

(11) Número de Publicação: **PT 1517987 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/21 (2011.01) **C12N 7/02** (2011.01)
C12N 5/07 (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.03.19**

(30) Prioridade(s): **2002.03.20 US 366014 P**
2003.03.18 US 391498

(43) Data de publicação do pedido: **2005.03.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.06.01**
131/2011

(73) Titular(es):

MERIAL LIMITED
3239 SATELLITE BOULEVARD, BUILDING 500
DULUTH, GA 30096 **US**

(72) Inventor(es):

FREDERIC R. DAVID **US**
MICHAEL E. TANNER **US**

(74) Mandatário:

ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **CÉLULAS DE PULMÃO DE RATO-DO-ALGODÃO PARA CULTURA DE VÍRUS**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADAS UMA LINHA CELULAR DE RATO-DO-ALGODÃO, UTILIZAÇÕES DE CÉLULAS DE RATO-DO-ALGODÃO PARA CRESCIMENTO, PROPAGAÇÃO OU CULTIVO DE ORGANISMOS, PATÓGENOS OU VÍRUS, TAL COMO PRRSV E UTILIZAÇÕES DOS ORGANISMOS, PATÓGENOS OU VÍRUS RESULTANTES.

DESCRIÇÃO

"CÉLULAS DE PULMÃO DE RATO-DO-ALGODÃO PARA CULTURA DE VÍRUS"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a uma nova linha celular e suas utilizações, incluindo um novo método para a produção do vírus que causa a doença suína, conhecida como síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRS).

De um modo mais geral, a descrição refere-se à propagação de organismos ou patógenos, tais como vírus, e. g., vírus virulentos ou atenuados, utilizando células de pulmão de rato-do-algodão ou as células ou a linha celular de acordo com a invenção (e. g., células depositadas para a produção de organismos ou patógenos, tais como vírus, e. g., vírus virulentos ou atenuados, tais como organismos ou patógenos, e. g., vírus que, normalmente, não têm roedores ou ratos ou o rato-do-algodão ou a célula de pulmão de rato-do-algodão como um hospedeiro natural, ou vírus de ARN, por exemplo vírus de ARN de cadeia positiva, de cadeia simples, como vírus da Ordem Nidovirales, por exemplo, artevírus ou vírus na família Arteriviridae, e. g., vírus de elevação da lactato desidrogenase (LDV), vírus da arterite equina (EAV), vírus da febre hemorrágica símia (SHFV) e vírus de PRRS (cujo vector é tipicamente artrópodes); vírus na família Coronaviridae, e. g., coronavírus, tais como vírus da bronquite infecciosa, coronavírus canino, coronavírus felino, coronavírus 229E humano, vírus da diarreia epidémica porcina, vírus da gastroenterite

transmissível, vírus da gastroenterite transmissível porcina, vírus respiratório porcino, coronavírus bovino, coronavírus OC43 humano, vírus da hepatite murina, vírus da encefalomielite de hemaglutinação porcina, coronavírus de rato, vírus da sialodacrioadenite, vírus da bronquite infecciosa aviária, coronavírus de peru, coronavírus de coelho (também vírus cujo vetor é tipicamente artrópodes) e Torovírus, tais como torovírus equino, torovírus porcino, torovírus humano, torovírus bovino.

Os vírus propagados, de um modo vantajoso, utilizando células de pulmão de rato-do-algodão ou as células ou linha celular de acordo com a descrição incluem Parainfluenza Canino (CPI), e. g., CPI tipo 2 (CPI-2), adenovírus, tais como adenovírus canino (CAV), e. g., adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), adenovírus porcino (PAV), e. g., adenovírus porcino tipo 3 e tipo 5 (PAV-3), herpesvírus bovino, e. g., herpesvírus bovino tipo 1 (responsável por rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR)), herpesvírus equino (EHV), e. g., tipo 1 (EHV-1) ou tipo 4 (EHV-4), rotavírus bovino (BRV), vírus parainfluenza bovino tipo 3 (PI-3), coronavírus bovino entérico e respiratório (BCV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV).

De um modo mais vantajoso, o vírus é o vírus de PRRS.

E em formas de realização bastante vantajosas, as células de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular é a que foi depositada na ATCC como PTA-3930 ou uma célula de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular tendo todas as características de identificação de ATCC PTA-3930 ou uma célula de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular produzida através do cultivo de células de pulmão de rato-do-algodão até, pelo menos, 10, e. g.,

até, pelo menos, 21 ou 76 ou 100 passagens, tais como 10 ou mais, ou 21 ou mais, ou 76 ou mais passagens, e. g., pelo menos, 10 ou 21 ou 76 passagens e, de um modo vantajoso, até (e incluindo) 100 passagens e o estabelecimento de uma linha celular, de modo a que as células de pulmão de rato-do-algodão sejam essencialmente células epiteliais e as características morfológicas sejam mantidas ao longo das passagens.

Consequentemente, a descrição refere-se a tais células ou linha celular, assim como todas as suas utilizações.

Os vírus propagados utilizando células de pulmão de rato-do-algodão ou células ou a linha celular de acordo com a invenção são úteis para a preparação de composições imunogénicas e vacinas contra doenças causadas pelos vírus, tal como PRRSV. Do mesmo modo, organismos ou outros patógenos propagados utilizando as células de pulmão de rato-do-algodão ou células ou a linha celular de acordo com a invenção são úteis para a preparação de composições imunogénicas e de vacina contra esses outros patógenos ou organismos.

Esta descrição também se refere à utilização de vírus cultivados por passagem em células de acordo com a invenção, por exemplo, proporcionar composições imunogénicas e vacinas atenuadas, inactivadas e subunitárias; e, deste modo, a descrição refere-se a tais composições imunogénicas e vacinas atenuadas, inactivadas ou subunitárias.

ANTECEDENTES

A síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRS) foi descrita, em primeiro lugar, na Carolina do Norte (EUA) em 1987. Esta doença suína foi definida naquele momento como "Doença Suína Misteriosa" ou MSD e, mais tarde, foi conhecida como "Síndrome Respiratória e de Infertilidade Suína" ou SIRS. Surgiu, depois, na Europa Central em 1990. No início, na Europa, a doença foi denominada "Síndrome Abortiva e Respiratória Epidémica Porcina" ou PEARS e, finalmente, "Síndrome Reprodutiva e Respiratória Porcina" ou PRRS que se tornou a denominação mundialmente aceite.

O vírus de PRRS é um vírus com envelope, de ARN de cadeia simples, isolado pela primeira vez nos Países Baixos e denominado como vírus de Lelystad. Foi classificado como um membro da família Arteriviridae. Os vírus da família Arteriviridae estão na Ordem Nidovirales. Outros vírus na Ordem Nidovirales são vírus na família Coronaviridae, tais como coronavírus e torovírus.

A PRRS foi descrita no documento WO92/21375. Um isolado, como depositado na *Collection Nationale de Culture de Micro-organismes* (CNCM) do Instituto Pasteur, Paris, França, sob o número de acesso I-1102. Um tipo da América do Norte também foi isolado (documento WO93/03760) e o vírus foi depositado na *American Type Culture Collection* (ATCC), sob o número de acesso VR-2332.

Em porcas, a doença PRRS é caracterizada por distúrbios reprodutivos e sintomas respiratórios. As células alvo para os vírus de PRRS são as células de macrófago.

Um dos problemas que tem impedido a obtenção de produtos imunológicos contra o vírus de PRRS é a disponibilidade limitada de substratos estáveis para a replicação de vírus.

O vírus de PRRS poderia apenas ser amplificado em culturas de macrófagos alveolares porcinos (PAM) (Wensvoort G., et al., *in The Vet. Quart.* 13:121-130, 1991). A necessidade de utilizar porcos isentos de doença de uma determinada idade para a obtenção destes macrófagos implicava várias desvantagens. Além disso, a susceptibilidade a infecção viral não estava garantida nos PAM recuperados, devido aos substratos celulares derivados de diferentes animais serem sempre variáveis. Isto colocava uma importante desvantagem na produção de lotes antigénicos de qualidade constante e homogénea e cada lote necessitava de ser avaliado, de modo a determinar a sua susceptibilidade.

Tem havido investigação para outros substratos celulares. Deste modo, na PATENTE U.S. Nº 5476778, 15 linhas celulares obtidas de diversas espécies (e. g., bovina, canina, felina, humana, porcina, símia) e de diversos tecidos (e. g., rim, pulmão, testículo) foram testadas para a cultura de vírus de PRRS. Das 15 linhas celulares, apenas um tipo (células de MA-104) permite o crescimento de vírus de PRRS.

Linhos celulares de rim de macaco (por exemplo VERO, MA-104, MARC-145, ver, respectivamente, a PATENTE U.S. Nº 5476778 e documento WO98/00165) são utilizadas para a cultura e atenuação de vírus de PRRS. Mas os títulos de vírus de PRRS nestas células são baixos e, por conseguinte, o custo de produção é elevado.

Papp *et al.* 1997 (*J General Virology* 78: 2933-2943) descrevem um modelo animal para a infecção de herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). Papp *et al.* mostram que o BHV-1 pode replicar-se em células de pulmão de rato-do-algodão (CRL) *in vitro*.

O documento EP 0676467 descreve estirpes Europeias do vírus de PRRS que estão atenuadas. O documento EP 0676467 divulga vacinas para a protecção de porcos contra a PRRS. O documento EP 0676467 descreve anticorpos monoclonais que são reactivos com PRRS e anticorpos monoclonais que são não reactivos com as estirpes atenuadas.

Embora as vacinas de PRRS inactivadas e atenuadas estejam, agora, comercialmente disponíveis, seria de grande valor ter substratos celulares alternativos para produzir vírus de PRRS, e. g., para a produção de vacinas ou composições imunogénicas. E, de um modo mais geral, seria de grande valor ter substratos celulares alternativos para produzir patógenos, tais como vírus, por exemplo, vírus de ARN, por exemplo, vírus de ARN de cadeia positiva, de cadeia simples, como vírus da Ordem Nidovirales, tais como artevírus ou vírus na família Arteriviridae e vírus na família Coronaviridae, e. g., para a produção de vacinas ou composições imunogénicas.

Além disso, seria vantajoso proporcionar uma nova linha celular de pulmão de rato-do-algodão.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na verificação de que embora os roedores não sejam hospedeiros naturais para vírus de PRRS,

as células de pulmão do rato-do-algodão são permissivas a crescimento ou propagação de vírus de PRRS. Além disso, uma nova linha celular derivada de tecido de pulmão de rato-do-algodão foi produzida e depositada.

A presente invenção também é baseada na verificação de que as células de pulmão do rato-do-algodão também são permissivas a crescimento ou propagação de outros vírus, cujos vírus não são um patógeno natural de roedores. Estes vírus incluem vírus parainfluenza canino tipo 2 (CPI-2), adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1), herpesvírus equino tipo 4 (EHV-4), rotavírus bovino (BRV) e coronavírus bovino (BCV).

A presente invenção refere-se a uma linha celular de rato-do-algodão, depositada na *American Type Culture Collection*, sob o número de acesso ATCC PTA-3930.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para produção de um vírus compreendendo a propagação do vírus em células de pulmão de rato-do-algodão; em que o vírus é o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV) e em que as células de pulmão de rato-do-algodão são as células da linha celular de rato-do-algodão ATCC PTA-3930.

Num aspecto adicional, a presente invenção refere-se à utilização de células de pulmão de rato-do-algodão para a propagação de PRRSV, em que as células de pulmão de rato-do-algodão são as células da linha celular de rato-do-algodão ATCC PTA-3930.

A presente invenção, num aspecto adicional, refere-se a uma cultura compreendendo PRRSV e células de pulmão de rato-do-algodão, em que as células de pulmão de rato-do-algodão são as células da linha celular de rato-do-algodão ATCC PTA-3930.

A presente invenção, noutro aspecto, refere-se a um kit compreendendo PRRSV e células de pulmão de rato-do-algodão, em que as células de pulmão de rato-do-algodão são as células da linha celular de rato-do-algodão ATCC PTA-3930.

De um modo mais geral, a presente descrição envolve a utilização de células de pulmão de rato-do-algodão ou células ou a linha celular de acordo com a invenção para propagar organismos ou patógenos como vírus, e. g., vírus virulentos ou atenuados, tais como vírus que, normalmente, não têm roedores ou ratos ou o rato-do-algodão ou células de pulmão de rato-do-algodão como um hospedeiro natural, ou vírus da Ordem Nidovirales, por exemplo, artevírus ou vírus na família Arteriviridae, e. g., vírus de elevação da lactato desidrogenase (LDV), vírus da arterite equina (EAV), vírus da febre hemorrágica símia (SHFV) e vírus de PRRS (cujo vector é tipicamente artrópodes); vírus na família Coronaviridae, e. g., coronavírus, tais como vírus da bronquite infecciosa, coronavírus canino, coronavírus felino, coronavírus 229E humano, vírus da diarreia epidémica porcina, vírus da gastroenterite transmissível, vírus da gastroenterite transmissível porcina, vírus respiratório porcino, coronavírus bovino, coronavírus OC43 humano, vírus da hepatite murina, vírus da encefalomielite de hemaglutinação porcina, coronavírus de rato, vírus da sialodacrioadenite, vírus da bronquite infecciosa aviária, coronavírus de peru, coronavírus de coelho (também vírus cujo vector é tipicamente artrópodes) e Torovírus, tais como

torovírus equino, torovírus porcino, torovírus humano, torovírus bovino.

Os vírus propagados, de um modo vantajoso, utilizando células de pulmão de rato-do-algodão ou as células ou linha celular de acordo com a invenção incluem Parainfluenza Canino (CPI), e. g., CPI tipo 2 (CPI-2), adenovírus, tais como adenovírus canino (CAV), e. g., adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), adenovírus porcino (PAV), e. g., adenovírus porcino tipo 3 (PAV-3), Herpesvírus bovino, e. g., herpesvírus bovino tipo 1 (responsável por rinotraqueite bovina infecciosa (IBR)), herpesvírus equino (EHV), e. g., tipo 1 (EHV-1) ou tipo 4 (EHV-4), rotavírus bovino (BRV), vírus parainfluenza bovino tipo 3 (PI-3 ou bPI-3), coronavírus bovino (BCV) e vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV). De um modo mais vantajoso, o vírus é o vírus de PRRS. Consequentemente, a descrição refere-se à propagação ou cultivo ou crescimento de tais vírus.

Alguns vírus podem crescer em células de pulmão do Rato-do-algodão, tais como herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) (ver Papp Z. et al., *J. Gen. Virol.*, 1997, 78, 2933-2943, e. g., p. 2935), vírus parainfluenza bovino tipo 3 (bPI-3) (ver Breker-Klassen M.M. et al., *J. Virol.*, 1995, 69(7), 4308-4315) e adenovírus porcino tipo 3 (PAV-3) (ver o pedido de patente PCT WO-A3-99/53047). Estes documentos não conseguem descrever ou sugerir a utilização de tais células e vírus nelas produzidos, para a preparação de composições imunogénicas ou vacinas inactivadas, atenuadas ou subunitárias e sua administração a animais e métodos de imunização ou vacinação.

A descrição também envolve as células de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular é a que foi depositada na ATCC como PTA-3930 ou uma célula de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular tendo todas as características de identificação de ATCC PTA-3930 ou uma célula de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular produzida através do cultivo de células de pulmão de rato-do-algodão até, pelo menos, 10 ou 21 ou 76 passagens, tais como 10 ou mais, ou 21 ou mais, ou 76 ou mais passagens, e. g., pelo menos, 10 ou 21 ou 76 passagens e, de um modo vantajoso, até - e incluindo - 100 passagens e o estabelecimento de uma linha celular, de modo a que as células de pulmão de rato-do-algodão sejam essencialmente células epiteliais e as características morfológicas sejam mantidas ao longo das passagens.

A presente descrição envolve, de um modo vantajoso, a utilização de células de pulmão de Rato-do-algodão (células de CRL), e. g., linhas celulares preparadas a partir destas células, para a propagação de vírus de PRRS virulento ou atenuado.

A presente descrição também envolve, de um modo vantajoso, a utilização de células de CRL, e. g., células ou linhas celulares preparadas a partir destas células, tais como células ou linhas celulares da descrição (e. g., a linha celular depositada ou células tendo suas características), para a propagação de organismos ou patógenos, tais como vírus, e. g., vírus virulento ou atenuado, tais como CPI-2, CAV-2, EHV-1, EHV-4, BRV, BCV.

Deste modo, a descrição compreende um método para o cultivo ou propagação de um vírus, tal como PRRSV, CPI-2, CAV-2, PAV-5,

EHV-1, EHV-4, BRV, BCV, LDV, EAV, SHFV, vírus da bronquite infecciosa, coronavírus canino, coronavírus felino, coronavírus 229E humano, vírus da diarreia epidémica porcina, vírus da gastroenterite transmissível, vírus da gastroenterite transmissível porcina, vírus respiratório porcino, coronavírus bovino, coronavírus OC43 humano, vírus da hepatite murina, vírus da encefalomielite de hemaglutinação porcina, coronavírus de rato, vírus da sialodacrioadenite, vírus da bronquite infecciosa aviária, coronavírus de peru, coronavírus de coelho, torovírus equino, torovírus porcino, torovírus humano, torovírus bovino, compreendendo a colocação em contacto do vírus com células de pulmão de rato-do-algodão sob condições adequadas para cultivo ou propagação. O método pode, ainda, incluir a recolha do vírus resultante. Para a preparação de uma composição imunogénica ou imunológica ou de vacina, o vírus pode, opcionalmente, ser inactivado e/ou ter proteína(s) ou antigénio(s) ou epitopo(s) daí isolados (para composições inactivadas ou subunitárias) e o vírus ou a subunidade pode ser misturada com um veículo ou diluente e/ou adjuvante adequado, e. g., um veículo ou diluente e/ou adjuvante veterinariamente aceitável ou farmaceuticamente aceitável.

Os termos “composição imunogénica” e “composição imunológica” e “composição imunogénica ou imunológica” abrangem qualquer composição que deduz uma resposta imunitária contra o patógeno visado; por exemplo, após administração ou injecção dentro do animal (tal como porcino), deduz uma resposta imunitária contra o patógeno visado (e. g., PRRS). Os termos “composição de vacina” e “vacina” e “composição vacina” abrangem qualquer composição que induz uma resposta imunitária protectora contra o patógeno visado ou que protege, de um modo eficaz, contra o patógeno; por exemplo, após administração ou injecção

dentro do animal (*e. g.*, porcino), deduz uma resposta imunitária protectora contra o patógeno visado ou proporciona protecção eficaz contra o patógeno (*e. g.*, PRRS). Uma subunidade de um patógeno, *e. g.*, vírus, um antigénio ou imunogénio ou epitopo isolado do patógeno, *e. g.*, vírus; e uma composição subunitária compreende ou consiste essencialmente num ou mais antigénios, imunogénios ou epitopos isolados do patógeno, *e. g.*, vírus.

A presente descrição também proporciona culturas de um organismo ou patógeno, *e. g.*, vírus, tal como um vírus que, normalmente, não tem roedores ou ratos ou o rato-do-algodão ou célula de pulmão de rato-do-algodão como seu hospedeiro natural, por exemplo, PRRSV, LDV, EAV, SHFV, vírus da bronquite infecciosa, coronavírus canino, coronavírus felino, coronavírus 229E humano, vírus da diarreia epidémica porcina, vírus da gastroenterite transmissível, vírus da gastroenterite transmissível porcina, vírus respiratório porcino, coronavírus bovino, coronavírus OC43 humano, vírus da hepatite murina, vírus da encefalomielite de hemaglutinação porcina, coronavírus de rato, vírus da sialodacriaadenite, vírus da bronquite infecciosa aviária, coronavírus de peru, coronavírus de coelho, torovírus equino, torovírus porcino, torovírus humano, torovírus bovino, CPI-2, CAV-2, PAV-5, EHV-1, EHV-4, BRV ou BCV, de um modo vantajoso vírus de PRRS, CPI-2, CAV-2, EHV-1, EHV-4, BRV ou BCV, obtidos de cultivo ou propagação em células de pulmão de rato-do-algodão ou as células ou linha celular da descrição, *e. g.*, culturas ou preparações inactivadas, atenuadas e subunitárias.

Tais culturas são diferentes de culturas anteriores, visto que podem estar isentas de contaminantes de culturas propagadas em diferentes células e podem ter diferentes títulos de culturas

propagadas em diferentes células. Por exemplo, considere-se de novo o vírus de PRRS amplificado em células porcinas; as suas culturas são susceptíveis de conterem contaminantes de células porcinas e não é provável que o PRRSV cultivado em células de CRL contenha contaminantes verificados em células porcinas. Esta análise pode ser alargada a culturas de PRRSV e outros vírus cultivados noutras células que foram utilizadas para propagar PRRSV e outros vírus, em comparação com culturas de vírus cultivados em células de CRL, como na presente invenção, de modo a que seja claro que as culturas da presente invenção são diferentes de culturas anteriores.

A presente descrição também compreende composições imunogénicas e vacinas contra a doença de PRRS ou PRRSV que podem ser obtidas de cultura de vírus de PRRS de acordo com a descrição, de um modo vantajoso composições imunogénicas e vacinas vivas atenuadas, composições imunogénicas e vacinas inactivadas e composições imunogénicas e vacinas subunitárias.

A presente descrição também compreende composições imunogénicas e vacinas contra outros patógenos ou organismos cultivados ou propagados em células de CRL ou a linha celular ou células da invenção, e. g., composições ou vacinas vivas atenuadas, inactivadas ou subunitárias. Estas composições imunogénicas ou vacinas podem ser contra qualquer organismo ou patógeno ou vírus crescido, cultivado, propagado ou semelhantes, em células de CRL ou a linha celular ou células da invenção, por exemplo, tais composições imunogénicas ou de vacinas contra qualquer dos vírus ou organismos ou patógenos aqui mencionados, tais como CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1, EHV-4, BRV, bPI-3 ou BCV.

A descrição compreende kits contendo células e vírus ou organismo ou patógeno para neles cultivar, de um modo vantajoso em recipientes separados; e, de um modo ainda mais vantajoso, os recipientes separados estão na mesma embalagem; e, opcionalmente o kit inclui instruções para cultivar, crescer, alimentar as células e/ou vírus, com as instruções opcionalmente incluindo instruções para a recolha e/ou inactivação de vírus e/ou isolamento de um抗igénio ou imunogénio ou epitopo subunitário.

A descrição compreende, adicionalmente, composições de combinação; por exemplo, composições compreendendo uma ou mais vacinas ou composições imunogénicas aqui descritas ou uma vacina ou composição imunogénica aqui descrita em combinação com outra vacina ou composição imunogénica ou componente activo (e. g., vírus ou patógeno ou organismo inactivado ou atenuado ou seu抗igénio ou imunogénio ou proteína ou epitopo subunitário).

Deste modo, por exemplo, a descrição compreende composições imunogénicas e vacinas contra doença porcina compreendendo uma mistura de culturas de vírus de PRRS e PAV-3 de acordo com a descrição, tais como composições imunogénicas e vacinas vivas atenuadas, composições imunogénicas e vacinas inactivadas ou composições imunogénicas e vacinas subunitárias. O PAV-3 também pode ser um PAV-3 recombinante que contém uma ou mais sequência(s) de ácidos nucleicos codificando e que expressam, um ou mais imunogénio(s),抗igénio(s) ou epitopo(s) estranhos ou heterólogos ou exógenos (estranho, heterólogo ou exógeno como para o adenovírus). É feita menção dos documentos WO99/53047, WO99/08706, WO01/83737 e WO00/47756 quanto a exemplos de vectores de adenovírus porcinos recombinantes que podem ser utilizados na prática da descrição.

Outro exemplo é que a descrição compreende composições imunogénicas e vacinas contra doença canina que compreende uma mistura de culturas de vírus de CPI-2 e CAV-2 de acordo com a descrição, tais como composições imunogénicas e vacinas vivas atenuadas, composições imunogénicas e vacinas inactivadas ou composições imunogénicas e vacinas subunitárias. O CAV-2 também pode ser um CAV-2 recombinante que contém uma ou mais sequência(s) de ácidos nucleicos que codificam e que expressam, um ou mais imunogénio(s), antigénio(s) ou epitopo(s) estranhos ou heterólogos ou exógenos (estranho, heterólogo ou exógeno como para o adenovírus). É feita menção da patente U.S. Nº 6090393 quanto a exemplos de adenovírus caninos recombinantes que podem ser utilizados na prática da descrição.

Um exemplo adicional é que a descrição compreende composições imunogénicas e vacinas contra doença bovina que compreendem uma mistura de, pelo menos, duas ou, pelo menos, três ou todas as quatro culturas de vírus de acordo com a descrição compreendendo BHV-1, BRV, bPI-3 e/ou BCV, e.g., BHV-1+BRV, BHV-1+BRV+bPI-3, BHV-1+BRV+bPI-3+BCV, BRV+bPI-3, BRV+bPI-3+BCV, bPI-3+BCV, BHV+bP-3, BHV+bPI-3+BCV, BHV-1+BCV, BRV+BCV, tais como composições imunogénicas e vacinas vivas atenuadas, composições imunogénicas e vacinas inactivadas ou composições imunogénicas e vacinas subunitárias. Composições imunogénicas e vacinas contra doença respiratória bovina que compreendem uma mistura de, pelo menos, duas culturas de vírus de acordo com a descrição compreendendo BHV-1 e bPI-3 e composições imunogénicas e vacinas contra doença entérica bovina que compreendem uma mistura de, pelo menos, duas culturas de vírus de acordo com a descrição compreendendo BCV e BRV são consideradas vantajosas.

E são ainda um exemplo adicional de composições de combinação de acordo com a descrição as composições imunogénicas e vacinas contra doença equina que compreendem uma mistura de culturas de vírus de EHV-1 e EHV-4 de acordo com a descrição, tais como composições imunogénicas e vacinas vivas atenuadas, composições imunogénicas e vacinas inactivadas ou composições imunogénicas e vacinas subunitárias.

A descrição compreende a preparação de tais composições de combinação; por exemplo, através da mistura dos componentes activos, de um modo vantajoso em conjunto e com um veículo ou diluente e/ou adjuvante.

A descrição também compreende um kit para a preparação das composições imunogénicas ou de vacinas de combinação da descrição, por exemplo, um kit tal que compreende (a) um organismo, patógeno ou vírus ou seu antigénio ou epitopo (de um modo vantajoso, um vírus como aqui mencionado) e (b) um organismo, patógeno ou vírus ou seu imunogénio, antigénio ou epitopo (de um modo vantajoso, um vírus ou imunogénio, seu antigénio ou epitopo, mas outros patógenos como aqui mencionados também estão contemplados) que é diferente de (a), em recipientes separados, opcionalmente na mesma embalagem e, opcionalmente, com instruções para mistura e/ou administração.

A descrição compreende ainda métodos para a indução de uma resposta imunitária através da administração a um hospedeiro, tal como um hospedeiro susceptível a uma doença causada por um patógeno ou organismo ou vírus propagado numa célula de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular, e. g., uma célula de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular da descrição, e. g., um vírus como aqui mencionado, uma composição imunogénica ou de

vacina da descrição, compreendendo um tal patógeno ou organismo ou vírus inactivado ou atenuado ou um seu antigénio ou imunogénio ou epitopo, numa quantidade suficiente para induzir a resposta imunitária.

Deste modo, a presente descrição proporciona métodos para a imunização ou vacinação ou indução de uma resposta imunitária contra doença ou vírus de PRRS, utilizando uma composição imunogénica e/ou vacina aqui descrita, e. g., administração da composição imunogénica ou de vacina a um hospedeiro, e. g., porcino, numa quantidade suficiente para deduzir uma resposta imunitária adequada. E a descrição proporciona ainda métodos para a imunização ou vacinação ou indução de uma resposta imunitária contra doença ou vírus de CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1, EHV-4, BRV, bPI-3 ou BCV, utilizando uma composição imunogénica e/ou vacinas da descrição, administração da composição imunogénica ou de vacina a um hospedeiro, e. g., um hospedeiro natural do vírus, numa quantidade suficiente para deduzir uma resposta imunitária adequada.

A presente descrição, e. g., quando são empregues composições de cocktail ou de combinação, envolve métodos de imunização ou vacinação ou de dedução de uma resposta imunitária num animal hospedeiro contra dois ou mais antigénios, epitopos ou patógenos ou organismos ou vírus diferentes, tal como num porcino contra doença de PRRS e PAV-3, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz para dedução da resposta da composição(ões) imunogénica(s) e/ou vacina(s) e/ou vacina(s) da descrição. (É utilizada a indicação "(s)", visto que o método também pode ser praticado através da administração sequencial de composições ou vacinas aqui mencionadas). Do mesmo modo, como um exemplo adicional, a descrição envolve métodos de imunização ou

vacinação ou dedução de uma resposta imunitária num canino contra doença ou vírus de CPI-2 e CAV-2, utilizando ou administrando uma quantidade eficaz de composição(ões) imunogénica(s) e/ou vacina(s) da descrição. De modo semelhante, a descrição proporciona métodos de imunização ou vacinação ou de dedução de uma resposta imunitária num bovino contra, pelo menos, duas ou, pelo menos, três ou, pelo menos, quatro doenças ou vírus bovinos, utilizando ou administrando uma quantidade eficaz da composição(ões) imunogénica(s) e/ou vacina(s) e/ou vacina(s) aqui descritas. Adicionalmente, a descrição envolve métodos de imunização ou vacinação ou de dedução de uma resposta imunitária num bovino contra doença ou vírus de BHV-1 e bPI-3, utilizando ou administrando composição(ões) imunogénica(s) e/ou vacina(s) e/ou vacina(s) aqui descritas. A descrição também envolve métodos de imunização ou vacinação ou de dedução de uma resposta imunitária num bovino contra doença ou vírus de BCV e BRV, utilizando ou administrando composição(ões) imunogénica(s) e/ou vacina(s) e/ou vacina(s) aqui descritas. E a descrição envolve métodos de imunização ou vacinação ou de dedução de uma resposta imunitária num equino contra doença ou vírus de EHV-1 e EHV-4, utilizando ou administrando composição(ões) imunogénica(s) e/ou vacina(s) e/ou vacina(s) aqui descritas.

Importa notar que nesta divulgação e, particularmente nas reivindicações, termos tais como "compreende", "compreendido", "compreendendo" e semelhantes podem ter o significado atribuído aos mesmos no direito de Patente U.S.; e. g., podem significar "inclui", "incluído", "incluso" e semelhantes; e que termos, tais como "consistindo essencialmente em" e "consiste essencialmente em", têm o significado atribuído aos mesmos no direito de Patente U.S., e. g., admitem elementos não explicitamente enumerados, mas excluem elementos que se

verificam na técnica anterior ou que afectam uma característica básica ou inovadora da invenção.

Estas e outras formas de realização são divulgadas ou são óbvias e abrangidas pela seguinte Descrição Detalhada.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A requerente desenvolveu um método para produção ou propagação viral que utiliza células de pulmão de Rato-do-algodão, assim como uma nova linha celular; e a propagação ou produção ou cultivo ou crescimento de organismos ou patógenos ou vírus em tais células.

Foram recolhidos pulmões de ratos do algodão e submetidos a uma digestão enzimática (e. g., com tripsina e/ou colagenase). O sobrenadante contendo células dissociadas é recolhido e cultivado, por exemplo, como uma monocamada, ou em suspensão. De um modo vantajoso, as células são cultivadas como uma monocamada, por exemplo em Meio Mínimo Essencial (MEM), suplementado com soro bovino fetal (FBS) e/ou lactalbumina hidrosilato (LAH). De um modo vantajoso, o meio de cultura pode conter antibióticos, por exemplo, gentamicina, estreptomicina e/ou penicilina.

O vírus de PRRS foi cultivado nessa cultura celular de pulmão. Os vírus PAV-3, CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1, EHV-4, BRV, bPI-3 ou BCV também são cultivados nessa cultura celular de pulmão.

A cultura celular pode, de um modo vantajoso, resultar de várias passagens destas células. De um modo vantajoso, as passagens destas células permitem a produção de linhas celulares que são úteis, por exemplo, para a propagação de vírus de PRRS. Por exemplo, as células podem ser submetidas a, pelo menos, 10 passagens, e. g., 10 a 100 passagens. De um modo vantajoso, estas linhas celulares são duráveis na ausência de soro bovino fetal (FBS), embora o estabelecimento da monocamada requeira algum FBS ou outro factor de crescimento celular apropriado.

Outra vantagem da cultura de células de CRL de acordo com a descrição é que uma cultura de células pode persistir durante, pelo menos, um mês como uma monocamada ou suspensão saudável, sem requerer substituição de meios gastos ou suplementação nutricional adicional. Esta robustez conferiu a vantagem de múltiplas recolhas de vírus a partir da mesma cultura de células, sem a necessidade de tempo de arranque (estabelecimento de cultura) e consumo de stock celular.

É, deste modo, possível ter múltiplas recolhas virais a partir da mesma cultura celular. Numa forma de realização, o processo de cultura compreende duas ou mais recolhas do vírus, com ou sem reinoculação viral e/ou adição de meios de cultura frescos. De um modo vantajoso, após cada recolha, meios de cultura frescos são adicionados à cultura celular.

Seguindo este processo, células de pulmão de Rato-do-algodão foram cultivadas até 76 passagens e estabelecidas como uma linha celular. Estas células de pulmão de Rato-do-algodão são essencialmente células epiteliais e as características morfológicas são mantidas ao longo das passagens. A passagem 21 foi depositada, a 18 de Dezembro de

2001, sob os termos do Tratado de Budapeste, na *American Type Culture Collection*, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 e foi-lhe atribuído o número de acesso ATCC PTA-3930.

Numa forma de realização, a presente descrição envolve a utilização de células de pulmão epiteliais de Rato-do-algodão, linhas celulares epiteliais delas derivadas, tal como a linha celular PTA-3930 ou uma linha celular tendo as suas características de identificação, para a produção de vírus de PRRS virulento ou atenuado. Em formas de realização adicionais, a presente descrição envolve a utilização de células de pulmão epiteliais de Rato-do-algodão, linhas celulares epiteliais delas derivadas, tal como a linha celular PTA-3930 ou uma linha celular tendo as suas características de identificação, para a produção de vírus de CPI-2, CAV-2, EHV-1, EHV-4, BRV ou BCV virulento ou atenuado. Em formas de realização adicionais, a presente descrição envolve a utilização da linha celular PTA-3930 ou uma linha celular tendo as suas características de identificação, para a produção de vírus de BHV-1 ou bPI-3 virulento ou atenuado. A linha celular, ou uma linha celular tendo as suas características de identificação, também pode ser utilizada em relação a outros vírus aqui mencionados.

Outro aspecto da descrição é, deste modo, um método de produção de vírus de PRRS, compreendendo o cultivo de vírus de PRRS numa cultura celular de pulmão de Rato-do-algodão, compreendendo células epiteliais, de um modo vantajoso numa linha celular de pulmão de Rato-do-algodão. Por exemplo, a produção viral é feita na linha celular PTA-3930 ou uma linha celular tendo as suas características de identificação. Este método de produção de vírus também pode ser utilizado para os

vírus de CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1, EHV-4, BRV, bPI-3 e BCV, assim como para outros vírus aqui mencionados.

O vírus pode ser um vírus virulento ou um vírus atenuado.

A produção de vírus compreende as etapas de inoculação e propagação do vírus em tais células. Antes de inoculação, as células de acordo com a invenção podem ser cultivadas num meio de cultura adequado, por exemplo, meio MEM suplementado com FBS ou outro factor de crescimento celular apropriado. A cultura celular é, de um modo vantajoso, feita a uma temperatura entre 35 e 39 °C, de um modo vantajoso em torno de 37 °C. De um modo vantajoso, a cultura celular é uma monocamada. Alternativamente, a cultura celular é uma suspensão. Em geral, o vírus é inoculado quando as células cultivadas em monocamada estão confluentes. O vírus extracelular pode ser recuperado directamente com o sobrenadante. O vírus intracelular pode ser recuperado após disruptão apropriada das células, por exemplo, por congelação/descongelação ou sonicação. No caso de culturas celulares em suspensão, o vírus pode ser recuperado, e. g., após filtração do filtrado. O vírus pode ser recuperado 2 a 15 dias, tal como 3 a 7 dias, de um modo mais vantajoso 5 a 7 dias pós-inoculação. A produção do vírus é feita de acordo com o conhecimento geral do especialista na técnica envolvendo a produção viral. A cultura de vírus em bruto é obtida nesta fase.

Os meios de cultura utilizados nesta invenção podem ser suplementados com antibióticos.

Se necessário, o vírus, e. g., vírus de PRRS, é adaptado para o crescimento nas células de acordo com a invenção. A adaptação pode ser feita por co-culturas em células de acordo com a invenção e células de rim de macaco, tal como MA-104. A

adaptação é feita, como é bem sabido, por passagens seriais em co-culturas, com quantidade incrementalmente crescente de células de acordo com a invenção. Esta adaptação também pode ser feita para os vírus de CPI-2, CAV-2, BHV-1, EHV-1; EHV-4, BRV, bPI-3 ou BCV, assim como outros vírus aqui mencionados.

A cultura em bruto pode ser concentrada e/ou purificada.

A concentração pode ser realizada por qualquer método convencional conhecido por um especialista na técnica, por exemplo, por precipitação selectiva ou por ultrafiltração. A purificação pode ser realizada por qualquer método convencional conhecido por um especialista na técnica, por exemplo, métodos de ultracentrifugação ou cromatografia, e. g., filtração em gel. As culturas concentradas de vírus, culturas purificadas ou culturas concentradas e purificadas são obtidas nesta fase.

Noutro aspecto da descrição, as culturas de vírus de acordo com a descrição (em bruto, concentradas, purificadas ou concentradas e purificadas) podem ser inactivadas através da utilização de qualquer método convencional, por exemplo método térmico e/ou químico. Um método vantajoso é a inactivação química, por exemplo, utilizando beta-propiolactona, formalina, etilenimina ou um seu derivado, tal como etilenimina binária (BEI) e combinações destes compostos de inactivação. As culturas de vírus de PRRS inactivado são obtidas nesta fase.

Noutro aspecto da descrição, fracções imunogénicas, como glicoproteínas ou proteínas, podem ser extraídas do vírus presente nas culturas de vírus de acordo com a descrição (em bruto, concentradas, purificadas ou concentradas e purificadas, opcionalmente inactivadas). A extracção de fracções imunogénicas

do vírus é feita de acordo com o conhecimento geral de um especialista na técnica. As preparações de vírus subunitárias são obtidas nesta fase.

Outros aspectos da descrição são, deste modo, as culturas de vírus em bruto, culturas concentradas, culturas purificadas, culturas concentradas e purificadas, culturas inactivadas, preparações subunitárias aqui descritas.

Numa forma de realização vantajosa da descrição, o vírus virulento pode ser atenuado por um número suficiente de passagens em células de acordo com a descrição. Um especialista na técnica é capaz de determinar, por experimentação de rotina, o número de passagens suficiente para atenuação do vírus. É obtida a preparação de vírus atenuado.

Também é um objectivo desta descrição proporcionar composições imunogénicas e vacinas para prevenir a infecção com o vírus. Estas composições imunogénicas e vacinas compreendem, pelo menos, uma cultura ou preparação como aqui se descreve.

O termo de "composição imunogénica" abrange aqui qualquer composição capaz, após ter sido administrada a um animal, e. g., porcino, de deduzir uma resposta imunitária contra o vírus ou antigénio ou imunogénio ou epitopo. O termo de "vacina" abrange aqui qualquer composição capaz, após ter sido administrada ao animal, e. g., porcino, de induzir uma resposta imunitária protectora contra o vírus ou proteger, de um modo eficaz, o animal contra o referido vírus.

As composições imunogénicas ou vacinas de acordo com a descrição podem incluir a cultura ou preparação de vírus ou

antigénio ou imunogénio ou epitopo do vírus e, pelo menos, um imunogénio, antigénio ou epitopo de outro patógeno ou outro patógeno (e. g., patógeno inactivado ou atenuado). Esse imunogénio, antigénio ou epitopo pode, e. g., ser de origem bacteriana ou parasítica ou viral ou uma forma inactivada ou atenuada do patógeno. A descrição também comprehende kits para preparar estas composições de combinação, assim como métodos para preparação destas composições de combinação e a utilização dos componentes destas composições de combinação para preparar as composições de combinação. Consequentemente, a descrição envolve um kit para a preparação das composições imunogénicas ou de vacinas de combinação da descrição, por exemplo, um kit tal que comprehenda (a) um organismo, patógeno ou vírus ou seu antigénio ou epitopo (de um modo vantajoso, um vírus como aqui mencionado) e (b) um organismo, patógeno ou vírus ou seu imunogénio, antigénio ou epitopo (de um modo vantajoso, um vírus ou imunogénio, seu antigénio ou epitopo, mas outros patógenos como aqui mencionados também estão contemplados) que é diferente de (a), em recipientes separados, opcionalmente na mesma embalagem e, opcionalmente, com instruções para mistura e/ou administração.

As composições imunogénicas e/ou vacinas de acordo com a descrição podem incluir cultura ou preparação de vírus de PRRS (e. g., PRRSV inactivado ou atenuado o um seu imunogénio ou antigénio ou epitopo) e, pelo menos, um imunogénio, antigénio ou epitopo de outro patógeno porcino (incluindo, sem limitação, o patógeno na forma inactivada ou atenuada). Este patógeno pode ser seleccionado do grupo incluindo mas não limitado a vírus da pseudo-raiva, vírus da influenza porcina, parvovírus porcino, vírus da gastroenterite transmissível (coronavírus), circovírus porcino, tal como circovírus porcino tipo 2, rotavírus,

adenovírus porcino tipo 3, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. De um modo vantajoso, as composições imunogénicas e vacinas de acordo com a descrição podem incluir uma cultura ou preparação de vírus de PRRS e vírus de PAV-3 cultivados e propagados em células ou linhas celulares de acordo com a descrição, e. g., na linha celular PTA-3930 ou uma linha celular tendo todas as suas características de identificação. Os imunogénios de patógenos porcinos podem incluir gB de vírus da pseudo-raiva, gC de vírus da pseudo-raiva, gD de vírus da pseudo-raiva, HA de influenza suína, NA de influenza suína, NP de influenza suína, ORF4 do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina, ORF7 do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina, ORF5 de PRRSV, ORF3 de PRRSV, ORF6 de PRRSV, fases de leitura aberta de PRRSV 5 (ORF5) e 6 (ORF6), fases de leitura aberta de PRRSV 5 (ORF5) e 3 (ORF3) e 6 (ORF6), E1 de Vírus da Cólica Suína, gene E2 de Vírus da Cólica Suína, VP2 de parvovírus, ORF1 de circovírus porcino tipo 2 ou ORF2 de circovírus porcino tipo 2. É feita referência às Patentes U.S. N° 6517843, 6497883, 6391314, 6379676, 6217883, 6207165 e publicação de Patente U.S. 2003003112 e documentos WO99/53047, WO99/08706, WO01/83737 e WO00/47756 para imunogénios de patógenos porcinos, moléculas de ácidos nucleicos codificando para o efeito e construções expressando as mesmas. Deste modo, a descrição também envolve métodos para a preparação destas composições, assim como kits para o efeito.

As composições imunogénicas e vacinas de acordo com a descrição podem incluir cultura ou preparação de vírus de CPI-2 e/ou CAV-2 (e. g., CPI-2 e/ou CAV-2 inactivado ou atenuado ou um

seu imunogénio ou antigénio ou epitopo) e, pelo menos, um imunogénio, antigénio ou epitopo de outro patógeno canino (incluindo, sem limitação, o patógeno na forma inactivada ou atenuada). Este patógeno pode ser seleccionado do grupo incluindo mas não limitado a vírus da esgana canina, parvovírus canino, coronavírus canino, herpesvírus canino, agente da doença de Lyme, *Borrelia burgdorferi* e vírus da raiva. De um modo vantajoso, as composições imunogénicas e vacinas de acordo com a descrição incluem uma cultura ou preparação de vírus de CPI-2 e/ou uma cultura ou preparação de vírus de CAV-2 de acordo com a descrição. Os imunogénios de CPI-2 podem ser F e/ou HN de CPI-2. Ver também as Patentes U.S. Nº 5616326, 6090393, 6159477, 6228846, com respeito a imunogénios de patógenos caninos e moléculas de ácidos nucleicos codificando para o efeito e construções que expressam as mesmas. Deste modo, a descrição também envolve métodos para a preparação destas composições, assim como kits para o efeito.

As composições imunogénicas e vacinas de acordo com a descrição podem incluir cultura ou preparação de vírus de BHV-1, BRV, bPI-3 e/ou BCV (e. g., BHV-1, BRV, bPI-3 e/ou BCV inactivado ou atenuado ou um seu imunogénio ou antigénio ou epitopo) e, pelo menos, um imunogénio, antigénio ou epitopo de outro patógeno bovino (incluindo, sem limitação, o patógeno na forma inactivada ou atenuada). Este patógeno pode ser seleccionado do grupo incluindo mas não limitado a vírus sincicial respiratório bovino e vírus da diarreia viral bovina. De um modo vantajoso, as composições imunogénicas e vacinas de acordo com a descrição incluem, pelo menos, duas culturas ou preparações de vírus de acordo com a descrição compreendendo BHV-1, BRV, bPI-3 ou BCV. Os imunogénios de BRSV podem ser F ou G ou N de BRSV, tais como F e/ou G ou N e/ou G de BRSV. Os

imunogénios de BHV-1 podem ser gB e/ou gC e/ou gD. Os imunogénios de BVDV podem ser a proteína E0 (gp48) e/ou a proteína E2 (gp53). O BVDV pode ser de tipo 1 e/ou tipo 2. Os imunogénios de bPI-3 podem ser F e/ou HN de bPI-3. Ver também as Patentes U.S. Nº 6451770, 6376473, 6224878, com respeito a imunogénios de patógenos bovinos e moléculas de ácidos nucleicos codificando para o efeito e construções que expressam as mesmas. Deste modo, a descrição também envolve métodos para a preparação destas composições, assim como kits para o efeito.

As composições imunogénicas e vacinas de acordo com a descrição podem incluir uma cultura ou preparação de vírus de EHV-1 e/ou EHV-4 (e. g., EHV-1 e/ou EHV-4 inactivado ou atenuado ou um seu imunogénio ou antigénio ou epitopo) e, pelo menos, um imunogénio, antigénio ou epitopo de outro patógeno equino (incluindo, sem limitação, o patógeno na forma inactivada ou atenuada). Este patógeno pode ser seleccionado do grupo incluindo mas não limitado a vírus da influenza equina, vírus da encefalomielite de leste (EEV), vírus da encefalomielite ocidental (WEV), vírus da encefalomielite Venezuelana (VEV), agente da doença de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, *Clostridium tetani*, vírus da arterite equina (EAV) e vírus da raiva. De um modo vantajoso, as composições imunogénicas e vacinas de acordo com a descrição podem incluir uma cultura ou preparação de vírus de EHV-1 e cultura ou preparação de vírus de EHV-4 de acordo com a descrição. As glicoproteínas de EHV podem ser gB, gD, gB+gD, gC e gE. É feita referência às Patentes U.S. Nº 6207166 e 6368603 para imunogénios de patógenos equinos e moléculas de ácidos nucleicos codificando para o efeito e construções que expressam as mesmas. Deste modo, a descrição também envolve métodos para a preparação destas composições, assim como kits para o efeito.

Uma composição imunogénica ou vacina de acordo com a descrição, que também compreende um tal componente imunogénico adicional (imunogénio, antigénio ou epitopo adicional), tem a vantagem de que induz uma resposta imunitária ou protecção contra várias infecções ou padecimentos ou seus agentes causativos ao mesmo tempo. Este componente imunogénico adicional pode ser um microrganismo atenuado ou inactivado, uma construção recombinante ou subunidades (e. g., proteínas, glicoproteínas, polipéptidos ou epitopos). Os processos de determinação de epitopo, tais como a geração de bibliotecas peptídicas de sobreposição (Hemmer B. et al., *Immunology Today*, 1998, 19 (4), 163-168), Pepscan (Geysen H. M. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, 81 (13), 3998-4002; Geysen H. M. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1985, 82 (1), 178-182; Van der Zee R. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1989, 19 (1), 43-47; Geysen H. M., *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 1990, 21 (4), 523-533; *Multipin Peptide Synthesis Kits* de Chiron) e algoritmos (De Groot A. et al., *Nature Biotechnology*, 1999, 17, 533-561), podem ser utilizados na prática da descrição, de modo a determinar epitopos de imunogénios, antigénios, polipéptidos, glicoproteínas e semelhantes, sem experimentação indevida. A partir dessa informação, podem construir-se moléculas de ácidos nucleicos codificando um tal epitopo; e, a partir desse conhecimento e conhecimento na técnica, podem construir-se vectores ou construções, e. g., vírus ou vectores ou plasmídeos recombinantes que expressam imunogénios, epitopos ou antigénios; todos sem experimentação indevida.

As composições imunogénicas ou as composições de vacinas compreendem ainda um excipiente, diluente ou veículo farmaceuticamente ou veterinariamente aceitável e,

opcionalmente, um estabilizante e/ou um adjuvante. As formulações adequadas serão evidentes para qualquer especialista na técnica. As formulações podem ser desenvolvidas para qualquer via de administração adequada.

O veículo farmaceuticamente aceitável pode ser água ou solução salina.

As composições imunogénicas inactivadas ou vacinas inactivadas compreendem, de um modo vantajoso, pelo menos, um adjuvante.

Os vírus vivos atenuados podem ser liofilizados, de um modo vantajoso com um estabilizador. A liofilização pode ser feita de acordo com processos de liofilização padrão bem conhecidos. Os estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis podem ser SPGA (sacarose fosfato glutamato albumina) (Bovarnik *et al.*, *J. Bacteriology*, 1950, 59: 509), hidratos de carbono (e. g., sorbitol, manitol, lactose, sacarose, glucose, dextrano, trealose), glutamato de sódio (Tsvetkov T *et al.*, *Cryobiology* 1983, 20(3): 318-23 ; Israeli E *et al.*, *Cryobiology* 1993, 30(5): 519-23), proteínas, tais como peptona, albumina ou caseína, agentes contendo proteína, tal como leite magro (Mills CK *et al.*, *Cryobiology* 1988, 25(2): 148-52 ; WolffE *et al.*, *Cryobiology* 1990, 27(5): 569-75) e tampões (e. g., tampão de fosfatos, tampão de fosfatos de metal alcalino).

Um adjuvante pode ser utilizado para tornar solúveis as preparações liofilizadas.

São exemplos de adjuvantes emulsões de óleo-em-água, água-em-óleo-em-água baseadas em óleo mineral e/ou óleo vegetal e tensioactivos não iónicos, tais como copolímeros em bloco,

Tween®, Span®. Outros adjuvantes adequados são, por exemplo, vitamina E, saponinas, Carbopol®, hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio ou óxido de alumínio ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach", *Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 6, Editado por Michael F. Powell e Mark J. Newman, 1995, Plenum Press, Nova Iorque). Os documentos aqui citados também podem ser consultados quanto a adjuvantes, assim como para excipientes, diluentes, transportadores e veículos.

Outro aspecto da presente descrição é um método de imunização ou um método de vacinação utilizando as composições imunogénicas ou as composições de vacinas de acordo com a descrição, respectivamente.

O método inclui, pelo menos, uma administração a um animal de uma quantidade eficiente da composição imunogénica ou vacina de acordo com a descrição. O animal pode ser macho, fêmea, fêmea prenhe e recém-nascido. Esta administração pode ser feita, de um modo notável, por injecção intramuscular (IM), intradérmica (ID) ou subcutânea (SC) ou por meio de administração intranasal ou oral. A composição imunogénica ou a vacina de acordo com a descrição pode ser administrada por uma seringa ou um aparelho sem seringa (como, por exemplo, Pigjet ou Biojector (Bioject, Oregon, EUA)).

Para composições atenuadas, as doses do vírus ou organismo ou patógeno produzido na nova cultura celular podem ser entre cerca de 10^3 e cerca de 10^7 CCID₅₀ (Doses medianas Infecciosas de Cultura Celular), de um modo vantajoso entre cerca de 10^4 e cerca de 10^6 CCID₅₀ e, de um modo mais vantajoso, cerca de 10^5 CCID₅₀. Os volumes são desde 0,2 a 2,0 mL, de um modo vantajoso cerca de 2,0 mL. Podem ser feitas uma ou mais administrações; e. g., com

duas injecções com 2-4 semanas de intervalo e, de um modo vantajoso, com um reforço cerca de 3 semanas após a primeira injecção.

Com composições inactivadas do vírus ou organismo ou patógeno produzido na nova cultura celular, pode ser administrado ao animal, aproximadamente, CCID₅₀ equivalente a 10⁴-10⁹ (título antes de inactivação), de um modo vantajoso, aproximadamente, CCID₅₀ equivalente a 10⁵-10⁸, numa unidade de dosagem simples. O volume de uma unidade de dosagem simples pode ser entre 0,2 mL e 5,0 mL e, de um modo vantajoso, entre 0,5 mL e 2,0 mL e, de um modo mais vantajoso, cerca de 2,0 mL. Podem ser feitas uma ou mais administrações; e. g., com duas injecções com 2-4 semanas de intervalo e, de um modo vantajoso, com um reforço cerca de 3 semanas após a primeira injecção.

Com composições subunitárias, e. g., do vírus ou patógeno ou organismo produzido na nova cultura celular, pode ser administrado ao animal, aproximadamente, 5 µg a 500 µg, de um modo vantajoso 20 µg a 50 µg. Os volumes são desde 0,2 a 2,0 mL, de um modo vantajoso cerca de 2,0 mL. Podem ser feitas uma ou mais administrações; e. g., com duas injecções com 2-4 semanas de intervalo e, de um modo vantajoso, com um reforço cerca de 3 semanas após a primeira injecção.

As composições de acordo com a descrição também podem ser administradas a outros mamíferos, e. g., murganhos ou animal de laboratório, por exemplo, para gerar anticorpos policlonais ou para preparar hibridomas para anticorpos monoclonais.

A invenção será, agora, ainda descrita por meio dos seguintes exemplos não limitativos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Obtenção de células de pulmão de Rato-do-algodão (CRL)

Após excisão a partir do animal eutanasiado, os pulmões foram colocados dentro de meios de cultura celular, contendo meio mínimo essencial F-15 (MEM F-15, Hyclone, cat#SH30024.02) e gentamicina a 30 µg/mL. Estes meios foram suplementados com antibiótico comercial (penicilina e estreptomicina) e antimicótico (anfotericina B), a uma concentração de 2%, v/v. Os pulmões foram digeridos, a 37 °C, num tubo de centrífuga cônico de 50 mL, contendo 25 mL de uma solução de colagenase (Sigma, cat#L-0130) e tripsina (Sigma, cat#T-8003), a uma concentração de 1 mg/mL e título de 1X (corresponde a uma concentração de 2,5 mg/mL), respectivamente, em MEM F-15 contendo gentamicina a 30 µg/mL. Após uma digestão de 30 minutos, foi adicionado Soro Bovino Fetal (FBS) (BioWhittaker), a uma concentração final de 10%, v/v. Após dispersão de células utilizando uma pipeta e clarificação, o sobrenadante contendo células dissociadas foi recolhido e plaqueado para dentro de frascos de 25 cm² com meio MEM F-15, contendo gentamicina a 30 µg/mL e suplementado com FBS a uma concentração final de 10%, v/v.

Exemplo 2: Cultura de células de CRL

Foi utilizada uma solução de tripsina para arrastar por lavagem qualquer FBS residual de uma monocamada confluente de células de CRL, obtidas no exemplo 1. As células revestidas com

0,1% (1X) de uma mistura de tripsina porcina com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (JRH Biosciences, cat#62244-79P) (3 mL para um frasco de 75 cm², 5 mL para um de 150 cm²) foram colocadas numa incubadora, a 37 °C e monitorizadas de perto, até o descolamento celular estar completo. As células foram dispersadas utilizando uma pipeta e foram recolhidos 3 mL de suspensão celular. Nesse momento, 1:4 das células recolhidas foram cultivadas com meios de cultura celular frescos contendo MEM F-15, gentamicina a uma concentração de 30 µg/mL e FBS a uma concentração de 10%, v/v.

As células de CRL foram cultivadas, a 37 °C, em incubadoras com pressão parcial de CO₂ a 5%. Uma fracção 1:4 de uma monocamada confluente era confluente em cerca de 4 dias e uma fracção 1:8 produziu uma monocamada confluente no espaço de cerca de 7 dias. Isto constitui uma passagem.

As células foram, depois, propagadas desde a passagem 2 até à passagem 76.

Após adição do crioprotector dimetilssulfóxido (DMSO), pequenos bancos foram congelados em todas as passagens até 76. Os bancos são armazenados em azoto líquido.

As células de CRL da passagem 21 foram depositadas com a *American Type Culture Collection*, sob o número de acesso ATCC PTA-3930.

Exemplo 3: propagação de vírus de PRRS em células de CRL

Foi feita utilização de um vírus de PRRS atenuado, conhecido por propagar-se em células de rim de macaco.

A propagação de vírus de PRRS foi feita numa monocamada de células de CRL, num frasco de 75 cm² (frasco T75), com 50 mL de meios de cultura contendo MEM F-15, gentamicina a uma concentração de 30 µg/mL e FBS a uma concentração de 10%, v/v. Antes da inoculação viral, as células foram incubadas, a 37 °C, durante 24 horas, até estarem confluentes. Após inoculação com 1 mL de vírus de PRRS, as células inoculadas foram incubadas, a 37 °C, durante 5-7 dias. O crescimento viral foi verificado por testagem indirecta de anticorpo imunofluorescente (IFA) e titulação do material sobrenadante. Após congelação/descongelação, o sobrenadante foi recolhido. Isto constitui uma cultura em bruto do vírus de PRRS.

Testagem indirecta de anticorpo imunofluorescente (IFA)

Para IFA, as células foram tripsinadas, dispersas, recolhidas e ressuspensas em meio MEM F-15 fresco, contendo gentamicina (a 30 µg/mL) e suplementado com FBS a uma concentração de 10%, v/v. As células foram semeadas em placas de 96 poços tratadas com cultura de tecidos, a 100 µL/poço e foram deixadas crescer até confluência, de um dia para o outro. Foram preparadas diluições seriais quádruplas dos vírus de PRRS. Depois, 100 µL ou 200 µL do vírus diluído foram carregados dentro de cada poço, numa fila da placa de 96 poços. A placa foi colocada numa incubadora de CO₂ a 5%, a 37 °C, durante 7 dias. Os poços contendo células de CRL infectadas foram determinados por

testagem indirecta de anticorpo imunofluorescente (IFA), com um anticorpo monoclonal anti-vírus de PRRS (SDOW 17, obtido da USDA; Magar R. et al., *Can J vet Res.*, 1995, 59(3): 232-4).

Caracterização de vírus de PRRS cultivado em cultura de CRL:

O vírus de PRRS foi titulado numa placa de 96 poços contendo células de CRL. O título foi calculado utilizando o método de Spearman-Karber de determinação de 50% de ponto final e foi referido numa base por mL. Os resultados são expressos em Log_{10} (FAID_{50})/mL. O resultado de titulação foi 4,3 em Log_{10} (FAID_{50})/mL.

Exemplo 4: adaptação de vírus de PRRS a crescimento em CRL e propagação

O vírus de PRRS NADC 8 estava adaptado a crescer em células de CRL. O NADC 8 foi obtido do *National Animal Disease Center* (USDA).

O vírus foi sequencialmente propagado em co-culturas de células de CRL e células de MA-104 (células de rim de macaco verde Africano, linha celular progenitora de MARC-145), contendo quantidade incrementalmente decrescente de células de MA-104. Inicialmente, as células de CRL foram semeadas, a uma razão 1:9, com as células de MA-104 (20000 células/mL de CRL:180000 células/mL de MA-104), a 37 °C, MEM F-15 com lactalbumina hidrosilato (LAH, a uma concentração de 0,1%, v/v), gentamicina a uma concentração de 30 µg/mL e FBS a uma

concentração de 10%, v/v. Quando estas co-culturas estavam confluentes, o vírus de PRRS foi inoculado (1 mL por frasco T75), sem qualquer reposição de meio. O crescimento viral foi verificado por testagem indirecta de anticorpo imunofluorescente (IFA, como descrito no exemplo 3) e titulação do material sobrenadante. As células inoculadas foram incubadas, a 37 °C, durante 5-7 dias. A passagem inclui uma congelação/descongelação, uma recolha do sobrenadante e uma subsequente inoculação de 1 mL do frasco T75 de co-cultura sucessiva, i.e., cerca de 10% do sobrenadante recolhido.

Isto é repetido através da passagem do inóculo em co-culturas de CRL:MA-104, de razões 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1, respectivamente.

Finalmente, num frasco T75, o vírus foi cultivado numa monocamada composta unicamente por células de CRL, com 50 mL de meios de cultura contendo MEM F-15, gentamicina a uma concentração de 30 µg/mL e FBS a uma concentração de 10%, v/v (portanto, sem LAH). As células de CRL inoculadas foram incubadas, a 37 °C, durante 5-7 dias. Após congelação/descongelação, o sobrenadante foi recolhido. Isto constitui uma cultura em bruto do vírus de PRRS.

A IFA mostrou que o NADC 8 tinha infectado células de CRL.

Caracterização de vírus de PRRS cultivado em cultura de CRL:

A estirpe NADC 8 do vírus de PRRS foi titulada numa placa de 96 poços contendo células de CRL. A cultura foi feita como

descrito anteriormente. O título foi calculado utilizando o método de Spearman-Karber de determinação de 50% de ponto final e foi referido numa base por mL. Os resultados são expressos em $\text{Log}_{10} (\text{FAID}_{50})/\text{mL}$.

O resultado de titulação foi 4,12 em $\text{Log}_{10} (\text{FAID}_{50})/\text{mL}$.

Outros vírus, tais como outros vírus da Ordem Nidovirales, por exemplo, artevírus ou vírus na família *Arteriviridae*, e. g., vírus de elevação da lactato desidrogenase (LDV), vírus da arterite equina (EAV), vírus da febre hemorrágica símia (SHFV), vírus na família *Coronaviridae*, e. g., coronavírus, tais como vírus da bronquite infecciosa, coronavírus canino, coronavírus felino, coronavírus 229E humano, vírus da diarreia epidémica porcina, vírus da gastroenterite transmissível, vírus da gastroenterite transmissível porcina, vírus respiratório porcino, coronavírus bovino, coronavírus OC43 humano, vírus da hepatite murina, vírus da encefalomielite de hemaglutinação porcina, coronavírus de rato, vírus da sialodacrioadenite, vírus da bronquite infecciosa aviária, coronavírus de peru, coronavírus de coelho, Torovírus, tais como torovírus equino, torovírus porcino, torovírus humano, torovírus bovino e outros vírus cujo hospedeiro não é naturalmente um roedor ou rato ou o rato-do-algodão, podem ser adaptados a crescer em células de pulmão de rato-do-algodão, de um modo vantajoso as células de pulmão de rato-do-algodão ou linha celular da descrição (e. g., as depositadas), empregando técnicas aqui descritas ou técnicas análogas às aqui descritas com respeito a PRRS.

Exemplo 5: método de inactivação

O vírus de PRRS propagado em CRL (exemplo 3 ou 4) é recolhido. A suspensão viral é sonicada a uma temperatura de cerca de 5 °C. A suspensão viral é filtrada através de uma membrana de porosidade de 50-100 µm, a cerca de 5 °C.

É adicionada beta-propiolactona à suspensão viral, à concentração final de 1/3000 (v/v). Após homogeneização por agitação, a suspensão é transferida para dentro de outro frasco estéril.

A inactivação é efectuada sob agitação, durante 24 horas, a cerca de 5 °C. O pH é regulado a cerca de 7,2 por adição de NaOH a 1 M.

A suspensão viral inactivada é concentrada por ultrafiltração de, aproximadamente, 50 vezes. A suspensão viral concentrada é armazenada a -40 °C.

Exemplo 6: Preparação da vacina inactivada na forma de uma emulsão à base de óleo mineral

A vacina é preparada com o vírus de PRRS inactivado, obtido no exemplo 5 (após descongelamento e diluição) e de acordo com a seguinte fórmula:

- suspensão de vírus de PRRS inactivado: 167 mL
- fase oleosa: 83 mL

A base oleosa contém 7% peso/volume (p/v) de oleato de anidromanitol, 8% p/v de ácido oleico etoxilado (11 óxidos de etileno) e 85% v/v de óleo de parafina líquida clara (de acordo com a farmacopeia Europeia).

A fase aquosa e a fase oleosa são esterilizadas separadamente por filtração. A emulsão é preparada por mistura e homogeneização dos ingredientes, com a ajuda de um emulsionador de turbina Silverson.

Uma dose de vacina contém cerca de $10^{7,5}$ CCID₅₀ (título antes de inactivação). O volume de uma dose de vacina é 2,0 mL para administração pela via intramuscular.

Exemplo 7: propagação de vírus em células de CRL

Stocks virais rotineiramente utilizados em ensaios como vírus de referência, relativamente aos quais reagentes de anticorpo fluorescente (FA) estavam disponíveis, foram titulados utilizando células de CRL. Devido a estes vírus de referência terem sido rotineiramente titulados utilizando linhas celulares padrão, cada tem um título conhecido com diversos graus de variação. Diluições décuplas ou quádruplas destes vírus de referência foram utilizadas para inocular células de CRL, num formato de 96 poços, utilizando o método padrão de titulação para cada vírus. Após 7 dias de incubação, as placas foram fixadas com acetona e coradas com os reagentes de FA apropriados. Os títulos das culturas positivas fluorescentes foram comparados com títulos obtidos de culturas celulares padrão. Os resultados são apresentados abaixo:

Vírus de Referência	Título/CRL	Título/Linha celular padrão
Parainfluenza Canino tipo 2 (CPI-2)	4,96	5,6 em células de MDCK
Adenovírus Canino tipo 2 (CAV-2)	1,72	5,8 em células de MDCK
Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1)	3,64	7,1 em células de MDBK
Herpesvírus Equino tipo 1 (EHV-1)	5,74	Título não determinado
Herpesvírus Equino tipo 4 (EHV-4)	5,44	6,13 em células Vero
Rotavírus Bovino (BRV)	5,32	6,0 em células de MA-104
Parainfluenza Bovino tipo 3 (bPI-3)	6,46	7,0 em células de MDBK
Coronavírus Bovino (BCV)	3,52	4,79 em células de MDBK
Reprod. & Respir. Porcino (PRRSV)	5,22	5,34 em células de MARC-145

Os títulos de vírus são expressos em \log_{10} de Dose Infecciosa de Cultura Celular 50 por mililitro (\log_{10} CCID₅₀/mL).

Embora em cada caso, os títulos gerados pelo ensaio baseado em CRL fossem inferiores aos da linha celular padrão, deve ser enfatizado que estes vírus não sofreram o processo de adaptação celular utilizando células de CRL que o vírus de referência sofreu com a linha celular padrão. Este foi apenas um teste para

detectar qualquer replicação viral. Por outras palavras, com algum esforço, é provável que a concentração de vírus vivo cultivado em células de CRL pudesse ser melhorada ao ponto em que fosse equivalente ou melhor do que a concentração de vírus cultivado em linhas celulares para as quais estava adaptado. Isto é mostrado pela PRRS adaptada a CRL (exemplo 4), cujos títulos da mesma diluição serial de vírus foram 5,22 e 5,34 (\log_{10} CCID₅₀/mL), quando foram utilizadas células de CRL e células de MARC-145 (um clone sensível de células de MA-104), respectivamente. Esta diferença em título é negligenciável.

Para efeitos de referência, são incluídos na descrição os seguintes parágrafos numerados:

1. Um método de produção de vírus de PRRS, em que se prepara uma cultura celular de pulmão de Rato-do-algodão e se propaga o vírus de PRRS nesta cultura celular.
2. O método de acordo com o parágrafo 1, em que a cultura celular compreende células epiteliais.
3. Um método de produção de vírus de PRRS, em que se prepara uma cultura de células de uma linha celular de pulmão de Rato-do-algodão e se propaga o vírus de PRRS nesta cultura.
4. O método de acordo com o parágrafo 3, em que a cultura compreende células epiteliais.
5. Um método de produção de vírus de PRRS, em que se prepara uma cultura celular epitelial de pulmão de Rato-do-algodão e se propaga o vírus de PRRS nesta cultura celular.

6. Um método de produção de vírus de PRRS, em que se prepara uma cultura de células de uma linha celular epitelial de pulmão de Rato-do-algodão e se propaga o vírus de PRRS nesta linha celular.
7. O método de acordo com o parágrafo 3 ou 6, em que a linha celular é a linha celular depositada na ATCC, sob o número de acesso PTA-3930 ou uma linha celular de pulmão de rato-do-algodão tendo todas as características de identificação da linha celular depositada na ATCC, sob o número de acesso PTA-3930.
8. O método de acordo com o parágrafo 7, em que a linha celular é a linha celular depositada na ATCC, sob o número de acesso PTA-3930.
9. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 8, em que o vírus de PRRS é um vírus de PRRS virulento.
10. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 8, em que o vírus de PRRS é um vírus de PRRS atenuado.
11. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 8, em que se propaga o vírus de PRRS nas células e se recupera uma cultura em bruto de vírus de PRRS.
12. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 8, em que se propaga o vírus de PRRS nas células, se recupera o vírus de PRRS, dando origem a uma cultura em bruto de vírus de PRRS e se submete esta cultura em bruto a purificação, dando origem a uma cultura purificada de vírus de PRRS.

13. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 8, em que se propaga o vírus de PRRS nas células, se recupera o vírus de PRRS, dando origem a uma cultura em bruto de vírus de PRRS e se submete esta cultura em bruto a concentração, dando origem a uma cultura concentrada de vírus de PRRS.

14. O método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 8, em que se propaga o vírus de PRRS nas células, se recupera o vírus de PRRS, dando origem a uma cultura em bruto de vírus de PRRS e se submete esta cultura em bruto a concentração e purificação, dando origem a uma cultura concentrada e purificada de vírus de PRRS.

15. O método de acordo com o parágrafo 11, em que se inactiva a cultura em bruto.

16. O método de acordo com o parágrafo 12, em que se inactiva a cultura purificada.

17. O método de acordo com o parágrafo 13, em que se inactiva a cultura concentrada.

19. O método de acordo com o parágrafo 14, em que se inactiva a cultura concentrada e purificada.

20. O método de acordo com o parágrafo 15, 16, 17 ou 18, em que se inactiva a cultura com um agente químico.

21. O método de acordo com o parágrafo 19, em que o agente químico é escolhido de entre o grupo consistindo em beta-propiolactona, formalina, etilenoimina e etilenimina binária.

22. O método de acordo com o parágrafo 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20, em que a cultura é tratada de forma a recuperar subunidades de PRRS.

23. O método de acordo com o parágrafo 9, em que o vírus de PRRS é propagado nas células e se recupera um vírus de PRRS atenuado.

24. Um vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS, obtido após propagação de vírus de PRRS em células de pulmão de Rato-do-algodão.

25. Um vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS, obtido após propagação de vírus de PRRS em linha celular de pulmão de Rato-do-algodão.

26. O vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS de acordo com o parágrafo 23 ou 24, em que as células são células epiteliais.

27. O vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS de acordo com o parágrafo 23 ou 24, em que as células compreendem células epiteliais.

28. O vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS de acordo com o parágrafo 25, em que a linha celular é a linha celular depositada na ATCC, sob o número de acesso

PTA-3930, ou uma linha celular de pulmão de rato-do-algodão tendo todas as características de identificação da linha celular depositada na ATCC, sob o número de acesso PTA-3930.

29. O vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS de acordo com o parágrafo 25, em que a linha celular é a linha celular depositada na ATCC, sob o número de acesso PTA-3930.

30. Um vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS, obtido através da realização do método de qualquer um dos parágrafos 1 a 20 ou 22.

31. O vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS de acordo com qualquer um dos parágrafos 23 a 28, estando inactivado.

32. O vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS de acordo com qualquer um dos parágrafos 23 a 28, estando atenuado.

33. Uma preparação subunitária de vírus de PRRS, obtida através da realização do método do parágrafo 21.

34. Uma composição imunogénica compreendendo um vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS de acordo com qualquer um dos parágrafos 23 a 31 e um excipiente, diluente ou veículo veterinariamente aceitável.

35. Uma composição imunogénica compreendendo uma preparação subunitária de vírus de PRRS de acordo com o parágrafo 32 e um excipiente, diluente ou veículo veterinariamente aceitável.

36. A composição imunogénica do parágrafo 33 compreendendo, adicionalmente, um estabilizante.
37. A composição imunogénica do parágrafo 33 ou 34 ou 35 compreendendo ainda um adjuvante.
38. Uma composição imunogénica compreendendo uma cultura de vírus de PRRS, obtida pelo método de acordo com o parágrafo 1.
39. Uma composição imunogénica compreendendo uma cultura de vírus de PRRS, obtida pelo método de acordo com o parágrafo 3.
40. Uma composição imunogénica compreendendo uma cultura de vírus de PRRS, obtida pelo método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 22.
41. Uma vacina compreendendo uma cultura de vírus de PRRS, obtida pelo método de acordo com o parágrafo 1.
42. Uma vacina compreendendo uma cultura de vírus de PRRS, obtida pelo método de acordo com o parágrafo 3.
43. Uma vacina compreendendo uma cultura de vírus de PRRS, obtida pelo método de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 22.
44. Uma vacina compreendendo um vírus de PRRS ou cultura de vírus de PRRS de acordo com qualquer um dos parágrafos 23 a 31 e um excipiente, diluente ou veículo veterinariamente aceitável.

45. Uma vacina compreendendo uma preparação subunitária de vírus de PRRS de acordo com o parágrafo 32 e um excipiente, diluente ou veículo veterinariamente aceitável.
46. A vacina do parágrafo 43 compreendendo ainda um estabilizante.
47. A vacina do parágrafo 43 ou 44 ou 45 compreendendo ainda um adjuvante.
48. Um método de imunização de um porcino, compreendendo a administração ao porcino de uma composição imunogénica de acordo com qualquer um dos parágrafos 33 a 39.
49. Um método de vacinação de um porcino, compreendendo a administração ao porcino de uma vacina de acordo com qualquer um dos parágrafos 40 a 46.
50. Linha celular de pulmão de Rato-do-algodão depositada na ATCC, sob o número de acesso PTA-3930, ou uma linha celular de pulmão de rato-do-algodão tendo todas as características de identificação da linha celular depositada na ATCC, sob o número de acesso PTA-3930.
51. Linha celular de pulmão de Rato-do-algodão depositada na ATCC, sob o número de acesso ATCC PTA-3930.

Tendo, deste modo, descrito em detalhe formas de realização preferidas da presente invenção, deve ser compreendido que a invenção, definida pelos parágrafos acima, não deve estar limitada a detalhes particulares expostos na descrição acima.

Lisboa, 4 de Julho de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Linha celular de rato-do-algodão depositada na *American Type Culture Collection*, sob o número de acesso ATCC PTA-3930.
2. Método para produção de um vírus, compreendendo a propagação do vírus em células de pulmão de rato-do-algodão; em que o vírus é o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV) e em que as células de pulmão de rato-do-algodão são as células da linha celular de rato-do-algodão ATCC PTA-3930.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o referido método compreende ainda a etapa de recolha do vírus resultante.
4. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que o vírus de PRRS está adaptado a crescer em células de rato-do-algodão por co-cultura com células de rim de macaco.
5. Utilização de células de pulmão de rato-do-algodão para a propagação de PRRSV, em que as células de pulmão de rato-do-algodão são as células da linha celular de rato-do-algodão ATCC PTA-3930.
6. Cultura compreendendo PRRSV e células de pulmão de rato-do-algodão, em que as células de pulmão de rato-do-algodão são as células da linha celular de rato-do-algodão ATCC PTA-3930.

7. Cultura de acordo com a reivindicação 6, em que a referida cultura está inactivada.
8. Kit compreendendo PRRSV e células de pulmão de rato-do-algodão, em que as células de pulmão de rato-do-algodão são as células da linha celular de rato-do-algodão ATCC PTA-3930.
9. Kit de acordo com a reivindicação 8, em que as referidas células e vírus estão em recipientes separados.
10. Kit de acordo com a reivindicação 8 ou 9, em que os recipientes separados estão na mesma embalagem.
11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, a utilização de acordo com a reivindicação 5, a cultura de acordo com a reivindicação 6 ou 7 ou o kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, em que o referido PRRSV é um vírus atenuado.

Lisboa, 4 de Julho de 2011

RESUMO

"CÉLULAS DE PULMÃO DE RATO-DO-ALGODÃO PARA CULTURA DE VÍRUS"

São divulgadas uma linha celular de rato-do-algodão, utilizações de células de rato-do-algodão para crescimento, propagação ou cultivo de organismos, patógenos ou vírus, tal como PRRSV e utilizações dos organismos, patógenos ou vírus resultantes.