



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

(11) BR 112013017014-0 B1



(22) Data do Depósito: 29/12/2011

(45) Data de Concessão: 15/12/2020

(54) Título: POLIOVÍRUS RECOMBINANTE ATENUADO, SEU USO, VACINA E MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA POLIOVACINA INATIVADA

(51) Int.Cl.: A61K 39/13; C12N 7/04; A61P 31/14.

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2010 GB 1022077.0

(73) Titular(es): THE SECRETARY OF STATE FOR HEALTH.

(72) Inventor(es): ANDREW MACADAM.

(86) Pedido PCT: PCT GB2011001779 de 29/12/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/090000 de 05/07/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 01/07/2013

(57) Resumo: POLIOVACINA INATIVADA. A presente invenção proporciona um poliovírus atenuado tendo uma região de não codificação 5' que consiste na região de não codificação 5' de Sabin 3, modificada de modo que ele não tem uma incompatibilidade de pares de bases na haste (a) ou (b), do domínio V, em que sete ou oito dos pares de bases das hastes (a) e (b) são pares U-A ou U-A, e uma proteína de cápside da cepa de Sabin 1, Mahoney, MEF ou Saukett.

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "POLIOVÍRUS RECOMBINANTE ATENUADO, SEU USO, VACINA E MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA POLIOVACINA INATIVADA".**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5            Esta invenção refere-se a poliovacinas inativadas. Em particular, a invenção refere-se a poliovacinas inativadas, poliovírus atenuados utilizados na produção de poliovacinas inativadas, e à preparação de tais poliovacinas inativadas.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

10          A Iniciativa Global de Erradicação da Pólio da Organização Mundial da Saúde (OMS) tem feito grandes progressos. A principal ferramenta utilizada no programa tem sido a vacina de pólio oral atenuada. Esta vacina viva atenuada foi conhecida durante muitos anos por causa da poliomielite associada com a vacina em uma pequena proporção de pacientes ou  
15          os seus contatos, e, mais recentemente, por ser capaz de reverter para um fenótipo transmissível, causando surtos em várias partes do mundo, onde os programas de vacinas vêm tornando-se menos vigoroso conforme a poliomielite desaparece. Excreção prolongada de poliovírus derivados de vacinas por alguns pacientes imunodeficientes, também tem sido bem documentada.  
20          O uso da vacina da poliomielite oral e sua capacidade para alterar o seu fenótipo é, portanto, um problema para a erradicação da poliomielite a nível mundial.

25          Seria muito imprudente parar a vacinação imediatamente, acredita-se que o último vírus de tipo selvagem tenha sido isolado porque o vírus tipo selvagem pode estar circulando despercebido devido à má fiscalização em algumas áreas. Além disso, os indivíduos imunodeficientes podem continuar a excretar o vírus durante muito tempo após a vacinação e podem ser uma fonte para o reaparecimento. Além disso, pode ainda haver surtos provocados pela vacina oral a partir dos últimos ciclos de sua utilização.

30          Vacinação e vigilância devem portanto continuar por algum tempo após a erradicação do vírus tipo selvagem ser declarada. Isto requer a utilização de poliovírus em laboratórios engajados na vigilância e na

produção de vacinas, que estarão principalmente envolvidos na fabricação de poliovacina inativada (IPV) do tipo desenvolvido por Salk.

A vacina de Salk é baseada em três cepas virulentas tipo selvagens de poliovírus ou seja, as cepas Mahoney (poliovírus tipo 1), MEF-5 1 (poliovírus tipo 2) e Saukett (poliovírus tipo 3) cultivadas em células Vero ex vivo (Wood et al, Biologicals 25:59-64, 1997). O poliovírus tipo selvagem em seguida, é inativado com formalina para produzir a IPV. As cepas tipo selvagem atualmente utilizadas na produção de IPV são conhecidas por serem paralíticas em seres humanos e são utilizadas em grandes 10 quantidades na produção de IPV. Isto representa um problema sério de contenção, que pode não ser fácil de conciliar com as escalas de produção exigidas para IPV. Algum interesse tem sido expresso em usar as mesmas cepas na fabricação de vacina inativada como são utilizadas na vacina oral, alegando que elas são atenuadas e, portanto, apresentam menos perigo que 15 ela possam escapar. No entanto, a sua instabilidade na replicação em humanos significa que elas permanecem perigosas, e as suas propriedades imunogênicas são diferentes das das cepas do tipo selvagem atualmente utilizadas de modo que um grande programa de desenvolvimento clínico seria necessário para desenvolver uma IPV baseada nestas cepas.

As vacinas de poliovírus vivas atenuadas desenvolvidas por Sabin na década de 50, utilizando os procedimentos essencialmente empíricos têm sido utilizadas em todo o mundo como poliovacinas orais vivas. Ao longo dos últimos anos, os cientistas têm empregue um certo número de técnicas de biologia molecular na tentativa de elucidar o 25 mecanismo pelo qual a neurovirulência destas cepas de vacina é reduzida. A maioria dos trabalhos tem se concentrado nos sorotipos 1 e 3. Para ambas estas sequências nucleotídicas completas das cepas de vacina têm sido comparadas com as dos seus progenitores neurovirulentos. No caso do poliovírus tipo 1, a cepa da vacina difere da sua progenitora em 47 posições 30 no genoma de base 7441 (Nomoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 79:5793-5797, 1982). Estudos análogos no poliovírus tipo 3 revelam apenas 10 diferenças de sequência de nucleotídeos no genoma de base 7432 entre

a vacina e a sua cepa progenitora (Stanway et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81:1539-1543, 1984).

A cepa do tipo 2 foi desenvolvida a partir de um progenitor naturalmente atenuado, mas a análise de uma cepa neurovirulenta 5 revertente, isolada de um caso da poliomielite associada à vacina, identificou 17 diferenças de Sabin 2 (Pollard et al., J. Virol 63:4949-4951 , 1989).

Anteriormente foi proposto um modelo para a estrutura secundária da região de não codificação 5' do genoma da cepa de poliovírus tipo 3 (Skinner et al., J. Mol Biol 207:379-392, 1989). No que se refere ao 10 domínio V (nucleotídeos 471-538), bases nas posições 471-473 e 477-483 são combinadas com bases nas posições 538-536 e 534-528, respectivamente, como segue:

471	477	483
... U C C ...	C C A U G G A ...	
... A G G ...	G G U G G C C U ...	
538	534	528

Por conveniência, as regiões emparelhadas são denominadas haste (a) (471-473/538-536) e haste (b) (477-483/534-528). Poliovírus 15 atenuados, em que um par de base da haste (a) ou haste (b), do domínio V é invertido são divulgados na EP-A-0383433. Poliovírus atenuados que não têm um par de base U-G ou outra incompatibilidade de par de base (saindo do pareamento de bases Watson-Crick) na haste (a) ou (b), do domínio V da região de não codificação 5' do genoma do poliovírus são descritos em 20 W098/41619 e em WO 2008/017870. Estes poliovírus atenuados têm substancialmente a mesma atenuação que, ou maior atenuação que, a cepa da vacina Sabin original (de modo que eles são seguros de usar), mas são muito mais estáveis geneticamente.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

25 Os presentes inventores desenvolveram cepas de poliovírus recombinantes intertípicas para utilização como sementes de IPV. As cepas de poliovírus da invenção têm propriedades imunogênicas melhoradas e capacidades de crescimento melhoradas em células de cultura de tecidos.

As cepas de poliovírus da invenção são também atenuadas e geneticamente estáveis, tornando-se seguras para utilização na produção de IPV. Em particular, os presentes inventores descobriram surpreendentemente que os poliovírus recombinantes intertípicos compreendendo uma região de não codificação 5' geneticamente modificada de Sabin 3, proteínas da cápside de Sabin 1, Mahoney, MEF ou Saukett e regiões de codificação não estruturais e regiões de não codificação 3' de Sabin 3 melhoraram propriedades imunogênicas em comparação com a cepa Sabin 3 com as mesmas modificações genéticas da região de não codificação 5'. As cepas de poliovírus da invenção podem ser cultivadas em cultura de tecidos e têm a imunogenicidade necessária para atuar como sementes de IPV, mas não se replicam em humanos elas devem ser expostas a grandes quantidades.

