

(11) Número de Publicação: **PT 968722 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/39 (2006.01) **A61K 39/155** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1995.05.08	(73) Titular(es): WYETH
(30) Prioridade(s): 1994.05.10 US 240373	FIVE GIRALDA FARMS, MADISON NEW JERSEY
(43) Data de publicação do pedido: 2000.01.05	07940-0874 US
(45) Data e BPI da concessão: 2007.06.20 074/2007	(72) Inventor(es): HSIEN-JUE CHU US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
	RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA VIVA MELHORADA CONTRA BRVS.**

(57) Resumo:
VACINA VIVA MELHORADA CONTRA BRVS.

RESUMO**"VACINA VIVA MELHORADA CONTRA BRSV"**

A invenção proporciona uma composição de vacina contra BRSV, a qual proporciona de forma vantajosa imunidade relativamente à infecção após uma única administração. A composição inclui um vírus BRS vivo modificado e um adjuvante, os quais em combinação proporcionam imunidade face à infecção com BRSV após uma única administração, e originam uma resposta imunológica específica contra o BRSV e que inclui imunidade mediada por células, e local (IgA segregado). Numa concretização preferida, o vírus BRS pertence à estirpe 375, e o adjuvante inclui um hidrocarboneto insaturado de terebentina, de preferência esqualeno ou esqualano, e um copolímero em blocos de polioxipropileno e polioxietileno, de preferência um em que o copolímero tenha uma componente de polioxipropileno (POP) com uma massa molecular média de entre cerca de 3250 e 4000, e a componente de polioxietileno (POE) constitua entre cerca de 10 e 20 % da molécula total. O adjuvante pode incluir opcionalmente um tensoactivo, de preferência um mono-oleato de polioxietilenossorbitan.

DESCRIÇÃO

"VACINA VIVA MELHORADA CONTRA BRSV"

Domínio da Invenção

Esta invenção diz respeito a métodos melhorados para se induzir imunidade protectora contra o Vírus Sinicial Respiratório de Bovinos (BRSV), empregando especificamente uma vacina viva modificada adequada para administração numa dose única aos animais receptores.

Antecedentes da Invenção

O Vírus Sinicial Respiratório de Bovinos (BRSV) é hoje em dia considerado um agente etiológico importante no Complexo de Doença Respiratória de Bovinos (BRDC). A doença caracteriza-se por uma respiração rápida, com tosse, perda de apetite, descargas oculares e nasais, e temperaturas elevadas. Num ataque agudo, a morte pode ocorrer nas 48 horas seguintes à manifestação dos sintomas.

O BRSV infecta gado de todas as idades, incluindo vitelos em aleitamento. O BRSV é considerado o patogénico viral mais comum na pneumonia enzoótica dos vitelos, e também tem sido associado ao enfisema pulmonar nos vitelos que terminaram recentemente a fase de aleitação. Desta

forma, existe uma necessidade de uma profilaxia eficiente contra este vírus, para os rebanhos de gado de carne e de leite.

É problemático estabelecer-se uma imunidade protectora eficaz contra o BRSV. Tal como em outras doenças mediadas por vírus, os teores em anticorpos contra o BRSV existentes no soro não se correlacionam necessariamente com a protecção face à doença. Este fenómeno pode reflectir um papel do IgA localmente produzido contra o BRSV (Kimman *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1097-1106, 1987), e/ou a necessidade de imunidade mediada por células para ser montada uma defesa eficaz contra este vírus. O estabelecimento de uma imunidade eficaz em vitelos apresenta obstáculos adicionais, uma vez que os anticorpos contra o BRSV provenientes da mãe podem aniquilar o imunogénio injectado e neutralizar a vacina de forma eficaz. Por ultimo, o custo e a inconveniência de vacinações múltiplas tornam desejável a existência de uma vacina numa dose única. Existe portanto uma necessidade na técnica, de formulações de vacina contra o BRSV numa dose única, que originem uma resposta imunológica vigorosa e multifacetada.

O régimen de administração padrão para as vacinas da técnica anterior contra o BRSV, é de duas doses (Stott *et al.*, *J. Hyg. Camb.* **93**: 251-261, 1984; Thomas *et al.*, *Agri-Practice* **5**: 1986; e Syvrud *et al.*, *Vet.Med.* **83**: 429-430, 1988; *Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals*, Edição

