INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 835930 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N007/00 A A61K039/12 B
A61K039/295 B

(12) ***FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO***

(22) *Data de depósito:* 1997.10.07

(30) *Prioridade:* 1996.10.09 EP 96202804

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

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.01.31

(73) *Titular(es):*
AKZO NOBEL N.V.
VELPERWEG 76 NL-6824 BM ARNHEM NL

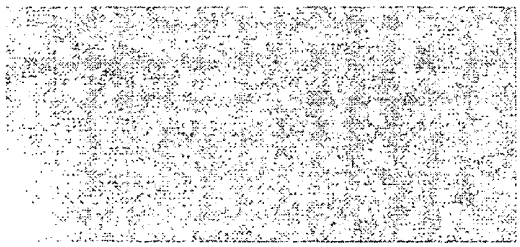
(72) *Inventor(es):*
PETRUS A. M. VAN WOENSEL NL
JEAN G. J. DEMARET NL

(74) *Mandatário(s):*
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* ESTIRPES EUROPEIAS DE VACINA DO VÍRUS DO SÍNDROMA REPRODUTIVO E RESPIRATÓRIO PORCINO (PRRSV)

(57) *Resumo:*

ESTIRPES EUROPEIAS DE VACINA DO VÍRUS DO SÍNDROMA REPRODUTIVO E RESPIRATÓRIO PORCINO (PRRSV)



DESCRIÇÃO

"Estirpes europeias de vacina do vírus do síndroma reprodutivo e respiratório Porcino (PRRSV)"

O presente invento refere-se a uma estirpe viva atenuada de um serótipo europeu do Vírus do Síndroma Reprodutivo e Respiratório Porcino (PRRSV), a métodos para a produção de tais estirpes, a vacinas com base nestas e a métodos para a produção de tais vacinas.

Em 1987, detectou-se na América do Norte uma doença em porcos desconhecida até então, a partir de onde, mais tarde, se espalhou até ao Canadá (Hill, H.; Em: Proceedings of the Mystery Swine Desease Committee meeting, Out. 6, 1990, Denver, Colorado, Livestock Conservation Institute, Madison Wi, E.U.A., Keffaber et al.; *Am. Assoc. Swine Pract. Newsletter* 1: 1-9 (1989)). A doença, que foi caracterizada pelo facto de induzir tanto aborto como doença respiratória, foi primeiro denominada Doença Misteriosa dos Suínos (MSD). Hoje em dia, na América e no Canadá, a doença é também conhecida como Síndroma de Infertilidade e Respiratório do Suíno (SIRS).

Em 1990, a doença foi identificada na Europa, onde causou primeiro surtos na Alemanha, seguidos por surtos na Holanda e na Bélgica, estando agora a doença a espalhar-se por toda a Europa. Na Europa a doença é normalmente conhecida como Síndroma Respiratório e Reprodutivo Porcino (PRRS) e como Síndroma Respiratório e de Aborto Epidémico Porcino (PEARS). Actualmente a doença é referida em todo o mundo como PRRS.

A patologia não está restringida a aborto e doença respiratória. Os outros sintomas associados à doença são: perda de apetite, anorexia, coloração azulada das extremidades, especialmente das orelhas.

Os efeitos patogénicos da doença, no que diz respeito tanto ao aborto como à doença respiratória, têm sido extensamente descritos na revisão geral de Christianson et al. (*Swine Health and Production* 2: 10-28 (1994)).

Sabe-se agora que o agente causador da doença é um pequeno vírus de ARN encapsulado pertencente ao grupo dos *Arteriviridae*.

As observações feitas por Wensvoort et al. (*J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 134-138 (1992)) e por Murtaugh et al. (*Arch. Virol.* 140: 1451-1460 (1995)) tornaram inequivocamente claro que existem dois (seró)tipos do vírus completamente diferentes: o (seró)tipo americano e o europeu.

O tipo europeu deste vírus foi descrito por Wensvoort et al. (*The Vet. Quarterly;* 13: 121-130 (1991)). Uma estirpe deste tipo europeu, denominada "Vírus Lelystad" (LV) foi depositada no Instituto Pasteur de Paris, França, sob o No. I-1102, em ligação com PCT WO 92/21375, pelo Central Veterinary Institute, Lelystad, Holanda. Uma outra estirpe europeia foi descrita na EPA No. 91.202.646.5 e foi depositada na Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) do Instituto Pasteur de Paris, França, sob o No. I-1140. Esta estirpe europeia foi recentemente descrita por Conzelmann et al. (*Virology* 193: 329-339 (1993)).

O tipo americano do vírus foi descrito por Benfield et al. (*J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 127-133 (1992)). Uma estirpe do tipo americano foi depositada na ATCC sob o No. VR-2332, sendo mencionada no PCT WO 93/03760 e no Pedido de Patente Europeia 0 529 584. Uma estirpe atenuada do serótipo americano foi descrita no Pedido de Patente Europeia 0 529 584. Esta estirpe deriva directamente da estirpe americana VR-2332 depositada. Por conseguinte, os animais vacinados com esta estirpe não irão obter uma protecção eficaz contra a infecção por estirpes europeias. Isto torna necessário desenvolver uma estirpe viva atenuada do serótipo europeu para ser utilizada como base de vacinas contra serótipos europeus.

