados com WNV sobre cada cavalo e permitindo que os mosquitos se alimentassem por 10-15 minutos.

Resultados:

Vacina	No. cavalos /grupo	Resultados de pós-desafio com WNV:			
		≥39,2°C	Sinais Clínicos	Viremia	Histo.
YF/WN inativado	6	0/6	0/6	0/6	0/6
Controles não vacinados	6	0/6	0/6	5/6	1/6

Exemplo 3

I. Visão geral experimental

[0073] O propósito deste experimento foi estabelecer a imunogenicidade do vírus quimérico inativado do Nilo Ocidental contido em uma vacina de combinação compreendendo os componentes antigênicos da vacina PRESTIGE® V+VEE (disponível na Intervet Inc, Millsboro, DE; i.e., vírus inativado da Encefalomielite Oriental, vírus inativado da Encefalomielite Ocidental, vírus inativado da Encefalomielite Venezuelana, vírus inativado do Herpes Eqüino de tipos 1 e 4 (Rinopneumonite), vírus inativado da Influenza (cepa Kentucky 1993, cepa Kentucky 2002, e New Market-2-93), e toxicóide do tétano, todos combinados com um adjuvante de poli(ácido acrílico).

[0074] Em particular, um propósito deste experimento foi para estabelecer a não-interferência das outras frações de vacina com o vírus do Nilo Ocidental inativado.

[0075] Vinte (20) cavalos machos e fêmeas foram vacinados duas vezes pela rota intramuscular (IM) três a quatro semanas à parte com uma dose de

1,0 mL de uma vacina de combinação compreendendo vírus inativado da Encefalomielite Oriental, vírus inativado da Encefalomielite Ocidental, vírus inativado da Encefalomielite Venezuelana, vírus inativado do Herpes Eqüino de tipos 1 e 4 (Rinopneumonite), vírus inativado da Influenza (cepa Kentucky 1993, cepa Kentucky 2002, e New Market-2-93), e toxicóide do tétano, todos combinados com um adjuvante de poli(ácido acrílico). Dez cavalos adicionais serviram como cavalos de controle não vacinados. 21 Dias após a 2ª vacinação, os cavalos vacinados e não-vacinados de controle foram desafiados pela rota intratecal com WNV virulento. Dois grupos separados de 10 cavalos vacinados e 5 cavalos de controle foram seqüencialmente vacinados e desafiados. Amostras de sangue para avaliação sorológica foram colhidas antes da vacinação, após a vacinação, e após o desafio e testadas para títulos de anticorpo neutralizador de vírus (VN) para WNV. Amostras de sangue foram colhidas após o desafio para isolamento de WNV. Títulos neurais foram colhidos no momento da necropsia para exame histológico.

[0076] Desafio dos cavalos com WNV virulento pela rota IT resultou em sinais de doença neurológica que são consistentes com aqueles observados em cavalos infectados sob condições naturais de campo. Após desafio, cavalos vacinados mostraram uma redução estatisticamente significativa em sinais clínicos de doença neurológica causada por WNV comparado com controles não vacinados e uma redução estatisticamente significativa de presença de vírus em fluidos corporais entre cavalos vacinados e cavalos de controle. Estes resultados estabeleceram a não-interferência das outras frações de vacina sobre a fração de Quimera de Flavivírus Morta. Dados adicionais estabeleceram a não-interferência da fração de Quimera de Flavivírus Morta sobre as outras frações de vacina.

II. Materiais e Métodos

A. Animais

[0077] Trinta (30) cavalos mestiços e de sexo misto e de seis a nove

meses de idade foram usados. Cavalos foram identificados por uma marca extremamente fria. Foram usados apenas cavalos com títulos de anticorpo neutralizador de vírus (VN) de < 5 para WNV conforme determinado por um teste de neutralização de redução de placa de 50%. Cavalos vacinados e de controle foram alojados juntos em instalações à prova de insetos e de roedores durante o período de vacinação e movidos para outra instalação para desafio com WNV virulento.

B. Vacinas

[0078] A vacina continha quimera YF/WN em combinação com vírus da Encefalomielite Oriental (EE), vírus da Encefalomielite Ocidental (WE), vírus da Encefalomielite Venezuelana (VE), vírus do herpes eqüino de tipo 1 (EHV-I), vírus do herpes eqüino de tipo 4 (EHV-4), cepa Kentucky 1993/A2 de vírus da influenza eqüina (EIV), cepa Kentucky 2002/A2 de EIV, e cepa New Market/2/93/A2 de EIV, e frações de toxóide de tétano. a vacina continha adjuvante de poli(ácido acrílico).

[0079] Duas vacinas foram usadas para demonstrar não-interferência. Uma vacina continha uma dose imunizadora de quimera inativada YF/WN e uma dose de liberação padrão dos vírus inativados restantes ou das frações de toxóide de tétano. A outra vacina continha uma dose de liberação padrão de quimera inativada YF/WN e uma dose imunizadora mínima dos vírus inativados restantes ou das frações de toxóide de tétano. Em cada caso, o(s) componente(s) presente(s) na dose de liberação padrão não interferiu com o(s) componente(s) presente(s) no nível de dose imunizadora mínima.

C. Vacinação

[0080] Os cavalos eram de 6 a 9 meses de idade no momento da primeira vacinação. Cavalos foram aleatoriamente separados em grupos pelo uso de um gerador de números aleatórios e aclimatizados por um mínimo de sete dias. Vinte cavalos foram vacinados IM no pescoço com duas doses de 1 mL da vacina três semanas à parte. Dez cavalos foram usados como controles

não vacinados. Dois grupos (cada um contendo 10 vacinados e 5 controles) foram seqüencialmente vacinados.

D. Teste cego

[0081] Pessoal do projeto que observaram os sinais clínicos e realizaram o teste de laboratório nas amostras clínicas não sabiam qual grupo os cavalos pertenciam.

F. Observações e retirada de amostras após a vacinação

[0082] Temperaturas corporais retais foram medidas e reações no sítio de injeção foram observadas nos dias 1 a 10 após a vacinação. Temperaturas corporais de $\geq$ 39,2ºC são consideradas uma temperatura elevada. Reações no sítio de injeção foram classificadas de acordo com um método de classificação. Quaisquer observações ou reações sistêmicas de saúde anormal foram registradas. Sangue para soro foi retirado nos dias 0, 7, e 21 dias após a vacinação e 21 dias após a segunda vacinação. Títulos de anticorpo neutralizador para WNV em amostras de soro foram determinados pelo uso de um teste de neutralização de redução de placa de 50%.

G. Desafio de cavalos com WNY virulento

[0083] 21 Dias após a segunda vacinação, cavalos foram desafiados por administração IT de 1 mL de cepa NY99 de WNY virulento. Resultados cinco titulações repetidas do material de desafio foram 5,0, 5,1, 5,1, 5,0, e 5,0 para uma média de 5,0 e 5,1, 5,1, 5,0, 5,0, e 5,1 para uma média de 5,1 $\log_{10}$ PFU/mL de dose, para grupos de desafio 1 e 2, respectivamente. Temperaturas corporais retais foram registradas nos dias 1 a 21 após o desafio. Desafio de cavalos de controle não vacinados com WNV pela rota IT resultou em sinais clínicos de doença que são observados em cavalos naturalmente infectados com WNV sob condições de campo. Cavalos foram observados durante período de pós-desafio de 21 dias para sinais clínicos de doença neurológica, nas seguintes categorias: mudanças em atividade mental, paresia, fasciculação, e ataxia / recúbito. Para cada categoria, sinais clínicos

foram classificados como 0 = nenhum, 1 = muito suave e poderia estar não notado, 2 = moderado e 3 = severo.

[0084] Sob confirmação de doença clínica severa, foram feitas tentativas para matar os animais dentro de 24 horas. Cavalos foram submetidos à eutanásia por razões humanitárias devidos aos sinais persistentes de doença do Nilo Ocidental, ou sinais agudos súbitos juntamente com recúbito e/ou incapacidade de locomoção sem auxílio como de acordo com Center for Veterinary Biologies Notice No. 04-09, datado de 1 de abril de 2004. Quaisquer outras observações de saúde anormais foram registradas. Amostras de sangue para sorologia foram retiradas no momento do desafio e em 7, 14, e 21 dias após o desafio. Amostras de sangue para isolamento de vírus foram retiradas dias 1 a 10 após o desafio. Sangue para sorologia, isolamento de vírus, e tecidos para histopatologia foi tirado no momento da necropsia. Lesões histopatológicas em tecidos neurais foram classificadas como 0 = nenhuma, 1 = muito suave / suave, 2 = moderada, e 3 = severa.

III. Resultados

A. Animais e vacinação

[0085] Temperaturas corporais de 39,2ºC foram registradas para um dia após a primeira vacinação para três cavalos vacinados e para dois dias para um animal de controle. Temperaturas corporais $\geq$ 39,2ºC não foram registradas para qualquer cavalo vacinado ou de controle após a segunda vacinação. Todos os cavalos estavam com saúde geral boa no início do estudo. Reações no sítio de vacinação foram avaliadas de acordo com um método de classificação (0 (sem reação) a 5 (reação sistêmica)). Após a primeira vacinação, reações suaves no sítio de injeção, de classificações de 2 ou menores, foram registradas em um ou dois dias para três cavalos. Outro cavalo vacinado teve uma reação suave que persistiu durante 10 dias após a primeira vacinação mas não causou qualquer dor ou resultou em relutância para movimento. Reações suaves no sítio de injeção, de classificações de 2 ou

menores, também foram observadas após a segunda vacinação que persistiu por 1 a 6 dias após a vacinação. Nenhuma das reações no sítio de injeção após a primeira ou a segunda vacinação foram observadas como dolorosas. Não foram observadas reações sistêmicas em qualquer um dos cavalos após a primeira ou segunda vacinação.

B. Sorologia após a vacinação e após o desafio com WNV

[0086] Dados sorológicos para cavalos vacinados e de controle são resumidos nas seguintes tabelas.

Grupo de vacinados: títulos de anticorpo neutralizador de redução de placa de 50% (PRNT50%) para WNV após 1ª e 2ª vacinações e após desafio.

	Títulos de PRNT50% para WNV nos dias após vacinação e desafio[a]:						
	Pós-Vacinação				**Pós-Desafio**		
Cavalo No.	**Dia 0**	**Dia 7**	**Dia 21[b]**	**Dia 42[c]**	**Dia 7**	**Dia 14**	**Dia 21**
201	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	≥1280	≥1280	≥1280
205	Neg.	Neg.	Neg.	40	640	≥1280	≥1280
209	Neg.	Neg.	Neg.	5	5	NS	NS
211	Neg.	Neg.	Neg.	5	80	≥1280	≥1280
212	Neg.	Neg.	Neg.	10	640	≥1280	≥1280
214	Neg.	Neg.	Neg.	20	640	≥1280	≥1280
217	Neg.	Neg.	Neg.	10	≥1280	≥1280	≥1280
218	Neg.	Neg.	Neg.	20	≥1280	≥1280	≥1280
220	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	20	≥1280	≥1280
223	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	320	≥1280	≥1280
227	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	640	≥1280	≥1280
229	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	20	≥1280	≥1280
230	Neg.	Neg.	Neg.	5	160	≥1280	≥1280
232	Neg.	Neg.	Neg.	20	10	≥1280	≥1280
233	Neg.	Neg.	20	20	20	≥1280	≥1280
234	Neg.	Neg.	Neg.	10	20	≥1280	≥1280
235	Neg.	Neg.	Neg.	5	80	≥1280	≥1280
238	Neg.	Neg.	Neg.	10	40	≥1280	≥1280
248	Neg.	Neg.	Neg.	160	160	≥1280	≥1280
254	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	320	≥1280	≥1280

[a] Valores de título são diluição de número de vezes representando a diluição mais alta de soro na qual redução de placa de 50% é observada em relação ao controle.
[b] = Dia 21 é o dia de 2ª vacinação, [c] = Dia 42 é 21 dias após a 2ª vacinação e dia de desafio
Neg. = Negativo, NS = Sem amostra, submetido à eutanásia

[0087] Grupo de controle: títulos de anticorpo neutralizador de redução de placa de 50% (PRNT50%) para WNV após 1ª e 2ª vacinações e após desafio.

Títulos de PRNT50% para WNV nos dias após vacinação e desafio[a]:		
	Pós-Vacinação	Pós-Desafio

Cavalo No.	Dia 0	Dia 7	Dia 21[b]	Day42[c]	Dia 7	Dia 14	Dia 21
202	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	≥1280	NS	NS
204	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	640	≥1280	≥1280
206	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	40	NS	NS
208	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	20	640	≥1280
216	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	20	≥1280	≥1280
219	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	≥1280	NS	NS
221	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	320	NS	NS
225	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	40	≥1280	≥1280
231	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	40	≥1280	≥1280
239	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	≥1280	≥1280	≥1280

[a] Valores de título são diluição de número de vezes representando a diluição mais alta de soro na qual redução de placa de 50% é observada em relação ao controle.
[b] = Dia 21 é o dia de 2ª vacinação, [c] = Dia 42 é 21 dias após a 2ª vacinação e dia de desafio
Neg. = Negativo, NS = Sem amostra, submetido à eutanásia

[0088] Todos os cavalos vacinados e de controle foram soronegativos para WNV no momento da vacinação e 7 dias após a primeira vacinação. A falta de uma resposta anamnésica para WNV em cavalos vacinados após a primeira vacinação indicou nenhuma exposição prévia ao WNV. Títulos de anticorpo neutralizador de vírus de redução de placa para WNV foram detectados em um cavalo vacinado após a primeira vacinação e foram detectados em 14 de 20 cavalos vacinados 21 dias após a segunda vacinação.

[0089] Todos os cavalos de controle não vacinados permaneceram soronegativos durante todo o período de primeira e segunda vacinações. Estes resultados demonstraram que os cavalos de controle não foram expostos ao WNV durante o período de vacinação, que estabelece a validade do estudo. Níveis altos de anticorpo neutralizador de vírus para WNV foram detectados em ambos os cavalos vacinados e de controle após desafio.

C. Temperaturas corporais retais e sinais neurológicos em cavalos após desafio com WNV virulento

[0090] Temperaturas corporais individuais de cavalos após desafio foram observadas. Seis dos 20 cavalos vacinados exibiram temperaturas corporais de ≥ 39,2ºC por um ou dois dias individuais após o desafio e três destes seis cavalos vacinados exibiram temperaturas corporais de ≥ 39,2ºC por dois ou mais dias consecutivos. Sete de 10 cavalos de controle não

vacinados exibiram temperaturas corporais $\geq$ 39,2°C em qualquer dia após desafio e todos os sete destes cavalos de controle exibiram temperaturas $\geq$ 39,2°C por dois ou mais dias consecutivos. Temperaturas após desafio foram comparadas por uma análise de variância de medidas repetidas usando um modelo que incluiu os efeitos de tratamento, dias, e a interação de tratamento e dias. Houve uma diferença significativa ($P<0,05$) em temperaturas corporais entre cavalos vacinados e cavalos e controle nos dias 8 a 10 após desafio. Quatro de 10 cavalos de controle foram submetidos à eutanásia no dia 10 após desafio devido à severidade dos sinais clínicos de doença.

[0091] Desafio de cavalos de controle não vacinados com WNV pela rota intratecal (IT) resultou em sinais clínicos de doença que estão consistentes com aqueles observados em cavalos naturalmente infectados com WNV sob condições de campo. Sinais clínicos que incluíram mudanças em atividade mental, paresia, fasciculação, e ataxia / recúbito também foram observados. Após desafio, 7 de 10 (70%) cavalos de controle não vacinados demonstraram sinais moderados a severos de doença neurológica de WNV por dois ou mais dias consecutivos ou demonstraram uma condição de saúde total severa devido à infecção de WNV de tal modo que eutanásia foi autorizada por razões humanitárias. Cavalos foram submetidos à eutanásia por rações humanitárias devido aos sinais persistentes de doença do Nilo Ocidental, ou sinais agudos súbitos juntamente com recúbito e/ou incapacidade para locomoção sem auxílio.

[0092] A definição de caso de infecção com WNV e resultado primário para demonstração de doença causada por WNV foi definida como cavalos possuindo sinais moderados ou severos de doença por dois ou mais dias consecutivos em qualquer uma das categorias de: mudanças em atividade mental, paresia, fasciculação, e ataxia / recúbito ou qualquer animal no qual eutanásia foi requerida devido à condição de saúde geral severa do animal como um resultado da infecção de WNV. Estes critérios tiveram que ser

satisfeitos com o objetivo de o resultado primário ser uma falha; caso contrário, o cavalo foi considerado um sucesso.

[0093] Apenas 5 de 20 (25%) dos cavalos vacinados demonstraram sinais moderados ou severos de doença neurológica de WNV por dois dias consecutivos após desafio ou foram submetidos à eutanásia comparados com 7 de 10 (70%) dos cavalos de controle. Análise para o resultado primário foi realizada em SAS com o Procedimento FREQ. Análise da proporção de cavalos atendendo à definição de caso mostrou que houve uma diferença significativa ($P<0,02$) entre os cavalos vacinados e de controle. A razão ímpar indicou que os cavalos vacinados foram 6 vezes mais propensos para serem protegidos contra sinais neurológicos de doença de WNV. Uma proporção estatisticamente maior ($P<0,95$) de cavalos de controle foi submetida à eutanásia devido aos sinais de doença de WNV em comparação com os cavalos de controle.

D. Isolamento de vírus do soro após desafio com WNV virulento

[0094] Resultados de WNV isolado de soro de cavalos após desafio também foram observados. WNV foi recuperado do soro de 6 de 20 cavalos vacinados e de 10 de 10 cavalos de controle nos dias 1 a 4 após desafio. Significativamente ($P<0,05$) mais controles foram mais virêmicos em comparação com os cavalos vacinados e os cavalos de controle foram significativamente ($P<0,01$) virêmicos mais dias em comparação com os cavalos vacinados.