8 1993/94, págs. 484, 740-741, 956-960, 982-983). Tal como se descreve em Kucera *et al.* (Agri-Practice, Vet. Med., Vol. **78**, Outubro de 1983, págs. 1599-1604, 1983), uma vacinação única experimental contra o BRSV induzia teores relativamente pequenos de título de anticorpos de neutralização do BRSV no soro (SN), enquanto que duas doses da vacina originavam títulos de anticorpos SN de entre 1:10 e 1:320. Para além disto, em rebanhos aparentemente expostos ao BRSV durante ensaios no campo, cerca de 48% dos animais não vacinados necessitavam de tratamento para doenças respiratórias, em comparação com 27% e com 21%, respectivamente para os animais vacinados com uma única dose e com duas doses. No entanto não se demonstrou de forma conclusiva que o agente que provocava a doença respiratória fosse o BRSV. Descreveu-se também que uma vacina numa só dose não parecia ser muito imunogénica. Avaliações posteriores permitiram concluir que seriam essenciais duas doses desta vacina para proporcionar uma boa protecção (Bovine Vet. Forum **1**: N°. 2 págs. 2-16, 1986; Syvrud, **et al.**, Vet. Med. 429-430, 1988).

No Vet. Immunol. Immunopathol. vol. 22, N°. 2, 1989 NL, páginas 145-60, Kimman e *tal.* descrevem a administração de, e as respostas locais e sistémicas devidas a memória contra, o Vírus Sincitial Respiratório de Bovinos, e os efeitos da quantidade de vírus da replicação do vírus, da via de administração e dos anticorpos maternos. No J. Clin. Microbiol. vol. 25, N°. 6, 1987, páginas 1.097-1.106, Kimman *et al.* descrevem repostas

locais e sistémicas contra a infecção por Vírus Sincitial Respiratório de Bovinos, bem como uma re-infecção, em vitelos com, e sem, anticorpos maternos. Em Vet. Q., vol. **13**, N°. 1, 1991 NL, páginas 47-59, Baker descreve mecanismos imunopatológicos humanos e bovinos do Vírus Sincitial Respiratório de Bovinos. Em Semin. Immunol., vol. **2**, N°. 5, 1990 EUA, páginas 360-374, Allison et al. descrevem formulações adjuvantes e o seu modo de actuação.

NO Pedido de Patente Europeia N°. 129.923 (publicado a 1 de Fevereiro de 1985 e emitido sob a forma de uma patente a 9 de Julho de 1988), descreve um método de se preparar uma vacina viva contra BRSV que envolve dissolver-se a vacina viva numa vacina inactivada contendo um ou mais antigénios (em especial vírus da gripe inactivado) formulada como uma emulsão de óleo em água. Obteve-se uma resposta sorológica em animais jovens que ainda possuíam imunidade materna. O pedido também descreve uma preparação viva modificada contendo BRSV e adjuvante. No entanto, não foram apresentados nenhuns dados quanto à eficácia da protecção de qualquer vacina de BRSV contra uma infecção por BRSV.

Um objecto da invenção é proporcionar uma vacina eficaz contra o BRSV, que origine imunidade preventiva e que impeça uma doença causada por este vírus.

Um outro objecto da invenção é proporcionar um adjuvante adequado para utilização numa vacina de BRSV, em

que o adjuvante aumente a imunogenicidade do vírus de forma a originar uma imunidade protectora após uma única dose de vacina.

A invenção inclui utilizações tal como pretendidas, nas reivindicações que lhe estão apensas.

A invenção também diz respeito a uma composição para incrementar a resposta imunológica, que inclui um copolímero em bloco, tal como um copolímero em bloco de polioxipropileno e polioxietileno (POP-POE), preferivelmente Pluronic® L121 (por exemplo, Patente U.S. 4.772.466), e uma componente orgânica tal como um óleo metabolizável, por exemplo um hidrocarboneto insaturado de terebentina, preferivelmente o esqualano (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracosano) ou o esqualeno. A composição também pode incluir um detergente ou um tensioactivo não iónico, preferivelmente um mono-oleato de polioxietileno-sorbitano tal como um detergente Tween®, de preferência Tween®-80, isto é, mono-oleato de polioxietileno(20)-sorbitano.

Nesta mistura de adjuvante de partida, o copolímero em blocos, o óleo orgânico, e o tensioactivo, podem estar presentes em quantidades adentro das gamas, respectivamente, de entre cerca de 10 e cerca de 40 mL/L, entre cerca de 20 e cerca de 80 mL/L, e entre cerca de 1,5 e cerca de 6,5 mL/L. Numa concretização preferida da mistura adjuvante de partida, a componente orgânica será o esqualano presente numa quantidade de cerca de 40 mL/L, o

tensioactivo será mono-oleato de polioxietileno-sorbitano (Tween®-80) presente numa quantidade de cerca de 3,2 mL/L, e o copolímero em blocos POP-POE será Pluronic® L121 presente numa quantidade de cerca de 20 mL/L. O Pluronic® L121 é um copolímero líquido a 15-40°C, em que a componente de polioxipropileno (POP) tem uma massa molecular de entre 3250 e 4000 e a componente de polioxietileno (POE) constitui entre 10 e 20%, de preferência 10%, da molécula total.