No Pedido de Patente Europeia No. EP 0 676 467 revelam-se, pela primeira vez, estirpes vivas atenuadas do serótipo europeu. Exemplos de estirpes atenuadas do serótipo europeu são as estirpes do vírus PRRS C e PRRS D, depositadas na Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) do Instituto Pasteur de Paris, França, sob os números de Acesso I-1387 (Estirpe D) e I-1388 (Estirpe C).

Estas estirpes são eficazes como base para vacinas vivas atenuadas contra PRRSV, no entanto, elas têm ainda um certo nível de virulência. Por conseguinte, desejam-se estirpes de PRRSV alternativamente atenuadas e métodos para a preparação de tais vírus.

É um objectivo do presente invento proporcionar estirpes de vírus contra PRRS vivas atenuadas de um serótipo europeu tendo a característica desejada de características de atenuação alternativas quando comparadas com as estirpes de vírus de PRRS vivos atenuados existentes. É um outro objectivo do presente invento proporcionar métodos para a preparação de tais estirpes de vírus de PRRS vivas atenuadas.

Estes objectivos são atingidos pelo presente invento que proporciona vírus de PRRS vivos atenuados de um serótipo europeu que têm a característica única de não serem infecciosos para macrófagos. Mostra-se nos Exemplos que tais estirpes apresentam um carácter mais atenuado em porcos, do que as estirpes progenitoras que são ainda infecciosas para macrófagos.

A expressão "não infeccioso para os macrófagos" deve ser entendida como se segue: uma dose $<10^4$ de doses infecciosas em culturas de tecidos $(TCID)_{50}$ de acordo com o presente invento não origina uma CPE visível numa cultura de macrófagos, mesmo 7 dias após infecção. Uma estirpe de campo de PRRSV infecciosa para macrófagos, típica, daria uma CPE completa com doses de partículas infecciosas de 1 $TCID_{50}$.on.

Os vírus do serótipo europeu são caracterizados por originarem um título sérico superior num Ensaio em Monocamada com Imunoperoxidase com um painel de anti-soros contra o vírus de PRRS europeu LV (CDI-NL-2.91; depositado no Instituto Pasteur sob I-1102) quando comparado com a reacção com um painel de anti-soros contra o vírus de PRRS americano PRRSV (ATCC VR-2332).

É um outro aspecto do invento proporcionar métodos para a preparação de estirpes de PRRS vivas atenuadas de acordo com o invento. Actualmente, todas as estirpes de PRRSV europeias são obtidas a partir de macrófagos de animais infectados e, em seguida, se possível mantidos em células MA104 ou seus clones, para propagação. Os métodos de acordo com o presente invento referem-se à adaptação de vírus de PRRS que cresceram em MA104 a células que não MA104. Estas células que não MA104 podem ser, por exemplo, células com uma esperança de vida limitada ou linhas de células imortalizadas estabelecidas. Em geral, as células que não MA104 serão células de mamífero. As células que não MA104 de mamífero são, por exemplo, linhas de células

para fins gerais tais como linhas de células BHK, linhas de células CRFK e linhas de células de rim bovino Madin Darby ou, por exemplo, células porcinas tais como células de testículo de Suíno ou células de rim de Suíno ou podem ser células de primatas que não MA104 tais como células VERO. A adaptação do PRRSV a células diferentes das células hospedeiras naturais compreende métodos padrão que podem ser realizados como se segue: um isolado de vírus de PRRS específico é feito crescer numa cultura contendo células porcinas ou outras células susceptíveis de origem que não porcina, nas quais o vírus pode ser multiplicado, tais como células MA104. Depois de crescer, o PRRSV é recolhido por recolha dos fluidos da cultura de células e/ou de células seguida por passagem dos fluídos da cultura de células e/ou das células para outro tipo de células para adaptação. As estirpes que foram primeiramente adaptadas a uma linha de células que não MA104 podem ser adicionalmente adaptadas a uma outra linha de células que não MA104 para posterior atenuação. Este processo de adaptação pode ser repetido, se desejado, ainda noutras células que não MA104. A adaptação ao crescimento, a diferentes temperaturas, pode também fazer parte do processo de atenuação. Após passagem para células que não MA104, o carácter não infeccioso para macrófagos pode ser obtido depois de um pequeno número de passagens. Um número de 5 passagens, normalmente o número de passagens necessário para se obter um vírus semente principal, é frequentemente suficiente para se obterem vírus não infecciosos para macrófagos de acordo com o invento.

Numa forma preferida, o método utiliza células de primata que não MA104 como células para adaptação. É evidente que, após adaptação a células de primata que não MA104 pode-se realizar qualquer outra adaptação em quaisquer outras células adequadas.

Numa forma mais preferida, o método utiliza, para a adaptação, células Vero como células de primata que não MA104.

A verificação do carácter não infeccioso para macrófagos das estirpes vivas atenuadas assim obtidas pode ser facilmente realizada por teste à ausência de crescimento *in vitro*, em macrófagos, das estirpes assim obtidas. As técnicas padrão quer para a preparação de culturas de macrófagos quer para a propagação do vírus infeccioso para macrófagos são bem conhecidas na arte e foram descritas, por exemplo, em WO 93/07898. Um sistema de teste simples

baseado em macrófagos isolados e deixados crescer sob condições padrão serve como sistema de teste para discriminar estirpes de PRRS vivas atenuadas de acordo com o invento de outros vírus de PRRS vivos atenuados que ainda mantinham o seu carácter infeccioso para macrófagos. Um sistema de teste possível é descrito no Exemplo 2.