Consequentemente, a presente invenção proporciona um poliovírus recombinante atenuado tendo:

(i) uma região de não codificação 5' que consiste na região de não codificação 5' de Sabin 3, modificada de modo que ela não tem uma incompatibilidade de pares de bases na haste (a) ou (b), do domínio V, em que sete ou oito dos pares de bases nas hastes (a) e (b) são pares de bases U-A ou A-U, e

(ii) uma proteína de cápside da cepa Sabin 1, Mahoney, MEF ou Saukett. A invenção também proporciona:

- um poliovírus inativado da invenção para utilização em uma vacina;

- a utilização de um poliovírus da invenção, tal como uma semente de poliovacina inativada (IPV);

- uma vacina compreendendo um poliovírus inativado e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável, e, opcionalmente, um adjuvante;

- um método para a preparação de uma poliovacina inativada, compreendendo:

(i) crescimento de um poliovírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 em cultura de células ex vivo;

- (ii) inativação do poliovírus; e
- (iii) formulação do poliovírus inativado com um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

5 A Figura 1 mostra a estrutura secundária prevista de RNA de domínio V (nucleotídeos 471-538) da cepa de vacina tipo 3 de Sabin 3 e cepas S15, S17; S18 e S19. Mutações introduzidas em cepas modificadas são mostradas em negrito.

10 A Figura 2 mostra as estruturas genômicas das cepas modificadas baseadas em S18. Sítio de restrição exclusivo, presente ou introduzido na cepa S18, é usado para trocar o domínio V e/ou região de codificação de proteína de cápside (PI). A nomenclatura vírus segue o formato em "S19/MahP1" indica um vírus com a sequência de domínio V S19, a sequência de cápside de Mahoney e a região de codificação não 15 estrutural de Sabin 3.

20 A Figura 3 ilustra a sensibilidade à temperatura de cepas tipo 3 em diferentes células. Os vírus foram ensaiados por formação de placas em temperaturas diferentes em células L20B, Vero, MRC5 e células Hep2C e os resultados foram representados em gráficos que mostram a redução de PFU a cada temperatura em comparação com a UFP a 31°C.

A Figura 4 mostra o crescimento em uma etapa, em células MRC5 a 33°C. Folhas de células replicadas de forma síncrona foram infectadas com o vírus tipo 3, incubados a 33°C, em seguida, colhidas em diferentes épocas e as titulações dos vírus determinadas.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O genoma do poliovírus é uma molécula de RNA linear única que é traduzida pela célula hospedeira como um polipeptídeo longo. O RNA de poliovírus comprehende uma extremidade 5' longa, altamente estruturada, que não codifica um produto polipeptídico e contém seis domínios, I a VI. 30 Vários desses domínios (incluindo o domínio V) juntos formam um sítio de entrada ribossômica interno (IRES), que determina a iniciação da tradução. A região de codificação do RNA de poliovírus é dividida em duas zonas, uma

que codifica para as proteínas estruturais que formam a cápside viral, e a outra que codifica para proteínas não estruturais, tais como proteases virais e um RNA dependente de RNA polimerase viral. A região não traduzida 3' é menos complexa do que a região de não codificação 5'.

- 5 Os presentes inventores desenvolveram cepas recombinantes intertípicas de poliovírus que possuem mutações no domínio V da região de não codificação 5', e assim são ambas atenuadas em comparação com as cepas de poliovírus do tipo selvagem e geneticamente estáveis. As cepas recombinantes de poliovírus intertípicas da invenção também têm uma ou  
 10 mais proteínas de cápside provenientes de cepas de poliovírus de Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, Mahoney, MEF ou Saukett. Proteínas de capsíde de poliovírus formam a camada de proteína que envolve a partícula de poliovírus. Estas proteínas de cápside estão expostas ao sistema imune do hospedeiro e direcionam a resposta imune do hospedeiro para o poliovírus.  
 15 Alterar a proteína de cápside do poliovírus recombinante intertípico permite que as propriedades imunogênicas do poliovírus sejam manipuladas.

Por conseguinte, os poliovírus atenuados da invenção compreendem a região de não codificação 5' proveniente de Sabin 3, que foi modificada de modo que as hastes (a) e (b) do domínio V não contêm uma  
 20 incompatibilidade de pares de bases e sete ou oito dos pares de base nas hastes (a) e (b) são pares de bases A-U ou U-A. O poliovírus atenuado da invenção também compreende uma proteína de cápside, tal como uma proteína de cápside, mais do que uma proteína de cápside, ou todas as proteínas estruturais provenientes da cepa de Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3,  
 25 Mahoney, MEF ou Saukett, de preferência de Sabin 1, Mahoney FAE e/ou Saukett e mais preferencialmente de Mahoney, MEF e/ou Saukett.

#### Modificação do domínio V

Os poliovírus atenuados da invenção são geneticamente estáveis e seguros para utilização como sementes de IPV. Isto é conseguido  
 30 através do enfraquecimento da estrutura do domínio V na região de não codificação 5' por substituição de pares de bases GC por pares de bases AU de modo que duas mutações simultâneas são necessárias para regenerar o

tipo selvagem, e a substituição de pares de bases GU por pares de bases UA para evitar a reversão para GC por uma única mutação e consequente reforço das estruturas. Tem sido mostrado que os vírus ajustados de modo que a estabilidade termodinâmica do domínio V é a mesma que a da cepa de vacina Sabin tipo 3 e têm as mesmas propriedades biológicas, mas são estáveis na passagem (Macadame et al., (2006) J. Virol. 80 (17):8653-63). O poliovírus atenuado da invenção compreende uma "região de não codificação 5' consistindo na região de não codificação 5' de Sabin 3, modificada de modo que ela não tenha uma incompatibilidade de pares de bases na haste (a) ou (b) do domínio V, em que sete ou oito dos pares de bases das hastas (a) e (b) são pares de bases U-A ou U-A.

Em uma modalidade preferida, o poliovírus atenuado da invenção compreende um domínio modificado V da região de não codificação 5' de Sabin 3, em que um par de bases U-A está presente nas posições 471-538 e 472-537 na haste (a) e nas posições 478-533, 480-531 e 481-530 na haste (b), e um par de bases A-U está presente nas posições 479-532 e 482-529 na haste (b). A sequência do domínio V modificado pode ser:

AUUCUAACUAUUAAAGCAGGCAGCUGCAACCCAGCAGCCAG  
20 CCUGUGGUAA CGCGCAAGUUAAAAGCGAAA (SEQ ID NO: 1).

Em uma outra modalidade preferida, o poliovírus atenuado da invenção compreende um domínio V modificado da região de não codificação 5' de Sabin 3, na qual um par de bases U-A está presente nas posições 471-538 e 472-537 na haste (a) e nas posições 478-533, 480-531 e 481-530 na haste (b), e um par de bases A-U está presente nas posições 477-534, 479-532 e 482-529 na haste (b). A sequência do domínio V modificado pode ser:

AUUCUAAAUAUUAAAGCAGGCAGCUGCAACCCAGCAGCCAG  
CCUGUCGUA CGCGCAAGUUAAAUCGAAA (SEQ ID NO: 2).

30 Poliovírus da invenção pode ser, correspondentemente, derivado da sequência de hastas (a) e (b) de poliovírus de Sabin 1 ou Sabin 2.

As mutações na região de não codificação 5' do poliovírus da

invenção atenuam a virulência dos vírus e geneticamente estabilizam os vírus, tornando-os menos suscetíveis a reverter para virulência. Estas mutações, assim, tornam o vírus seguro para produzir a um nível de contaminação mais baixo do que o nível requerido de contenção para os 5 vírus do tipo selvagem utilizados atualmente para produzir poliovacinas inativadas.