Noutro aspecto, a invenção presente proporciona uma composição imunogénica para imunizar um animal contra uma infecção pelo Vírus Sincitial Respiratório dos Bovinos (BRSV), que inclui um vírus BRS modificado e vivo, em combinação com o adjuvante acima e com um estabilizador, veículo ou diluente aceitável do ponto de vista farmacêutico. O adjuvante encontra-se presente na composição para vacina, a uma concentração final de entre cerca de 1 e 25% (em volume), de preferência a 5% (em volume). A composição também pode incluir outros vírus, tal como o Vírus Infeccioso da Rino-traqueíte dos Bovinos (IBRV), O da Diarreia Viral Bovina (BVDV), e o vírus Parainfluenza 3 (PI-3V), e pode ser administrada pela via intramuscular ou pela subcutânea.

Noutro aspecto ainda, a invenção presente proporciona um método para proteger um animal contra uma doença provocada pelo Vírus Sincitial Respiratório dos Bovinos, pela administração de uma única dose da vacina acima, incluindo BRSV vivo modificado e um adjuvante.

Descrição pormenorizada da Invenção

Tal como se utilize neste documento, "vacina viva modificada" é uma vacina que inclui o vírus que foi alterado, tipicamente por uma passagem por células de tecido em cultura, para atenuar a sua capacidade de provocar doença, mas que mantém a sua capacidade de proteger contra a doença ou uma infecção quando é administrado a animais.

"Adjuvante" significa uma composição constituída por uma ou mais substâncias, que incrementa a imunogenicidade e a eficácia de BRSV quando é misturada com BRSV na composição de uma vacina.

Uma "unidade infecciosa" de BRSV é definida como sendo a TCID₅₀, ou a quantidade de vírus necessária para infectar ou causar a morte de 50% das células de tecido em cultura.

A invenção presente proporciona uma vacina contra BRSV que é adequada para uma administração em dose única. A vacina é do tipo de vírus vivo modificado. Isto proporciona a vantagem de conservar a imunogenicidade e/ou a eficácia do vírus, enquanto diminui a sua virulência.

Pode preparar-se a vacina a partir de culturas virais recentemente colhidas, por métodos que são padrão na técnica (veja-se o Exemplo 1 adiante). Isto significa que o

vírus pode ser propagado em cultura de células de tecido, tais como fibroblastos diplóides humanos ou preferivelmente MDBK (de Rim de Bovino Madin-Darby), ou em outras células de bovino. O crescimento do vírus é monitorizado por técnicas habituais (observação do efeito citopático, imuno-fluorescência ou outros testes baseados em anticorpos), e colhe-se quando se obteve um título viral suficientemente elevado. As reservas de vírus podem ser ainda concentradas, ou liofilizadas, utilizando os métodos habituais, antes de serem incluídas na formulação de vacina. Podem empregar-se outros métodos, tais como os que se descreveram em Thomas, *et al.*, *Agri-Practice*, V.7 N°. 5, págs. 26-30.

A vacina da invenção presente inclui o vírus vivo modificado misturado com um ou mais estabilizadores, veículos e adjuvantes aceitáveis do ponto de vista farmacêutico. Incluem-se nos veículos cuja utilização é adequada o soro salino, o soro salino tamponizado com fosfato, os meios essenciais Mínimos (MEM), ou MEM com tampão HEPES. Incluem-se nos estabilizadores, sem que eles se limitem a estes, a sacarose, a gelatina, a peptona, os extractos proteicos digeridos, tais como NZ-Amina ou NZ-Amina AS. A invenção presente inclui em especial um adjuvante que aumenta a imunogenicidade do vírus vivo modificado e que permite que uma única administração proporcione imunidade protectora.

Incluem-se nos adjuvantes adequados o esqualano e o esqualeno (ou outros óleos de origem animal); copolímeros

em blocos tais como Pluronic® (L121) Saponina; detergentes tais como Tween®-80; Quil® A, óleos minerais tais como Drakeol® ou Marcol®, óleos vegetais tais como óleo de amendoim; adjuvantes provenientes de *Corynebacterium* como por exemplo de *Corynebacterium parvum*; adjuvantes provenientes de *Propionibacterium*, tal como por exemplo de *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis* (*Bacillus Calmette e Guerin*, ou BCG); interleuquinas tais como a interleuquina 2 e a interleuquina-12; monoquinas tais como a interleuquina 1; factor de necrose tumoral; interferões tais como interferão gama; combinações tais como saponina e hidróxido de alumínio ou Quil® com hidróxido de alumínio; lipossomas; adjuvantes iscom; extracto de paredes celulares de micobactérias; glicopéptidos sintéticos tais como dipéptidos muramílicos ou outros derivados; Avridina; Lípido A; sulfato de dextrano; DEAE-Dextrano ou DEAE-Dextrano com fosfato de alumínio; carboxipolimetilenos, tais como o Carbopol®; EMA; emulsões de copolímeros acrílicos tais como Neocryl® A640 (por exemplo na Patente U.S. 5.047.238); proteínas de vaccinia ou de vírus de varíola; adjuvantes que sejam partículas subvirais como por exemplo o orbivírus; toxina da cólera; brometo de dimetildioctodecilmónio; ou misturas destes.

Descreve-se no exemplo 2 adiante a formulação de uma mistura adjuvante preferida.

Pode administrar-se a vacina da invenção presente, de preferência pela via intramuscular ou pela

subcutânea, ou menos preferivelmente pela via intranasal, pela intraperitoneal, ou pela via oral.

Para uma administração numa dose única, a vacina deve conter uma quantidade de BRSV que corresponda a entre cerca de $10^{3,0}$ e cerca de $10^{6,0}$ TCID₅₀/mL, preferivelmente entre 10^4 e 10^5 TCID₅₀/mL. Pode administrar-se entre 1 e 5 mL, de preferência 2 mL, a cada animal, por via intramuscular, subcutânea, ou intraperitoneal. Pode administrar-se um a dez mL, preferivelmente 2 a 5 mL, por via oral ou intranasal.

Pretende-se que os exemplos seguintes ilustrem mais detalhadamente a invenção, sem limitarem o seu âmbito.

Exemplo 1: Crescimento e colheita de BRSV

A) Descrição das reservas de vírus: Pode obter-se o BRSV a partir de uma de entre diversas fontes facilmente acessíveis. Numa concretização, pode utilizar-se a estirpe 375 do BRSV. Esta estirpe virulenta de BRSV provinha da Iowa State University, Ames, Iowa. Considera-se e inclui-se na invenção qualquer estirpe de BRSV que seja adequada. De igual forma, os BHV-1, BVDV, e PI-3V são vírus facilmente acessíveis. Quando são obtidos sob formas virulentas, estes vírus podem ser atenuados, por métodos conhecidos, para se obterem vírus vivos modificados adequados para

utilização como vacinas. Os vírus também podem ser mortos por métodos convencionais, para se obterem vírus inativados para utilização em vacinas. São bem conhecidos os métodos para se atenuarem e para se inativarem os vírus, para utilização em vacinas. São conhecidas vacinas com vírus BRSV, BHV-1, BVDV, e PI-3V modificados vivos e/ou mortos, e estão disponíveis comercialmente. Veja-se, por exemplo, Thomas, *et al.*, acima, e Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals, acima e no Apêndice 2, A-31-45.

B) Cultura de células: Adquiriu-se a linha de células MDBK (NBL-1), isenta de BVD, junto da American Type Culture Collection. Foi mantida em OptiMEM (Gibco, Grand Island, NY), suplementado com até 10 % (em volume) de soro bovino, até 0,5 % de hidrolisado de lactalbumina (JRH, Lenexa, KS), até 30 mcg/mL de polimixina B (Pfizer, NY, NY) e neomicina (Upjohn, Kalamazoo, MI), e com até 2,5 mcg/mL de anfotericina B (Sigma Chemical Co., St. Louis MO). Podem também adicionar-se piruvato de sódio, bicarbonato de sódio, glucose, L-glutamina e cloreto de cálcio, tal como seja necessário para assegurar o crescimento das células.

Para a propagação do vírus, suplementou-se OptiMEM, Eagle's MEM, Medium 199, ou um meio

equivalente com até 2% de soro bovino, até 0,5% de albumina de soro bovino, até 0,5% de hidrolisado de lactalbumina, até 30 mcg/mL de polimixina B e de neomicina, e até 2,5 mcg/mL de anfotericina B. Podem também adicionar-se piruvato de sódio, bicarbonato de sódio, glucose, L-glutamina e cloreto de cálcio, tal como seja necessário para assegurar o crescimento das células.

C) Inoculação de culturas: Inocularam-se culturas individuais subconfluentes de células MDBK com BRSV, BVDV, PI-3V, ou BHV-1V, utilizando uma multiplicidade de infecções entre 1:5 e 1:5.000 unidades infecciosas por célula. Rejeitou-se o meio de crescimento das células e substituiu-se por meio de propagação viral (veja-se acima), e em seguida adicionou-se directamente o vírus semente ao caso de cultura. Mantiveram-se as culturas infectadas com vírus a 36°C.

Determinou-se o crescimento viral por exame do efeito citopático ao microscópio ou por contração com anticorpos fluorescentes. Para o BRSV, as células infectadas evidenciavam a formação de sincítiais e de células alongadas fusiformes, que progrediam até estar essencialmente envolvida a folha de células inteira. Para o BHV-1V, as células infectadas exibem granulação citoplásmica seguida de arredondamento e/ou aquisição de forma

de balão, por parte das células infectadas. Para o BVDV, as células infectadas formam vacúolos intracelulares, arredondam-se, e deixam áreas circunscritas isentas de células. As alterações citopáticas nas células infectadas com o PI-3V são semelhantes às evidenciadas pelas células infectadas pelo BHV-1V.

D) Colheita dos Vírus: Recolheram-se os meios de cultura em vasos estéreis. As diversas colheitas podem iniciar-se quando 50 % da folha de células evidenciar a citopatologia característica, e continuar até que 100% das células estejam afectadas. Os fluidos virais podem ser clarificados por centrifugação ou não. Armazenam-se os fluidos virais a -50°C ou a uma temperatura inferior, ou liofilizam-se e armazenam-se a entre 2 e 8°C.

Para a preparação de uma forma final de vacina, misturam-se as reservas de vírus, quer por si sós quer em conjuntos, com um adjuvante.

Quando se utilizam reservas virais no estado líquido, misturam-se 19 partes de reserva viral com uma parte de adjuvante, preferivelmente o adjuvante do Exemplo 2. Quando se utilizam reservas virais liofilizadas, prepara-se uma solução diluída a 5 % (em volume) do adjuvante em soro salino (mistura-se 1 parte de adjuvante com

19 partes de soro salino). Reconstitui-se a reserva viral liofilizada (rehidrata-se) com o adjuvante diluído, para se formar a composição final da vacina. Pode adicionar-se timerissol à formulação final, a uma concentração final de 1:10.000.

Exemplo 2: Formulação de uma reserva de adjuvante preferido

Preparou-se um adjuvante preferido para utilização na invenção presente, de acordo com a seguinte formulação:

copolímero em blocos de polioxipropileno-polioxietileno (por exemplo Pluronic® L121, BASF, Parsippany, NJ)	20 mL
esqualano (por exemplo Kodak, Rochester, NY)	40 mL
mono-oleato de polioxietileno-sorbitano (por exemplo Tween®-80, Sigma Chemical, St. Louis, MO)	3,2 mL
solução de sal tamponizada (por exemplo Solução D-V PAS, isenta de Ca e Mg)	936,8 mL

Misturam-se os ingredientes e homogeneiza-se até se obter uma massa ou uma emulsão estável. Antes da homogeneização, podem esterilizar-se num autoclave os ingredientes ou a mistura. Pode esterilizar-se ainda a emulsão por filtração. Pode adicionar-se formalina até uma concentração final de 0,2 %. Pode adicionar-se timerossal a uma diluição final de 1:10.000.

Exemplo 3: Melhoramento de uma Vacina de BRSV**Modificado Vivo**

Para este estudo, prepararam-se duas vacinas de BRSV, uma que continha e outra que não continha a mistura adjuvante descrita no Exemplo 2. A vacina sem adjuvante continha 2,52 log de unidades infecciosas de BRSV por 2 mL, enquanto a vacina que continha adjuvante continha 2,96 log de unidades infecciosas de BRSV por 2 mL e 5% de adjuvante (em volume).

Administrou-se a cada um dos elementos de um conjunto de 20 bovinos uma dose de 2 mL de vacina sem adjuvante, dez por via intramuscular e dez por via subcutânea. Administrou-se a outros cinco bovinos uma dose de 2 mL da vacina contendo o adjuvante. Repetiram-se todas as vacinações passados 21 dias. Obtiveram-se amostras de soro no sexto dia após a segunda vacinação, e testaram-se quanto à presença de anticorpos de neutralização anti-BRSV no soro. Descreve-se no Exemplo 4 o ensaio de determinação de anticorpos de neutralização no soro.

Os resultados deste estudo indicaram que 4 dos cinco vitelos que haviam sido inoculados com a vacina de BRSV contendo adjuvante mostravam evidência de anticorpos anti-BRSV (seroconversão), enquanto nenhum dos animais inoculados com a vacina de BRSV isenta de inoculante

demonstrou evidência de anticorpos. Isto indica que o adjuvante descrito no Exemplo 2 tem a propriedade de aumentar a imunogenicidade das vacinas com BRSV modificado vivo.

Exemplo 4: Administração de uma Dose única de vacina de BRSV melhorada

Levou-se a cabo o seguinte ensaio de vacinação e infecção para se determinar se uma única imunização com vacina de Vírus Sincicial de Bovinos modificado vivo (BRSV) formulado com um adjuvante induzia imunidade protectora em gado. Em segundo lugar, concebeu-se o estudo para se determinar se haveria interferência quando se procedesse à administração em simultâneo de Vírus de Diarreia Viral Bovina (BVDV) modificado vivo, de vírus herpes bovino do Tipo 1 (BHV-1 ou IBRV) modificado vivo, e de Vírus de Parainfluenza Bovina (PI3) modificado vivo, quanto à indução da imunidade protectora contra o BRSV.

A) Vacinas Experimentais: Fez-se crescer o Vírus Sincicial de Bovinos modificado vivo (BRSV), a cinco passagens após a semente de partida, em células de Rim Bovino Madin Darby (MDBK), à passagem 20 da reserva inicial de células. Em suma, plantaram-se células MDBK em frascos rotativos de 850 cm², a uma densidade de 3 X 10⁷ células por frasco rotativo, em Meio Mínimo

Essencial (MEM) contendo 5% de soro bovino, 0,5% de LAH, e 30 µg/mL de Gentamicina. Deixaram-se crescer as células a 37°C durante 2 dias antes de se infectarem com vírus. Decantou-se o meio dos frascos rotativos e adicionou-se-lhes vírus a uma Multiplicidade de Infecção de 1:600 em 100 mL de meio de propagação de vírus por frasco (MEM contendo 2% de soro bovino, 0,5% de LAH, e 30 µg/mL de Gentamicina). Sete dias depois da infecção, estava presente 100 % de citopatologia e recolheram-se os fluidos sobrenadantes. Estabilizou-se o vírus com 25% (em volume) de estabilizador SGGK3, e liofilizou-se. No dia da vacinação, reconstituiu-se o vírus liofilizado com 5% (em volume) de adjuvante diluído em diluente salino (Veja-se o Exemplo 2). Misturou-se o vírus BRSV reconstituído com vírus PI3, BVDV, e BHV-1. Determinou-se o título de cada componente da vacina por titulação em replicado, no dia da vacinação.

B) Animais Experimentais Utilizados: Utilizou-se um total de 30 bovinos para este estudo. Estes bovinos eram susceptíveis ao BRSV, tal como indicado por um título de anticorpos neutralizantes no soro (SN) de < 2 no dia da vacinação, para os animais do teste, e no dia da infecção para os controlos. Alojaram-se os animais ao ar livre com

acesso a um abrigo com três paredes, aberto a sul. Alojaram-se os controlos em separado dos animais vacinados antes da infecção, para evitar uma exposição ao vírus da vacina. Foi-lhes disponibilizada uma ração completa ao dia, e palha e água foram fornecidos *ad libitum*.

C) Vacinação: Administrou-se uma vez a cada animal a vacinar um volume de dois mL da vacina de combinação. Vacinaram-se vinte (20) animais (dez por via subcutânea e dez por via intramuscular) e não se vacinaram os dez animais restantes que serviram de controlos por infecção.

D) Infecção Experimental: Infectaram-se os animais com vírus BRSV virulento catorze dias a seguir à vacinação. Administrou-se um mínimo de $10^{5,7}$ TCID₅₀ de vírus BRSV virulento a cada vitelo, por infecção com aerossol, em três dias consecutivos.

E) Observações Clínicas: Observaram-se os animais diariamente -2 a 14 dias após a infecção, para despistar sinais de doença e de febre (temperatura rectal). Observaram-se os bovinos para detectar sinais de infecção com BRSV, incluindo mas não se limitando a, descargas nasais e oculares, conjuntivite, tosse, dispneia, anorexia, e

depressão. Registou-se diariamente a temperatura rectal durante o período de observação.

F) Determinações:

1. Determinação de Anticorpos neutralizantes no Soro (SN)

Misturaram-se diluições em série de soro termicamente inactivado com volumes iguais de suspensões virais, num teste de neutralização de vírus a soro constante, utilizando 100 a 500 TCID₅₀ de BRSV. Incubou-se durante 1 hora a 37°C a mistura de vírus e soro, e depois inoculou-se em células VERO em placas de microtitulação com 96 poços. A presença dos títulos em anticorpos SN era indicada pela ausência de vírus, tal como se detectava pelo seu efeito citopático. Para a determinação dos títulos em anticorpos SN, calcularam-se os pontos finais de 50% de neutralização de acordo com o método de Reed e Muench.