O carácter atenuado das estirpes de PRRSV de acordo com o presente invento pode ser ilustrado partindo de duas estirpes: I-1140, uma estirpe de PRRSV patogénica isolada em 1991 na Holanda, e I-1387, uma estirpe de campo de PRRSV fracamente patogénica (as duas estirpes depositadas na Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) do Instituto Pasteur de Paris, França, sob o seu número respectivo). Estas estirpes progenitoras são infecciosas para macrófagos. Destas estirpes progenitoras, as estirpes não infecciosas para macrófagos atenuadas de acordo com o invento foram preparadas como descrito no Exemplo 1. O carácter infeccioso para macrófagos foi determinado como descrito no Exemplo 2.

As estirpes seguintes estavam disponíveis para testes:

1. I-1140 88ª passagem em células MA104
2. I-1140 61ª passagem em células Vero
3. I-1387 20ª passagem em células MA104
4. I-1387 49ª passagem em células Vero

Apresenta-se de seguida a verificação dos resultados dos testes para as características infecciosas destas estirpes:

Estirpe		Linha de células	
	Macrófagos	Vero	MA104
1	+ + +	---	+ + +
2	---	+ + +	+ + +
3	+ + +	---	+ + +
4	---	+ + +	+ + +

Tabela 1. Comparação das estirpes de acordo com o invento e números de passagem elevada das estirpes progenitoras.

São também muito adequadas como estirpes progenitoras para atenuação de acordo com o presente invento, os vírus de PRRS que já estão atenuados num outro aspecto (i.e. não relacionado com a infecciosidade para macrófagos). Tais vírus foram descritos no Pedido de Patente Europeia No. EP 0 676 467, acima mencionado. Estas estirpes de vírus pertencem a um serótipo europeu e são reactivas com anticorpo monoclonal A27 produzido pelo hibridoma A27 depositado na Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) do Instituto Pasteur de Paris, França, sob o No. I-1401, mas não com anticorpo monoclonal A35 produzido pelo hibridoma A35 depositado no Instituto Pasteur de Paris, França, sob o No. I-1402. Se tais vírus forem tornados não infecciosos para macrófagos, de acordo com os métodos do presente invento, eles são ainda mais seguros uma vez que o seu carácter atenuado reside em dois ou mais aspectos diferentes, sendo um dos quais o carácter não infeccioso para macrófagos. Por conseguinte, numa concretização mais preferida do presente invento, o PRRSV vivo atenuado de acordo com o invento tem a característica adicional de ser reactivo com anticorpo monoclonal A27 produzido pelo hibridoma A27 depositado na Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) do Instituto Pasteur de Paris, França, sob o No. I-1401, mas não com o anticorpo monoclonal A35 produzido pelo hibridoma A35 depositado no Instituto Pasteur de Paris, França, sob o No. I-1402.

Uma vez que a estirpe não infecciosa para macrófagos de acordo com o presente invento derivada da estirpe I-1387 é tão fortemente atenuada após passagem sobre células Vero, esta estirpe viva atenuada é extremamente segura, quando administrada a animais (ver Exemplo 2 e posteriores). Por conseguinte, numa outra concretização mais preferida do presente invento, o PRRSV vivo atenuado é da estirpe que está depositada por AKZO Nobel NV na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes do Instituto Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 sob o Número de Acesso I-1758. A esta estirpe foi dada a Referência de Identificação "estirpe DV de PRRSV" sendo assim também referida, neste fascículo, como estirpe DV.

Os vírus vivos atenuados de acordo com o presente invento são, como resultado da sua incapacidade para infectar macrófagos, uma base muito adequada para vacinas pela razão seguinte: Estas estirpes não são infecciosas para os macrófagos. O macrófago é a célula alvo principal de PRRSV de tipo selvagem e uma das células chave do sistema imunitário. No entanto, elas

mantêm ainda a sua capacidade de desencadear o sistema imunitário. Por conseguinte, contrariamente às vacinas baseadas em estirpes vivas atenuadas conhecidas do serótipo europeu descritas no Pedido de Patente Europeia No. EP 0 676 467, as vacinas compreendendo os vírus vivos atenuados de acordo com o presente invento desencadeiam o sistema imunitário sem, simultaneamente, o incapacitarem.

Assim, as vacinas baseadas nas estirpes do presente invento proporcionam uma segurança de um tipo diferente das vacinas baseadas nas estirpes atenuadas conhecidas.

Por conseguinte, ainda numa outra concretização, o presente invento proporciona vacinas para a protecção de porcos contra a infecção por PRRSV, que são baseadas nas estirpes de PRRS vivas atenuadas não infecciosas para macrófagos acima descritas.

Devido à segurança dos vírus não infecciosos para macrófagos, as vacinas baseadas nestes vírus podem conter tipicamente 10^3-10^{10} partículas de vírus vivos.

As vacinas de acordo com o presente invento podem compreender um transportador farmaceuticamente aceitável. Um transportador possível é uma solução salina fisiológica. Um outro transportador farmaceuticamente aceitável é, por exemplo, o fluido da cultura de tecidos utilizado para sustentar o crescimento das células, em que os vírus são libertados a partir das células infectadas.