Mutações no domínio V podem ser introduzidas por qualquer um dos métodos convencionais de mutagênese conhecidos na técnica. A mutação pode, por exemplo, ser introduzida em uma cepa de poliovírus, 10 normalmente uma cepa de Sabin, por mutagênese direcionada a sítio de uma cópia de DNA correspondente ao RNA genômico de um poliovírus. Isto pode ser conseguido por subclonagem de uma região adequada de uma cópia de DNA infecciosa do genoma do poliovírus na única cadeia de DNA de um bacteriófago, tal como M13. Alternativamente, uma sequência mutada 15 pode ser sintetizada inteiramente in vitro.

Após a introdução da mutação ou de cada, a cópia de DNAs subclonados modificadas são reintroduzidas na cópia de DNA completa da qual foram derivadas. Vírus vivo é recuperado da cópia de DNA de comprimento completo mutada pela produção de um RNA de sentido 20 positivo, usando tipicamente um promotor T7 para direcionar a transcrição in vitro (Van der Werf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 83:2330-2334, 1986).

O RNA recuperado pode ser aplicado a culturas de tecidos, utilizando técnicas convencionais (Koch, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 61 :89-138, 1973). Após dois ou três dias de incubação, o vírus pode ser 25 recuperado a partir do sobrenadante da cultura de tecidos. O nível de neurovirulência e, portanto, de atenuação do vírus modificado pode então ser comparado com o do vírus não modificado utilizando um teste padrão DL<sub>50</sub> em camundongos que são transgênicos para o receptor do poliovírus humano do teste de segurança e vacinas aprovadas pela OMS em macacos 30 (OMS . Tech. Rep. Ser. 687.: 107-175).

A atenuação devida ao enfraquecimento do domínio V, também tem sido demonstrada se correlacionar aproximadamente com a

sensibilidade à temperatura em células BGM (Macadam et al., Virology 181:451-458, 1991) ou em células L20B (como descrito para células CM-1 en Macadam et al., Virology 189:415-422, 1992). A sensibilidade à temperatura de vírus modificado pode assim ser determinada como uma  
 5 seleção preliminar para determinar o nível de atenuação esperado. Isto pode ser expresso como a temperatura (T) na qual o número de formação de placas utilizando (pfu) é reduzido por uma potência de 10 (1,0 Log<sub>10</sub>) uma vez que o número tenha sido obtido, por exemplo, a 33 °C ou 35 °C nas mesmas células. Quanto mais baixo o valor de T, maior é o grau de  
 10 atenuação.

#### Região de Codificação Estrutural

A região de codificação estrutural do genoma do poliovírus codifica proteínas de cápside que formam o revestimento de proteína protetor das partículas de poliovírus. O poliovírus atenuado da invenção  
 15 pode compreender uma ou mais proteína de cápside de cepa de Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, Mahoney, MEF ou cepa Saukett, de preferência de Mahoney, MEF e/ou Saukett. Em uma modalidade preferida, o poliovírus atenuado da invenção compreende todas as proteínas da cápside de cepa de Sabin 1, Mahoney, MEF ou Saukett. O poliovírus da invenção pode  
 20 compreender proteínas da cápside de qualquer combinação das diferentes cepas, por exemplo, de Mahoney e MEF, de Mahoney e Saukett, de FAE e Saukett ou de Mahoney, MEF e Saukett.

Cepas recombinantes intertípicas podem ser produzidas por técnicas convencionais conhecidas na área.

#### 25 Região de codificação não estrutural e região de não codificação 3'

O poliovírus da invenção pode ter uma região de codificação não estrutural e uma região de não codificação 3' de qualquer uma das cepas de Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, Mahoney, MEF e Saukett.

Em uma modalidade preferida, o poliovírus atenuado da  
 30 invenção tem uma região de codificação não estrutural e uma região de não codificação 3' derivada de Sabin 3. Produzir o poliovírus da invenção em uma cepa de estrutura principal de Sabin 3 trocando as proteínas de cápside

como um cassete elimina qualquer possível efeito conhecido ou desconhecido de recombinação in vitro ou in vivo, entre as cepas de fora para as regiões da cápside. Isto também torna a construção mais fácil e as propriedades dos vírus mais previsíveis.

5                  Em uma modalidade, o poliovírus atenuado da invenção tem uma região de codificação não estrutural e uma região de não codificação 3' derivada de Sabin 1 ou Sabin 2, em particular quando a região de não codificação 5' é derivada de Sabin1 ou Sabin 2.

Mutações no gene da protease 2A

10                Um poliovírus atenuado da invenção pode compreender uma mutação no gene de protease 2, a referida mutação está associada com rendimentos mais elevados de partículas imunogênicas em linhagens celulares de origem do macaco, tais como células Vero. Tais mutações podem ser obtidas por passagem de um poliovírus da invenção para células  
15                Vero ou através de qualquer técnica mutagênica padrão.

A mutação no gene da protease 2A é normalmente aquela que é obtida por passagem de um poliovírus da invenção para células Vero. Outras mutações no gene da protease 2A que aumenta o rendimento do poliovírus em linhagens celulares de macaco podem também ser introduzidas. A  
20                mutação no gene da protease 2A pode ser introduzida diretamente através da mutação de um clone infeccioso do poliovírus.

Em uma modalidade, um poliovírus atenuado da presente invenção compreende uma mutação no gene da protease 2A que não altera os resíduos H20, D38 ou C109. Em uma modalidade preferida, a mutação  
25                do gene da protease 2A do polivírus compreende uma das seguintes alterações de aminoácidos: A8V, Y10C, 17CY, N18S, T19C, Y19H, L21R, T23I, E25G, A30P, I33V, W35R, K45E, G48D, E65K, E65V, Y70C, T79A, F80L, Y82H, Y93H, H96Y, S105T, P106S, I122V, V123A, G127R, V131A E S134T.

30                As mutações no gene de protease 2A estão associadas à redução da sensibilidade à temperatura e/ou uma maior aptidão em linhagens celulares de origem do macaco, tais como as células Vero, mas

mantendo o grau de atenuação que é observado em poliovírus correspondentes que não possuem a mutação de protease 2A.

Assim, a invenção também proporciona um método para a produção de poliovírus atenuados compreendendo uma mutação no gene da 5 protease 2A compreendendo passagem de um poliovírus da invenção para células Vero e selecionando poliovírus com uma mutação no gene de protease 2A associada com rendimentos mais elevados de partículas imunogênicas, a seleção envolvendo:

(i) o sequenciamento do gene da protease 2A e a identificação 10 de mutações adequadas, ou

(ii) a triagem dos poliovírus para identificar partículas virais com um grau de atenuação inalterado, ou substancialmente inalterado, e sensibilidade à temperatura reduzida, em comparação com os poliovírus da invenção que não foram passados para células Vero.

15 Os ensaios de sensibilidade à temperatura podem, por exemplo, ser realizados utilizando células Vero como descrito em Macadam et al., Virology 189:415-22, 1992.

Mutações no gene da protease 2A podem ser introduzidas por 20 quaisquer métodos conhecidos de introdução de mutações no DNA, como descrito acima.

De preferência, os poliovírus da invenção que são cultivados em células não humanas, tais como células Vero, em métodos de produção de IPV compreendem pelo menos uma mutação no gene da protease 2A, tal como aqui descrito.

## 25 Vacinas

Os poliovírus da invenção podem ser usados em pequena escala nas atividades de vigilância, tais como estudos de soroprevalência e em grande escala na produção de IPV. Os poliovírus da invenção requerem confinamento mínimo prévio para a erradicação do vírus da poliomielite, e 30 contenção de pós-erradicação na categoria BSL3-poliomielite como requerido pelo guia da OMS atual para as cepas viáveis infecciosas para humanos não seria necessária.