2. Titulação de Vírus em Vacina à Diluição Final

Determinou-se o título da vacina em BRSV por

titulação em replicado no dia da vacina. Em resumo, misturou-se a vacina de combinação com antissoros neutralizantes adequados. Incubaram-se as misturas da vacina com antissoros a 37°C durante entre 45 e 60 minutos. Fizeram-se diluições em série da vacina e dos antissoros e inocularam-se em células VERO. A presença de vírus era indicada pela presença de efeito citopático e confirmada por imunofluorescência específica (FA). Calculou-se o título do vírus em cada réplica pelo método de Reed and Muench. O título médio da fracção de BRSV da vacina era de $10^{3,4}$ TCID₅₀ por dose.

3. Titulação do Vírus para Infecção

Diluiu-se em série a diluição do BRSV para infecção, e inoculou-se em células MDBK em placas de microtitulação com 96 poços. A presença de vírus era indicada pela presença de efeito citopático e confirmada por imunofluorescência específica tal como se descreveu para o isolamento do vírus.

Para interpretar os resultados, atribuíram-se classificações clínicas tal como se segue:

Sinal Clínico	Classificação/Observação	
Descarga Nasal		
Severa serosa	2	
Ligeira		
mucopurulenta	2	
Moderada		
mucopurulenta		3
Severa		
mucopurulenta	4	
Descarga Ocular		
Severa serosa	1	
Ligeira		
mucopurulenta	2	
Moderada		
mucopurulenta		3
Severa		
mucopurulenta	4	
Conjuntivite	2	
Tosse	2	
Dispneia	2	
Anorexia	1	
Hiperemia e enrubescimento da mucosa nasal		1
Febre (tem que ser pelo menos 1°F acima da linha de base)		
103,5 a 103,9 °F		1
104,0 a 104,9 °F		2
105,0 a 105,9 °F		3
≥ 106,0 °F	4	

Considerou-se que era normal uma descarga serosa ligeira, nasal ou ocular, para gado alojado ao ar livre. Considerou-se a febre significativa apenas quando era pelo menos de um grau superior à temperatura de linha de base do corpo. Determinou-se a temperatura de linha de base do corpo como sendo a média das temperaturas do corpo para cada animal, no dia antes da infecção e no dia da infecção.

As classificações clínicas totais para cada animal foram obtidas por soma total. Compararam-se as classificações clínicas dos animais vacinados e dos de controlo pelo método de Análise da Soma por Graus de Mann Whitney.

Observaram-se sinais clínicos da doença nos animais de controlo, a partir do dia 5 e até ao dia 10 após a infecção (Tabela 1). Observou-se que todos os controlos (100%) apresentavam sinais de doença respiratória em diversos dias. Os sinais específicos de doença respiratória incluíam descarga nasal serosa severa (descarga pingando de facto das narinas), descarga nasal mucopurulenta, descarga ocular, e tosse. A classificação clínica média para os vitelos de controlo foi de 3,7.

Em comparação, os sintomas respiratórios eram muito menos comuns nos animais vacinados. Só 40 % dos animais vacinados apresentavam quaisquer sinais de doença respiratória, e só dois (10%) apresentavam sinais clínicos em diversos dias. A classificação clínica média para o

grupo vacinado foi de 1,0. Verificou-se existir uma diminuição significativa da doença clínica nos animais vacinados, em comparação com os do grupo de controlo, por uma Análise de Soma por Graus de Mann Whitney ($p < 0,05$).

Estes dados mostram que a administração de uma única dose de vacina de vírus BRSV vivo modificado, de acordo com esta invenção, protege contra uma infecção com BRSV virulento. Este método de vacinação é eficaz, mesmo quando são co-administradas outras vacinas com a vacina BRSV.

Desta forma, a invenção proporciona uma composição de uma vacina para imunizar um animal contra uma infecção por Vírus Sincitial respiratório de Bovinos (BRSV). A vacina inclui um vírus BRS modificado vivo, um adjuvante, e um veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico, de tal forma que a combinação proporciona imunidade contra uma infecção por BRSV após uma única administração, e origina uma resposta imune específica contra o BRSV que é seleccionada de entre imunidade mediada por células e imunidade local (IgA segregado).

A imunidade mediada por células inclui estimulação das Células T Ajudantea, das Células T Assassinas, e das Células T de Hipersensibilidade Prolongada, bem como a estimulação de produção de macrófagos, de monócitos, e de outras linfoquinas e de interferão. A presença de imunidade mediada por células pode ser determinada por testes

convencionais *in vitro* e *in vivo*. A imunidade local, tal como a de IgA segregado, pode ser determinada por testes de ELISA ou IFA convencionais que demonstram um título de anticorpos neutralizantes no soro, de 1-2 ou maior. De acordo com a invenção, as consequências da imunidade mediada por células ou da imunidade local são específicas para, ou associadas ao, BRSV.

Lisboa, 27 de Agosto de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um Vírus Sincitial Respiratório de Bovinos modificado vivo e de um ou mais adjuvantes em combinação com um ou mais estabilizadores, veículos e adjuvantes aceitáveis do ponto de vista farmacêutico, seleccionados de entre os adjuvantes que proporcionem uma resposta imunológica multifacetada contra o BRSV modificado, sendo os adjuvantes referidos seleccionados de entre aqueles que proporcionem imunidade mediada por células e imunidade local (IgA segregado) e que para além disso sejam elementos do conjunto constituído por: esqualano e o esqualeno (ou outros óleos de origem animal); copolímeros em blocos, de preferência Pluronic® (L121); Saponina; detergentes ou tensioactivos não iónicos, de preferência mono-oleato de polioxietileno(20)-sorbitano Tween®-80; Quil® A, óleos minerais, de preferência Drakeol® ou Marcol®, óleos vegetais; adjuvantes provenientes de *Corynebacterium* como por exemplo de *Corynebacterium parvum*; adjuvantes provenientes de *Propionibacterium*, de preferência de *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis* (*Bacillus Calmette* e *Guerinn*, ou BCG); interleuquinas seleccionadas de entre a interleuquina 2 e a interleuquina-12; monoquinas, de preferência a interleuquina 1; factor de necrose tumoral; interferões de preferência interferões gama; combinações de saponina com hidróxido de alumínio ou

de Quil® com hidróxido de alumínio; lipossomas; adjuvante iscom; extracto de paredes celulares de micobactérias; glicopéptidos sintéticos, de preferência dipéptidos muramílicos ou outros derivados; Avridina; Lípido A; sulfato de dextrano; DEAE-Dextrano ou DEAE-Dextrano com fosfato de alumínio; carboxipolimetilenos, de preferência o Carbopol®; EMA; emulsões de copolímeros acrílicos, de preferência Neocryl® A640; proteínas de vaccinia ou de vírus de varíola; adjuvantes que sejam partículas subvirais, de preferência o orbivirus; toxina da cólera; brometo de dimetildioctadecilmónio; ou misturas destes, na preparação de uma vacina de Vírus Sincitial Respiratório de Bovinos de dose única, de tal forma que a vacina origine uma imunidade positiva contra a infecção por BRSV após uma única administração.

2. A utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o adjuvante inclua também um tensoactivo.

3. A utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o adjuvante também inclua um tensoactivo presente numa concentração final de cerca de 0,0015 a 0,20 % (em volume).

4. A utilização de acordo com a reivindicação 2 ou a 3, em que o tensoactivo seja mono-oleato de poli-oxietileno-sorbitano.

5. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a vacina também incluía Vírus de Rino-traqueíte de Bovinos (BHV-IV), Vírus de Diarreia de Bovinos (BVDV), e Vírus de Parainfluenza 3 (PI-3V).

Lisboa, 27 de Agosto de 2007

BIBLIOGRAFIA CITADA NA DESCRIÇÃO

A lista da bibliografia citada pela requerente destina-se unicamente ao leitor. Ela não integra o documento de patente Europeia. Ainda que se tenha tido grande cuidado na compilação da bibliografia, não se podem excluir erros nem omissões, e o EPO rejeita qualquer responsabilidade a este respeito.

Documentos de patentes citados na descrição

- EP 129923 A
- US 4772466 A
- US 5047238 A

Outra literatura citada na descrição

- **KIMMAN e tal.** J. Clin. Microbiol., 1987, **25**, 1097-1106.
- **STOTT et al.** J. Hyg. Camb. 1984, **93**, 251-261.
- **THOMAS et al.** Agri-Practice, 1986, **5**.
- **SYVRUD et al.** Vet. Med., 1988, **83**, 429-430.
- Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals. 1993, **78**, 484, 740-741, 956-960, 982-983.
- Agri-Practice. Vet. Med. Outubro 1983, **78**, 1599-1604.
- Bovine Vet. Fórum **1**, 16 de Fevereiro de 1986, 2.
- **SVYRUD et al.** Vet. Med., 1988, 429-430
- Vet. Immunol. Immunopathol., 1989, **22**(2), 145-160.
- Bovine Respiratory Syncytial Vírus and the effect of the amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies, J. Clin. Microbiol., 1987, **25**(6), 1.097-1.106
- Bovine Respiratory Syncytial Virus infection, and re-infection in calves with and without maternal antibodies. Vet Q., 1991, **13**(1), 47-59
- **BAKER**, Human and Bovine Respiratory Syncytial Virus immunopathologic mechanisms. Semin. Immunol. 1990, **2**(5), 369-374,
- **THOMAS et al.**, Agri-Practice **7**(5), 26-30