Pode também incorporar-se na vacina viva atenuada, de acordo com o invento, um adjuvante e, se desejado, um ou mais emulsionantes tais como Tween® e Span®. Os adjuvantes adequados são por exemplo solubilizado de acetato de vitamina E, hidróxido, fosfato ou óxido de alumínio, emulsões em óleo (mineral) tais como Bayol® e Marcol52® e saponinas. A incorporação dos antigénios em *Iscoms* é também uma forma possível de adjuvação.

A vacina de acordo com o invento é produzida, de preferência, numa forma criodessecada. É vantajoso adicionar um estabilizante a vírus vivos atenuados, particularmente se a composição seca de vírus vivos for preparada

por liofilização. Os estabilizantes adequados são, por exemplo, SPGA (Bovamik et al., *J. Bacteriology* 59, 509, 1950), hidratos de carbono (tais como sorbitol, manitol, trealose, amido, sacarose, dextrano ou glucose), proteínas (tais como albumina ou caseína) ou seus produtos de degradação e tampões (tais como fosfatos de metais alcalinos). Se desejado, pode também adicionar-se um ou mais compostos com actividade adjuvante, como acima descrito.

Uma vacina de acordo com o invento pode ser administrada por injecção intramuscular ou subcutânea ou por via intranasal, intratraqueal, oral, cutânea, percutânea/intradérmica ou administração intracutânea. Uma forma muito conveniente de administração é a administração intradérmica ou intramuscular. Por conseguinte, numa concretização preferida, a vacina de acordo com o invento compreende um transportador que é adequado a aplicação intradérmica ou intramuscular. Uma solução salina fisiológica é, por exemplo, um transportador simples e adequado a aplicação intradérmica ou intramuscular.

A vacina de acordo com o invento pode ser administrada a porcos dependendo da história de vacinação das porcas a 1, 3, 6 ou 10 semanas de idade, a porcas antes do acasalamento e/ou até 6 semanas antes de parir (vacinação de reforço) ou a varrões de meio em meio ano (reforços).

Numa forma preferida, a vacina do presente invento compreende, juntamente com o vírus de PRRS vivo atenuado, um outro patogénio ou material antigénico de um outro patogénio, atenuado ou inactivado não relacionado (i.e. que não PRRSV). Um tal patogénio pode ser, por exemplo, uma bactéria ou um parasita, mas pode ser também de origem viral. Normalmente, o patogénio não relacionado ou o seu material antigénico será um patogénio porcino. Uma vacina de acordo com o invento que também compreende um tal patogénio ou material antigénico de um outro patogénio atenuado ou inactivado adicional, tem a vantagem de induzir protecção contra várias infecções ao mesmo tempo. O material antigénico é entendido como o material que é capaz de induzir uma resposta imunogénica. Exemplos de material antigénico são as proteínas, polissacáridos e lipopolissacáridos. Numa forma mais preferida, o patogénio é seleccionado a partir do grupo de vírus *Pseudorabies*, vírus de influenza porcina, parvovírus porcino, vírus de gastrenterite transmissível, Rotavírus, *Escherichia coli, Erysipelo rhusiopathiae, Bordetella bronchiseptica, Salmonella cholerasuis*,



Haemophilus parasuis, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Uma vacina de acordo com o invento pode ser derivada de um qualquer vírus de PRRS vivo atenuado isolado de um serótipo europeu de acordo com o presente invento. A estirpe DV de PRRSV depositada, desenvolvida utilizando métodos de acordo com o presente invento, tem todas as características que a tornam uma estirpe de vacina muito adequada. Assim, numa forma preferida, a vacina é derivada de uma estirpe DV de PRRSV, depositada no Instituto Pasteur sob o Número de Acesso I-1758.

De novo, ainda numa outra concretização, o presente invento proporciona métodos para a preparação de uma vacina viva atenuada para combate ao PRRS. Uma forma conveniente para se obter uma vacina baseada em PRRSV vivo atenuado de acordo com o invento compreende a mistura de uma quantidade adequada de vírus de acordo com o invento com um transportador farmaceuticamente aceitável.

Adicionalmente, podem ser adicionados outros materiais, tais como adjuvantes, emulsionantes e estabilizantes, acima mencionados, para melhorar o desempenho e a estabilidade da vacina.

Exemplo 1: experiências de adaptação

Adaptação de isolado de PRRSV I-1140 a células Vero:

O I-1140, uma estirpe patogénica de PRRSV isolada em 1991 na Holanda (acima mencionada e depositada na Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) do Instituto Pasteur de Paris, França, sob este número), foi primeiramente cultivado em macrófagos de pulmão porcino, e depois feito crescer em células MA104 como se segue:

As monocamadas semi-confluentes de células MA104 (70 cm^2) foram inoculadas com a estirpe de PRRSV a 80% de confluência com um MOI de 1. A inoculação foi realizada primeiramente por remoção do meio de cultura de tecidos, depois adicionou-se 1 ml de vírus PRRSV e deixou-se na monocamada durante, pelo menos, 2 horas a 37°C. Após este período adicionou-se um novo meio de cultura de tecidos e as células foram adicionalmente incubadas a 37°C

em CO_2 humidificado (CO_2 a 5%). Quando se observou CPE, o sobrenadante foi recolhido e as células foram congeladas e descongeladas 3x, centrifugadas durante 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi recolhido. Os dois sobrenadantes foram então reunidos e utilizados para inocular uma monocamada fresca das mesmas células. Este processo foi então repetido até o vírus estar completamente adaptado à linha de células e poderem ser obtidos, nesta linha de células, títulos comparáveis às culturas de macrófagos. Durante este processo, a identidade do vírus foi determinada por Ensaio de Imunofluorescência (IFA) com soro policlonal específico de PRRSV e anticorpos monoclonais específicos de PRRSV.