Os poliovírus atenuados podem portanto ser utilizados como sementes (IPV). Assim, a presente invenção proporciona um poliovírus atenuado inativado da invenção. A invenção também proporciona a utilização de Um poliovírus, de acordo com a invenção, tal como uma semente de IPV.

Também proporcionado pela invenção é um método para a preparação de uma poliovacina inativada, compreendendo:

- (i) crescimento de um poliovírus atenuado de acordo com a invenção através de cultura celular ex vivo;
- 10 (ii) inativação do poliovírus; e
- (iii) formulação do poliovírus inativado com um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

O poliovírus atenuado pode ser cultivado em células não humanas cultivadas tais como células L20B e células Vero. O poliovírus atenuado pode ser cultivado em células humanas cultivadas tais como células MRC5 e Hep2C.

O poliovírus pode ser inativado por qualquer método adequado. Normalmente, os métodos utilizados para inativar poliovírus tipo selvagem nas IPVs atualmente utilizadas são empregados. Por exemplo, o poliovírus 20 pode ser inativado por formaldeído, β-propiolactona ou tratamento com etileneirnina binária, de preferência por tratamento com formaldeído.

Um poliovírus atenuado de acordo com a invenção pode ser inativado. As cepas de poliovírus atenuados inativados da invenção podem ser combinadas com um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. Qualquer veículo ou diluente convencionalmente utilizado em preparações de vírus inativados, tais como preparações de IPV, pode ser empregue. A preparação de IPV pode compreender poliovírus inativado compreendendo proteínas de cápside de tipo 1, tipo 2 e/ou tipo 3.

Os poliovírus inativados atenuados da invenção podem, 30 portanto, ser usados para vacinar contra a poliomielite, em um paciente humano. Por conseguinte, a invenção proporciona um método de vacinação de um indivíduo contra o poliovírus, o método compreendendo a

administração a um indivíduo com tal necessidade, de uma quantidade eficaz de um poliovírus inativado da invenção. Uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para induzir uma resposta imune protetora contra o poliovírus. Para esta finalidade, eles podem ser administrados por qualquer 5 via adequada, tal como por via parenteral. A administração parentérica pode ser por injeção subcutânea, intradérmica ou intramuscular. Os poliovírus inativados da invenção podem ser administrados com um adjuvante.

Uma dose correspondente à quantidade administrada por uma 10 IPV convencional, tal como 8 a 40 unidades de antígeno D, pode ser administrada.

A dose do poliovírus recombinante inativado intertípico da invenção pode ser ajustada para alcançar o grau necessário de imunogenicidade. Por exemplo, quando uma proteína de cápside é derivada de Sabin 2 ou Sabin 3 uma dose mais elevada pode ser usada do que 15 quando a proteína de cápside é derivada de Sabin 1, MEF, Mahoney ou Saukett. Por exemplo, uma dose de cerca de 16 a cerca de 80 unidades de antígeno D, tal como cerca de 30 unidades de antígeno D (por exemplo, 32 unidades de antígeno D), ou cerca de 60 unidades de antígeno D (por exemplo, 64 unidades de antígeno D) pode ser utilizada. As doses mais 20 baixas podem ser utilizadas, se a vacina for administrada com um adjuvante apropriado.

A presente invenção proporciona uma vacina compreendendo 25 um poliovírus inativado da presente invenção e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. A vacina pode ainda compreender um adjuvante. A vacina pode compreender uma ou mais cepas de poliovírus recombinante intertípico diferente da invenção. Por exemplo, a vacina pode compreender uma mistura de vírus que compreende proteínas estruturais de 30 cepas de poliovírus do tipo 1 e tipo 2, tipo 1 e tipo 3, tipo 2 e tipo 3 ou tipo 1, tipo 2 e tipo 3. Tipicamente, as proteínas da cápside do tipo 1 serão de Sabin 1 ou Mahoney, preferencialmente Mahoney, a proteína de cápside do tipo 2, de Sabin 2 ou MEF, preferencialmente MEF e as proteínas da cápside do tipo 3 de Sabin 3 ou Saukett, preferencialmente Saukett.

Tendo em vista as diferentes immunogenicidades relativas do poliovírus do tipo 1, tipo 2 e tipo 3 da invenção, a vacina pode conter quantidades diferentes de poliovírus contendo proteínas de cápside tipo 1, tipo 2 e/ou tipo 3. Por exemplo, uma proporção tipo 1: tipo 2: tipo 3 x: y: z 5 pode ser utilizada, em que x < y < z. Em um exemplo específico, a proporção pode ser 30:32:45 unidades de antígeno D.

O poliovírus inativado da invenção pode ser administrado como uma poliovacina independente ou em uma vacina de combinação, contendo outros componentes, tais como DTP (difteria, tosse convulsa, tétano), Hib 10 (Haemophilus influenza do tipo B) ou hepatite B.

A presente invenção também proporciona: a utilização de um poliovírus inativado de acordo com a invenção na fabricação de um medicamento para utilização em um método de vacinação contra a poliomielite, e um poliovírus inativado de acordo com a invenção para 15 utilização em um método de vacinação contra o poliovírus.

Os seguintes Exemplos ilustram a invenção.

#### Exemplos

##### Exemplo 1: Construção de novas cepas

S 15, S17, S18 e S19 (Tabela 1, Figura 1) são derivados da 20 cepa de poliovacina oral tipo 3 Sabin 3. Os vírus foram construídos e recuperados através de métodos padrão. Nucleotídeos mutantes são mostrados em negrito na Figura 1, caso contrário, as sequências são idênticas às de Sabin 3. Substituição de pares de bases CG por pares de base UA ou AU reduz progressivamente a estabilidade termodinâmica do 25 domínio V; remoção de todas os pares de bases UG tornando a estrutura geneticamente estável como uma única mutação, então, enfraqueceria os pares de bases relevantes. Duas mutações simultâneas seriam obrigadas a reforçar a estrutura, pois isso só poderia ser alcançado através da troca do par de base UA por um par de base CG (ou GC).

30 Os vírus foram construídos e recuperados através de métodos padrão. Mais especificamente, S17, S18 e 19 S foram construídos por mutagênese de PCR. Para cada plasmídeo, três fragmentos da região de

não codificação 5' de Sabin 3, foram amplificados por PCR utilizando iniciadores que incorporam as alterações de sequência necessária (como mostrado na Figura 1), localizados nos nucleotídeos (a) 31-50 e 471-489, (b) 471-489 e 522-540 e (c) 522-540 e 755-778. Os três fragments sobrepostos 5 (a) - (c) foram purificados em gel, misturados e reamplificados com iniciadores externos então o fragmento 747bp compreendendo a mutação da região de não codificação 5' foi clonada em pCR2.1 (Invitrogen) e sequenciada. Fragmentos M1ul-Sacl (279-751), com sequências corretas foram ligados em clones Sabin 3 sem o fragmento Sacl-Sacl (751-1900). Os 10 clones infecciosos de comprimento completo foram gerados pela adição de um fragmento parcial Sacl/Smal (2768).

As regiões de codificação de proteínas de cápside (P1) de ambos S18 e S19 foram substituídas exatamente pelas regiões das cepas de vacinas vivas atenuadas sorotipo 1 e sorotipo 2 (Sabin 1 e Sabin 2) ou 15 pelas regiões P1 das cepas de semente IPV do tipo selvagem Mahoney (tipo 1), MEF (tipo 2) e Saukett (tipo 3). Sequências da cápside foram amplificadas por PCR utilizando RNA da cepa de poliovírus relevante como modelo e os iniciadores que incorporaram os sítios de restrição Sacl e SacII nas extremidades 5' e 3' (Figura 2) sem alterar a sequência de codificação.

20 regiões Sabin 1 e Mahoney P1 foram amplificadas utilizando iniciadores:

- SACI [5'-ATCATAATGGGAGCTCAGGTTCA-3'] (SEQ ID NO: 3) e
- 2ASAC1(-) [5'TTGTAAACCCGCGGTGTACACAGCTTATTCTGA  
TGCCCCAAAGCC ATATGTGGTCAGAT-3'] (SEQ ID NO: 4).

