

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.01.19	(73) Titular(es): MERIAL LIMITED 3239 SATELLITE BLVD BLDG.500 DULUTH GA 30096-4640 US
(30) Prioridade(s): 2004.01.21 US 537849 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.12.27	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.09.28 242/2011	(72) Inventor(es): HERVÉ POULET FR DENIS BARRAL FR
	(74) Mandatário: ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINAS MELHORADAS DE FCV INATIVADO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A VACINAS MELHORADAS DE CALICIVÍRUS FELINO (FCV) INATIVADO. A INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA UM PROCESSO PARA PRODUZIR FCV INATIVADO ESTABILIZADO E A UTILIZAÇÃO DESSE FCV INATIVADO ESTABILIZADO, NA PRODUÇÃO DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DE FCV. A INVENÇÃO PROPORCIONA AINDA MÉTODOS DE INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNITÁRIA NUM ANIMAL DA FAMÍLIA FELIDAE, DE UM MODO PREFERIDO, UM GATO, UTILIZANDO AS COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS DE ACORDO COM A INVENÇÃO.

RESUMO

"VACINAS MELHORADAS DE FCV INATIVADO"

A presente invenção refere-se a vacinas melhoradas de calicivírus felino (FCV) inativado. A invenção também proporciona um processo para produzir FCV inativado estabilizado e a utilização desse FCV inativado estabilizado, na produção de composições imunogénicas de FCV. A invenção proporciona ainda métodos de indução de resposta imunitária num animal da família Felidae, de um modo preferido, um gato, utilizando as composições imunogénicas de acordo com a invenção.

DESCRIÇÃO

"VACINAS MELHORADAS DE FCV INACTIVADO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições imunogénicas de calicivírus felino (FCV) inactivadas melhoradas e estabilizadas. A invenção também proporciona um processo para produzir FCV inactivado e estabilizado, e a utilização desse FCV inactivado e estabilizado na produção de composições imunogénicas de FCV. A invenção proporciona ainda as composições imunogénicas de acordo com a invenção para utilização nos métodos de indução de respostas imunitárias em animais da família Felidae, de um modo preferido um gato.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O calicivírus felino (FCV) foi primeiro descrito em 1957 (Fastier, L.B. (1957) *Am. J. Vet. Res.* 18: 382-389). O FCV afecta um grande número de animais da família Felidae, sendo o FCV transportado por até 15 a 20% dos gatos domésticos clinicamente saudáveis (Coutts *et al* (1994) *Vet. Rec.* 135: 555-556; Ellis, T.M. (1981) *Australian Vet. J.* 57: 115-118; Harbour *et al.* (1991) *Vet. Rec.* 128: 77-80; Reubel *et al*, (1992) *Feline Dentistry* 22: 1347-1360). O calicivírus ocorre frequentemente com outra infecção das vias respiratórias superiores, tais como o vírus herpes felino (FHV), vírus da

rinotraqueíte ou clamidiose em gatos domésticos e felídeos selvagens. O FCV é transmitido horizontalmente e não há evidência de transmissão vertical da mãe para o seu gatinho durante a gestação (Johnson, R.P. (1984) *Res. Vet. Sci.* 31: 114-119). A transmissão de FCV ocorre principalmente através do contacto entre animais infectados e animais saudáveis ou através das vias respiratórias durante os espirros (Wardley R C. (1976) *Arch. Virol* 52: 243-249). O FCV é bastante resistente a vários agentes desinfectantes e, por isso, também pode ser disseminado na ausência de contacto directo.

O FCV é geralmente conhecido por provocar uma doença caracterizada por conjuntivite, rinite, traqueíte, pneumonia e por vesicularização/ulceração do epitélio da cavidade oral. Outros sintomas incluem febre, anorexia, letargia, andar rígido e por vezes descarga nasal e ocular. O FCV afecta normalmente a garganta, e por vezes os pulmões; pode também infectar os intestinos e foi isolado a partir das fezes. Após uma fase inicial de hipertermia, estas doenças respiratórias são geralmente seguidas por ulcerações bucais (palato, língua, lábios e nariz), rinite, conjuntivite e, possivelmente, anorexia e astenia. O FCV também pode provocar pneumonia, enterite e dor articular (síndrome de claudicação). A morbidez pode ser elevada e a recuperação é seguida por um estado de transportador prolongado. O tipo de sintomas da doença provocados pelo FCV depende da estirpe de FCV; algumas estirpes produzirão pouca ou nenhuma doença, enquanto outras estirpes mais virulentas provocam pirexia, anorexia, depressão ou pneumonia. Uma estirpe particular pode provocar úlceras nas patas, assim como na boca.

O calicivírus felino da família dos Caliciviridae é um vírus sem envelope, compreendendo um genoma de ARN de cadeia simples

de sentido positivo, que é poliadenilado e é de cerca de 7,7 quilobases de tamanho (Radford *et al.* (1997) *Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV* 93-99). A cápside de FCV é compreendida por uma proteína da cápside principal única da 66 kDa (quilodalton), a proteína p66. A biologia molecular dos calicivírus foi revista por Clarke e Lambden (1997) *J. Gen. Virol.* 8: 291-301. Como muitos vírus de ARN, existe uma grande heterogeneidade dentro da população viral de FCV. As variações antigénicas, demonstradas desde os inícios dos anos 70 através de experiências cruzadas de neutralização de soro, tornam possível classificar os FCV em várias estirpes de vírus ou quasi-espécies (Radford *et al.* (1997) *Proc. 1st Int. Symp. Caliciviruses ESVV* 93-99). Foram identificadas e isoladas várias estirpes de FCV, em particular a estirpe F9 (depositada na American Type Culture Collection ou ATCC com o n° de acesso VR-782), estirpe 2280 (ATCC VR-2057), estirpe KCD (ATCC VR-651), estirpe CFI (ATCC VR-654), estirpe FCV-LLK e estirpe FCV-M8.

Devido ao longo estado de transportador após a recuperação de uma infecção com FCV, assim como, resistência do FCV a agentes de desinfecção, o FCV é altamente contagioso e facilmente disseminado, particularmente, entre grupos de animais em proximidade, por exemplo, em abrigos de animais ou em clínicas veterinárias. Por isso, tem existido e permanece uma forte necessidade na técnica para vacinas eficazes para FCV.

A vacinação contra FCV foi introduzida no final dos anos 70, utilizando estirpes de FCV atenuadas, principalmente a estirpe F9 isolada nos EUA em 1958 por Bittle (Bittle *et al.* (1960) *Am. J. Vet. Res.* 21: 547-550) ou estirpes derivadas de F9 através da passagem *in vitro* ou *in vivo* ("tipo F9").

Estão também disponíveis vacinas que são baseadas em estirpes inactivadas de FCV. Estas vacinas utilizam, principalmente, as estirpes 255 e 2280, que foram isoladas nos EUA em 1970 num gato com pneumonia (Kahn e Gillepsie, (1970) *Cornell Vet.* 60: 669-683; Povey *et al.* (1980) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177: 347-350) e em 1983 num gato que sofre de claudicação, respectivamente (Pedersen *et al.* (1983) *Fel. Prac.* 13: 26-35; Pedersen N.C. e Hawkins K.F. (1995) *Vet Microbiol.* 47: 141-156).

Devido ao desvio antigénico ao longo do tempo, os anti-soros produzidos contra estirpes de vacina isolados nos anos 60 e 70, tais como estirpes F9, 255 ou 2280, neutralizam apenas alguns isolados das estirpes isoladas nos anos 90. Por exemplo, o soro anti-F9 neutraliza 43% dos isolados americanos do período 1990-1996, em contraste com a sua capacidade para neutralizar 56% dos isolados do período 1980-89 e 86% do isolado do período 1958-79 e apenas 10% dos isolados Ingleses do período 1990-96 (Lauritzen *et al.* (1997) *Vet. Microbiol.* 56: 55-63). Consequentemente, as vacinas atenuadas e inactivadas estirpes de FCV no presente já não oferecem protecção suficiente contra estirpes de FCV recentemente isoladas.

A Patente US Nº 6534066 descreve a utilização de novas estirpes de FCV para a produção de vacinas de FCV. Entre estas estirpes, a estirpe 431 de FCV (depositada no CNMC sob o número de acesso I-2166) é um isolado do anti-soro para o qual foi apresentado para neutralizar um número grande de isolados de campo heterólogos. Isto está em contraste com as estirpes de vacina históricas, tais como F9 e FCV-225, cujos anti-soros neutralizam números muito limitados de recentes isolados de campo de FCV.

A maioria das vacinas de FCV comerciais são vacinas atenuadas. Estão disponíveis apenas algumas vacinas inactivadas, todas elas contendo um adjuvante. Povey e colaboradores (Povey *et al.* (1978) *Feline Practice* 8(3): 35-42) descrevem uma preparação de formalina inactivada e FCV adjuvantada utilizada em gatinhos.

Quando uma vacina é inactivada, a inactivação é normalmente realizada por tratamento químico com agentes, tais como formalina ou formaldeído, β -propiolactona, etilenoimina, etilenoimina binária na presença ou ausência de tratamento com calor. Na Patente U.S. Nº 6534066, por exemplo, o FCV é inactivado pela etilenoimina e adjuvantado com uma emulsão de óleo em água. A Patente U.S. Nº 6355246 descreve vacinas de FCV atenuadas isoladas a partir de urina de felino. A inactivação de FCV pode ser alcançada por tratamento com formaldeído ou etilenoimina binário (BEI). Particularmente, a Patente U.S. Nº 6355246 não dirige o especialista na técnica, nem lhe proporciona métodos para inactivar FCV.