A 5ª passagem do I-1140 em células MA104 foi utilizada para infectar células CV1 (rim de macaco Verde Africano) pelo método seguinte:

As células CV1 foram deixadas crescer sob condições padrão de crescimento de células. A uma confluência de 70 a 80%, o meio foi removido da monocamada de CV1. O sobrenadante obtido à CPE máxima de uma monocamada infectada de células MA104 foi primeiro filtrado através de um filtro de 0,2 μm e depois colocado na monocamada de CV1. Após um dia de incubação a 37°C e CO_2 a 5%, o meio foi substituído por um novo meio de cultura de tecidos. As células foram adicionalmente incubadas a 37°C e CO_2 a 5%, durante 7 dias. Durante este período as células foram diariamente observadas ao microscópio. Passados 7 dias, as células foram congeladas e descongeladas 3x, os sobrenadantes foram recolhidos por centrifugação e filtrados através de um filtro de 0,2 μm. O material filtrado foi então utilizado para incubar uma nova monocamada de células CV1, como acima descrito. Este processo foi realizado em 3 ciclos, após o terceiro ciclo os sobrenadantes recolhidos e filtrados foram analisados quanto à presença de PRRSV por incubação dos sobrenadantes em células MA104. A presença de PRRSV foi mostrada pela presença de uma fluorescência específica de PRRSV utilizando um anticorpo monoclonal específico de PRRSV, I-1401. (O anticorpo monoclonal I-1401 foi depositado na Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) do Instituto Pasteur de Paris, França, sob este número). Observou-se nos sobrenadantes das células CV1 um título de PRRSV de 6,6 $TCID_{50}$/ml. A passagem 13 de I-1140 em células CV1 foi realizada em células Vero pelo método acima descrito. Nesta altura, após 3 ciclos de passagens cegas, detectou-se PRRSV nos sobrenadantes de células Vero. O

vírus foi adicionalmente adaptado a células Vero realizando 61 passagens em células Vero. Para comparação, a 88ª passagem da estirpe progenitora I-1140 em células MA104, e assim não adaptada a células que não MA104, foi utilizada como controlo na tabela 1, onde se comparou a infecciosidade para macrófagos das várias estirpes.

Adaptação de isolado I-1387 de PRRSV a células Vero

O isolado I-1387 foi primeiro cultivado em macrófagos de pulmão porcino. A 5ª passagem de I-1387 foi então colocada em células MA104 pelo método acima descrito. A passagem 38 de I-1387 em células MA104 foi utilizada para infectar células Vero de acordo com o método dado acima. O PRRSV foi detectado nos sobrenadantes das células Vero. Este isolado foi adicionalmente adaptado a células Vero por realização de 49 passagens nestas células. Esta estirpe foi utilizada nas experiências de segurança e nas experiências de desafio de vacinação descritas nos Exemplos 2 e 3. Para comparação, a 20ª passagem da estirpe progenitora I-1387 em células MA104, e assim não adaptada a células que não MA104, foi utilizada como controlo na tabela 1, onde se comparou a infecciosidade para macrófagos das várias estirpes.

Exemplo 2: sistema de teste de infecciosidade para macrófagos

Neste teste, as quatro estirpes de vírus mencionadas na tabela 1 (ver acima) foram analisadas quanto à sua infecciosidade para macrófagos, como se segue:

Os macrófagos alveolares de suíno foram obtidos como se segue: porcos SPF foram sacrificados, os seus pulmões foram removidos e lavados com 3000 ml de PBS. As células foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas em meio MEM (GIBCO) + FCS a 10% até uma concentração de 0,3 x 10^6 células/ml. Finalmente, as células foram semeadas em placas de microcultura de 96 poços com 225 µl de suspensão de células/poço e as placas foram armazenadas durante quatro dias numa incubadora de CO_2. Imediatamente antes da titulação, as placas de microtitulação foram esvaziadas e cheias de novo com meio fresco. Colocaram-se nos poços amostras de 25 µl compreendendo 10^4 partículas de vírus infecciosas para MA104 do vírus a ser testado e realizaram-se diluições em série de 10 vezes. Finalmente, as placas



foram incubadas numa incubadora de CO_2, durante 7 dias. Não pôde ser detectado qualquer crescimento em macrófagos, medido por CPE, para as estirpes que foram adaptadas às células que não MA104, enquanto que as estirpes de controlo não adaptadas eram infecciosas para os macrófagos, como era de esperar. Os resultados são apresentados na tabela 1 (ver acima).