25 A região P1 Sabin 2 foi amplificada com:

- SAC2a [5'-ACAATGGGCGCTCAA-3'] (Seq ID NO: 5) e
- 2ASAC2(-) [5 -TTGTAAACCCGCGGTGTACACAGCTTATTCTGA  
TGCCCCAAAGCC AT AAGTCGTTAAC-3'] (SEQ ID NO: 6).

A região P1 MEF foi amplificada com:

- 30
- SAC2b [5'- AC AATGGG AGCTC AA-3'] (SEQ ID NO: 7) e
  - 2ASACMEF(-) [5'-TTGTAAACCCGCGGTGTACACAGCTTATT  
TGATGCCAAAGCC ATAGGTTGTCAAGC-3'] (SEQ ID NO: 8).

A região P1 Saukett foi amplificada utilizando os iniciadores:

- S3P1 [5'-AACTGCAGGCCAGCCGGCATGGCCGGAGCTC  
AAGTATCATCCCAA-3'] (SEQ ID NO: 9) e
- 2ASACSkt(-) [5'-TTGTAACCCGCGGTGTACACAGCTTATT  
5 TGATGCCAAAGCCGTAGGTGGTCAAAC-3'] (SEQ ID NO: 10).

Um local de restrição SacII foi introduzido em S18 por mutagênese de PCR utilizando os iniciadores:

- 2ASAC3(+) [5'-GTGTACACCGCGGGTTACAA-3'] (SEQ ID NO: 11) e
- 2ASAC3(-) [5'-TTGTAACCCGCGGTGTACAC-3'] (SEQ ID NO: 12).

10 Sequências de fragmentos de DNA compreendendo as cópias de todas as regiões P1 foram verificadas antes de incorporação em plasmídeos genômicos de comprimento completo usando sítios de restrição SacI e SacII. Assim, doze amostras finais foram produzidas (Tabela 2, Figura 2), que diferem na sua sequência de domínio V (como tipo S18 ou 15 tipo S19) e a sua sequência de codificação da proteína de cápside (Sabin ou tipo selvagem, serotipos 1, 2 ou 3). As sequências das regiões de não codificação 5' de todos os mutantes foram confirmadas seguinte à extração de RNA e RT-PCR.

Os vírus foram recuperados por transfecção de monocamadas 20 HEp2C com  $\geq 2 \mu\text{g}$  transcrições T7 (Van der Werf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 83:2330-2334, 1986), seguido por incubação a 33 °C durante 24-48 horas, altura em que o efeito citopático completo era aparente.

#### Exemplo 2: Fenótipos de Atenuação e Infectividade

Ao longo dos últimos 15 anos, a utilização de camundongos 25 transgênicos que expressam o receptor do poliovírus humano para avaliar a virulência de poliovírus foi estabelecida e validada.

Inoculação intraespinhal de camundongos transgênicos expressando o receptor de poliovírus (camundongo TgPVR) é um método altamente sensível de medir a infeciosidade in vivo, uma vez que a 30 replicação do vírus leva à perda neuronal e sinais clínicos evidentes de paralisia. Menos de dez PFU de vírus de tipo selvagem é normalmente suficiente para paralisar 50% dos camundongos, utilizando esta via de

inoculação (Chumakov et al., Dev. Biol (Basel) 105: 171 -177, 2001).

O fenótipo de atenuação das cepas mutantes de Sabin 3 e das cepas recombinantes intertípicas foi determinado por este método padrão. Os resultados são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

**5 Tabela 1: Efeito de substituição de domínio V nos fenótipos de atenuação**

<b>Camundongo TgPVR</b>	
<b>PD<sub>50</sub> i.s. /log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub></b>	
Sabin 1	2.25
Mahoney	≤ 0.7
S15/1	2.0
S18/1	>8.6 (1/16)
Sabin 2	6.4
Sabin 3	3.6
S15	3.7
S17	7.4
S18	> 8.4 (0/16)
S19	> 8.2 (0/16)
Leon	0.7
*	paralisado/total na dose mais alta

Tabela 2: Fenótipos Atenuação de novas cepas de vacina candidatas

<b>Camundongo TgPVR</b>	
<b>PD<sub>50</sub> i.s. /log<sub>10</sub> CCID<sub>50</sub></b>	
S18/S1P1	> 8.25 (0/8)*
S18/MahP1	> 8.3 (0/8)
S19/S1P1	> 8.15 (0/8)
S19/MahP1	> 8.10 (0/8)
S18/S2P1	> 8.0 (0/8)
S18/MEFP1	> 8.2 (0/8)
S19/S2P1	> 8.15 (0/8)
S19/MEFP1	> 8.25 (0/8)
S18	> 8.4 (0/16)
S18/SktP1	> 8.15 (0/8)
S19	> 8.2 (0/16)
S19/SktP1	> 8.45 (0/8)
*	paralisado/total na dose mais alta

Utilizar a via intraespinal altamente sensível a menos de 10 unidades infecciosas de cultura de células do tipo selvagem e cepas de Mahoney Leon foi suficiente para paralisar metade dos camundongos (Tabela 1). Cepa S15 era indistinguível de Sabin 3, como observado no 5 macaco de teste Macadame et al., 2006), e todos os vírus derivados de S18 tiveram  $PD_{50}$ s em excesso de  $10^8$  CCID<sub>50</sub> (Tabelas 1 e 2). Estes são provavelmente subestimados, pois representam a titulação máxima possível na dose inoculada, que é 5  $\mu$ l. O efeito de 3 trocas de pares de base CG-UA em vírus derivados de E19, por extrapolação, deve provavelmente estar 10 superior a uma redução de mil vezes na infectividade neste modelo. Estes resultados sugerem que os vírus com base em S18 e S19 seriam substancialmente menos infecciosos para humanos do que Sabin 3, que tem uma baixa infectividade a menos que ele reverta no domínio V (que estas cepas não podem).

#### 15 Exemplo 3: Estabilidade na passagem

Para avaliar a estabilidade, os vírus foram passados a 37 °C em células L20B sob condições que selecionam rapidamente reversão no domínio V de Sabin 3, imitando seleção no intestino humano. Sob estas condições, as sequências de domínio V de S15 e S16 (fenotipicamente 20 semelhante a S15) foram completamente estáveis (Macadam et al., 2006). Vírus derivados de S18 e S19 foram também estáveis em passagem e têm a vantagem de mutações emparelhadas não reversíveis adicionais. O mesmo aconteceu em células Vero, mas a seleção de reversão no domínio V de Sabin 3 ocorreu em um ritmo mais lento.

25 Todos os vírus selecionados Vero tinham uma mutação no gene da protease 2A e cresceu a temperaturas mais elevadas do que os seus progenitores, de uma forma limitada. Este fenômeno representa uma adaptação a células de macaco e não é observado em células de origem humana ou de camundongo. Estas mutações parecem não ter nenhum 30 efeito sobre a fenótipos in vivo (Tabela 3). Os  $PD_{50}$ s de um dos vírus após 10 passagens em células Vero a 37°C, e três das placas selecionadas a 37°C foram indistinguíveis dos seus progenitores, S18.

De igual modo, a presença da mutação N18S em 2A não teve nenhum efeito sobre a atenuação de fenótipos das cepas S19-IPV com cápsides de tipo selvagem (Tabela 4). Na dose mais elevada administrada intraespinalmente não houve nenhuma doença clínica em nenhum dos 5 camundongos. Resultado semelhante foi obtido anteriormente no modelo de macaco da poliomielite. Duas mutações diferentes 2A, que suprimiram o fenótipo sensível à temperatura de Sabin 2, causado pela mutação atenuante em 481 no domínio V, não afetou a atenuação (Rowe et al., *Virology* 269:284-293, 2000).

10 Tabela 3: Fenótipos de atenuação de mutantes S18 2A in vivo

	<b>Camundongo TgPVR</b>
	<b>PD<sub>50</sub> i.s. /log<sub>10</sub></b>
	<b>CCID<sub>50</sub></b>
S18	>8.4 (0/8)*
S18 p10V	>8.2 (0/8)*
S18/2A-V123A	>7.9 (0/8)*
S18/2A-G127R	>7.9 (0/8)*
S18/2A-Y82H	>7.8 (0/8)*

\* paralisado/total na dose mais alta

Tabela 4: Fenótipos de atenuação de mutantes S19 2A<sup>pro</sup>

	<b>Camundongo TgPVR</b>
	<b>PD<sub>50</sub> i.s. /log<sub>10</sub></b>
	<b>CCID<sub>50</sub></b>
S19/MahP1/2A-N18S	>7.7 (0/8)*
S19/MEFP1/2A-N18S	>7.9 (0/8)*
S19/MEF2P1/2A-N18S	>7.5 (0/8)*
S19/SktP1/2A-N18S	>7.0 (0/8)*

\* paralisado/total na dose mais alta

Exemplo 4: Propriedades de Crescimento em Cultura Celulares

Em cultura celulares, enfraquecimento progressivo da estrutura secundária de RNA do domínio V reduziu progressivamente o limite superior 15 da temperatura a que o vírus era capaz de se replicar (Figura 3). Os limites reais dependeram do substrato celular usado com células Hep2C sendo mais permissivas, células L20B menos, e células Vero intermédia. Células MRC5 também são intermediárias, mas mais permissivas do que as células

Vero.

As cinéticas de crescimento e produção de todas as cepas foram semelhantes em células MRC5 a 33°C, produzindo rendimentos tão elevados quanto os vírus do tipo selvagem ( $10^8$  -  $10^9$  DICC<sub>50</sub>/mL) em 24 horas (Figura 4). Células MRC5 são validadas e licenciadas para a produção de IPV embora não muitos fabricantes as usem, preferindo cultura de células Vero sem soro em microveículos. Rendimentos iniciais em células Vero são variáveis, dependendo da fonte e do nível de passagem das células, mas eram rotineiramente menores do que em células MRC5. Até agora, as titulações de  $2 \times 10^8$  / ml foram obtidas às 24 horas para o vírus S18 e  $5 \times 10^7$  / ml para vírus S19. No entanto, a prova preliminar (abaixo) sugere que os rendimentos de antígeno D em células Vero equivalentes aos obtidos com as sementes do tipo selvagem atuais podem ser obtidos.

#### Exemplo 5: Imunogenicidade

Os dois ensaios de liberação de batelada padrão para produtos IPV são o teste de ELISA de antígeno D e o teste de imunogenicidade de camundongo (European Pharmacopoeia-supplement 2001 2000:0214 1289-1293). O ensaio ELISA utiliza anticorpos específicos para vírions nativos de pólio para medir a antigenicidade e, em seguida, a potência é expressa por comparação com uma preparação padrão. Para o ensaio *in vivo* grupos de ratos foram imunizados com quatro diluições de vacina e os seus soros foram testados quanto à presença de anticorpos neutralizantes. Potência de vacina é calculada por comparação estatística das taxas de seroconversão para as preparações de ensaio com as obtidas com uma preparação padrão. Ambos os ensaios foram empregues para avaliar a imunogenicidade das novas cepas aqui descritas.

Para todos os vírus indicados na Tabela 5, os estoques de uma titulação elevada de vírus foi preparado e inativado com formaldeído usando o protocolo do fabricante escalonado para baixo (Martin et al., J. Gen. Vir. 84:1781-1788, 2003). ELISAs de antígeno D foram realizados em material antes e depois da inativação. Esses dados foram utilizados para calcular doses adequadas para ensaios *in vivo*, que foram realizados utilizando

Procedimentos Operacionais Padrão de liberação de lote da vacina. Vacinas passam no teste de rato, se 95% do limite de confidência de potência incluir o valor 1,0, assim todas as construções com cápsides do tipo selvagens (e S18/S1P1) eram suficientemente imunogênicas para ser liberadas como

5 IPV.

Poliovírus MEF-1 foi isolado em 1942 e continha pelo menos dois componentes intimamente relacionados; cepas MEF-1 atualmente utilizadas pelos fabricantes de IPV também diferem em várias posições de nucleotídeos (Odoom, JK, PhD Thesis, London School of Hygiene and 10 Tropical Medicine, 2008). A sequência de aminoácidos da proteína de cápside do vírus S18/MEFP1 foi encontrada diferindo daquela da cepa de referência de potência de IPV em uma posição de modo que outra versão, S18/MEF2P1, foi construída, que tinha a mesma sequência de aminoácidos da cápside como referência. Em ensaios de imunogenicidade de rato 15 S18/MEF2P 1 era indistinguível da cepa de referência tendo uma potência relativa de 1,0 (Tabela 4), enquanto que o vírus S18/MEFP1 tinha uma potência ligeiramente inferior. Ambas as cepas eram suficientemente potentes para passar por um teste de liberação do lote de vacina (o IC deve incluir um valor de 1,0), mas é provável que as cepas MEF2P1 com 20 sequências de proteína de cápside sejam preferíveis para a produção de vacina.

Tabela 5: Antigenicidade e imunogenicidade de novas cepas

	Pré-inativação de unidade CCID <sub>50</sub> /D Ag (log <sub>10</sub> )	Rendimento D Ag após inativação (%)	Pós-inativação de unidade CCID <sub>50</sub> /D Ag (log <sub>10</sub> )	Potência relativa in vivo (95% CI)
S18/S1P1	5.6	6	6.8	1.5 (0.8-3.0)
S18/MahP1	6.0	11	7.0	1.2 (0.6-2.3)
S18/S2P1	7.0	90	7.1	0.1 (0.04-0.2)
S18/MEFP1*	7.0	91	7.1	0.5 (0.2-1.0)
S18/MEF2P1*			7.3	1.0 (0.4-2.4)
Sabin 3	6.9	38	7.3	0.4 (0.2-0.9)
S18	6.7	23	7.3	0.3 (0.1-0.7)
S18/SktP1	6.8	90	6.9	1.6 (0.8-3.3)

\* S18/MEFP1 contém uma única diferença de aminoácidos na região da proteína de cápside em comparação com a cepa MEF usada para fazer a referência IPV; S18/MEF2P1 é idêntica na região da proteína de cápside para a cepa MEF usada para fazer referência IPV.

5                   Após a análise estatística, os resultados mostraram:

(i) As alterações introduzidas no domínio V não tiveram nenhuma influência sobre a inativação, antigenicidade ou a imunogenicidade.

10                  (ii) Os rendimentos de imunógeno em termos de DAGU / titulação infecciosa inicial estiveram na linhagem com os dados do fabricante.

(iii) As cepas com proteínas de cápside do tipo selvagem foram aproximadamente tão imunogênicas quanto a cepa de IPV equivalente.

15                  (iv) Em comparação com a cepa de referência do tipo-selvagem relevante, as cepas com proteínas da cápside Sabin foram ligeiramente mais (tipo 1), muito menos (tipo 2) e ligeiramente menos (tipo 3) imunogênicas.

#### Exemplo 6: Crescimento e Estabilidade em células Vero

Quando cepas S18 e S19 de poliovírus são cultivadas em células Vero, a sua replicação inicial é muito lenta. Poliovírus com mutações 20 específicas no gene de protease 2A crescem de forma mais eficiente em células Vero. Quando muitos poliovírus são cultivados em células Vero que se adaptam ao crescimento nesse tipo de célula, e ele é mutações no gene da protease 2A que são responsáveis pelo aumento da eficiência de crescimento. Versões das cepas S18 e S19 que possuem uma modificação 25 apropriada introduzida no gene 2A (por exemplo, a mutação N18S) não requerem a etapa de adaptação e replicam eficientemente em células Vero desde o início.

O efeito de uma mutação V123A no gene da protease 2A de Sabin 3, S18 e S19 sobre crescimento em células Vero foi demonstrado 30 através da infecção de células Vero em uma multiplicidade de infecção de 1,0 e incubando as células durante 48 h a 33 °C. Os rendimentos foram medidos através de um ensaio CCID<sub>50</sub>em células Hep2C a 33 °C. Os

resultados são apresentados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Efeito de mutações 2A sobre rendimento\* em células Vero

	$\log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{ml}$	30
+ 2A-V123A		
<b>Sabin 3</b>	8.5	8.7
<b>S18</b>	7.8	8.6
<b>S19</b>	7.2	8.3 35

O vírus S18/MahP1 é um vírus equivalente com uma mutação introduzida no gene 2A, S18/MahP1/2A N18S, foi cultivado em células Vero 5 a três temperaturas diferentes ao longo de 10 passagens para determinar a estabilidade da sequência do gene de protease 2A e da sequência do domínio V. Como mostrado na Tabela 7, a seguir, a sequência do domínio V e a sequência de gene 2A de protease mutada N18S foi completamente estável. A sequência de gene 2A de protease não mutada apanhou 10 mutações que facilitam o crescimento em células Vero, como esperado.

Tabela 7: Estabilidade de sequência após 10 passagens em células Vero

	Temperatura de passagem	Sequência de dominio V	Sequência 2A <sup>pro</sup>
<b>S18/MahP1</b>	33°C	Sem mudança	Mutações selecionadas*
	35°C	Sem mudança	Mutações selecionadas*
	37°C	Sem mudança	Mutações selecionadas*
<b>S18/MahP1/2A N18S</b>	33°C	Sem mudança	Sem mudanças
	35°C	Sem mudança	Sem mudanças
	37°C	Sem mudança	Sem mudanças

\* L17R, N18S, L21R, P90S, S105T ou D138N

## REIVINDICAÇÕES

1. Poliovírus recombinante atenuado, caracterizado pelo fato de que apresenta:

(i) uma região não codificante 5' que consiste na região não codificante 5' de Sabin 3, modificada de modo que ela não tenha um mal pareamento de pares de bases na haste (a) ou (b), do domínio V,

em que:

(a) um par de bases U-A está presente nas posições 471 a 538 e 472 a 537 na haste (a) e nas posições 478 a 533, 480 a 531 e 481 a 530 na haste (b) e um par de bases A-U está presente nas posições 479 a 532 e 482 a 529 na haste (b); ou

(b) um par de bases U-A está presente nas posições 471 a 538 e 472 a 537 na haste (a) e nas posições 478 a 533, 480 a 531 e 481 a 530 na haste (b) e um par de bases A-U está presente em posições 477 a 534, 479 a 532 e 482-529 na haste (b); e

(ii) uma região codificante de capsídeo P1 da cepa Sabin 1, Mahoney, MEF ou Saukett.

2. Poliovírus de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta uma região codificante não estrutural e uma região não codificante 3' derivada de Sabin 3.

3. Poliovírus de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma mutação no gene da protease 2A, a referida mutação sendo associada com rendimentos mais elevados de partículas imunogênicas em células de origem de macaco, e em que a referida mutação é qualquer uma ou mais das seguintes alterações de aminoácidos: A8V, Y10C, C17Y, N18S, Y19C, Y19H, T23I, E25G, A30P, I33V, W35R, K45E, G48D, E65K, E65V, Y70C, T79A, F80L, Y82H, Y93H, H96Y, S105T, P106S, I122V, V123A, G127R, V131A e S134T.

4. Poliovírus de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 3, caracterizado pelo fato de que é inativado.

5. Poliovírus de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é para uso em uma vacina.

6. Poliovírus de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é para uso em um método de vacinação contra poliovírus.

7. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende um poliovírus, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

8. Uso de um poliovírus, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é como uma semente de poliovacina inativada (IPV).

9. Uso de um poliovírus, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para utilização em um método de vacinação contra poliovírus.

10. Método para a preparação de uma poliovacina inativada, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) cultivar um poliovírus, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em cultura de células *ex vivo*;

(ii) inativar o poliovírus; e

(iii) formular o dito poliovírus inativado com um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o poliovírus é cultivado em células não humanas.

1/4

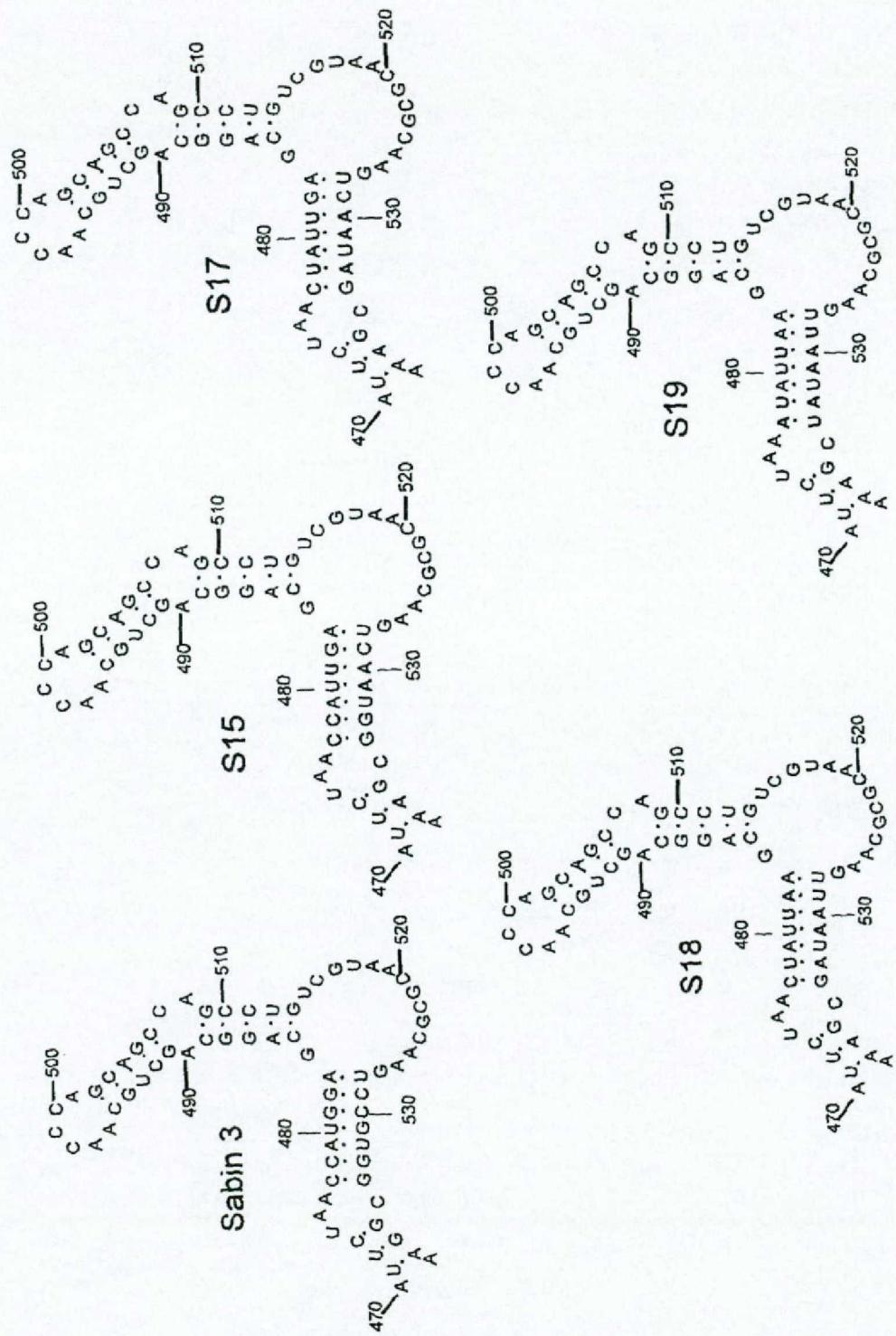


FIG. 1

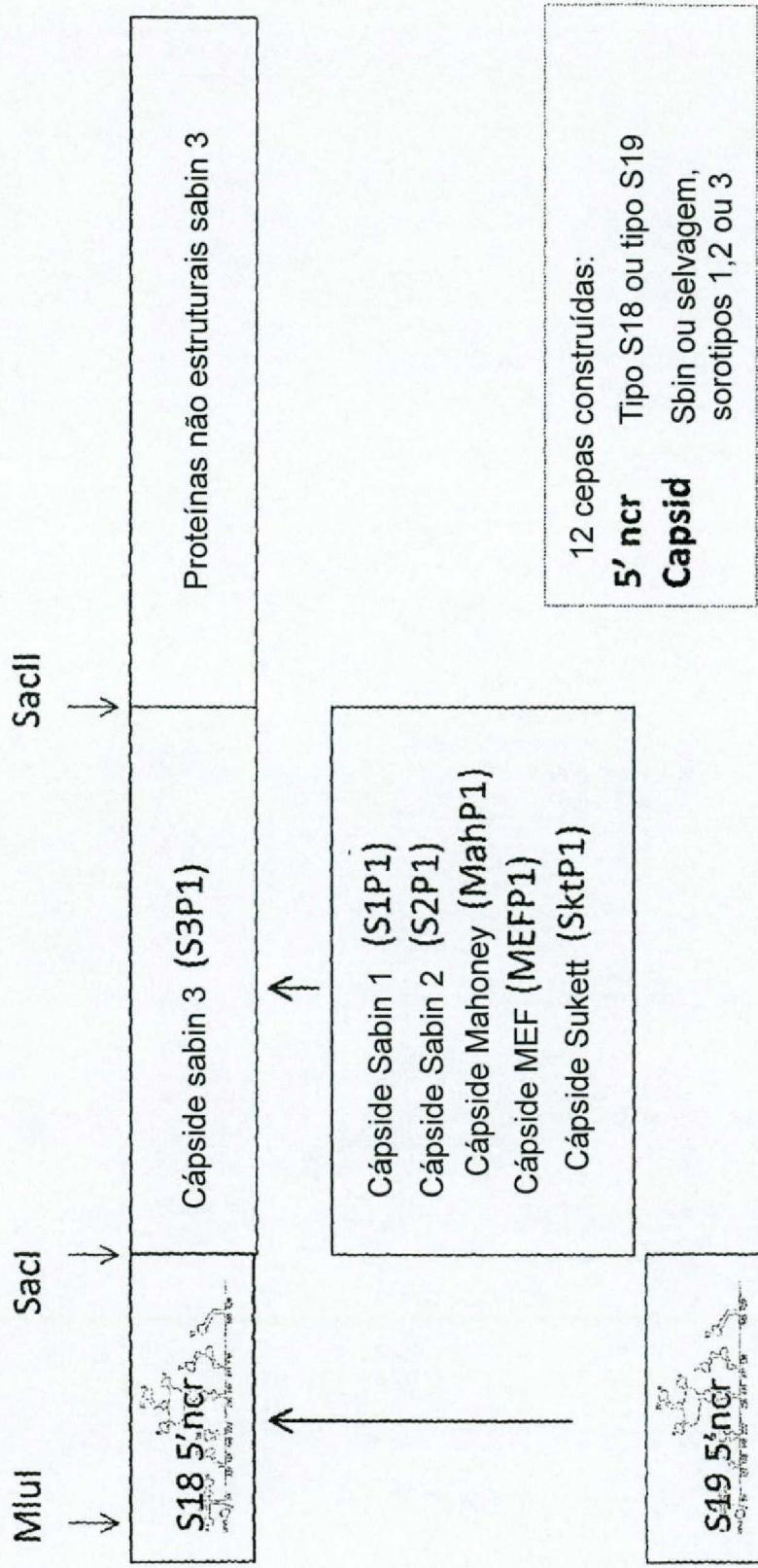


FIG. 2

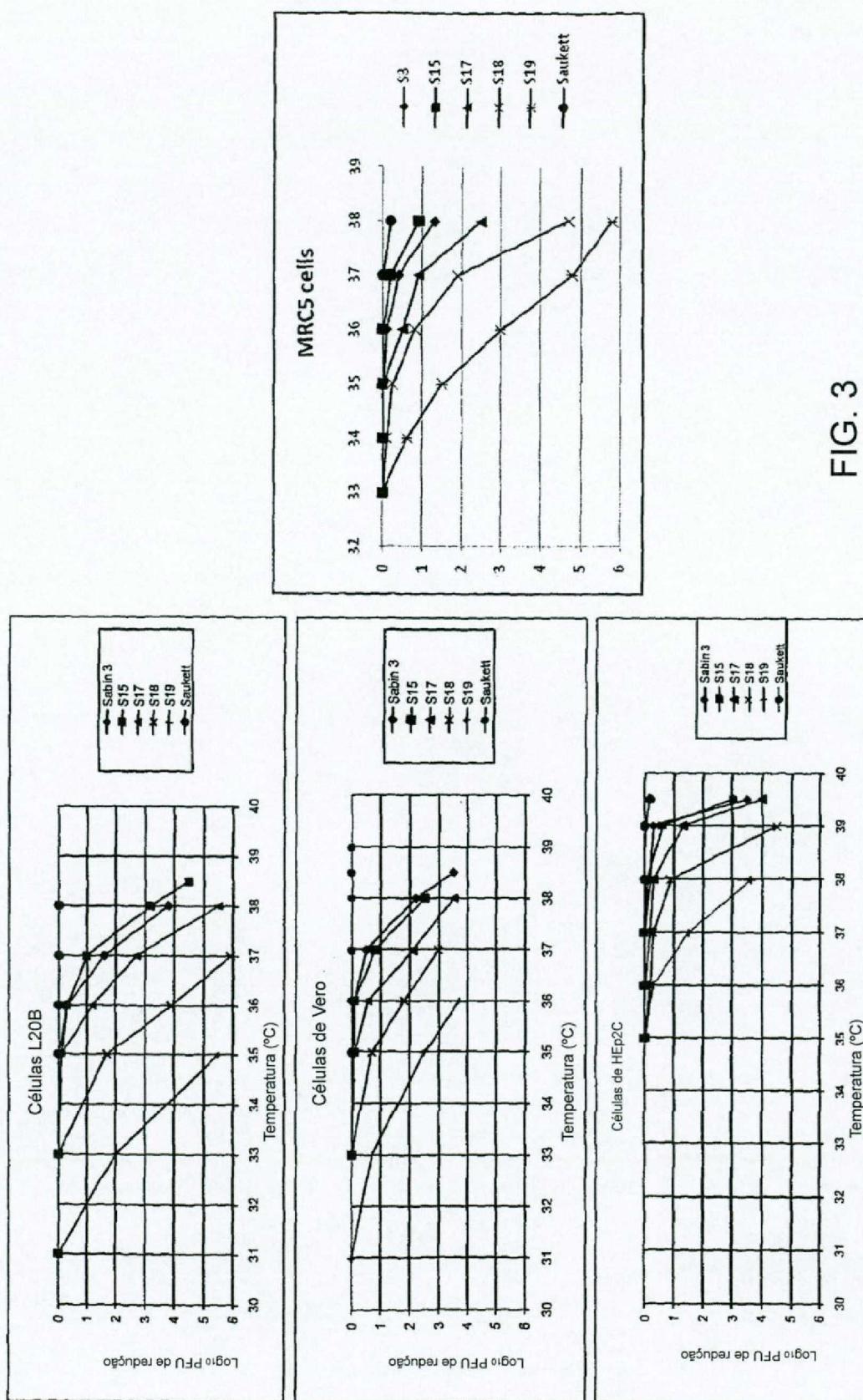


FIG. 4