As vacinas inactivadas até agora utilizadas contra FCV requerem ou preferem adjuvantes na vacina ou composição imunogénica para melhorar a resposta imunitária e para induzir melhor a protecção contra estirpes de FCV heterólogas que emergem da população de gatos. Todavia, as vacinas adjuvantadas induzem uma taxa mais elevada de reacções adversas locais do que as não adjuvantadas (Gobar *et al.*, (2002) *JAVMA* 220(10): 1477-1482) e desse modo aumenta o risco de fibrossarcomas associados a vacina no sítio de injeção (Baker R.J. (1998) *Feline Practice* 26(5): 18-20).

Presentemente, as vacinas de FCV não adjuvantadas são vacinas vivas modificadas, contendo normalmente, a estirpe F9. A virulência residual de FCV F9 foi demonstrada através de vários estudos em calicivirose pós vacina (Dawson *et al.*, (1993) *Vet. Rec.* 132: 346-350). Embora exista apenas um serotipo de FCV, tem sido observada variação antigénica elevada entre isolados de FCV e são identificados regularmente isolados no campo (Lauritzen, *et al.* (1997) *Vet. Microbiol.* 56: 55-63). Esta variação antigénica elevada conduz frequentemente a taxas de falência aumentadas de neutralização de FCV através de anti-soros baseados numa vacina de F9. Além disso, as estirpes vivas de FCV modificado estão implicadas na emergência de novas variantes antigénicas no campo (Radford *et al.*, (1997) *Vaccine* 15(12/13): 1451-1458). A segurança destas vacinas vivas modificadas é por isso questionável.

Consequentemente, permanece uma necessidade na técnica para vacinas de FCV ou composições imunogénicas eficazes, inactivadas não adjuvantadas com segurança melhorada e que são capazes de induzir uma resposta imunitária forte contra estirpes de FCV heterólogas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

As vacinas de FCV ou composições imunogénicas inactivadas anteriores compreendem normalmente uma mistura de viriões e fracções de proteína de FCV que resultam da degradação da cápside viral. A presente requerente descobriu que para uma vacina não adjuvantada ou composição imunogénica, é essencial limitar a degradação da cápside viral e reter intactos os viriões tanto quanto possível.

Tem sido, surpreendentemente, verificado que submeter FCV a tratamento através de um agente de inactivação que inactiva o vírus e a tratamento com formaldeído que pode estabilizar o virião permite que se obtenha uma composição de FCV inactivados possuindo boa eficácia, mesmo na ausência de qualquer adjuvante. Sem desejar estar ligado a qualquer teoria em particular, crê-se que a presença de formaldeído estabiliza as cápsides virais. A estabilidade aumentada da cápside viral resulta num aumento da estabilidade da vacina ou composição imunogénica de FCV durante armazenamento a longo prazo e antes da administração ao animal. Podem ser utilizados outros compostos químicos que actuam de modo semelhante para estabilizar a cápside viral, em vez de formaldeído.

Um primeiro aspecto da presente invenção proporciona uma composição imunogénica inactivada estabilizada, não adjuvantada contra calicivírus felino (FCV), compreendendo um FCV inactivado por um ou mais agentes inactivadores e estabilizado por um composto de aldeído, em que o composto de aldeído compreende uma cadeia de alquilo C₁-C₅ linear e, em que a composição imunogénica é uma mistura com um veículo ou excipiente aceitável e, em que os agentes inactivadores são seleccionados do grupo que consiste em etilenoimina, acetiletilenoimina, propilenoimina e β -propiolactona.

De um modo preferido, o excipiente ou veículo é aceite de um ponto de vista veterinário. Noutra forma de realização, a composição imunogénica é liofilizada e está misturada com um excipiente ou veículo liofilizado.

De um modo preferido, o agente de inactivação é etilenoimina.

Quando é utilizada etilenoimina como o agente inactivador, a etilenoimina está presente de cerca de 0,5 mM a cerca de 20 mM, de um modo preferido, de cerca de 1 mM a cerca de 10 mM.

Quando o composto de aldeído compreende uma cadeia alquilo C_1 linear, o composto de aldeído compreende um grupo aldeído. Quando o composto de aldeído compreende uma cadeia de alquilo C_2 - C_5 linear, o composto de aldeído compreende dois grupos aldeído. Numa forma de realização alternativa, um dos dois grupos aldeído podem ser substituídos por um grupo cetona ou epóxi. O composto de aldeído pode ser seleccionado do grupo consistindo em formaldeído, glicidaldeído, glutaraldeído, glioxal ou metilglioxal. Quando o composto de aldeído é formaldeído, o formaldeído está presente de cerca de 0,05 g/L a cerca de 0,8 g/L. De um modo preferido, o formaldeído está presente de cerca de 0,1 g/L a cerca de 0,5 g/L.

Outra forma de realização compreende ainda, um composto de neutralização compreendendo grupos tiol (e. g., tiosulfato e cisteína). A presente descrição também compreende, pelo menos, uma estirpe de FCV, em que, pelo menos, uma ou todas as estirpes de FCV são inactivadas e estabilizadas. A estirpe de FCV pode ser seleccionada do grupo consistindo em FCV F9, FCV 255, FCV 2280, FCV 431, FCV G1, FCV LLK, FCV KCD, FCV CFI, FCV M8 e FCV US 100869 (ATCC N° de Acesso FCV PTA 5930).

Noutra forma de realização, as composições imunogénicas da invenção compreendem ainda, pelo menos, um imunogénio não FCV de um patogénio de felino, que pode ser seleccionado do grupo

consistindo em herpesvírus felino (FHV), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da panleucopenia felina (FPV), vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da raiva e Clamídia. De um modo preferido, pelo menos, um imunogénio não FCV de um patogénio felino compreende um microrganismo vivo atenuado ou um vector recombinante que expressa, pelo menos, um imunogénio não FCV de um patogénio felino.

Um segundo aspecto de uma invenção proporciona um processo para inactivar e estabilizar FCV, compreendendo os passos de reagir o FCV com um agente inactivador e um composto de aldeído, em que o composto de aldeído compreende uma cadeia alquilo C_1-C_5 linear e, em que os agentes inactivadores são seleccionados do grupo consistindo em etilenoimina, acetiletilenoimina, propilenoimina, e β -propiolactona e recuperando o FCV inactivado e estabilizado. Uma forma de realização preferida recupera o FCV inactivado e estabilizado através de cromatografia de exclusão por tamanho, ultracentrifugação e precipitação selectiva.

Noutro aspecto da presente invenção, é proporcionado um processo para produzir uma composição imunogénica inactivada, estabilizada, não adjuvantada, contra FCV para armazenamento a longo prazo, compreendendo misturar o FCV inactivado e estabilizado da invenção numa quantidade suficiente para induzir uma resposta imunitária a FCV com um excipiente de liofilização, e congelando a composição.

Ainda outro aspecto proporciona um processo para produzir uma composição imunogénica inactivada, estabilizada, não adjuvantada contra FCV, compreendendo misturar o FCV inactivado e estabilizado da descrição numa quantidade suficiente para

induzir uma resposta imunitária para FCV com um excipiente ou veículo veterinariamente aceitável.

São também proporcionadas na presente divulgação composições imunogénicas inactivadas, estabilizadas, não adjuvantadas da invenção, para utilização na indução de uma resposta imunitária num Felidae contra FCV.

Outro aspecto proporciona a composição imunogénica inactivada, estabilizada, não adjuvantada da invenção e, pelo menos, um imunogénio não FCV de outro patogénio felino, para utilização na indução de uma resposta imunitária num Felidae contra FCV e, pelo menos, um imunogénio não FCV de um patogénio felino.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A seguinte Descrição Detalhada, dada a título de exemplo, e não pretendendo limitar a invenção às formas de realização específicas descritas, pode ser entendida em conjunção com as Figuras anexas, nas quais:

A Figura 1 é um gráfico que apresenta a média da classificação clínica total durante as duas semanas pós-desafio por tipo de composição administrada (de acordo com o Exemplo 3).

A Figura 2 é um gráfico que apresenta a média da classificação clínica máxima para uma observação num gato durante as duas semanas pós-desafio por tipo de composição administrada (de acordo com o Exemplo 3).

A Figura 3 é um gráfico apresentando a média dos títulos de anticorpo neutralizador anti-FCV255 (expresso como $\log_{10}$) por grupo e dia (de acordo com o Exemplo 4).

A Figura 4 é um gráfico que apresenta as classificações globais por grupo (de acordo com o Exemplo 4).

A Figura 5 é um gráfico que apresenta a média da excreção de FCV após desafio por grupo e dia, expressa como $\log_{10}$ CCDE)₅₀/mL (de acordo com o Exemplo 4).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

É referido que nesta divulgação e particularmente nas reivindicações, termos tais como “compreende”, “compreendido”, “compreendendo” e semelhantes podem possuir o significado que lhe é atribuído na lei de Patentes dos U.S.; e. g., eles podem significar “inclui”, “incluído”, “incluindo”, e semelhantes; e termos tais como “consistindo essencialmente em” e “consiste essencialmente em” possuem o significado que lhes é atribuído na lei de Patentes dos U.S., e. g., eles permitem elementos não explicitamente apresentados, mas excluem elementos que são encontrados na técnica anterior ou que afectam uma característica básica ou nova da invenção.

O termo “composição imunogénica” cobre qualquer composição capaz, uma vez administrada à espécie alvo nas condições da invenção, de induzir uma resposta imunitária dirigida contra o FCV. O termo “vacina” pretende significar uma composição capaz de induzir protecção eficaz. As espécies alvo são os Felidae, de um modo preferido, gatos.

A presente invenção refere-se a uma composição imunogénica ou vacina de FCV inactivada, estabilizada, não adjuvantada compreendendo o FCV que foi submetido a um agente inactivador e a um composto de aldeído estabilizador. Um grupo preferido de compostos estabilizadores são os aldeídos que possuem uma cadeia alquilo C_1 - C_5 linear compreendendo um grupo aldeído quando a cadeia é C_1 e dois grupos aldeído terminais quando a cadeia é C_2 - C_5 e, opcionalmente, um grupo aldeído pode ser substituído por uma cetona ou um grupo epóxi quando a cadeia é a cadeia C_2 - C_5 e a composição imunogénica ou vacina é liofilizada numa mistura com um excipiente ou veículo de liofilização ou em mistura com um excipiente ou veículo aceitável em termos veterinários.

Um "agente inactivador" é um agente capaz de bloquear a multiplicação de um vírus através de uma reacção irreversível, principalmente, mas não limitado a, reacções com ácidos nucleicos virais, que não afectam substancialmente a propriedade imunogénica do vírus. Os agentes inactivadores da invenção são etilenoimina, acetiletilenoimina, propilenoimina e β -propiolactona. Numa forma de realização preferida, o agente inactivador é etilenoimina.

Numa forma de realização preferida, o FCV é inactivado com etilenoimina. A concentração final de etilenoimina pode ser desde cerca de 0,5 mM a cerca de 20 mM e, de um modo preferido, desde cerca de 1 mM a cerca de 10 mM. A temperatura pode ser desde cerca de 2 °C a cerca de 40 °C e, de um modo preferido, desde cerca de 5 °C a cerca de 30 °C.

Os compostos de aldeído estabilizadores podem reagir com grupos amino (e. g., grupos amino nos aminoácidos lisina,

arginina ou histidina) e grupos hidroxilo de proteína(s) (e. g., grupos hidroxilo em aminoácidos tirosina) e podem formar ligações entre duas proteínas e/ou numa proteína. O composto de aldeído estabilizador é, de um modo preferido, seleccionado do grupo consistindo em formaldeído (ou metanal), glicidaldeído (ou 2,3-epoxi-1-propanal), glutaraldeído (ou 1,5- dial-pentano), glioxal (ou 1,2-dial-etano), metilglioxal (ou piruvaldeído). Numa forma de realização preferida, o composto de aldeído estabilizador é formaldeído.

Quando o formaldeído é utilizado como o aldeído estabilizador, a concentração final pode ser de cerca de 0,05 g/L a cerca de 0,8 g/L, de um modo preferido, de cerca de 0,075 g/L a cerca de 0,6 g/L e, de um modo mais preferido de cerca de 0,1 g/L a cerca de 0,5 g/L. A temperatura pode ser de cerca de 2 °C a cerca de 37 °C, de um modo preferido de cerca de 2 °C a cerca de 22 °C e, de um modo mais preferido, de cerca de 4 °C a cerca de 7 °C.

Para ajustar as condições de estabilização (temperatura, concentração do composto de aldeído estabilizador e duração), pode ser realizada a quantificação dos viriões FCV. Pode ser utilizada qualquer técnica apropriada para quantificar viriões, por exemplo, um ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) utilizando um anticorpo monoclonal ou policlonal específico para a proteína da cápside de FCV. Antes da quantificação por ELISA, os viriões podem ser separados a partir da cultura de vírus tratados com técnicas conhecidas do especialista na técnica, por exemplo, cromatografia por exclusão de tamanho, ultracentrifugação em gradiente de sacarose, ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio e precipitação selectiva, por exemplo, precipitação com polietilenoglicol (PEG).

A suspensão de FCV utilizada para a composição imunogénica ou vacina contém, de um modo preferido, de cerca de $10^{8,5}$ a cerca de 10^{11} CCID₅₀ por dose antes da inactivação, de um modo mais preferido, de cerca de 10^9 a cerca de 10^{10} CCID₅₀ por dose antes da inactivação. Após finalização da inactivação e/ou estabilização, o agente inactivador e/ou o composto de aldeído estabilizador pode ser removido da suspensão através de métodos de neutralização conhecidos por um especialista na técnica, por exemplo, adicionado compostos neutralizadores compreendendo grupos tiol (e. g., tiosulfato, cisteína).

A eliminação do agente inactivador e/ou do composto de aldeído de estabilização, ou alternativamente, recuperar o FCV inactivado e estabilizado a partir da suspensão pode ser realizada através de técnicas conhecidas do especialista na técnica, por exemplo, cromatografia por exclusão de tamanho, ultracentrifugação num gradiente de sacarose, ultracentrifugação num gradiente de cloreto de cézio, precipitação selectiva, por exemplo, precipitação com polietilenoglicol (PEG).

A recuperação dos viriões a partir da suspensão, após inactivação e estabilização do vírus, pode ser atingida concomitantemente no passo do processo que elimina o agente inactivador e/ou o aldeído de estabilização. Numa forma de realização alternativa, recuperar os viriões inactivados e estabilizados pode ser alcançado num passo discreto que não é concomitante com o passo que elimina o agente inactivador e/ou o composto de aldeído. Este passo de recuperação do virião pode ser alcançado através de técnicas conhecidas de um especialista na técnica, por exemplo, cromatografia por exclusão de tamanho, ultracentrifugação num gradiente de sacarose, ultracentrifugação

num gradiente de cloreto de cézio e precipitação selectiva, por exemplo, precipitação com polietilenoglicol (PEG).

As composições imunogénicas e vacinas de acordo com a descrição podem compreender uma combinação de, pelo menos, duas estirpes de FCV que são inactivadas e estabilizadas, ou uma combinação de, pelo menos, duas estirpes de FCV em que, pelo menos, uma das estirpes de FCV está inactivada e estabilizada.

De um modo preferido, a(s) estirpe(s) de FCV é/são seleccionadas a partir daqueles que foram isoladas recentemente no campo. Estirpes preferidas incluem as estirpes 431 (depositadas em CNCM com o número de acesso I-2166; ou qualquer estirpe que reage com o anticorpo monoclonal 44 secretado pelo hibridoma depositado em CNCM com o número de acesso 1-2282; ver Patente U.S. N° 6534066), FCV G1 (depositado em CNCM com o número de acesso I-2167) (CNCM = "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes", Instituto Pasteur, Paris, França), FCV US 100869 (também conhecido como FCV PTA 5930; depositado na ATCC em 22 de Abril de 2004) (ATCC = "American Type Culture Collection", Manassas, Virginia, EUA) e, mais geralmente, qualquer uma das novas estirpes altamente virulentas descritas nas publicações (Pedersen *et al.* (2000) *Vet Microbiol.* 73 : 281-300; Schorr-Evans *et al.* (2003) *JFMS* 5 : 217-226; Hurley *et al.* (2003) *Vet Clin. Small Anim.* 33: 759-772). Numa forma de realização preferida, a composição imunogénica ou vacina compreende FCV inactivado e estabilizado 431 (ou qualquer estirpe que reage com o anticorpo monoclonal 44) e FCV inactivado e estabilizado G1. Noutra forma de realização preferida, a composição imunogénica ou vacina compreende o FCV inactivado e estabilizado US 100869 (ATCC N° acesso FCV PTA 5930). Outras estirpes de FCV que podem ser utilizadas na

presente descrição ou adicionalmente a esta incluem, mas não estão limitadas a, FCV F9, FCV 255, FCV 2280, FCV LLK FCV KCD, FCV CFI e FCV M8.

A composição imunogénica ou vacina de FCV inactivado e estabilizado pode ser facilmente combinada com vacina(s) ou composições imunogénicas vivas atenuadas ou inactivadas que é/são utilizadas para outra(s) doença(s) de felinos. Por isso, outro objectivo da descrição é uma composição imunogénica ou vacina em combinação não adjuvantada compreendendo, pelo menos, um FCV estabilizado e inactivado e, pelo menos, um componente imunogénico não FCV para induzir no hospedeiro uma resposta imunitária contra, pelo menos, um outro patogénio felino, em que o referido componente imunogénico não FCV pode ser um imunogénio de outro patogénio felino ou um vector recombinante que expressa este imunogénio, em que a composição imunogénica ou vacina combinada não adjuvantada está liofilizada numa mistura com um excipiente ou veículo de liofilização ou em mistura com um veículo ou excipiente aceitável em termos veterinários. A forma liofilizada é preferida.

Numa forma de realização preferida, a composição imunogénica ou vacina combinada não adjuvantada compreende o componente imunogénico não FCV na forma de um microrganismo atenuado vivo ou de um vector recombinante que expressa, pelo menos, um imunogénio do patogénio felino. O vector recombinante pode ser um plasmídeo ou um vector viral; por exemplo, o vector pode ser um poxvírus, um adenovírus ou um herpesvírus. A forma liofilizada é preferida.

Os patogénios de felino não FCV adicionais são, de um modo preferido, seleccionados do grupo compreendendo o vírus da

rinotraqueíte felina ou herpesvírus felino (FHV), o vírus da leucemia felina (FeLV), o vírus da panleucopenia felina ou o parvovírus felino (FPV), o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da raiva e Clamídia (e. g., *Chlamydophila felis*).

A composição imunogénica ou vacina combinada, no que respeita à invenção, combina pelo menos, a composição imunogénica de FCV da reivindicação 1 adicionalmente a componentes imunogénicos não FCV, tais como:

- FHV, FPV, FeLV e Clamídia
- FHV, FPV e FeLV
- FHV, FPV e Raiva
- FHV, FPV e Clamídia
- FHV, FPV, Clamídia e Raiva
- FHV e FPV
- FHV e Clamídia
- FHV

Numa forma de realização preferida destas várias combinações, são utilizados microrganismos vivos atenuados para FHV, FPV e Clamídia e um (ou mais) vector recombinante que expressa os genes de FeLV é/são utilizados para o FeLV. O vector recombinante pode ser um vírus da varíola aviário (por exemplo vCP97, como descrito na Patente U.S. Nº 5753103) que expressa os genes de FeLV *env* e *gag/pol*. Para a raiva, pode ser utilizado um vector recombinante, nomeadamente um vírus da varíola aviária (por exemplo, vCP65, como descrito na Patente U.S. Nº 5843456) que expressa o gene da raiva glicoproteína G.

Outro objectivo da invenção é um processo de inactivação e estabilização de FCV, compreendendo reagir o FCV com um agente inactivador e um composto de aldeído estabilizador formado por uma cadeia alquilo C_1-C_5 linear compreendendo um grupo aldeído quando a cadeia é C_1 e dois grupos aldeído terminais quando a cadeia é C_2-C_5 e, opcionalmente, um grupo aldeído pode ser substituído por uma cetona ou um grupo epóxi quando a cadeia é a cadeia C_2-C_5 . Formas de realização preferidas para o agente inactivador e o composto de aldeído estabilizador e suas condições de utilização são como acima descrito, naquilo que se refere à invenção.

O processo da invenção compreende a cultura de FCV em células hospedeiras adequadas, o tratamento com o agente inactivador e o composto de aldeído estabilizador. A cultura e propagação do vírus FCV é, de um modo preferido, realizada em células de felino, mais particularmente em células de Rim de Felino Crandell-Reese ou células CRFK (acessível na American Type Culture Collection sob o número CCL-94) com uma multiplicidade de infecção (MOI) de doses de 2 a 0,01 de culturas de células infectadas 50% (CCID₅₀) por célula, de um modo preferido 0,5 CCID₅₀/célula.

A adição do composto de aldeído estabilizador pode ser realizada antes, durante ou após o passo de inactivação. A neutralização do agente inactivador e/ou o composto de aldeído estabilizador pode ser realizado como descrito acima.

Os viriões de FCV estabilizados inactivados podem ser concentrados e/ou recuperados a partir da suspensão através de técnicas de concentração convencionais, por exemplo, através de ultrafiltração e depois opcionalmente purificados através de

meios de purificação convencionais, por exemplo, cromatografia por exclusão de tamanho, ultracentrifugação num gradiente de sacarose, ultracentrifugação num gradiente de cloreto de cézio ou precipitação selectiva, por exemplo, na presença de polietilenoglicol (PEG).

Numa forma de realização, a composição imunogénica ou vacina compreende FCV da invenção liofilizados estabilizados e inactivados e um excipiente ou veículo de liofilização, que pode incluir aminoácidos, e. g., ácidos glutâmicos ou hidratos de carbono, e. g., lactose e suas misturas, e. g., SPGA (sacarose/fosfato/glutamato/albumina; ver também Pedido de Patente Europeia N° de Série 0496135). O FCV inactivado e estabilizado pode ser armazenado a longo prazo a cerca de 5 °C, ou alternativamente, congelado ou liofilizado, de acordo com técnicas conhecidas dos especialistas na técnica.

Por isso, para produzir as composições de FCV imunogénicas da presente invenção, o FCV é cultivado em cultura de células numa linha celular de felinos adequada, i. e., células de CRFK, nos títulos suficientes para produzir uma suspensão viral em quantidades suficientes para produzir uma composição imunogénica. O FCV é recolhido de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. O calicivírus é então concentrado, congelado, e armazenado a -70 °C ou liofilizado e armazenado de 4 °C.

Ainda outro objectivo da invenção é um processo de produção de uma composição imunogénica ou vacina compreendendo proporcionar o FCV inactivado e estabilizado da invenção numa quantidade suficiente para induzir uma resposta imunitária e liofilizar o referido FCV (e possivelmente adicionar um

estabilizador de liofilização) ou na forma líquida misturando o referido FCV com um excipiente ou veículo aceitável em termos veterinários. Excipientes adequados são, por exemplo, água, soluções isotônicas, soro fisiológico tal como, mas não limitado a, NaCl e soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS), dextrose, manitol, sorbitol, lactose, glicerol, etanol ou semelhantes, e suas combinações. Adicionalmente, se desejado, a vacina pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares tais como, mas não limitadas a, agentes humidificantes ou emulsificantes, e agentes de tamponamento de pH.

As composições imunogénicas e as vacinas de acordo com a descrição podem compreender um ou mais adjuvantes, mas não obrigatoriamente. De um modo preferido, as composições da invenção compreendem um FCV inativado e estabilizado que é imunogénico mesmo na ausência de adjuvante. Se desejado, todavia, pode ser incluído um adjuvante aceitável nas composições da invenção. O adjuvante aceitável é um adjuvante hidrossolúvel. Esses adjuvantes aceitáveis podem ser polímeros de ácido acrílico ou metacrílico, polímeros de anidrido maleico e de um derivado de alcenilo, sequências imunoestimuladoras (ISS), em particular sequências de oligodesoxirribonucleótidos possuindo um ou mais motivos de CpG não metilados (Klinman D.M. *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2879-2883; documento WO-A1-98/16247), uma emulsão de óleo-em-água, em particular a emulsão de SPT descreve na página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995 e a emulsão MF59 descrita na página 183 do mesmo trabalho, lípidos catiónicos contendo um sal de amónio quaternário, citocinas ou suas combinações ou misturas.

Ainda outro objectivo da descrição é um método de imunização de um animal da família Felidae, de um modo preferido gatos, incluindo recém-nascidos, gatinhos, machos, fêmeas e fêmeas grávidas, contra a doença FCV, compreendendo o método administrar uma composição imunogénica ou vacina de FCV não adjuvantada inactivada e estabilizada, de acordo com a descrição.

Um outro objectivo da descrição é um método de imunização de um animal da família Felidae, de um modo preferido, gatos, incluindo recém-nascidos, gatinhos, machos, fêmeas e fêmeas grávidas contra, pelo menos, duas doenças de felinos incluindo a doença de FCV, compreendendo o método administrar uma vacina não adjuvantada combinada compreendendo FCV inactivado e estabilizado de acordo com a descrição e, pelo menos, um imunogénio não FCV de outro patogénio felino ou vector recombinante que expressa, pelo menos, um imunogénio não FCV de outro patogénio felino.

Podem ser utilizadas diferentes vias para administrar as composições imunogénicas ou vacinas de acordo com a descrição. Estas incluem, mas não estão limitados a a via parentérica, oronasal, intramuscular, intradérmica, subcutânea e mucosal (e. g., oral). As vias de administração preferidas incluem a via de injeção subcutânea ou intramuscular. Podem ser administradas vacinas ou composições imunogénicas através de qualquer meio que incluem, mas não estão limitados a seringas, dispositivos de injeção sem agulha. Os injectores sem agulha podem ser utilizados para distribuição transdérmica (distribuição intradérmica e subcutânea e possivelmente distribuição intramuscular). Utilizando um sistema de injeção sem agulha, os volumes de dose são determinados pelo volume necessário para

distribuir a composição imunogénica de FCV e pode estar entre 0,1 mL e 1 mL.

Utilizando uma seringa, os volumes de dose das vacinas e composições imunogénicas estão geralmente entre 0,2 e 2,0 mL, de um modo preferido, cerca de 1,0 mL. Os gatos podem ser vacinados a partir de cerca das 6 semanas de idade. Podem ser realizadas duas ou mais administrações, por exemplo, com intervalos de 3-5 semanas. De um modo preferido, pode ser realizado um reforço de administração, por exemplo, anualmente. Alternativamente os gatos podem ser iniciados com apenas uma injeção.

A invenção será agora descrita em maior detalhe através dos seguintes exemplos não limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Inativação de FCV por Formaldeído

Foram cultivadas células CRFK (Células de Rim de Felinos Crandell-Reese, acessíveis da American Type Culture Collection sob CCL-94) a 37 °C em frascos de rotação de 2 litros (850 cm²) com meio Eagle modificado (MEM, Gibco BRL) suplementado com 2,5% de hidrolisado de lactalbumina e 5% de soro de vitela fetal. Foram adicionados trezentos mililitros de uma suspensão celular em meio MEM, contendo cerca de 100000 células/mL, por frasco de rotação. Após 3 dias, a camada celular tronou-se confluenta. O meio de cultura celular foi, então, substituído com MEM sem soro e foi adicionada a estirpe 431 do vírus FCV a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,5 CCID₅₀/célula. A cultura viral foi mantida a 37 °C durante 24 até 48 horas até ter sido obtido um

efeito citopático para a camada celular inteira. A suspensão viral foi recolhida e depois clarificada num filtro que possui uma porosidade de 1,5 μm e armazenada a 5 °C. O título do vírus FCV recolhido foi de 8,5 $\pm$ 0,3 $\log_{10}$ CCID₅₀/mL.

A suspensão viral foi inactivada com etilenoimina à concentração de 8 mM a 22 °C durante 18 horas. A etilenoimina foi preparada dissolvendo 36 g de pastilhas de hidróxido de sódio em 257,5 mL de água destilada e adicionando 87,5 g de bromoetilamina (BEA), correspondendo aproximadamente a uma solução de 1,2 M de etilenoimina. No final da inactivação, parte da suspensão viral inactivada foi estabilizada através da adição de formaldeído a uma concentração final de 0,5 g/L e a 5 °C ($\pm$ 3 °C) durante 24 horas. Parte da suspensão viral inactivada foi mantida instabilizada como uma suspensão de controlo.

Uma porção da suspensão viral inactivada e estabilizada e uma porção da suspensão de controlo foram submetidas à precipitação selectiva na presença de polietilenoglicol (PEG). Foi adicionado PEG 6000 às suspensões a uma concentração de 6%, e agitada a 5 °C ($\pm$ 3 °C) durante 3 horas. As suspensões foram então centrifugadas a cerca de 1330 g durante 90 minutos. Os sobrenadantes, contendo a proteína p66 solúvel e os precipitados, contendo os viriões, foram separados e recuperados. Os precipitados foram dissolvidos em soro fisiológico tamponado com fosfato estéril (PBS) sem cálcio e sem magnésio.

Dois a três dias após o final do passo de inactivação, as proteínas de FCV p66 foram quantificadas por titulação por ELISA na suspensão viral inactivada e estabilizada, na suspensão de controlo, nos sobrenadantes e nos precipitados em solução.

Revestindo anticorpos policlonais anti-FCV numa placa de titulação, adicionando diferentes diluições da suspensão viral inactivada e estabilizada, a suspensão de controlo, os sobrenadantes e a solução precipitada, realizando titulação por ELISA. A placa de titulação foi mantida a 37 °C durante 3 horas, seguido por lavagem da placa de titulação com um tampão de lavagem e, subsequentemente, adicionando um anticorpo monoclonal específico para a proteína da cápside de FCV p66 acoplada a uma peroxidase. A placa de titulação foi ainda incubada a 37 °C durante 1 hora, após a qual a placa foi lavada com o tampão de lavagem. À placa lavada, foi adicionado 100 µL da solução de TMB (5,5'-tetrametilbenzidina) por poço a 20 °C e mantido na escuridão a 20 °C durante 30 minutos. O desenvolvimento de cor foi bloqueado adicionando 50 µL de ácido sulfúrico a 2 M por poço. Os títulos da ELISA foram medidos opticamente e expressos como $\log_{10} DO_{50}$ (densidade óptica 50%), que corresponde ao logaritmo base dez da diluição, originando 50% da densidade óptica máxima. O desvio padrão da titulação da ELISA é de 0,07.

Tabela 1: Degradação dos viriões FCV após inactivação

	Inactivação sem estabilização	Inactivação e estabilização
Proteína p66 total na suspensão viral não submetida a precipitação com PEG	2,81	2,36
Proteína P66 no sobrenadante (p66 solúvel)	2,55	2,18
Proteína P66 no precipitado (p66 no virião)	1,95	2,62

Estes resultados demonstram a degradação dos viriões FCV após inativação na ausência de estabilização e o efeito de estabilização do formaldeído.

Exemplo 2: Efeito de Estabilização de Formaldeído em FCV Várias Condições

A estirpe 431 de FCV foi cultivada essencialmente como descrito no Exemplo 1.

Foram testados três métodos de inativação:

- 1) etilenoimina à concentração de cerca de 4 mM a 20 °C durante 24 horas,
- 2) etilenoimina à concentração de cerca de 8 mM a 20 °C durante 24 horas,
- 3) etilenoimina à concentração de cerca de 8 mM a 5 °C durante 24 horas.

A suspensão viral foi estabilizada por formaldeído a várias concentrações finais de 0,1 g/L - 0,5 g/L e a 5 °C (+/- 3 °C) durante 5 dias. Uma suspensão de controlo não continha qualquer formaldeído.

As proteínas p66 de FCV foram quantificadas como descrito no Exemplo 1 antes e após precipitação selectiva com PEG, por titulação de ELISA. Os títulos de ELISA são expressos como $\log_{10}$ da DO_{50} .

Tabela 2: Os Títulos de ELISA das proteínas p66 de FCV

Formaldeído 5 dias, 5 °C	Etilenoimina								
	4 mM, 20 °C, 24 h			8 mM, 20 °C, 24 h			8 mM, 5 °C, 24 h		
	Total de proteína	p66 solúvel	p66 no virião	Total de proteína	p66 solúvel	p66 no virião	Total de proteína	p66 solúvel	p66 no virião
0,5 g/L	2,15	1,53	1,56	1,96	1,37	1,09	2,11	1,42	1,38
0,1 g/L	2,38	1,88	1,56	2,24	1,87	0,98	2,27	1,72	1,35
0 g/L	2,41	1,86	1,34	2,14	1,85	0,82	2,3	1,76	1,14

Estes resultados demonstraram o efeito estabilizador de 0,1 g/L e 0,5 g/L de solução de formaldeído em relação a várias condições de inativação.

Exemplo 3: Imunogenicidade de viriões de FCV Inativados

As estirpes FCV 431 foram cultivadas, inativadas e estabilizados essencialmente como descrito no Exemplo 1. Esta suspensão viral foi separada por cromatografia por exclusão de tamanho em duas fracções contendo, respectivamente, o virião (também denominada fracção p66 viral) e a proteína p66 solúvel (também denominada fracção de p66 solúvel). Após separação, as duas fracções foram armazenadas a 5 °C.

Foram preparadas um total de 12 vacinas, contendo 1 mL da fracção da p66 viral diluídas ou não diluídas (1/1, 1/4 e 1/16) e formuladas com 1 mL de PBS (soro fisiológico tamponado com fosfato; sem cálcio e sem magnésio); 1 mL da fracção p66 viral diluída ou não diluída (1/1, 1/4 e 1/16) e formulada com 1 mL de uma emulsão óleo-em-água (óleo de parafina, éteres de álcool gordo e polióis, ácidos gordo de polioxietileno); 1 mL da fracção p66 solúvel diluída ou não diluída (1/1, 1/4 e 1/16) e formulada com o PBS; 1 mL da fracção de p66 solúvel diluída ou

não diluída (1/1, 1/4 e 1/16) e formulada com a emulsão óleo-água.

As vacinas não diluídas contêm aproximadamente a quantidade de proteína correspondente a 10 mL de cultura viral bruta. As fracções de p66 viral e as fracções de p66 solúveis foram diluídas pela adição de PBS sem cálcio e sem magnésio.

Vinte e quatro gatinhos sem um patogénio específico (SPF), cada um com, aproximadamente, 8-9 semanas de idade, foram divididos aleatoriamente por 12 grupos e administrados subcutaneamente duas vezes, com 28 dias de intervalo, com 2 mL destas vacinas. Não foi observado efeito relacionado com a quantidade injectada de proteína p66. Os seguintes resultados são o reflexo de todos os gatos que foram desafiados, pela via oronasal à estirpe virulenta FCV 431 no dia 46 (0,25 mL por narina e 0,5 mL oralmente, $10^{5,5}$ CCID₅₀/mL).

Foram observados sinais clínicos durante as duas semanas pós-desafio. A classificação utilizada para o cálculo da classificação clínica é como se segue:

Tabela 3: Classificações Clínicas dos Felinos Vacinados

Parâmetros	Observação	Classificação
Temperatura rectal	$T^{\circ} < 39,5^{\circ}\text{C}$	0
	$39,5^{\circ}\text{C} \leq T^{\circ} < 40^{\circ}\text{C}$	1
	$T^{\circ} \geq 40^{\circ}\text{C}$	2
Condição geral do corpo	Normal	0
	Depressão	1
Ulceração oronasal	Ausência	0
	Diâmetro $< 5\text{ mm}$	1
	Diâmetro de 5 a 10 mm	2
	Diâmetro $> 10\text{ mm}$	3
Rinite	Corrimento nasal seroso	1
	Corrimento nasal muco-purulento	2
Conjuntivite	Corrimento seroso	1
	Corrimento nasal muco-purulento	2
Gengivite	Presente	1
Coxear	Presente	1

A classificação clínica total é a soma de todos os sinais clínicos observados num gato durante as duas semanas pós-desafio. São indicados meios da classificação clínica total por tipo de vacinas na seguinte tabela e na Figura 1.

Tabela 4: Classificação Clínica Total Média Por Tipo de Vacina

	Fracção de p66 Viral	Fracção de p66 Solúvel
PBS	17,17	29,33
Emulsão	16,17	20,83

A classificação clínica máxima é a classificação clínica mais elevada obtida para uma observação num gato durante as duas semanas pós-desafio. As médias da classificação clínica máxima

por tipo de vacinas estão indicadas na tabela seguinte e na Figura 2.

Tabela 5: Classificação Clínica Máxima Média Por Tipo de Vacina

	Fracção de p66 Viral	Fracção de p66 Solúvel
PBS	2,33	4,67
Emulsão	2,83	2,83

Houve uma diferença significativa entre as médias da classificação clínica máxima obtida para os grupos da fracção p66 viral/PBS e da fracção de p66 solúvel/PBS (valor de P, $p=0,0495$).

Estes resultados demonstram que os viriões inactivados mantêm a imunogenicidade na ausência de adjuvante. Pelo contrário, as proteínas p66 solúveis induzem uma boa resposta imunogénica apenas na presença de adjuvante.

Exemplo 4: Vacinação de gatos com FCV Inactivado

O FCV 431 foi cultivado, inactivado com etilenimina e estabilizados por acção de formaldeído essencialmente como descrito no Exemplo 1. O mesmo processo foi aplicado para a extirpe G1 de FCV.

Uma vacina combinada (vacina A) compreendeu $5,60 \log_{10}$ CCID₅₀ por dose de vírus de rinotraqueíte felina atenuada (FHV-1), $4,17 \log_{10}$ CCID₅₀ por dose de vírus de panleucopenia felina atenuada (FPV), $8,29 \log_{10}$ CCID₅₀ por dose de vector recombinante de varíola aviária vCP97 expressando os genes *env* e *gag/pol* de

FeLV (ver documento US-A-5753103), $4,8 \log_{10}$ ELD₅₀ por dose de Clamídia atenuada, $8,7 \log_{10}$ CCID₅₀ por dose de FCV 431 inactivado e estabilizado (título equivalente de FCV antes da inactivação), $8,7 \log_{10}$ CCID₅₀ por dose de FCV inactivado e estabilizado G1 (título equivalente de FCV antes da inactivação) e água fisiológica.

Dezoito gatinhos sem patogénio específico entre as 8 e 9 semanas de idade foram divididos aleatoriamente por 3 grupos (6 gatinhos por grupo). Os gatinhos do grupo A foram vacinados com uma dose da vacina A. Os gatinhos do grupo B foram vacinados com uma mistura de uma vacina comercial contendo numa forma liofilizada, uma estirpe viva modificada de FCV F9, um FHV-1 vivo modificado e um FPV vivo modificado, e de uma vacina comercial contendo um FeLV inactivado e adjuvante Carbopol®, esta vacina actua como diluente para a vacina comercial liofilizada. Os gatinhos do grupo C permaneceram não vacinados como controlo. A vacina foi administrada duas vezes, com intervalo de 28 dias, por via subcutânea. Quatro semanas após a última vacinação, todos os gatos foram desafiados através da via oronasal com a estirpe heteróloga virulenta de FCV 255 (Scott FW. *Am. J. Vet. Res.* 1977. 38(2). 229-34) (0,25 mL por narina e 0,5 mL oralmente, $10^{8,2}$ CCID₅₀/mL).

Foram observados anticorpos neutralizantes anti-FCV255, pesos dos animais, temperaturas rectais, condições gerais, sintomas gerais e locais e excreções virais durante as duas semanas pós-desafio. Os títulos do anticorpo de calicivírus (expresso como $\log_{10}$) são apresentados na seguinte tabela e na Figura 3.

Tabela 6: Títulos de Anticorpo de Acordo com o Grupo

	D0	D28	D56	D70
Grupo A	0,20	0,20	1,13	2,23
Grupo B	0,20	0,62	1,28	2,43
Grupo C	0,20	0,20	0,20	2,83

No dia 0, os títulos de anticorpo foram negativos em todos os grupos.

Após uma injeção da vacina, nenhum dos gatos vacinados foi seroconvertido excepto no grupo B. Após a segunda injeção, todos os gatos tinham títulos de anticorpos neutralizadores. Os títulos de anticorpo médios no momento do desafio (D56) não foram diferentes entre os grupos vacinados (teste Tukey) mas foram significativamente mais elevados do que no grupo de controlo (ANOVA, $p=0,0002$).

A classificação utilizada para o cálculo da classificação é como segue:

Tabela 7: Classificação Clínica Global de Gatos Vacinados

Parâmetros	Observação	Classificação
Temperatura rectal	$T^{\circ} < 39,5^{\circ}C$	1
	$T^{\circ} \geq 37^{\circ}C$	2
Condição geral do corpo*	Depressão	2
	Morte	10
Ulceração oronasal*	Pequena e pouca em número	1
	Grande e numerosa	3

(continuação)

Parâmetros	Observação	Classificação
Corrimento nasal	ligeiro	1
	Copioso	2
Corrimento ocular*	Presente	1
Peso	Perda de peso	2

*A adição das classificações da condição geral do corpo, ulceração oronasal, corrimento nasal e corrimento ocular representa a classificação dos sintomas clínicos como apresentados na Figura 4.

Os resultados da classificação clínica são apresentados na Tabela seguinte e na Figura 4.

Tabela 8: Classificações Clínicas de Gatos Vacinados

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Temperatura rectal	2	1	3
Perda de peso	18	20	22
Sintomas clínicos	4	43	116

Todos os gatos de controlo, excepto um, apresentaram sintomas clínicos típicos de infecção com FCV. Uma comparação par-a-par com o teste de Tukey demonstrou que o grupo A foi o único grupo vacinado a ser significativamente diferente do grupo de controlo.

Foram recolhidas zaragatoas da faringe e testadas para excreção viral. Os resultados da excreção de FCV (expressos como $\log_{10}$ CCID₅₀/mL) são apresentados na tabela seguinte e na Figura 5.

Tabela 9: Níveis de Excreção de FCV em Gatos Vacinados

	D56	D58	D60	D62	D64	D67	D70
Grupo A	1,20	2,20	2,28	1,62	1,70	1,45	1,70
Grupo B	1,20	1,95	1,37	1,45	1,53	1,28	1,37
Grupo C	1,28	3,12	3,20	3,45	2,87	2,20	1,62

Após o desafio, foi observada excreção viral em todos os grupos, mas foi reduzida nos grupos vacinados em comparação com o grupo de controlo (ANOVA, $p < 0,00001$). Não houve diferença entre os grupos vacinados (teste de Tukey).

Ambas as vacinas protegeram os gatos contra um desafio da FCV 255 heterólogo através de uma forte redução dos sintomas clínicos e excreção viral. O nível de protecção das vacinas da descrição foi, pelo menos, tão bom como para a vacina comercial de F9 vivo modificado. Isto demonstra que pode ser obtida uma vacinação eficaz contra FCV utilizando uma vacina de FCV inactivado e estabilizado na ausência de adjuvante e que o nível de protecção é, pelo menos, tão bom como o obtido com vacinas vivas comerciais.

A compatibilidade *in vivo* entre o FCV 431/G1 inactivado e estabilizado e os outros componentes da vacina (vírus da rinotraqueíte felina, vírus da panleucopenia infecciosa felina, vírus da leucemia felina e Clamídia) também foi demonstrada.

Lisboa, 30 de Novembro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogénica inactivada, estabilizada, não adjuvantada contra o calicivírus felino (FCV), compreendendo um FCV inactivado por um ou mais agentes inactivadores e estabilizados por um composto de aldeído, em que o composto de aldeído compreende uma cadeia alquilo C₁-C₅ linear e em que a composição imunogénica é uma mistura com um excipiente ou veículo aceitável e em que os agentes inactivadores são seleccionados do grupo consistindo em etilenoimina, acetiletilenoimina, propilenoimina e β -propiolactona.
2. Composição da Reivindicação 1, em que o excipiente ou veículo é aceitável em termos veterinários.
3. Composição da Reivindicação 1, em que a composição é liofilizada e está em mistura com um excipiente ou veículo liofilizado.
4. Composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o agente inactivador é β -propiolactona.
5. Composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o agente inactivador é etilenoimina e em que a etilenoimina está presente desde cerca de 0,5 mM a cerca de 20 mM.
6. Composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o agente inactivador é etilenoimina e, em que a etilenoimina está presente desde cerca de 1 mM a cerca de 10 mM.

7. Composição da Reivindicação 1, em que o composto de aldeído compreende uma cadeia alquilo C_1 linear e em que o composto de aldeído compreende um grupo aldeído.
8. Composição da Reivindicação 1, em que o composto de aldeído compreende uma cadeia de alquilo C_2-C_5 linear e em que o composto de aldeído compreende dois grupos aldeído.
9. Composição da Reivindicação 8, em que um dos dois grupos aldeído é substituído por uma cetona ou um grupo epóxi.
10. Composição da Reivindicação 1, em que o composto de aldeído é seleccionado do grupo consistindo em formaldeído, glicidaldeído, glutaraldeído, glioxal ou metilglioxal.
11. Composição de Reivindicação 10, em que o composto de aldeído é formaldeído e em que o formaldeído está presente de cerca de 0,05 g/L a cerca de 0,8 g/L.
12. Composição da Reivindicação 10, em que o composto de aldeído é formaldeído e em que o formaldeído está presente de cerca de 0,1 g/L a cerca de 0,5 g/L.
13. Composição da Reivindicação 1, compreendendo ainda um composto de neutralização, em que o composto de neutralização compreende tiossulfato e cisteína.
14. Composição da Reivindicação 1, compreendendo ainda, pelo menos, uma estirpe de FCV adicional, em que, pelo menos, uma ou ambas as estirpes de FCV é inactivada e estabilizada.

15. Composição da Reivindicação 14, em que, pelo menos, uma estirpe adicional de FCV é seleccionada do grupo consistindo em FCV US 100869 (FCV PTA 5930), FCV F9, FCV 255, FCV 2280, FCV 431, FCV G1, FCV LLK, FCV KCD, FCV CFI e FCV M8.
16. Composição da Reivindicação 1, compreendendo ainda, pelo menos, um imunogénio não FCV de um patogénio felino.
17. Composição da Reivindicação 16, em que o patogénio felino é seleccionado do grupo consistindo em herpesvírus felino (FHV), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da panleucopenia felina (FPV), vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da raiva e Clamídia felina.
18. Composição da Reivindicação 16, em que, pelo menos, um imunogénio não FCV de um patogénio felino compreende um microrganismo atenuado vivo ou um vector recombinante que expressa, pelo menos, um imunogénio de um patogénio felino.
19. Processo para inactivar e estabilizar FCV, compreendendo os passos de reagir FCV com um agente inactivador e um composto de aldeído, em que o composto de aldeído compreende uma cadeia alquilo C₁-C₅ linear e em que o agente inactivador é seleccionado do grupo consistindo em etilenoimina, acetiletilenoimina, propilenoimina e β -propiolactona, e recuperando o FCV inactivado e estabilizado.
20. Processo da Reivindicação 19, em que o agente inactivador é β -propiolactona.

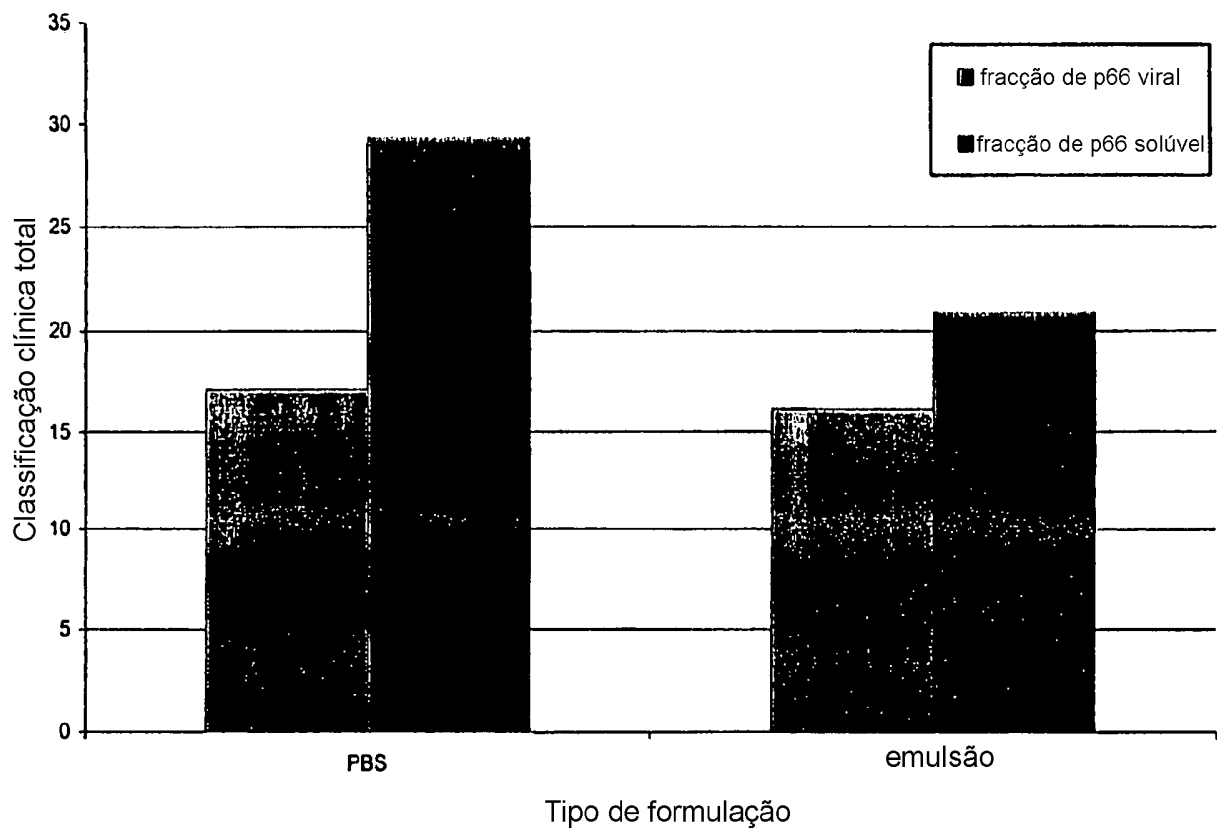
21. Processo da Reivindicação 19, em que o agente inactivador é etilenoimina e em que a etilenoimina está presente de cerca de 0,5 mM a cerca de 20 mM.
22. Processo da Reivindicação 19, em que o agente inactivador é etilenoimina e em que a etilenoimina está presente de cerca de 1 mM a cerca de 10 mM.
23. Processo da Reivindicação 19, em que o composto de aldeído compreende uma cadeia alquilo C_1 linear e em que o composto de aldeído compreende um grupo aldeído.
24. Processo da Reivindicação 19, em que o composto de aldeído compreende uma cadeia de alquilo C_2 - C_5 linear e em que o composto de aldeído compreende dois grupos aldeído.
25. Processo da Reivindicação 24, em que um dos dois grupos aldeído é substituído com uma cetona ou um grupo epóxi.
26. Processo de Reivindicação 19, em que o composto de aldeído é seleccionado do grupo consistindo em formaldeído, glicidaldeído, glutaraldeído, glioxal ou metilglioxal.
27. Processo da Reivindicação 26, em que o composto de aldeído é formaldeído e em que o formaldeído está presente de cerca de 0,05 g/L a cerca de 0,8 g/L.
28. Processo da Reivindicação 26, em que o composto de aldeído é formaldeído e em que o formaldeído está presente de cerca de 0,1 g/L a cerca de 0,5 g/L.

29. Processo da Reivindicação 19, compreendendo ainda o passo de reagir o FCV inactivado e estabilizado com um composto de neutralização, em que o composto de neutralização compreende tiossulfato e cisteína.
30. Processo da Reivindicação 19, em que o FCV inactivado e estabilizado é recuperado por cromatografia por exclusão de tamanho, ultracentrifugação e precipitação selectiva.
31. Processo da Reivindicação 19, compreendendo ainda o passo de liofilizar o FCV inactivado e estabilizado num excipiente de liofilização.
32. Processo para produzir uma composição imunogénica inactivada, não adjuvantada, compreendendo misturar o FCV inactivado e estabilizado da Reivindicação 1 numa quantidade suficiente para induzir uma resposta imunitária para FCV com um excipiente ou veículo aceitável em termos veterinários.
33. Processo para produzir uma composição imunogénica inactivada, não adjuvantada para armazenamento a longo prazo, compreendendo misturar o FCV inactivado e estabilizado da Reivindicação 1 numa quantidade suficiente para induzir uma resposta imunitária para FCV com um excipiente de liofilização e congelando a composição.
34. Composição imunogénica inactivada, estabilizada, não adjuvantada da Reivindicação 1 para utilização na indução de uma resposta imunitária num Felidae contra FCV.

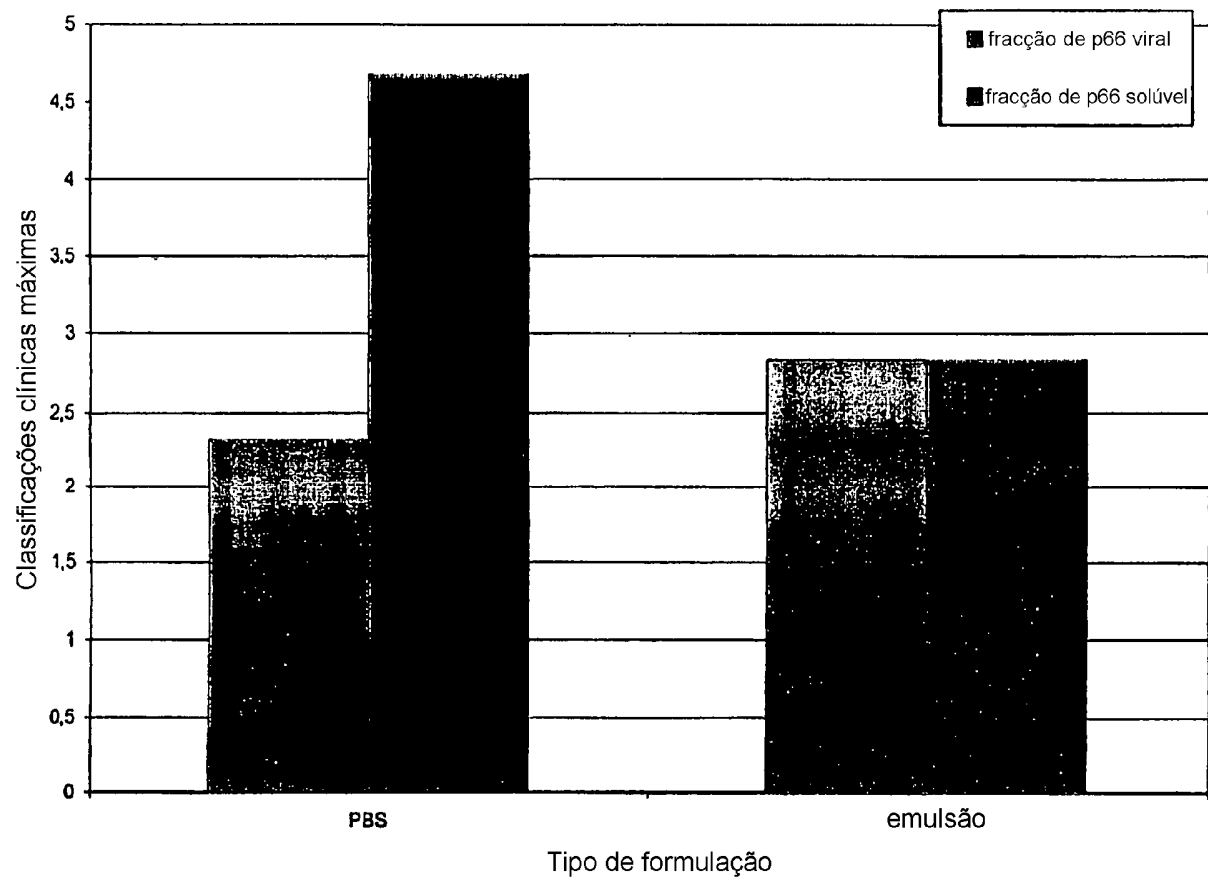
35. Composição imunogénica inactivada, estabilizada, não adjuvantada da Reivindicação 17 para utilização na indução de uma resposta imunitária num Felidae contra FCV.
36. Combinação compreendendo a composição imunogénica inactivada, estabilizada não adjuvantada de Reivindicação 1 e, pelo menos, um imunogénio não FCV de outro patógeno felino para utilização na indução de uma resposta imunitária num Felidae contra FCV e, pelo menos, um imunogénio não FCV de um patógeno felino.
37. Combinação de acordo com Reivindicação 36, em que pelo menos um patógeno de felino adicional é seleccionado do grupo consistindo em herpesvírus felino (FHV), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da panleucopenia felina (FPV), vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da raiva e Clamídia felina.
38. Combinação de acordo com a Reivindicação 36, em que, pelo menos, um imunogénio não FCV de um patógeno felino compreende um microrganismo atenuado vivo ou um vector recombinante que expressa, pelo menos, um imunogénio de um patógeno felino.

Lisboa, 30 de Novembro de 2011

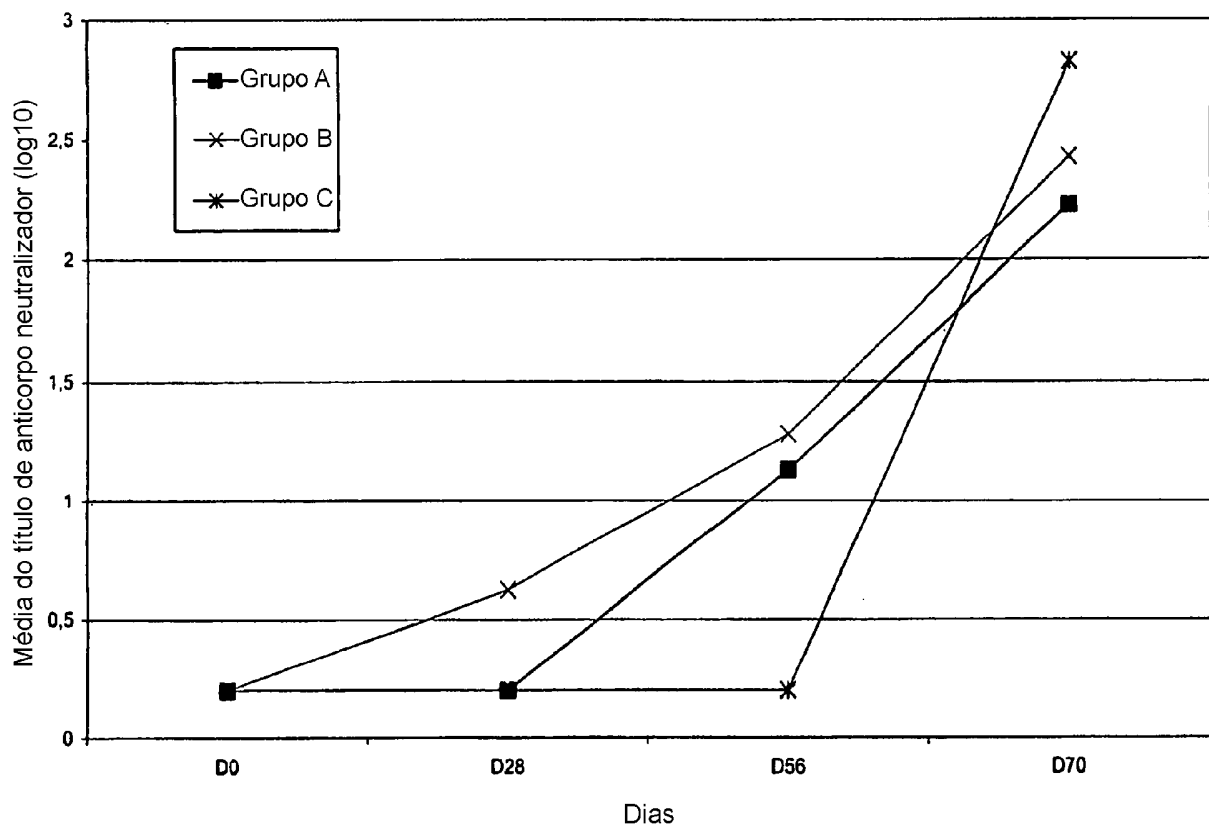
Médias das classificações clínicas totais por tipo de vacinas

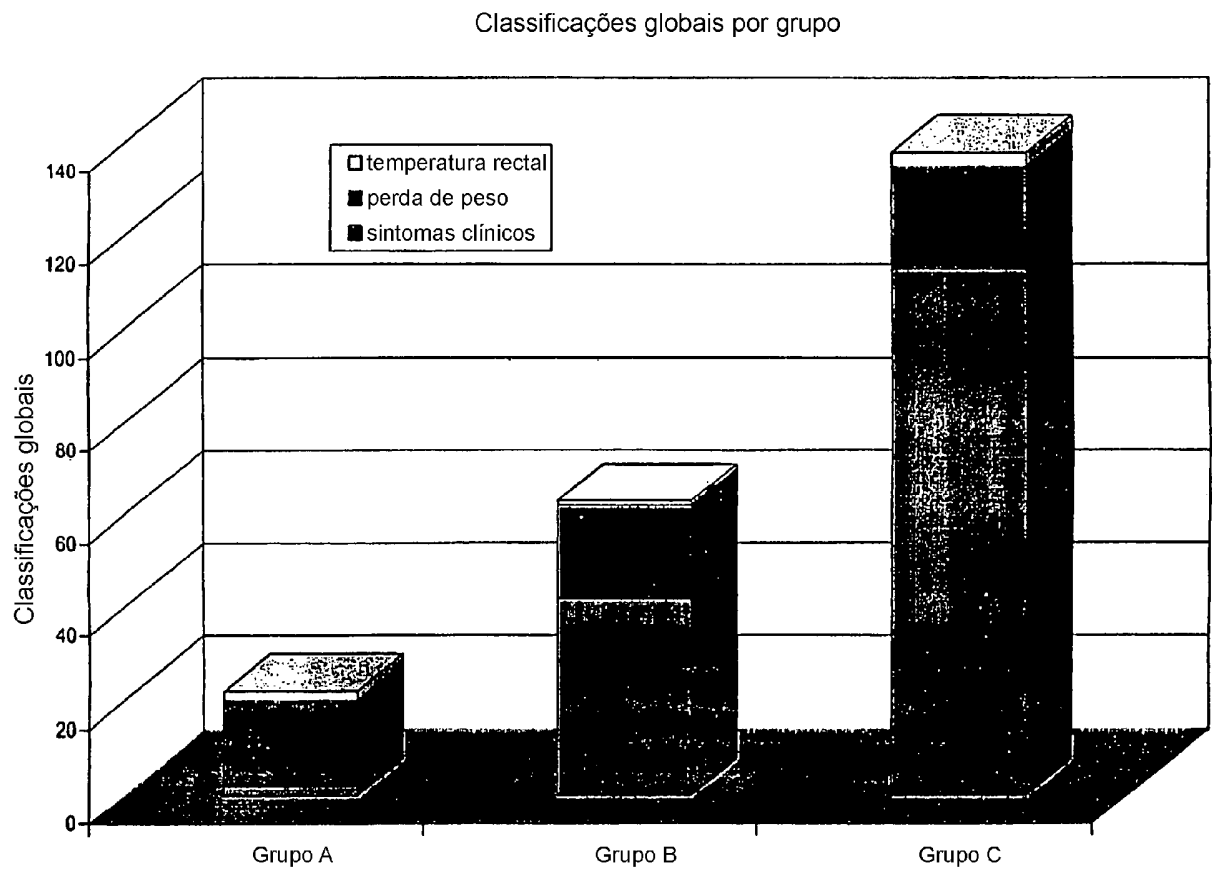


Médias das classificações clínicas máximas por tipo de vacinas



Média dos títulos do anticorpo neutralizante anti-FCV255 por grupo e por dia





Média da excreção de FCV (log10 CCID50/mL) após exposição por grupo e por dia