Exemplo 3: testes de atenuação

Para testar se a adaptação do vírus a estas células induz qualquer atenuação positiva da virulência, testaram-se todas as estirpes de vírus em porcas grávidas pelo método seguinte:

As porcas, negativas para o vírus de PRRS e anticorpos específicos de PRRSV, foram infectadas com uma das estirpes de PRRSV dadas acima, aproximadamente aos 90 dias de gestação. Para se medir a virulência de uma dada estirpe, determinou-se o número de leitões abortados e leitões que morreram numa semana. Obtiveram-se os resultados seguintes:

Estirpe	Dose ($TCID_{50}$)	Nado morto	Morto após uma semana	Vivo após uma semana	Morto (%)	Vivo (%)
1140	10^5	13	11	9	73	26
1140 61p Vero	$10^{7,5}$	15	5	11	65	35
1387	$10^{7,5}$	16	8	34	50	50
1387 49p Vero	$10^{8,6}$	1	4	25	17	83

Tabela 2. Resultados de atenuação.

Pode-se concluir, a partir da tabela 2 apresentada acima, que as estirpes de PRRSV, que perderam a sua infecciosidade para macrófagos, apresentam características atenuadas favoráveis.

Para o I-1140 observaram-se significativamente menos leitões mortos após a infecção das porcas com a estirpe não infecciosa para macrófagos. Dado

o facto de, quando comparada com a estirpe I-1140 progenitora, se ter administrado uma dose trezentas vezes superior de I-1140 adaptado a Vero, estabeleceu-se uma redução muito substancial na virulência. Observou-se um efeito similar na experiência em que se administrou às porcas I-1387. Uma dose de $10^{7,5}$ $TCID_{50}$ induziu ainda um número significativo de leitões mortos. No entanto, com a estirpe não infecciosa para macrófagos, observou-se uma redução marcada na virulência; embora administrada numa dose extremamente elevada (10 vezes superior à dose de $10^{7,5}$ $TCID_{50}$), observou-se a morte de um número significativamente inferior de leitões.

Exemplo 4: Experiências de segurança

I) **Segurança da estirpe DV em leitões com 5-6 semanas de idade. Dose única e dose elevada**

Três experiências envolveram a vacinação de animais alvo; leitões novos. O procedimento destas experiências está sumariado na tabela 3. Para o teste de segurança, os animais foram pesquisados quanto a possíveis sinais clínicos, atribuíveis à vacinação.

Exp. No.	Dose		Método de Aplicação*	Idade (semanas)	Número	Dias de período de observação
	$TCID_{50}$	ml				
131	$10^{6,9}$	2	i.m.	5	10	28
135	$10^{5,5}$	2	i.m	5	10	28
	$10^{5,5}$	0,2	i.d.	5	10	28
	$10^{4,8}$	2	i.m.	5	10	28
	$10^{4,5}$	0,2	i.d.	5	10	28
	$10^{3,5}$	2	i.m.	5	10	28
	$10^{3,8}$	0,2	i.d.	5	10	28
192	$10^{6,6}$	2	i.m.	6	8	3-15
	$10^{6,4}$	0,2	i.d.	6	8	3-15

* i.m.: intramuscular i.d.: intradérmica

Tabela 3.

Resultados:

Nestas experiências, após vacinação, não foram notados sinais clínicos atribuíveis à vacinação.

Conclusão

As estirpes de acordo com o invento são perfeitamente seguras para o animal alvo: o leitão novo.

II) **Segurança em porcas grávidas**

A porca grávida é considerada como o animal mais sensível para estudos de segurança, porque a infecção com vírus de PRRS, aproximadamente aos 90 dias de gestação, conduz a uma elevada percentagem de abortos e mumificações (30-100%) e a uma percentagem elevada de mortes na primeira semana após o nascimento dos leitões nascidos vivos. Neste teste de segurança, cada porca foi inoculada intramuscular e intradermicamente, aos 94 dias de gestação, com uma dose massiva de $10^{8,3}$ $TCID_{50}$ por local de injecção.

As investigações envolveram os pontos seguintes:

- Reacções locais e sistémicas nas porcas
- Nível de anticorpos nas porcas no parto para mostrar a "captação" de vacina
- desempenho reprodutor das porcas
- Re-isolamentos de vírus a partir de amostras de soro de leitões colhidas no dia do nascimento.

Resultados:

O nível de anticorpos medido num Ensaio de Imunofluorescência foi >8 (log_2) em todas as porcas indicando que o vírus tinha sido "captado". Após vacinação não se observaram reacções sistémicas durante um período de 5 dias de monitorização de temperatura e 14 dias de observações clínicas. Apenas se observou uma reacção local menor, numa porca no dia 7 após vacinação i.m.. Durante uma semana após aplicação intradérmica observaram-se reacções cutâneas locais: vermelhidão, calor, pontos palpáveis e algumas lesões. Estas reacções cutâneas locais desapareceram rapidamente e deixaram de ser visíveis na 2ª semana.

Os resultados do desempenho reprodutor estão sumariados na tabela 4:



Porca No.	Número de leitões que morreram	
	Antes ou ao nascer	Durante uma semana após o nascimento
4611	0 de 12	1 de 12
4608*	0 de 15	2 de 15
465	1 de 11	1 de 11

Tabela 4.

* Os dois leitões da porca 4608, colocados com a porca 465, sobreviveram.

O número de leitões que sobreviveram é considerado, pelo menos, um número médio normal (> = 10,08 de acordo com o Handboek voor de Varkenshouderij ISBN 90-800999-3-7). Está completamente de acordo com os desempenhos reprodutor anteriormente encontrados nestas mesmas porcas.