E. Histopatologia de tecidos neurais em cavalos vacinados e cavalos de controle após desafio com WNV virulento

[0095] No momento de necropsia, tecido neural de ponte, medula, e hipotálamo / tálamo foram colhidos e analisados para histopatologia devido à encefalite viral. Em geral, houve histopatologia reduzida em cavalos vacinados em comparação com cavalos de controle mas não houve uma diferença estatisticamente significativa.

IV. Conclusão

[0096] Desafios de cavalos com WNV virulento pela rota IT resultou em sinais de doença neurológica que estão consistentes com aqueles observados em cavalos infectados sob condições naturais de campo e estão consistentes com doença neurológica observada em estudos com uma vacina monovalente para WNV. Após desafio, cavalos vacinados mostraram uma redução estatisticamente significativa em sinais clínicos de doença neurológica causada por WNV em comparação com cavalos de controle não vacinados e uma redução estatisticamente significativa de presença de vírus em fluidos corporais entre cavalos vacinados e cavalos de controle. Estes resultados atendem aos critérios para demonstração satisfatória da imunogenicidade de fração de Quimera de Flavivírus Morta, Vírus do Nilo Ocidental contida em uma vacina compreendendo os componentes de PRESTIGE® V+VEE vacina (disponível na Intervet Inc, Millsboro, DE; i.e., vírus da Encefalomielite Oriental (EE), vírus da encefalomielite ocidental (WE), vírus de encefalomielite venezuelana (VE), vírus do herpes eqüino de tipo 1 (EHV-I), vírus do herpes eqüino de tipo 4 (EHV-4), cepa Kentucky 1993/A2 de vírus da influenza eqüina (EIV), cepa Kentucky 2002/A2 de EIV, e cepa New Market/2/93/A2 de EIV, e frações de toxóide de tétano. Estes resultados estabeleceram a não-interferência de outras frações de vacina sobre a fração de Quimera de Flavivírus Morta.

[0097] Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades específicas e seus exemplos, será entendido que ela é capaz de outras modificações e as reivindicações apendidas são intencionadas para cobrirem quaisquer variações, usos, ou adaptações da invenção seguindo, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais desvios da presente descrição como provenientes dentro do conhecimento ou da prática costumeiros dentro da técnica à qual a invenção pertence e como pode ser aplicado às características essenciais descritas aqui acima sejam quer agora existentes

quer posteriormente ocorrentes. Além disso, embora as modalidades da invenção tenham sido descritas com características dimensionais e/ou medições e/ou componentes específicos, será entendido que as modalidades são capazes de características dimensionais e/ou medições e/ou componentes diferentes sem se desviarem dos princípios da invenção e as reivindicações apendidas são intencionadas para cobrirem tais diferenças. Ainda mais, todas as patentes, publicações impressas, e semelhantes aqui mencionadas são por meio desta aqui incorporadas como referências.

REIVINDICAÇÕES

1. Flavivírus quimérico inativado, caracterizado pelo fato de compreender um vírus da Febre Amarela no qual as seqüências de nucleotídeos codificadoras das proteínas de pré-membrana e de envelope são substituídas por seqüências de nucleotídeos codificadoras de proteínas de pré-membrana e de envelope de um vírus do Nilo Ocidental.

2. Flavivírus quimérico inativado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o vírus da febre amarela é derivado da cepa 17D.

3. Flavivírus quimérico inativado de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o vírus quimérico compreende uma seqüência de sinal na terminação de aminoácido da proteína de pré-membrana, e a seqüência de sinal é aquela do vírus da febre amarela.

4. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de compreender o vírus quimérico inativado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Vacina, caracterizada pelo fato de compreender o vírus quimérico inativado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

6. Vacina de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o vírus quimérico inativado está presente em uma concentração variando entre 10^2 e 10^8 unidades formadoras de placa (pfu).

7. Vacina de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizada pelo fato de ser para o uso na prevenção ou tratamento de uma infecção pelo vírus do Nilo Ocidental em um animal, em que o flavivírus quimérico inativado é administrado por uma via subcutânea, intramuscular, submucosa, mucosa ou intradérmica.

8. Vacina de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um ou mais de vírus inativado de encefalomielite oriental, vírus inativado de encefalomielite ocidental, vírus

inativado de encefalomielite venezuelana, vírus do herpes eqüino inativado de tipo 1, vírus do herpes eqüino inativado de tipo 4, cepa KY93/A2 do vírus da influenza eqüina inativo, cepa KY02/A2 do vírus da influenza eqüina inativo, cepa NM/2/93/A2 do vírus da influenza eqüina inativo e uma fração de toxóide de tétano.