Conclusão

Embora administrada numa dose extremamente elevada no momento óptimo de gestação para induzir o aborto, não se observaram nesta experiência sinais clínicos de infecções por vírus de PRRS.

Exemplo 5: Experiências de vacinação-desafio

Em duas experiências de vacinação-desafio, investigaram-se as propriedades protectoras da vacinação com vírus de PRRS de acordo com o presente invento. Nas duas experiências, vacinaram-se grupos de dez leitões isentos de anticorpos de PRRS com 5 a 6 semanas de idade, com vacina de vírus PRRS estirpe DV, com títulos que variam entre $10^{3,5}$ e $10^{6,9}$ $TCID_{50}$ (ver também tabela 2; grupos 131 e 135). Nestas experiências também se investigaram aspectos de segurança e disseminação. Quatro semanas após a vacinação, estes leitões foram intranasalmente desafiados com 10^5 $TCID_{50}$ de um vírus de PRRS tipo selvagem heterólogo. Após vacinação e desafio monitorizou-se a resposta serológica no animal vacinado assim como nos animais sentinela colocados em contacto directo com os vacinados e nos controlos colocados no mesmo edifício mas fisicamente separados (pocilgas diferentes).

O principal critério para avaliar as propriedades protectoras da vacina foi a quantidade de vírus da estirpe de desafio re-isolado a partir do soro obtido em vários momentos após o desafio. O re-isolamento foi determinado com dois



parâmetros diferentes: determinaram-se o período durante o qual o vírus de desafio podia ser re-isolado e o título do vírus no momento do re-isolamento.

Resultados:

Resposta serológica

Os títulos de anticorpos medidos em IFA em unidades de $\log_2$ após vacinação e desafio são apresentados na tabela 5, para vacinados, sentinelas e controlos.

Vacinados												
Exp. No.	Método de aplicação	Dose	N	Título médio de anticorpos nos dias seguintes								
				Vacinação				Desafio				
				0	14	21	28[2]	0[2]	3	7	10	13/14
131	i.m.	$10^{6.9}$	9	0	6,9	10,0	11,6	11,6				12,0
135	i.m.	$10^{5.5}$	10	0			9,7	9,7	10,9	10,3	11,6	10,7
	i.d.	$10^{5.5}$	10	0			9,5	9,5	10,9	10,9	10,9	11,1
	i.m.	$10^{4.8}$	10	0			10,0	10,0	11,4	10,8	11,4	11,3
	i.d.	$10^{4.5}$	10	0			9,1	9,1	10,6	10,7	11,5	10,4
	i.m.	$10^{3.5}$	10	0			9,3	9,3	10,2	9,8	12,1	11,4
	i.d.	$10^{3.8}$	10	0			9,2	9,2	10,2	10,0	10,8	10,6
Sentinelas												
Exp. No.	Colocado no grupo		N									
131	i.m.	$10^{6.9}$	4	0	0	2,5	4,5	4,5				11,5
135	i.m.	$10^{5.5}$	2	0			0	0	0	0	9,3	9,8
	i.d.	$10^{5.5}$	2	0			0	0	0	0	11,3	10,3
	i.m.	$10^{4.8}$	2	0			4,7	4,7	7,8	7,8	10,8	10,3
	i.d.	$10^{4.5}$	2	0			0	0	0	0	9,8	8,3
	i.m.	$10^{3.5}$	2	0			0	0	0	3,7	7,3	9,3
	i.d.	$10^{3.8}$	2	0			0	0	0	0	7,3	9,3
Controlos												
131			5	0	0	0	0	0				1,6
135			12	0			0,7[3]	0,7[3]	0	0	7,4	8,7

Tabela 5.

[1] i.m. = intramuscular i.d. = intradérmica

[2] Dia 28 após vacinação = Dia 0 após desafio

[3] níveis não específicos

Os maiores títulos de anticorpo foram encontrados na experiência 131. Esta experiência mostrou que já é detectável uma nítida resposta de anticorpos duas semanas após a vacinação. Nas duas experiências, os títulos nos animais vacinados eram muito superiores aos dos controlos, também após o desafio. Este foi especificamente o caso da experiência 131. A resposta serológica medida na experiência 135 após aplicação intramuscular e intradérmica foi comparável. Possivelmente, os títulos mais baixos observados e a reacção de reforço mais lenta foram observados no grupo vacinado com uma dose de $10^{3,5}$ $TCID_{50}$ mas foram também obtidos títulos significativos com esta dose mais baixa testada. Sentinelas: 2 de 4 animais seroconverteram na experiência 131 e 1 de 12 na experiência 135. Nas duas experiências não se observou seroconversão nos controlos mantidos na mesma área dos vacinados mas fisicamente separados.

Re-isolamento do vírus (desafio)

Os títulos médios de PRRSV (log_{10}) encontrados no soro (média para cada grupo) são apresentados na tabela 6 para vacinados, sentinelas e controlos.

Vacinados								
Exp. No.	Método de Aplic.	Dose $TCID_{50}$	Título médio de vírus nos dias após o desafio					Duração média da excreção de vírus em dias
			0	3	6/7	10	13	
131	i.m.	$10^{6,9}$	0	0	0	0	0	0
135	i.m.	$10^{5,5}$	0	0,3	0,9	1,0	0,3	3,5
	i.d.	$10^{5,5}$	0	0,3	0,4	0,8	0,2	2,4
	i.m.	$10^{4,8}$	0	0,3	0,4	0,2	0	1,7
	i.d.	$10^{4,5}$	0	0,2	0,3	0,5	0,3	1,5
	i.m.	$10^{3,5}$	0	0,4	1,6	1,0	0	3,7
	i.d.	$10^{3,8}$	0	0,2	1,1	1,0	0	2,7
Sentinelas								
Exp. No.	Colocadas no grupo		N					
131	i.m.	$10^{6,9}$	4	0	1,3	2,9	3,3	2,6	>13
135	i.m.	$10^{5,5}$	2	0	2,4	3,8	3,6	1,9	13
	i.d.	$10^{5,5}$	2	0	3,1	3,6	3,1	3,1	13
	i.m.	$10^{4,8}$	2	0,9	0,7	0	1,6	0	6,5
	i.d.	$10^{4,5}$	2	0	2,1	3,9	3,6	1,1	11,5
	i.m.	$10^{3,5}$	2	0	2,4	3,6	4,1	3,1	13
	i.d.	$10^{3,8}$	2	0	2,1	3,6	3,6	2,4	13
Controlos								
131			5	0	0	2,9	3,9	3,4	>13
			12	0	2,6	4,0	3,7	1,5	11,5

Tabela 6.

[1] i.m. = intramuscular i.d. = intradérmica

Na experiência 131, não foi re-isolado qualquer vírus de desafio dos animais vacinados. Na experiência 135 verificou-se em todos os grupos uma redução significativa na taxa de re-isolamento e na duração do re-isolamento comparativamente aos controlos não vacinados. Os efeitos referentes à redução no grupo intramuscularmente vacinado com uma dose de $10^{3,5}$ $TCID_{50}$ foram ligeiramente inferiores aos dos outros grupos.

Apenas 2 de 4 sentinelas na experiência 131 seroconverteram após a vacinação, na experiência 135 apenas 1 de 12 animais. Num outro animal sentinela do mesmo grupo (i.m. $10^{4,5}$) isolou-se o vírus de PRRS no momento do desafio o qual era provavelmente vírus de vacina.

Conclusão:

Uma resposta de anticorpo nítida é já detectável duas semanas após a vacinação, e aumenta para títulos elevados. A resposta serológica após aplicação intramuscular e intradérmica é comparável. Obtêm-se títulos significativos até mesmo com uma dose de $10^{3,5}$ $TCID_{50}$. Não se observou em todos os grupos qualquer re-isolamento ou uma taxa de re-isolamento e duração do re-isolamento significativamente reduzidas comparativamente aos controlos não vacinados. O vírus espalha-se para os controlos directos apenas numa taxa muito baixa. Com esta taxa de disseminação, o vírus da vacina extinguir-se-á em poucos ciclos de replicação demonstrando adicionalmente o carácter atenuado das estirpes de acordo com o invento.

Lisboa, [illegible]

Por AKZO NOBEL N.V.
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus do Síndroma Reprodutivo e Respiratório Porcino (PRRSV) vivo atenuado de um serótipo europeu, caracterizado por não ser infeccioso para macrófagos.

2. PRRSV vivo atenuado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser reactivo com o anticorpo monoclonal A27 produzido pelo hibridoma A27 depositado na Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) do Instituto Pasteur de Paris, França, sob o No. I-1401, mas não com o anticorpo monoclonal A35 produzido pelo hibridoma A35 depositado no Instituto Pasteur de Paris, França sob o No. I-1402.

3. PRRSV vivo atenuado de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por ser da estirpe depositada no Instituto Pasteur sob o número de Acesso I-1758.

4. Método para a preparação de PRRSV vivo atenuado de acordo com as reivindicações 1-3, caracterizado por o método compreender a adaptação de um PRRSV que cresceu em MA104 de um serótipo europeu a células de mamífero que não MA104.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por se utilizarem células de primata que não MA104 como células de mamífero que não MA104.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por se utilizarem células Vero como células de primata que não MA104.

7. Vacina para a protecção de porcos contra a infecção por PRRSV, caracterizada por compreender PRRSV vivo atenuado de acordo com a reivindicação 1-3 e um transportador farmaceuticamente aceitável.

8. Vacina de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por compreender adicionalmente um ou mais patogénios atenuados ou inactivados que não PRRSV ou seu material antigénio.

9. Vacina de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por os referidos patogénios que não PRRSV serem seleccionados de entre vírus *Pseudorabies*, vírus de influenza porcina, parvovírus porcino, vírus de gastrenterite transmissível, Rotavírus, *Escherichia coli*, *Erysipelo rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella cholerasuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

10. Vacina de acordo com as reivindicações 7-9, caracterizada por compreender um transportador que é adequado para aplicação intradérmica ou intramuscular.

11. Vacina de acordo com as reivindicações 7-10, caracterizada por estar numa forma criodessecada.

12. Método para a preparação de uma vacina viva atenuada para combate a PRRS, caracterizado por compreender a mistura de um PRRSV vivo atenuado de acordo com as reivindicações 1-3 com um transportador farmaceuticamente aceitável.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se utilizar para mistura o PRRSV vivo atenuado depositado no Instituto Pasteur sob o número de Acesso I-1758.

Lisboa, 20.11.00

Por AKZO NOBEL N.V.
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA