



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

(21) BR 112020011044-2 A2



(22) Data do Depósito: 03/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(54) Título: VACINAÇÃO COM PARTÍCULAS DE REPLICON E ADJUVANTE DE ÓLEO

(51) Int. Cl.: A61K 39/193; A61K 9/10; A61P 31/16; A61P 31/12; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 04/12/2017 US 62/594,342; 18/12/2017 US 62/607,101.

(71) Depositante(es): INTERVET INTERNATIONAL B.V..

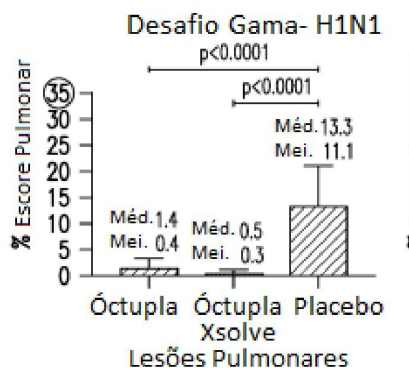
(72) Inventor(es): MARK A MOGLER; ERIN STRAIT; RUUD PHILIP ANTOON MARIA SEGERS.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018083297 de 03/12/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/110481 de 13/06/2019

(85) Data da Fase Nacional: 01/06/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se à vacinação contra patógenos de animais usando partículas de RNA de replicon de alfavírus e adjuvantes de óleo. A uma vacina, e um kit de partes compreendendo as partículas de replicon e o adjuvante de óleo. Também a métodos e usos de fabricação e utilização da vacina e dos componentes do kit.



VACINAÇÃO COM PARTÍCULAS DE REPLICON E ADJUVANTE DE ÓLEO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se à vacinação contra patógenos de animais usando partículas de replicon de RNA de alfavírus e adjuvantes de óleos. A uma vacina e um kit de partes compreendendo as partículas de replicon e o adjuvante de óleo. E também aos métodos e usos de fabricação e utilização da vacina e dos componentes do kit.

ANTECEDENTES

[002] Várias estratégias baseadas em vetores foram empregadas ao longo dos anos para vacinas, em um esforço para proteger contra patógeno de animais. Uma dessas estratégias vetoriais inclui o uso de partículas de replicon de RNA derivadas de alfavírus (RP) [Vander Veen, et al. Anim Health Res Rev. 13(1):1-9. (2012) doi: 10.1017/S1466252312000011; Kamrud et al., J Gen Virol. 91 (Pt 7): 1723-1727 (2010)] que foram desenvolvidas a partir de vários alfavírus diferentes, incluindo o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEE) [Pushko et al., Virology 239: 389-401 (1997) vírus Síndbis [Bredenbeek et al., Journal of Virology 67: 6439-6446 (1993)] e vírus da Floresta de Semliki [Liljestrom e Garoff, Biotechnology (NY) 9: 1356- 361 (1991)]. Os antígenos patogênicos codificados são expressos pela partícula de replicon, após a infecção de uma célula de um alvo humano ou animal. O resultado é a indução de anticorpos protetores contra o antígeno expresso. As RPs têm um perfil atraente de segurança e eficácia quando comparadas a algumas formulações de vacinas tradicionais [Vander Veen, et al. Anim Health Res Rev. 13 (1): 1-9 (2012)]. A plataforma de RP é a base para várias vacinas licenciadas pelo USDA, que inclui: Vacina da Diarreia Epidêmica Porcina, Partícula de RNA (Código de Produto 19U5.P1), Vacina da Influenza Porcina, RNA (Código de Produto 19A5.D0), Vacina da Influenza

Aviária, RNA (Código de Produto 19O5.D0) e Produto de Prescrição, Partícula de RNA (Código de Produto 9PP0.00).

[003] As partículas de RNA de replicon derivado de alfavírus carecem dos genes de proteínas estruturais do alfavírus, mas mantêm os elementos de replicação necessários para a autoamplificação de RNA citoplasmático e a expressão de ácidos nucleicos heterólogos inseridos, conduzidos pelo promotor subgenômico de alfavírus 26S altamente ativo. Por conseguinte, as RPs são partículas infecciosas de ciclo único, com defeito de replicação devido à ausência de genes proteicos estruturais. [Lundstrom, *Vaccines* 6: 2392-2415 (2014)]. As proteínas estruturais necessárias para o empacotamento e produção de partículas de replicon, portanto, devem ser fornecidas *in trans* em células hospedeiras adequadas, para produzir as RPs [*vide*, Vajdy *et al.*, *Immunol. and Cell Biol.* 82: 617-627 (2004)]. As proteínas estruturais são geralmente fornecidas pela cotransfecção transitória do RNA de replicon e um ou mais RNAs “auxiliares” codificando as proteínas estruturais. Alternativamente, a RP pode ser produzida a partir de linhas celulares de empacotamento que expressam as proteínas estruturais virais, de maneira constitutiva ou transitória, a partir de uma ou mais cassetes de expressão de DNA. Dessa maneira, a produção das partículas de replicon preserva a natureza defeituosa da replicação dos vetores, pois as proteínas estruturais não são incluídas no genoma de RP resultante [Polo *et al. Dev. Biol.*, 104: 181-185 (2000)]. Estas partículas de replicon de RNA de alfavírus com defeito na replicação, quando usadas para a imunização de um humano ou animal alvo, induzem respostas imunes protetoras *in vivo*. Os vetores de alfavírus com base em VEE, por exemplo, provocam fortes respostas imunológicas mucosas e sistêmicas após imunização sistêmica de camundongos e animais maiores [Davis *et al.*, *IUBMB Life* 53: 209-211 (2002)].

[004] Adjuvantes são compostos conhecidos que são capazes de fornecer uma estimulação não específica ao sistema imune de um humano ou animal alvo. O uso padrão de adjuvantes é em vacinas com base em antígenos inativados ou de subunidades. Existe uma grande variedade de tipos de adjuvantes e composições, por exemplo: sais de alumínio como Hidróxido de alumínio, ou Fosfato de alumínio, lipossomas, glucanos, alginato, componentes bacterianos como componentes de parede celular, óleos minerais ou não minerais, adjuvantes sintéticos como: polímeros de bloco não iônicos, poliaminas como sulfato de dextrano, Carbopol™, pirano e saponinas, como: Quil A™ ou Q-vac™. Saponina e componentes de vacina podem ser combinados em um ISCOM™.

[005] Além disso, peptídeos tais como muramildipeptídeos, dimetilglicina, e tuftsin, são usados frequentemente como adjuvantes. De maneira similar, produtos de combinações, como as composições ISA™ (Seppic, França).

[006] Um manual sobre adjuvantes e seus usos e efeitos é: “*Vaccine adjuvants*” (*Methods in molecular medicine*, vol. 42, D. O'Hagan ed., 2000, Humana press, NJ, ISBN: 0896037355).

[007] A citação de qualquer referência na presente invenção não deve ser interpretada como um reconhecimento de que tal referência está disponível como “estado da técnica” para o presente pedido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] A presente invenção fornece uma vacina compreendendo uma partícula de replicon de RNA de alfavírus codificando um antígeno originário de um patógeno de animal, em que a vacina também compreende um adjuvante de óleo.

[009] Em uma modalidade da vacina da invenção, o adjuvante de óleo compreende pelo menos um óleo selecionado a partir de um óleo mineral e um óleo não mineral.

[010] Em uma modalidade da vacina da invenção, o adjuvante de óleo compreende um óleo mineral; preferencialmente o óleo mineral é um óleo de parafina líquida.

[011] Em uma modalidade da vacina da invenção, o adjuvante de óleo compreende um óleo não mineral; preferivelmente o óleo mineral é selecionado a partir de um óleo sintético, um óleo semissintético, um óleo animal e um óleo vegetal. O óleo não mineral é selecionado mais preferencialmente dentre um esqualano, um esqualeno, um tocoferol e um óleo vegetal. Em uma modalidade, o tocoferol é um alfa-tocoferol; mais preferencialmente, o alfa-tocoferol é selecionado a partir de Vitamina E, e acetato de vitamina E. Em uma modalidade, o óleo vegetal é um oleato, mais preferencialmente oleato de etila.

[012] Mais preferencialmente, o óleo não mineral é esqualano.

[013] Em uma modalidade preferencial da vacina da invenção, o adjuvante de óleo compreende mais de um óleo.

[014] Em uma modalidade do adjuvante de óleo compreendendo mais de um óleo, o adjuvante compreende um óleo mineral e um ou mais óleos não minerais. Mais preferencialmente, o adjuvante de óleo compreende um óleo de parafina líquida como o óleo mineral e um ou mais óleos não minerais selecionados a partir de esqualano, esqualeno, vitamina E, acetato de vitamina E, oleato e oleato de etila. Ainda mais preferencialmente, o adjuvante de óleo compreende um óleo de parafina líquida e acetato de vitamina E. Mais preferencialmente, o adjuvante de óleo é XSolve™.

[015] Em uma modalidade alternativa do adjuvante de óleo compreendendo mais de um óleo, o adjuvante compreende mais de um óleo

não mineral. Preferencialmente, o adjuvante de óleo compreende mais de um óleo não mineral, selecionado a partir de esqualano, esqualeno, vitamina E, acetato de vitamina E, oleato e oleato de etila. Ainda mais preferencialmente, o adjuvante de óleo compreende esqualano e acetato de vitamina E. Mais preferencialmente, o adjuvante de óleo é SVEA™.

[016] Em uma modalidade da vacina da invenção, a quantidade de óleo mineral no adjuvante de óleo é de 1 - 70% v/v do adjuvante de óleo. Preferencialmente, o adjuvante de óleo compreende uma quantidade de óleo mineral de 5 - 60% v/v do adjuvante de óleo.

[017] Em uma modalidade da vacina da invenção, a quantidade total de óleo não mineral é de 0,1 - 30% p/v do adjuvante de óleo. Preferencialmente, o adjuvante de óleo compreende uma quantidade total de óleo não mineral de 0,5 - 25% v/v do adjuvante de óleo.

[018] Em uma modalidade, quando o óleo não mineral compreende esqualano, o adjuvante de óleo compreende esqualano a 0,5 - 30% p/v do adjuvante de óleo; mais preferencialmente, o adjuvante de óleo compreende esqualano a 1 - 25% p/v, a 2 - 15% p/v, ou mesmo compreende esqualano a 3 - 10% p/v do adjuvante de óleo.

[019] Alternativamente ou adicionalmente, em uma modalidade em que o óleo não mineral compreende acetato de vitamina E, o adjuvante de óleo compreende acetato de vitamina E a 0,1 - 30% p/v do adjuvante de óleo; mais preferencialmente, o adjuvante de óleo compreende acetato de vitamina E a 0,5 - 20% p/v, a 1 - 16% p/v, ou mesmo compreende acetato de vitamina E a 2 - 10% p/v do adjuvante de óleo.

[020] Em uma modalidade da vacina da invenção, o adjuvante de óleo é formulado como uma emulsão de um óleo e uma fase aquosa.

Preferencialmente, o adjuvante de óleo é formulado como uma emulsão óleo em água (O/A).

[021] Em uma modalidade, a fase aquosa compreende água de qualidade farmacêutica aceitável.

[022] Em uma modalidade, a emulsão do adjuvante de óleo é formulada como uma microemulsão, em que as gotículas da fase interna são menores que 1 micrômetro. Preferencialmente a microemulsão é uma emulsão O/A, mais preferencialmente a micro emulsão O/A é preparada usando homogeneização de alta energia, ainda mais preferencialmente preparada por um método de microfluidização.

[023] Em uma modalidade da vacina da invenção, a emulsão do adjuvante de óleo compreende um emulsificante, preferencialmente o emulsificante compreende um Polissorbato, mais preferencialmente o emulsificante compreende um Polisorbato 80.

[024] Em uma modalidade, a vacina da invenção compreende uma emulsão do adjuvante de óleo, preferencialmente a vacina compreende o adjuvante de óleo formulado como uma emulsão O/A.

[025] Em uma modalidade da vacina da invenção, a vacina é formulada como uma emulsão óleo em água (O/A).

[026] Em uma modalidade da vacina da invenção, a partícula de replicon de RNA de alfavírus é uma partícula de replicon de RNA de alfavírus de Encefalite Equina Venezuelana (VEE). Em uma modalidade mais específica, a partícula de replicon de RNA de alfavírus de VEE é uma partícula de replicon de RNA de alfavírus de VEE TC-83. Em outras modalidades, a partícula de replicon de RNA de alfavírus é uma partícula de replicon de RNA de alfavírus de vírus Síndbis. Ainda em outras modalidades, a partícula de replicon de RNA de alfavírus é uma partícula de replicon de RNA de alfavírus de vírus da Floresta Semliki.

[027] Em uma modalidade da vacina da invenção, para o antígeno codificado originário de um patógeno de animal, o patógeno de animal é selecionado a partir de um vírus, uma bactéria, um parasita, um protozoário, um fungo, uma rickettsia e um prion. Mais preferencialmente, o antígeno codificado originário de um patógeno de animal é um antígeno originário de um vírus ou uma bactéria. Mais preferencialmente, o antígeno é de um vírus.

[028] Em uma modalidade da vacina da invenção, a RP codifica um antígeno originário de um patógeno de animal, pelo qual o animal é um animal de relevância para a ciência veterinária. Preferencialmente, o animal é selecionado a partir de um peixe, uma ave e um mamífero. Mais preferencialmente, o animal é um animal selvagem, de gado ou de companhia. Um animal de gado é um peixe, uma ave, porcino ou ruminante; preferencialmente o porcino é um porco; preferencialmente, a ave é uma galinha, um peru, pato, ganso, codorna ou avestruz; preferencialmente o ruminante é uma vaca, ovelha, cabra, búfalo, camelo ou cervo; preferencialmente o peixe é um peixe ósseo, mais preferencialmente um peixe salmonídeo ou ciclídeo (isto é, um membro da família Cichlidae). O peixe salmonídeo é preferencialmente selecionado a partir de salmão do Atlântico, salmão *steelhead*, salmão-rei, salmão-prateado, salmão-rosa, salmão-keta e salmão-vermelho, truta arco-íris, truta das fontes, truta-de-lago e truta-marrom e truta-do-ártico. O peixe ciclídeo é preferencialmente uma Tilápia. O animal de companhia é preferencialmente selecionado a partir de um gato, um cão e um equino. Mais preferencialmente o animal é uma Tilápia, uma galinha ou um porco.

[029] Em uma modalidade da vacina da invenção, a sequência nucleotídica do gene que codifica o antígeno originário de um patógeno de animal da invenção é otimizada para expressão nas células das espécies de animais alvo da vacina. Em uma modalidade, a otimização de sequência nucleotídica é uma

otimização de códons. Em uma modalidade, a otimização de sequência nucleotídica é uma otimização da estrutura secundária da transcrição de RNA.

[030] Em uma modalidade preferencial, a otimização de sequência nucleotídica do gene que codifica o antígeno originário de um patógeno de animal da invenção refere-se tanto ao uso de códons quanto à estrutura secundária da transcrição de RNA. Preferencialmente, a otimização de sequência nucleotídica é realizada de acordo com os procedimentos descritos em um ou mais das patentes US 7.561.972, US 7.561.973, US 7.805.252 e US 8.126.653.

[031] Em uma modalidade particularmente preferencial da vacina da invenção, o adjuvante de óleo compreende um óleo mineral e um óleo não mineral, a vacina é formulada como uma emulsão O/A, a partícula de replicon de RNA de alfavírus é uma partícula de replicon de RNA de alfavírus de VEE, o antígeno de um patógeno de animal é um antígeno de um vírus e o vírus é um patógeno de um porcino.

[032] Em uma modalidade preferencial da vacina da invenção, o antígeno codificado originário de um patógeno de animal é uma hemaglutinina (HA) ou uma proteína neuraminidase (NA) de um vírus influenza ou um fragmento antigênico dessa proteína HA ou NA. A proteína HA e/ou a proteína NA originam-se preferencialmente a partir de um vírus Influenza tipo A, mais preferencialmente originam-se a partir de um vírus de influenza A porcino ou a partir de PEDV.

[033] A presente invenção fornece ainda vacinas multivalentes compreendendo as partículas de replicon de RNA de alfavírus da presente invenção, em que a vacina compreende mais de uma RP que codifica um antígeno, ou a vacina compreende um ou mais RPs cada um codificando um ou mais de um antígeno para a invenção.

[034] A vacina da invenção compreende uma quantidade imunologicamente eficaz das partículas de replicon de RNA de alfavírus para a invenção. Em uma modalidade, a vacina compreende cerca de 1×10^3 a 1×10^{11} RPs. Em modalidades mais particulares, a vacina compreende cerca de 1×10^4 a 1×10^{10} RPs. Em modalidades ainda mais particulares, a vacina compreende cerca de 1×10^5 a 1×10^9 RPs.

[035] A vacina da invenção compreende uma quantidade imunologicamente eficaz do adjuvante de óleo para a invenção. Em uma modalidade, a vacina compreende o adjuvante de óleo em uma quantidade entre cerca de 10% - 90% v/v da vacina. Mais preferencialmente, a vacina compreende o adjuvante de óleo em uma quantidade entre cerca de 20% - 80% v/v, 30 - 70% v/v, ou mesmo 40 - 60% v/v da vacina. Mais preferencialmente, a vacina compreende o adjuvante de óleo em uma quantidade de cerca de 50% v/v da vacina.

[036] Em modalidades particulares, a vacina da presente invenção é administrada em doses de volume por animal de 0,05 mL a 5 mL. Em modalidades mais particulares, a dose administrada por animal é de 0,1 mL a 2 mL. Em modalidades ainda mais particulares, a dose administrada é de 0,2 mL a 1,5 mL. Em modalidades ainda mais particulares, a dose administrada é de 0,3 a 1,0 mL. Em modalidades mais particulares ainda, a dose administrada por animal é de 0,4 mL a 0,8 mL.

[037] Em uma modalidade da vacina da invenção, a vacina compreende um adjuvante adicional. Preferencialmente, o adjuvante adicional é selecionado a partir do grupo composto por: um componente de parede celular bacteriana, uma citocina e um ácido nucleico imunoestimulante compreendendo uma CpG não metilada. Em uma modalidade, o ácido nucleico imunoestimulante é um ou

mais selecionados a partir das patentes WO 2012/089.800 (família X4), WO 2012/160.183 (família X43) e WO 2012/160.184 (família X23).

[038] Em uma modalidade da vacina da invenção, a vacina compreende um antígeno adicional de um patógeno de animal. Em uma modalidade preferencial, o antígeno adicional é selecionado a partir do grupo: um microrganismo vivo atenuado, um microrganismo inativado e uma subunidade de um microrganismo.

[039] Em um aspecto adicional a invenção fornece um kit de partes compreendendo pelo menos dois recipientes, por meio do qual pelo menos um recipiente compreende a partícula de replicon de RNA de alfavírus codificando um antígeno originário de um patógeno de animal e pelo menos um recipiente compreende um adjuvante de óleo. Os pelo menos dois recipientes compreendem cada um, a partícula de replicon de RNA de alfavírus, ou o adjuvante de óleo, em quantidades imunologicamente eficazes.

[040] Em modalidades preferenciais do kit de partes da presente invenção, uma ou mais ou todas: a partícula de replicon de RNA de alfavírus, o antígeno codificado, o patógeno de animal e o adjuvante de óleo são definidos em qualquer uma ou mais das modalidades como descrito na presente invenção.

[041] Em modalidades preferenciais, pelo menos um recipiente compreendendo a RP compreende a RP como uma liofilizada.

[042] Em uma modalidade alternativa, pelo menos um recipiente compreendendo a RP compreende a RP em uma solução aquosa; a solução aquosa compreendendo preferencialmente uma solução tampão; a solução aquosa é preferencialmente mantida refrigerada ou congelada. Em uma modalidade, a solução aquosa é uma solução de RP reconstituída, gerada a partir da mistura da RP liofilizada e um diluente aquoso adequado.

[043] Na modalidade em que pelo menos um recipiente compreende a RP como uma liofilizada, o kit de partes para a invenção pode compreender um recipiente adicional contendo um diluente adequado para reconstituir a RP liofilizada. Em uma modalidade preferida, o diluente é uma solução aquosa, compreendendo preferencialmente uma solução tampão e/ou um estabilizador e água de qualidade farmacêuticamente aceitável.

[044] Em uma modalidade preferencial, o recipiente compreendendo o adjuvante de óleo compreende o adjuvante de óleo formulado como uma emulsão de um óleo e uma fase aquosa; preferencialmente a emulsão é uma emulsão óleo em água.

[045] Em uma modalidade do kit de partes, o kit compreende instruções para uso do kit e/ou de suas partes componentes. Em modalidades preferenciais, as instruções de uso são fornecidas em, ou com uma ou mais das partes componentes do kit; ou são fornecidas como maneira de referência às instruções em formato eletrônico, como informações visíveis ou disponíveis para *download* em um site da internet do fabricante ou do distribuidor do kit.

[046] Em uma modalidade, o kit de partes é uma caixa compreendendo os pelo menos dois recipientes, e instruções de uso exibidas em um carreador de informações (por exemplo, um cartão ou folheto) compreendido com ou dentro da caixa.

[047] Em uma modalidade do kit de partes, o kit também pode ser uma oferta dos componentes (relacionados à venda comercial), por exemplo, em um site na internet, para uso em um método de imunização da invenção.

[048] Em uma modalidade do kit de partes, um ou mais dos recipientes podem compreender um adjuvante adicional, como descrito na presente invenção; também ou alternativamente, um ou mais dos recipientes podem

compreender um antígeno adicional de um patógeno de animal, como descrito na presente invenção.

[049] O replicon de RNA de alfavírus codificando um antígeno originário de um patógeno de animal e o adjuvante de óleo, ambos como definidos na presente invenção, podem ser administrados a um animal alvo. Tal administração induzirá uma proteção imunológica eficaz no referido animal contra a infecção ou doença causada pelo patógeno de animal. A administração pode ser realizada, por exemplo, de acordo com as diretrizes do EMA - CVMP para o uso associado de medicamentos veterinários imunológicos.

[050] Desse modo, em um aspecto adicional, a invenção fornece um método de imunização de um animal compreendendo administrar ao animal, quantidades imunologicamente eficazes de uma partícula de replicon de RNA de alfavírus que codifica um antígeno originário de um patógeno de animal e de um adjuvante de óleo.

[051] Em uma modalidade preferencial do método de imunização de um animal da presente invenção, o método compreende administrar ao animal a vacina da invenção.

[052] Em modalidades preferenciais do método de imunização de um animal da presente invenção, um ou mais ou todos: a partícula de replicon de RNA de alfavírus, o antígeno codificado, o patógeno de animal e o adjuvante de óleo são definidos em qualquer uma ou mais das modalidades como descrito na presente invenção.

[053] Em modalidades preferenciais do método de imunização de um animal da presente invenção, o antígeno codificado originário de um patógeno de animal é um antígeno originário de um patógeno de um peixe, um membro da família Cichlidae, uma Tilápia, um mamífero, uma ave, e uma galinha.

[054] Em uma modalidade do método de imunização de um animal da invenção, a partícula de replicon de RNA de alfavírus e o adjuvante de óleo são administrados no ou sobre o corpo do animal alvo ou no ou sobre o corpo do animal em uso simultâneo ou em uso concomitante.

[055] Em uma modalidade preferencial do método de imunização de um animal da invenção, a partícula de replicon de RNA de alfavírus e o adjuvante de óleo são administrados no ou sobre o corpo do animal alvo em uso simultâneo, isto é, como uma composição única.

[056] Em uma modalidade preferencial, a composição única é a vacina da invenção.

[057] Em uma modalidade preferencial, a composição única é preparada pouco antes da administração ao animal alvo pela mistura de uma composição compreendendo a RP e uma composição compreendendo o adjuvante de óleo, ambos como descrito para a invenção; mais preferencialmente pela mistura do conteúdo dos recipientes do kit de partes da invenção; ainda mais preferencialmente pela mistura de uma solução aquosa compreendendo as RPs e uma composição compreendendo uma emulsão O/A do adjuvante de óleo. Em uma modalidade alternativa ainda mais preferencial, a composição única é preparada reconstituindo a RP liofilizada com a emulsão O/A do adjuvante de óleo, ambos como definidos na presente invenção para a invenção. Efetivamente, a preparação da composição única gera a vacina da invenção.

[058] Preferencialmente “pouco antes da administração ao animal alvo” é dentro 24 horas antes da administração ao animal alvo, mais preferencialmente dentro de 16 horas, dentro de 12 horas, dentro de 8 horas, dentro de 4 horas ou mesmo dentro de 2 horas antes da administração no alvo animal, nesta ordem de preferência.

[059] Em uma modalidade preferencial alternativa do método de imunização de um animal da invenção, a partícula de replicon de RNA de alfavírus e o adjuvante de óleo são administrados no ou sobre o corpo do animal alvo em uso concomitante, isto é, como compreendido em composições separadas, as quais são administradas separadas no local e/ou tempo

[060] Em uma modalidade preferencial, o uso concomitante compreende a administração no ou sobre o corpo do animal alvo, mas separada no local e/ou no tempo, da partícula de replicon de RNA de alfavírus e do adjuvante de óleo, como compreendido no kit de partes da invenção.

[061] Em uma modalidade preferencial do uso concomitante da invenção, as composições separadas são administradas aos locais separados no ou sobre o corpo do animal alvo, pela mesma ou por diferentes vias de administração, dentro de um período de tempo limitado um do outro; preferencialmente, a “quantidade limitada de tempo” dentro de 2 semanas um do outro, mais preferencialmente dentro de 1 semana um do outro, ainda mais preferencialmente dentro de 1 dia, dentro de 16 horas, dentro de 12 horas, dentro de 8 horas, dentro de 4 horas, dentro de 2 horas, dentro de 1 hora, dentro de 30 minutos ou até 10 minutos um do outro, nesta ordem de preferência. Mais preferencialmente, a administração de uso concomitante é substancialmente simultânea.

[062] Em uma modalidade preferencial do uso concomitante da invenção, as composições separadas são administradas dentro de uma quantidade de tempo limitado uma da outra, no ou sobre o corpo do animal alvo, pela mesma ou por diferentes vias de administração, em locais separados. Para a invenção, os locais separados da administração são separados no ou sobre o corpo do animal por pelo menos 1 cm entre si; preferencialmente pelo menos 2 cm, pelo

menos 5 cm, pelo menos 10 cm ou mesmo pelo menos 25 cm entre cada, nesta ordem de preferência.

[063] Em uma modalidade preferencial do uso concomitante da invenção, as composições separadas são administradas dentro de uma quantidade de tempo limitado de cada uma, no ou sobre o corpo do animal alvo, pela mesma ou por diferentes vias de administração, em substancialmente o mesmo local no ou sobre o corpo do animal alvo mas suficientemente separados um do outro a tempo de impedir a mistura das composições no local da administração. Para a invenção, a separação suficiente no tempo para impedir a mistura não ocorre dentro de 2 horas uma da outra, preferencialmente dentro de 6 horas, dentro de 12 horas, dentro de um dia, dentro de 2 dias ou mesmo dentro de uma semana uma da outra., nesta ordem de preferência.

[064] Em uma modalidade do método de imunização de um animal da invenção, a administração no ou sobre o corpo de animal alvo é realizada por administração por via parentérica. Em uma modalidade alternativa, a administração é por um método de administração via mucosa. Ainda em uma modalidade alternativa, a vacina é administrada por um método de administração tópica.

[065] O método de administração preferencial é selecionado a partir de intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, subcutâneo, por imersão e spray. O método intradérmico de administração é preferível por um meio de administração sem agulha, mais preferencialmente usando um dispositivo IDAL® (Aplicação Intra-Dérmica de Líquidos).

[066] Em uma modalidade da administração da vacina da invenção, a vacina é administrada como uma vacina iniciadora e/ou como uma vacina de reforço. Em modalidades específicas, uma vacina da presente invenção é administrada como uma vacina de dose única (uma dose), sem a necessidade de

administrações de reforço subsequentes. Em certas modalidades, no caso da administração de ambas uma vacina iniciadora e de uma vacina de reforço, a vacina iniciadora e a vacina de reforço são administradas por uma via idêntica. Em modalidades alternativas, no caso da administração de ambas uma vacina iniciadora e de uma vacina de reforço, a administração da vacina iniciadora pode ser realizada por uma via e a vacina de reforço por outra via.

[067] Em certas modalidades da administração da vacina da invenção, a vacina é administrada a porcos e a vacina iniciadora e a vacina de reforço são ambas administradas por injeção intradérmica. Em uma modalidade alternativa, a vacina iniciadora é administrada por injeção intradérmica e a vacina de reforço é administrada por outra via.

[068] Em um aspecto adicional, a invenção fornece um método para a produção de uma vacina da presente invenção, o método compreendendo a etapa de mistura da partícula de replicon de RNA de alfavírus codificando um antígeno originário de um patógeno de animal e o adjuvante de óleo. Tanto a partícula de replicon de RNA de alfavírus como o adjuvante de óleo são misturados em quantidades imunologicamente eficazes.

[069] Em modalidades preferenciais do método para produção de uma vacina da presente invenção, uma ou mais ou todos: a partícula de replicon de RNA de alfavírus, o antígeno codificado, o patógeno de animal e o adjuvante de óleo são definidos em qualquer uma ou mais das modalidades como descrito na presente invenção.

[070] Em uma modalidade de um método para a produção de uma vacina da presente invenção, a partícula de replicon de RNA de alfavírus é compreendida em uma solução aquosa.

[071] Em uma modalidade preferencial de um método para a produção de uma vacina da presente invenção, a mistura é realizada de modo que a partícula

de replicon de RNA de alfavírus, respectivamente a solução aquosa compreendendo a partícula de replicon de RNA de alfavírus e o adjuvante de óleo, sejam misturados em uma razão de volume entre 1:10 e 10:1; mais preferencialmente em uma razão de volume entre 1:5 e 5:1, entre 1:4 e 4:1, entre 1:3 e 3:1 ou mesmo entre 1:2 e 2:1, nesta ordem de preferência. Mais preferencialmente, a partícula de replicon de RNA de alfavírus, respectivamente a solução aquosa compreendendo a partícula de replicon de RNA de alfavírus e o adjuvante de óleo são misturados em uma razão de volume de cerca de 1:1.

[072] Em uma modalidade, o método para a produção da vacina da presente invenção compreende a mistura dos conteúdos dos recipientes do kit de partes da presente invenção.

[073] Em uma modalidade de um método para a produção de uma vacina da presente invenção, a partícula de replicon de RNA de alfavírus, respectivamente uma solução aquosa compreendendo a partícula de replicon, é misturada com um adjuvante de óleo conforme definido para a invenção que é compreendida em outra emulsão O/A compreendendo um antígeno de um patógeno. Preferencialmente, a outra emulsão O/W é uma vacina compreendendo um patógeno viral e/ou bacteriano inativado. Em uma modalidade mais preferencial, uma RP que codifica um antígeno de SIV ou de PEDV é misturado com uma vacina de emulsão O/A compreendendo circovírus porcino (PCV) e/ou *Mycoplasma hyopneumoniae*, como Circumvent® PCVM.

[074] Em um aspecto adicional, a invenção fornece para uma partícula de replicon de RNA de alfavírus codificando um antígeno originário de um patógeno de animal, para uso na proteção de um animal contra infecções ou doenças causadas pelo patógeno de animal, em que a partícula de replicon de RNA de alfavírus é administrada no ou sobre o corpo do animal alvo em uso simultâneo ou em uso concomitante com um adjuvante de óleo. Tanto a partícula de

replicon de RNA de alfavírus como o adjuvante de óleo são compreendidos no uso da proteção de um animal, em quantidades imunologicamente eficazes.

[075] Em modalidades preferenciais da partícula de replicon de RNA de alfavírus para uso na proteção da presente invenção, um ou mais de todos: a partícula de replicon de RNA de alfavírus, o antígeno codificado, o patógeno de animal e o adjuvante de óleo são como definidos em qualquer uma ou mais modalidades como descrito na presente invenção.

[076] Em uma modalidade preferencial de replicon de RNA de alfavírus para uso na proteção da presente invenção, o uso compreende a uso da vacina da invenção.

[077] Em uma modalidade de replicon de RNA de alfavírus para uso na proteção da presente invenção, a proteção é eficaz em animais-alvo de diferentes idades e tipos.

[078] Em uma modalidade, o uso é para a proteção de animais jovens. Preferencialmente, os animais jovens são porcos com até 3 semanas de idade, ou galinhas com até 1 semana de idade, ou peixes salmonídeos com até 14 meses de idade.

[079] Em uma modalidade adicional, o uso é para a proteção de animais adolescentes. Preferencialmente, animais adolescentes são porcos de 3 semanas a 8 meses de idade, ou galinhas de 1 a 22 semanas de idade, ou são peixes salmonídeos de 14 a 24 meses de idade.

[080] Em uma modalidade adicional, o uso é para a proteção de animais adultos. Preferencialmente, os animais adultos são porcos com mais de 8 meses de idade, ou galinhas com mais de 22 semanas de idade, ou são peixes salmonídeos com mais de 24 meses de idade.

[081] Para Tilápias, os períodos preferidos para uso para a proteção da invenção são comumente expressos não por idade, mas por indicação de uma

faixa de peso corporal total: a vacinação por tratamento de banho de imersão é preferencialmente realizada quando a Tilápia pesa entre 0,5 g e 5 g. A vacinação por injeção parenteral é preferencialmente feita quando a Tilápia pesa entre 10 g e 100 g; mais preferencialmente quando a Tilápia pesa entre 20 g e 25 g.

[082] Em uma modalidade de replicon de RNA de alfavírus para uso na proteção da presente invenção, o animal alvo pode ser soropositivo ou soronegativo, seja para anticorpos contra o patógeno de animal, seja para o patógeno de animal, respectivamente, para um antígeno do patógeno de animal.

[083] Em uma modalidade de replicon de RNA de alfavírus para uso na proteção da presente invenção, o animal alvo é um animal positivo para MDA (anticorpos derivados da mãe), pelo qual o MDA é reativo com o patógeno de animal contra o qual a proteção é destinada. Mais preferencialmente, o animal positivo para MDA é uma ave, um ruminante ou um porco. Ainda mais preferencialmente, o animal positivo para MDA é um porco.

[084] Em uma modalidade de replicon de RNA de alfavírus para uso na proteção da presente invenção, o animal alvo é um animal gestante. Mais preferencialmente o animal gestante é um ruminante ou um porco. Ainda mais preferencialmente o animal gestante é um porco.

[085] Em uma modalidade de replicon de RNA de alfavírus para uso na proteção da presente invenção, a proteção é de animais de produção. Preferencialmente, os animais de produção são porcinos mantidos para engorda, ou são galinhas de corte ou poedeiras, ou são ruminantes para a produção de leite ou carne, ou são salmões ou são Tilápias.

[086] Em uma modalidade adicional a proteção é dos animais para reabastecer populações. Preferencialmente, os animais para repovoamento de populações são animais com linhas de pais ou avós animais de produção.

[087] Em um aspecto adicional, a invenção fornece para o uso de uma partícula de replicon de RNA de alfavírus codificando um antígeno originário de um patógeno de animal, para a fabricação de uma vacina para a proteção de um animal contra infecção ou doença causada pelo patógeno de animal, compreendendo o uso simultâneo ou o uso concomitante da referida partícula de replicon de RNA de alfavírus com um adjuvante de óleo. Tanto a partícula de replicon de RNA de alfavírus como o adjuvante de óleo são usados em quantidades imunologicamente eficazes.

[088] Em modalidades preferenciais do uso para a fabricação da vacina da presente invenção, um ou mais ou todos: a partícula de replicon de RNA de alfavírus, o antígeno codificado, o patógeno de animal e o adjuvante de óleo são definidos em qualquer uma ou mais das modalidades como descrito na presente invenção.

[089] Em um aspecto adicional, a invenção fornece para o uso de uma partícula de replicon de RNA de alfavírus codificando um antígeno originando de um patógeno de animal, para a fabricação de um componente de um kit de partes conforme definido na presente invenção, por meio do qual o kit é destinado a proteção de um animal contra infecção ou doença causada pelo patógeno de animal, pelo uso simultâneo ou pelo uso concomitante dos componentes do referido kit. Tanto a partícula de replicon de RNA de alfavírus como o adjuvante de óleo são usados em quantidades imunologicamente eficazes.

[090] Em modalidades preferenciais do uso para a fabricação da vacina de um componente de um kit de partes da presente invenção, um ou mais ou todos: a partícula de replicon de RNA de alfavírus, o antígeno codificado, o patógeno de animal e o adjuvante de óleo são definidos em qualquer uma ou mais das modalidades como descrito na presente invenção.

[091] Em um aspecto adicional, a invenção fornece para o uso de uma partícula de replicon de RNA de alfavírus codificando um antígeno originando de um patógeno de animal, para a proteção de um animal contra infecção ou doença causada pelo patógeno de animal, em que o uso compreende o uso simultâneo ou o uso concomitante da referida partícula de replicon de RNA de alfavírus com um adjuvante de óleo. Tanto a partícula de replicon de RNA de alfavírus como o adjuvante de óleo são usados em quantidades imunologicamente eficazes.

[092] Em modalidades preferenciais do uso para a proteção de um animal da presente invenção, um ou mais ou todos: a partícula de replicon de RNA de alfavírus, o antígeno codificado, o patógeno de animal e o adjuvante de óleo são definidos em qualquer uma ou mais das modalidades como descrito na presente invenção.

[093] Estes e outros aspectos da presente invenção serão mais bem apreciados por referência às seguintes Figuras e pela Descrição Detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[094] Figuras 1 e 2: Resultados do Exemplo 2:

[095] Figuras 1A-1B: Lesões Pulmonares

[096] Figuras 1C-1D: Excreção nasal

[097] Figuras 1E-1F: Títulos de NI

[098] Figuras 2A-2F: Resultados de título HI (figuras numeradas da esquerda para a direita, linha superior e linha inferior)

[099] Figura 3: Respostas de anticorpos séricos ao antígeno N1-clássico em porcos vacinados com NA-RP multivalente do Exemplo 3:

[100] São representadas as respostas de anticorpos séricos da inibição da neuraminidase (NI) específicas para a cepa N1-clássica das composições de vacina, conforme descrito no Exemplo 3. As amostras de soro foram coletadas

antes da primeira vacinação (3 semanas de idade), antes da segunda vacinação (7 semanas de idade) e antes do desafio (10 semanas de idade).

[101] Figura 4: A eficácia da vacina quádrupla de NA-RP contra infecções por desafio, como testado no Exemplo 3, em relação aos escores de lesões pulmonares macroscópicas 5 dias após a infecção pelo vírus H1N1:

[102] Isso mostra os escores das lesões pulmonares dos porcos após a administração das composições de vacinação descritas no Exemplo 3 e a infecção por desafio com o vírus H1-gama-N1-clássico.

[103] Figuras 5 e 6: Resultados dos títulos de NI do Exemplo 8:

[104] A figura 5 apresenta os títulos de NI contra o antígeno de NA N1-clássico nos três instantes medidos ao longo do tempo, incluindo os desvios padrão. Isso é representativo do perfil de título de NI medido para os outros três tipos de NA.

[105] A Figura 6 representa os títulos médios de NI do grupo dos 4 tipos de NA combinados, 7 dias após a segunda vacinação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[106] A presente invenção fornece vacinas que incluem uma quantidade imunologicamente eficaz de uma ou mais partículas de replicon de RNA de alfavírus que codificam um ou mais antígenos de um patógeno de animal e um adjuvante de óleo. As partículas de replicon de RNA de alfavírus são efetivamente similares a um vírus vivo, na medida em que podem infectar células hospedeiras de um humano ou animal alvo e expressar os genes que eles compreendem. Isso também é demonstrado pelo fato de que as RPs são comumente quantificadas por titulação de inefetividade nas células. Portanto, essas RPs, em um carreador farmacêuticamente aceitável, geralmente são o único componente de uma vacina eficaz, semelhante a uma vacina viral viva

(atenuada). Várias vacinas baseadas em RPs não adjuvadas foram desenvolvidas e comercializadas.

[107] Os adjuvantes são usados principalmente apenas em combinação com antígenos de vacina inativos ou com subunidades. Além disso, os adjuvantes de óleos podem ser bastante agressivos para outros constituintes da vacina, portanto, adjuvantes de óleos não são comumente combinados com vacinas vivas. Além disso, sabe-se que as vacinas de RPs de RNA de alfavírus, especialmente aquelas baseadas em alfavírus VEE, são conhecidas por induzir - próximo de uma resposta imune adquirida - já por si mesmas uma forte resposta antiviral a partir do sistema imune inato do alvo. Assim, evitando efetivamente qualquer necessidade de imunoestimulação adicional.

[108] No entanto, verificou-se surpreendentemente que um adjuvante de óleo poderia aumentar significativamente a eficácia imunogênica de partículas de replicon de RNA de alfavírus que codificam um antígeno originado de um patógeno de animal. Isso contrasta com um adjuvante à base de Alumínio, como hidróxido de alumínio. A eficácia aprimorada pode ser obtida quando as RPs e o adjuvante de óleo foram aplicados quando combinados em uma única composição (isto é, uso simultâneo), ou quando foram administrados como composições separadas (isto é, uso concomitante). A extensão do aprimoramento da eficácia por um adjuvante de óleo também foi algo inesperado, pois a dose efetiva mínima de RPs poderia ser reduzida por várias ordens de magnitude, para uma vacinação com RP e adjuvante de óleo, como comparado com uma sem adjuvante (de óleo). Além disso, o uso de adjuvante de óleo foi capaz de aumentar a duração da resposta imune de uma vacinação de RP. Também, a combinação de adjuvante de óleo e RP foi capaz de fornecer uma excelente resposta imune quando o componente de RP sozinho não induziu nenhuma imunização.

[109] A fim de apreciar mais completamente a invenção, são fornecidas as seguintes definições.

[110] Uma “vacina” é uma composição bem conhecida com efeito médico, que compreende um componente imunologicamente ativo e um carreador farmacologicamente aceitável. A solução aquosa e/ou o adjuvante de óleo podem funcionar como um “carreador” para a vacina. O “componente imunologicamente ativo” para a vacina da invenção é o antígeno codificado originário de um patógeno de animal, que é entregue e expresso por meio da RP. A vacina estimula o sistema imune de um animal alvo vacinado, o que induz uma resposta imunológica protetora. A resposta pode se originar do sistema imunológico inato e/ou adquirido do animal e pode ser do tipo celular e/ou humoral.

[111] Uma vacina fornece “proteção” “contra infecção ou doença”, reduzindo em um animal vacinado a gravidade de uma infecção ou infestação subsequente, por exemplo, reduzindo o número de patógenos ou diminuindo a duração da replicação do patógeno no ou sobre o animal, e reduzindo o número, a intensidade ou a gravidade das lesões causadas por uma infecção ou infestação. Além disso, ou conseqüentemente, uma vacina é eficaz na redução ou melhoria dos sintomas (clínicos) da doença que podem ser causados por tal infecção, infestação ou replicação, ou pela resposta do alvo a essa infecção, infestação ou replicação. Uma referência para tais doenças e sinais clínicos é: “*The Merck veterinary manual*” (10ª ed., 2010, CM Kahn ed., ISBN: 091191093X). Essa vacina é coloquialmente referida como: vacina ‘contra’ o patógeno específico.

[112] O termo “compreendendo” (bem como variações como “compreenda”, “compreende” e “compreendido”), conforme usado na presente invenção, refere-se a todos os elementos, e em qualquer combinação possível

concebível para a invenção, que sejam cobertos por ou incluídos na seção de texto, parágrafo, reivindicação, etc., na qual esse termo é usado, mesmo que esses elementos ou combinações não sejam explicitamente recitados; e não digam respeito a exclusão de nenhum desses elemento(s) ou combinações. Consequentemente, qualquer seção de texto, parágrafo, reivindicação, etc. pode também se relacionar a uma ou mais modalidade(s), nas quais o termo “compreende” (ou suas variantes) é substituído por termos como “consiste em”, “consistindo em” ou “consiste essencialmente em”.

[113] Como usado na presente invenção, o termo “replicon” refere-se a um genoma viral de RNA modificado que carece de um ou mais elementos (por exemplo, sequências de codificação para proteínas estruturais) que, se estivessem presentes, permitiriam a propagação bem-sucedida do vírus parental em culturas de células ou hospedeiros de animais. Em contextos celulares adequados, o replicon se amplificará e poderá produzir uma ou mais espécies de RNA subgenômico.

[114] Como usado na presente invenção, o termo “partícula de replicon de RNA de alfavírus”, abreviado “RP”, é um replicon de RNA derivado de alfavírus embalado em proteínas estruturais virais, por exemplo, o capsídeo e as glicoproteínas, que também são derivadas de um alfavírus, por exemplo, conforme descrito por Pushko *et al.*, [*Virology* 239 (2): 389-401(1997)]. Uma RP infecta uma célula-alvo adequada e depois expressa o(s) gene(s) heterólogo(s) inserido(s), mas não pode se propagar em culturas de células ou hospedeiros de animais (sem um plasmídeo auxiliar ou componente análogo), porque o replicon não codifica os componentes estruturais do alfavírus (por exemplo, capsídeo e glicoproteínas virais).

[115] O uso de termos singulares por conveniência na descrição não tem a intenção de ser tão limitante. Assim, por exemplo, a referência a uma “partícula

de replicon de RNA de alfavírus” inclui referência a uma pluralidade dessas partículas de replicon de RNA de alfavírus, a menos que indicado de outra forma.

[116] A RP “codificando” um antígeno refere-se à transcrição e/ou tradução do ácido nucleico para o antígeno proteico que está compreendido na RP, resultando na expressão do antígeno proteico. Tipicamente, tal sequência de ácido nucleico codificando uma proteína é uma fase de leitura aberta (ORF), indicando que não estão presentes códons de parada indesejáveis que concluiriam prematuramente a translação da proteína. A sequência de ácido nucleico pode ser um gene inteiro codificando uma proteína completa ou pode ser um fragmento de gene codificando uma seção de uma proteína, por exemplo, codificando apenas a forma madura ou secretada de uma proteína, ou seja, sem um 'líder', 'âncora' ou 'sequência de sinal'. A sequência nucleotídica pode ser de uma fonte natural ou sintética.

[117] A construção e manipulação da sequência heteróloga de ácido nucleico expressando o antígeno para a invenção pode ser realizada por técnicas biológicas moleculares bem conhecidas, envolvendo clonagem, transfecção, recombinação, seleção e amplificação. Essas e outras técnicas são explicadas em grande detalhe em livros didáticos padrão como os de Sambrook & Russell: “*Molecular cloning: a laboratory manual*” (2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN: 0879695773); Ausubel et al., em: *Current Protocols in Molecular Biology* (J. Wiley e Sons Inc., NY, 2003, ISBN: 047150338X); C. Dieffenbach e G. Dveksler: “*PCR primers: a laboratory manual*” (CSHL Press, ISBN 0879696540); e “*PCR protocols*”, por: J. Bartlett e D. Stirling (Humana press, ISBN: 0896036421).

[118] Para a invenção, uma “proteína” é uma cadeia molecular de aminoácidos. Uma proteína pode ser uma proteína nativa ou madura, uma pré- ou pró-proteína ou parte de uma proteína. Inter alia: peptídeos, oligopeptídeos e polipeptídeos estão incluídos na definição de proteína.

[119] Um “antígeno” para a invenção refere-se a uma proteína que pode, nas circunstâncias corretas, induzir uma resposta imunológica protetora em um animal alvo.

[120] Os termos “originam de”, “originários de” e “originando de” são usados de forma intercambiável em relação a um determinado antígeno proteico e ao patógeno ou cepa desse patógeno que o codifica naturalmente. Tal como utilizado na presente invenção, estes termos significam que a sequência de aminoácidos não modificada e/ou modificada do antígeno proteico fornecido é codificada por esse patógeno ou cepa desse patógeno. A sequência de codificação, dentro de um construto de ácido nucleico da presente invenção para um antígeno proteico originado de um patógeno, pode ter sido geneticamente manipulada de modo a resultar em uma modificação, truncamento, e/ou extensão da sequência de aminoácidos do antígeno proteico expresso em relação à sequência de codificação correspondente de tal antígeno proteico no patógeno ou cepa do patógeno (incluindo cepas naturalmente atenuadas) das quais se originam.

[121] O “patógeno de animal” refere-se a qualquer entidade biológica capaz de causar infecção e/ou doença em um animal de relevância veterinária, tais como animais selvagens, de gado ou de companhia.

[122] Para a invenção, o patógeno de animal pode ou não ser um patógeno natural do animal alvo que está recebendo a vacina da invenção.

[123] Um “óleo” é usado aqui em seu significado comum e refere-se a uma substância química não polar com um teor de hidrocarboneto relativamente alto que geralmente é um líquido relativamente viscoso, tem uma densidade mais leve que a água e é hidrofóbico e lipofílico. Um óleo pode ser de origem mineral ou de origem “não mineral”, como de origem sintética, semissintética, animal ou vegetal. Alguns óleos são metabolizáveis.

[124] O termo “mineral” indica que o respectivo óleo se origina de uma fonte mineral, normalmente de petróleo.

[125] Um “óleo semissintético” é um óleo de origem não mineral, como um óleo animal ou vegetal, mas que foi modificado em estrutura e/ou composição por um processo químico ou físico.

[126] O termo “adjuvante” é usado aqui em seu significado comum de uma composição capaz de estimular uma resposta imune em um animal alvo de uma maneira não específica.

[127] Um “óleo de parafina líquida” é um tipo de óleo mineral, também chamado de óleo (mineral) branco ou óleo de parafina líquida leve, e tem o número CAS: 8042-47-5. Está geralmente disponível, também em qualidade de grau farmacêutico. São exemplos: Drakeol® 6VR (Penreco), Marcol® 52 (Exxon Mobile) e Klearol® (Sonneborn).

[128] Um “acetato de vitamina E” refere-se ao composto químico com número CAS: 58-95-7. Alguns nomes alternativos são: acetato de tocoferol ou acetato de alfa-tocoferol. O acetato de vitamina E é um éster acetato de vitamina E (tocoferol) e pode ser derivado de materiais vegetais como sementes, nozes, frutas ou folhas ou de carnes gordurosas, mas também pode ser produzido sinteticamente. Assim, formas naturais, sintéticas ou semissintéticas, ou misturas das mesmas são incluídas na definição de acetato de vitamina E. O acetato de vitamina E é comercialmente disponível, em graus diferentes de pureza.

[129] Um “esqualano” refere-se ao composto químico com número CAS 111-01-3. Alguns nomes alternativos são: óleo de fígado de tubarão hidrogenado, hexametil-tetracosano, ou peridroesqualeno. Este não deve ser confundido com esqualeno (CAS nº 111-02-4), que é um óleo C30 poliinsaturado e é metabolizável como um composto da via do colesterol.

[130] Originalmente, o precursor do esqualano era obtido a partir dos fígados de tubarão, mas, devido a preocupações ambientais, mudou-se para outras fontes naturais, como o azeite de oliva ou a síntese química. Desse modo, formas naturais, sintéticas ou semissintéticas, ou misturas das mesmas são incluídas na definição de acetato de vitamina E. Esqualano está disponível comercialmente em uma variedade de purezas, por exemplo: de origem vegetal, de Worlee (Esqualano, vegetal) ou Croda (Pripure Squalane); ou sintético, por exemplo, de Kuraray (Esqualano-PE). Para a invenção, é preferida uma alta pureza do esqualano: preferencialmente acima de 75% de pureza, mais preferencialmente acima de 80, 90 ou mesmo acima de 95% de pureza, nessa ordem de preferência.

[131] Uma “emulsão” é uma mistura de pelo menos dois líquidos imiscíveis, em que um é disperso no outro. Normalmente, as gotículas da fase dispersa são muito pequenas, na faixa de micrômetros ou menos. Para a invenção, a emulsão compreende um óleo e uma fase aquosa.

[132] Os procedimentos e equipamentos para a preparação de uma emulsão em qualquer escala são bem conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em manuais como: “*Remington: the science and practice of pharmacy*” (2000, Lippincot, EUA, ISBN: 683306472), e: “*Veterinary vaccinology*” (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdã, ISBN 0444819681).

[133] Quando o adjuvante de óleo da invenção é uma emulsão, a emulsão pode ser uma emulsão água em óleo (A/O), onde o óleo é a fase externa contínua. Alternativamente, a emulsão pode ser uma emulsão “óleo em água” (O/A), em que o óleo é a fase interna dispersa.

[134] Pela seleção do tipo apropriado e pela concentração de emulsificante(s), tais emulsões podem ser formadas e mantidas de maneira estável.

[135] O emulsificante toma posição na interfase entre água e óleo e estabiliza as gotículas da fase interna dispersa. Muitos emulsificantes diferentes são conhecidos e são adequados para uso farmacêutico, como em vacinas. O emulsificante preferencial para o adjuvante de óleo da invenção é o Polisorbato 80, também conhecido como mono-oleato de polioxietileno sorbitano e disponível comercialmente como Tween® 80. O Tween 80 é utilizado no adjuvante de óleo para a invenção em uma quantidade de 0,1 - 10% p/v do adjuvante de óleo.

[136] Para a presente invenção, o adjuvante de óleo, quando na forma de uma emulsão O/A, consiste assim, em uma fase aquosa externa e uma fase oleosa interna dispersa. Isto facilita a mistura do adjuvante de óleo como emulsão O/A com a RP codificando um antígeno originário de um patógeno de animal para a invenção. Por exemplo, pela mistura de uma composição aquosa compreendendo a RP, com a emulsão O/A de adjuvante de óleo. Um simples chacoalhar com as mãos por cerca de 1 minuto é suficiente para misturar adequadamente as duas composições aquosas.

[137] Alternativamente, e altamente vantajosamente, o adjuvante de óleo como uma emulsão O/A pode ser usado diretamente para reconstituir a RP a partir de uma forma liofilizada. Isto significa que a RP pode ser fornecida em uma forma altamente estabilizada como uma liofilizada, e a vacina da invenção pode ser preparada por mistura no local em um momento conveniente, antes da administração a um animal alvo.

[138] Como usado na presente invenção, o termo “cerca de” é usado de forma intercambiável com o termo “aproximadamente” e significa que um valor abrange cinquenta por cento do valor indicado, isto é, uma composição contendo “aproximadamente” 1×10^8 partículas de replicon de RNA de alfavírus

por mililitro contém de 5×10^7 a $1,5 \times 10^8$ partículas de replicon de RNA de alfavírus por mililitro.

[139] Um exemplo de um adjuvante de óleo de emulsão O/A para a vacina da invenção é: XSolve™. XSolve é uma combinação de dois componentes adjuvantes de emulsão O/A: Diluvac Forte™ que tem base em acetato de vitamina E (vide EP 382.271) e Microsol™ que tem base em óleo de parafina líquida (vide WO 2009/144.088).

[140] Nessas emulsões, o tamanho médio de volume das gotículas de óleo do óleo mineral e não mineral pode ser diferente. Preferencialmente, as gotículas do óleo mineral são de tamanho submicrônico.

[141] Convenientemente, a emulsão de adjuvante de óleo é preparada separadamente dos RPs da invenção. Consequentemente, podem ser utilizados métodos e equipamentos para a emulsificação do adjuvante de óleo que não seriam compatíveis com a manutenção da qualidade dos RPs, caso estes estivessem presentes no adjuvante de óleo. Um exemplo é um método de emulsificação de alto cisalhamento usado para obter uma emulsão submicrônica por homogeneização de alta pressão, como em um processador de microfluidizador (Microfluidics, MA, EUA).

[142] Um exemplo adicional de um adjuvante de óleo de emulsão O/A para a vacina da invenção é: SVEA™, que compreende esqualano e acetato de vitamina E, e é descrito em: WO 2018/115.435.

[143] Para a invenção, os nomes de microrganismos ou patógenos, como, por exemplo, o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEE) e o vírus da influenza aviária, etc., referem-se às respectivas classificações taxonômicas desses microrganismos, conforme aplicável atualmente. No entanto, esses nomes podem mudar com o tempo, pois novas ideias podem levar à reclassificação em um grupo taxonômico novo ou diferente. No entanto, como

isso não altera os próprios microrganismos nem seus repertórios antigênicos, mas apenas seus nomes científicos ou classificações, tais microrganismos reclassificados permanecem dentro do escopo da invenção.

[144] A referência a uma família taxonômica inclui qualquer microrganismo que seja uma espécie, subtipo, variante, biotipo, sorotipo ou genótipo dentro dessa família.

[145] Para a invenção, “porcino” refere-se a animais da família Suidae e, preferencialmente, a animais do gênero *Sus*, por exemplo: um porco selvagem ou doméstico, javali, babirussa ou facocero-comum. Isso também inclui porcos indicados por um nome arbitrário referente ao seu sexo, idade ou tamanho, como: porca, javali, porco para engorda, marrã, desmamado ou leitão.

[146] Como usado na presente invenção, o termo “aves” refere-se a aves de relevância agrícola, tais como: galinha, peru, pato, ganso, perdiz, pavão, codorna, pombo, faisão, galinha d'angola ou avestruz. Preferencialmente, as aves são galinha, peru, pato ou ganso. Mais preferencialmente, as aves são galinha ou peru. Mais preferencialmente as aves são galinhas.

[147] As aves podem ser de qualquer tipo, como poedeiras, reprodutoras, de corte, raças combinadas ou com linhas parentais de qualquer uma dessas raças. O tipo de aves preferencial são as de corte.

[148] Como usado na presente invenção, o termo “Tilápia” pode incluir quase uma centena de espécies de peixes ósseos da família Cichlidae. As Tilápias são principalmente peixes de água doce que habitam córregos rasos, lagoas, rios e lagos e são menos comumente encontrados vivendo em água salobra.

[149] Um “kit de partes” para a invenção é tipicamente uma combinação embalada de recipientes com composições específicas em quantidades predeterminadas, kit que pode incluir ou referir-se a instruções para executar a preparação e vacinação da invenção.

[150] O alvo para a vacina, o método de imunização e os compostos e usos para proteger os animais da invenção, são animais que necessitam de uma vacinação contra infecção ou doença causada pelo patógeno específico do qual o antígeno codificado se origina. A idade, peso, sexo, status imunológico e outros parâmetros do alvo a ser vacinado/protegido/imunizado não são críticos, embora seja claramente favorável vacinar alvos saudáveis e não infectados, e vacinar o mais cedo possível.

[151] Como usado na presente invenção, um “agrupamento filogenético” é um conjunto de neuraminidases do vírus influenza que foram agrupadas (no mesmo ramo) em uma árvore filogenética ou árvore evolutiva que está enraizada em um ancestral semelhante (homólogo). Para as neuraminidases do IAV-S (NAs) encontradas nos EUA, existem dois agrupamentos filogenéticos predominantes de N1, N1-clássico e N1-pandêmico e dois agrupamentos filogenéticos predominantes de N2, N2-1998 e N2-2002. O agrupamento filogenético N1-clássico contém os NAs agrupados com o NA do vírus da influenza porcina clássica H1N1. O agrupamento filogenético N1-pandêmico contém os NAs agrupados com o NA que vem do vírus da influenza pandêmica H1N1. O agrupamento filogenético N2-1998 contém os NAs agrupados com o NA do vírus da influenza H3N2 humana que infectou porcos em 1998, enquanto o O agrupamento filogenético N2-2002 contém os NAs agrupados com o NA do vírus da influenza H3N2 humana que infectou porcos em 2002. [*Vide, Anderson et al., Influenza and other Respiratory Viruses* 7(Supl. 4): 42-51 (2013)].

[152] O termo “não IAV-S” é usado para modificar termos como patógeno, e/ou antígeno (ou imunógeno) para significar que o respectivo patógeno e/ou antígeno (ou imunógeno) não é um patógeno de IAV-S, nem um antígeno de IAV-S (ou imunógeno) e que um antígeno proteico não IAV-S (ou imunógeno) não se origina a partir de um IAV-S.

[153] Como usada na presente invenção, uma vacina multivalente é uma vacina que compreende dois ou mais antígenos diferentes, por meio das quais a diferença pode estar em qualquer um de vários níveis biológicos, como gênero, espécie, sorotipo, etc. Em uma modalidade particular deste tipo, a vacina multivalente estimula o sistema imune do animal alvo contra dois ou mais patógenos de animais diferentes, ou contra variantes imunologicamente distintas do mesmo patógeno.

[154] Como usado na presente invenção, o termo “farmaceuticamente aceitável” é usado de maneira adjetiva para significar que o substantivo modificado é apropriado para uso em um produto farmacêutico. Quando é usado, por exemplo, para descrever um excipiente em uma vacina farmacêutica, caracteriza o excipiente como sendo compatível com os outros ingredientes da composição e não prejudicial de maneira desvantajosa ao animal receptor pretendido, por exemplo, um porcino.

[155] A “administração” da vacina, respectivamente os componentes do kit da invenção a um alvo animal podem ser realizados usando qualquer método e via viáveis. Tipicamente, a maneira ideal de administração será determinada pelo tipo de vacina/composto aplicado e pelas características do alvo e da doença contra a qual ele se destina a proteger. Dependendo de como a vacina/composto é formulado, diferentes técnicas de administração podem ser aplicadas. Por exemplo, como uma vacina/composto de emulsão O/A da invenção pode ser administrada por via enteral ou mucosa, isto é, por meio de colírio, gotejador nasal, oral, entérico, oro-nasal, spray. Outra possibilidade é por meio de um método de administração em massa, como via ingestão de água potável, aspersão, atomização, por alimentação, etc.

[156] A “administração parenteral” inclui injeções subcutâneas, injeções submucosas, injeções intravenosas, injeções intramusculares, injeções intradérmicas e infusão.

[157] A “administração via mucosa” inclui as vias de administração ocular, nasal, oral, óculo-nasal, intratraqueal, intestinal, anal e vaginal.

[158] A “administração tópica” inclui vias de administração dérmica e transdérmica.

[159] O método, tempo e volume da administração de uma vacina, respectivamente componente do kit da invenção, é preferencialmente integrado aos esquemas de vacinação existentes de outras vacinas que o animal alvo possa exigir, a fim de reduzir o estresse no alvo e reduzir custos trabalhistas. Essas outras imunizações podem ser administradas por um método de uso associado, de maneira compatível com seu pedido registrado.

[160] Como usado na presente invenção, o termo “fragmento antigênico” em relação a uma proteína particular (por exemplo, um antígeno de proteína) é um fragmento dessa proteína que é antigênica, ou seja, capaz de interagir especificamente com uma molécula de reconhecimento de antígeno do sistema imune, como uma imunoglobulina (anticorpo) ou receptor de antígeno de célula T. Por exemplo, um fragmento antigênico de uma neuraminidase de IAV-S (NA) é um fragmento da proteína de NA que é antigênica. Preferencialmente, um fragmento da presente invenção é imunodominante para reconhecimento de anticorpos e/ou receptores de células T. Em modalidades particulares, um fragmento antigênico em relação a um dado antígeno proteico é um fragmento dessa proteína que retém pelo menos 25% da antigenicidade da proteína de comprimento total. Em modalidades preferenciais um fragmento antigênico retém pelo menos 50% da antigenicidade da proteína de comprimento total. Em modalidades mais preferenciais, um fragmento antigênico retém pelo menos

75% da antigenicidade da proteína de comprimento total. Fragmentos antigênicos podem ser tão pequenos quanto 12 aminoácidos ou, no outro extremo, ser grandes fragmentos nos quais estão faltando tão pouco quanto um único aminoácido da proteína de comprimento total. Em modalidades particulares, o fragmento antigênico compreende 25 a 150 resíduos de aminoácidos. Em outras modalidades, o fragmento antigênico compreende 50 a 250 resíduos de aminoácidos.

[161] Como usada na presente invenção, uma sequência de aminoácidos é 100% “idêntica” ou possui 100% de “identidade” com uma segunda sequência de aminoácidos quando os resíduos de aminoácidos de ambas as sequências são idênticos. Por conseguinte, uma sequência de aminoácidos é 50% “idêntica” a uma segunda sequência de aminoácidos quando 50% dos resíduos de aminoácidos das duas sequências de aminoácidos são idênticos. A comparação de sequência é realizada sobre um bloco contíguo de resíduos de aminoácidos compreendido por uma dada proteína, por exemplo, uma proteína ou uma porção do polipeptídeo sendo comparada. Em uma modalidade particular, exclusões ou inserções selecionadas que poderiam de outro modo alterar a correspondência entre as duas sequências de aminoácidos são levadas em consideração.

[162] Como usado na presente invenção, a identidade percentual da sequência de nucleotídeos e aminoácidos pode ser determinada usando C, MacVector (MacVector, Inc. Cary, NC 27519), Vector NTI (Informax, Inc. MD), Oxford Molecular Group PLC(1996) e o algoritmo Clustal W com os parâmetros padrão de alinhamento e parâmetros padrão de identidade. Esses programas comercialmente disponíveis também podem ser usados para determinação da similaridade de sequência usando os mesmos parâmetros padrão ou análogos. Alternativamente, uma pesquisa Blast avançada sob as condições de filtro

padrão pode ser usada, por exemplo, usando o programa Pileup, Pacote GCG, v.7 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) usando os parâmetros padrão.

[163] Quando as partículas de replicon de RNA de alfavírus são armazenadas separadamente, mas pretendem ser misturadas com outros componentes da vacina antes da administração, as partículas de replicon de RNA de alfavírus podem ser armazenadas em uma solução aquosa estabilizadora similar a solução desses outros componentes, por exemplo, uma solução com alto teor de sacarose.

[164] Uma vacina da presente invenção pode ser prontamente administrada por qualquer “método de imunização de um animal” padrão. O técnico no assunto apreciará que a via de administração seja escolhida levando em consideração as características do animal alvo e a vacina a ser administrada. Preferencialmente, a composição da vacina é formulada adequadamente para cada tipo de animal alvo e via de administração.

[165] Para a invenção, a “subunidade de microrganismos” pode ser uma molécula biológica ou sintética, como uma proteína, um carboidrato, um lipopolissacarídeo, um lipídio ou uma molécula de ácido nucleico.

[166] Está bem ao alcance do técnico no assunto otimizar adicionalmente uma vacina, um kit, método, ou uso da invenção. Geralmente, isso envolve o ajuste fino da eficácia da vacinação/imunização para melhorar ainda mais sua proteção imune fornecida. Isso pode ser feito adaptando a dose, o volume, o adjuvante ou o conteúdo de antígeno do material administrado ou por administração por uma via, método ou regime diferente. Todos estes estão dentro do escopo da invenção.

[167] Também deve ser entendido que esta invenção não se limita às configurações particulares, etapas do processo e materiais revelados na

presente invenção, pois tais configurações, etapas do processo e materiais podem variar um pouco. Também deve ser entendido que a terminologia empregada na presente invenção é usada apenas com a finalidade de descrever modalidades particulares e não se destina a ser limitativa, visto que o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações anexas e equivalentes das mesmas.

TABELA DE SEQUÊNCIA

<u>ID SEQ NO:</u>	<u>Descrição (5' -> 3')</u>	<u>Tipo</u>
1	ggcgcgccgcacc	ácido nucleico
2	ttaattaa	ácido nucleico

[168] Os exemplos não limitantes a seguir servem para fornecer apreciação adicional da invenção, mas não pretendem de forma alguma restringir o escopo efetivo da invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

UM ADJUVANTE DE ÓLEO MELHORA A MAGNITUDE E A DURAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS EM SUÍNOS PARA UMA PARTICULA DE REPLICON DE RNA DE ALFAVÍRUS CODIFICANDO UM HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA INFLUENZA PORCINA

Materiais e métodos

[169] Os vetores de replicon de VEE projetados para expressar um gene de hemaglutinina (HA) foram construídos como descrito anteriormente [*vide* US 9.441.247 B2; os conteúdos por este meio incorporado na presente invenção por referência], com as seguintes modificações: a inserção do gene HA foi submetido a otimização de sequência (ATUM, CA, EUA). O vetor de replicon derivado TC-83 “pVEK” [divulgado e descrito em US 9.441.247 B2] foi digerido com enzimas de restrição *AscI* e *PacI*. Um plasmídeo de DNA contendo a fase de leitura aberta de

códon otimizado dos genes de N1 ou N2, com a sequência de flanqueamento 5' (5'-GGCGCGCCGCACC-3') [SEQ ID NO: 1] e sequência de flanqueamento 3' (5'-TTAATTAA-3') [SEQ ID NO: 2], foi digerido de modo similar com enzimas de restrição *Ascl* e *Pacl*. O cassete de gene sintético foi então ligado ao vetor pVEK digerido e os clones resultantes foram renomeados como “pVHV-N1-pandêmico”, “pVHV-N1-clássico”, pVHV-N2-2002 “e” pVHV-N2-1998”. A nomenclatura do vetor “pVHV” foi escolhida para se referir a vetores de replicons derivados de pVEK contendo cassetes de transgene clonados *via* os locais de *Ascl* e *Pacl* no local de clonagem múltipla de pVEK.

[170] A produção de partículas de replicon de RNA TC-83 (RP) foi conduzida de acordo com métodos anteriormente descritos [US 9.441.247 B2 e U.S. 8.460.913 B2; os conteúdos por meios dos quais é incorporado na presente invenção por referência]. Resumidamente, o DNA de vetor de replicon de pVHV e plasmídeos de DNA auxiliar foram linearizados com enzima de restrição *NotI* antes da transcrição *in vitro* usando RNA polimerase MegaScript™ T7 e cap análogo (Promega, Madison, WI). Importaneamente, os RNAs auxiliares usados na produção carecem da sequência promotora subgenômica de VEE, conforme descrito previamente [Kamrud *et al.*, *J Gen Virol.* 91 (Pt 7): 1723-1727 (2010)]. O RNA purificado para os componentes auxiliares e replicon foi combinado e misturado com uma suspensão de células Vero, galvanizado em cubetas de 4 mm e retornada ao meio de cultura celular SFM OptiPro® (Thermo Fisher, Waltham, MA). Após a incubação durante a noite, as partículas de replicon de RNA de alfavírus foram purificadas, formuladas em solução salina tamponada com fosfato com 5% p/v de sacarose e 1% v/v de soro porcino, esterilizadas passando por um filtro de membrana de 0,22 micron e distribuídas em alíquotas para armazenamento. O título de RP funcional foi determinado por ensaio de imunofluorescência de infecção em monocamadas de células Vero. Lotes de RP

foram identificados de acordo com o antígeno codificado pelo replicon empacotado.

[171] Dez leitões negativos para anticorpos contra o vírus da influenza porcina foram randomizados em grupos de cinco porcos. Preparou-se uma vacina de RP expressando o antígeno de hemaglutinina de uma cepa de influenza porcina H3N2 a um título de 5×10^5 RP/dose. Imediatamente antes da vacinação, a vacina do grupo de somente RP foi diluída 1:1 (v/v) com diluente estéril de PBS, enquanto a vacina de RP + grupo de adjuvante foi diluída 1:1 (v/v) com adjuvante XSolve. Os porcos foram então vacinados por via intramuscular com 2,0 mL do material apropriado. O processo de vacinação foi conduzido nos dias 0 e 21 do estudo, em cada vez com uma nova preparação da vacina. Os soros coletados durante o estudo foram analisados quanto à atividade de inibição de hemaglutinação (HI) usando o antígeno do vírus da influenza porcina H3N2. Os resultados foram reportados como a maior diluição com atividade inibitória; títulos inferiores a 1:10 foram reportados como 1:9; títulos > 640 foram relatados como 1: 641. Os títulos de média geométrica são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1: Título de Média Geométrica de Inibição de Hemaglutinação (HI)

Dia de Estudo	0	21	28	35	56	70	84
RP	9,0	9,0	25,8	22,5	12,9	9,4	9,4
RP + adjuvante	9,0	9,2	242,7	211,1	91,9	52,8	52,8

[172] Na dose relativamente baixa de 5×10^5 RP, a vacina não adjuvada induziu um título de HI de baixa magnitude, breve e transitório. Em comparação, a vacina adjuvante induziu títulos de HI altos após a vacinação de reforço, e esses títulos de HI permaneceram elevados até o final do teste de 84 dias.

[173] Essa descoberta foi a primeira indicação clara de que o XSolve poderia ter um efeito tão dramático na imunização por RP porcina em doses muito baixas

(5×10^5 RP). Estudos anteriores usando a vacina de RP sem adjuvante tiveram que empregar quantidades muito mais altas do componente de RP por dose, por exemplo: 1×10^9 para RP de FMD e 5×10^7 para RP de SIV).

EXEMPLO 2

UM ADJUVANTE DE ÓLEO MELHORA A MAGNITUDE E A DURAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS EM SUÍNOS PARA UMA PARTÍCULA DE REPLICON DE RNA DO ALFAVÍRUS MULTIVALENTE CODIFICANDO ANTÍGENOS DO VÍRUS DA INFLUENZA PORCINA

[174] Grupos de leitões desmamados de uma vara negativa para influenza porcina foram randomizados em grupos de tratamento, conforme indicado na Tabela 2. Uma vacina multivalente de partículas de replicon de RNA de alfavírus para influenza porcina foi combinada usando oito antígenos de partículas de RNA individuais que expressam HA ou NA de várias cepas de influenza porcina, cada uma combinada a aproximadamente 1×10^7 RP/dose. Foram incluídos dois antígenos H3, quatro H1, um N1 e um N2, e um ensaio sorológico emparelhado (HI ou NI) foi usado para avaliar a resposta de anticorpos a cada antígeno. O estudo foi conduzido como um projeto duplicado, com metade dos animais desafiados com o vírus H1N1 e a outra metade desafiada com o vírus H1N2.

TABELA 2: Protocolo Experimental do Exemplo 2

Grupo	Número de porcos	Vacina	Cepa de desafio
1	16	somente RP multivalente	H1N1
2	16	RP multivalente + adjuvante de óleo	
3	16	Placebo	
4	16	somente RP multivalente	H1N2
5	16	RP multivalente + adjuvante de óleo	
6	16	Placebo	

[175] Verificou-se que o uso de adjuvante de óleo XSolve aumenta significativamente a magnitude da resposta sorológica para todas as oito frações da vacina. Enquanto ambas as formulações de vacina protegiam contra lesões

pulmonares (Figuras 1A-1B), a adição de XSolve melhorou, entretanto, a eficácia da vacina quando medida por excreção nasal do vírus da influenza H1N1 e H1N2 (Figuras 1C-1D). As Figuras 1 - 1F representam as pontuações correspondentes ao título de NI. O efeito do adjuvante nos títulos de HI está representado nas Figuras 2A-2F.

[176] Este estudo demonstrou que a RP de SIV multivalente não adjuvada induziu anticorpos para todas as frações, mas que a adição de um adjuvante de óleo reforçou significativamente a resposta imune de todas as frações. A redução da excreção nasal e o agrupamento mais apertado das pontuações pulmonares representam importantes vantagens clínicas, por exemplo, no que se refere à limitação da propagação horizontal de uma infecção em uma vara ou população.

EXEMPLO 3

EFICÁCIA DE UMA VACINA NA-RP QUÁDRUPLA AJUSTADA CONTRA INFECÇÃO POR H1N1 EM SUÍNOS DESMAMADOS, TENDO ANTICORPOS N1 NO MOMENTO DA PRIMEIRA VACINAÇÃO

[177] Um estudo de desafio de vacinação foi realizado para determinar a eficácia e imunogenicidade de dois níveis de dose de uma vacina quádrupla adjuvante NA-RP. A vacina adjuvante incluiu quatro construções de RP, cada uma das quais codificou individualmente um único, gene de NA diferente de um US IAV-S contemporâneo isolado. Juntos, esses genes NA representam dois agrupamentos filogenéticos N1 (N1-clássico e N1-pandêmico) e dois agrupamentos N2 (N2-1998 e N2-2002) vide Tabela 3). A vacina adjuvante foi administrada por duas vacinas intramusculares (IM) vacinas a 1 mL/dose), em porcos desmamados com anticorpos positivos ao antígeno N1-clássico no momento da sua primeira vacinação. A eficácia de vacina NA-RP quádrupla

adjuvante foi testada contra uma infecção por desafio heterólogo ao N1 (vírus H1N1).

Materiais e métodos

Construto de antígenos de NA-RP:

[178] As partículas de replicon de RNA de alfavírus (RPs) de replicação defeituosa codificaram o gene da neuraminidase (NA), e foram preparadas basicamente conforme descrito no Exemplo 1 da presente invenção.

TABELA 3: Genes N1 e N2 codificados nas construções NA-RP do exemplo 3

Agrupamento filogenético de NA	Cepa doadora de genes	No. de acesso ao GenBank
N1-clássico	A /porcino/ Iowa/A01410307/2014 (H1N1)	KJ605083
N1-pandêmico	A/ porcino/ Minnesota/A01483170/2014 (H1N1)	KP036969
N2-1998	A/ porcino/Michigan/A02077465/2015 (H1N2)	KR982634
N2-2002	A/porcino/Illinois/A01475495/2014 (H1N2)	KJ941362

n = 10 porcos por grupo

Vírus

[179] Os vírus desafiados foram obtidos dos Laboratórios Nacionais de Serviços Veterinários do USDA. A/porcino/Illinois/A01554351/2015 (H1N1) possui um gene de HA do agrupamento H1-*gama* e um gene de NA do agrupamento N1-clássico. Os vírus foram propagados em uma cultura de células MDCK. As células confluentes foram infectadas por aproximadamente 48 horas, até que o efeito citopático fosse evidente em mais de 70% da monocamada celular. Na colheita, o sobrenadante foi removido dos vasos e clarificado por centrifugação antes do armazenamento congelado do vírus.

Animais

[180] Os leitões desmamados foram selecionados de uma vara de alta saúde com base na triagem sorológica para confirmar a falta de anticorpos de HI ou de NI (inibição de neuraminidase) pré-existentes à vacina e desafiar as cepas.

Os animais eram uma mistura de machos e fêmeas e tinham aproximadamente três semanas de idade no momento da primeira vacinação.

Vacinação e Desafio

[181] Os grupos de tratamento estão esboçados na Tabela 4. Uma vacina quádrupla de NA-RP foi formulada a 10^6 cópias cada RP/dose, com base em um ensaio de potência com base em imunofluorescência para quantificar RPs funcionais. Os antígenos NA-RP foram formulados em um estabilizador consistindo em 1% de soro porcino e 5% de sacarose. A vacina placebo consistiu no mesmo estabilizador, mas sem o antígeno. As vacinas foram misturadas com adjuvante de óleo XSolve (1:1 v/v, dose de 1 mL), pouco antes da administração por meio da via IM a porcos com 3 e 7 semanas de idade. Os níveis de dose foram titulados novamente pelo teste IFA no material da vacina retido após a vacinação. As amostras de soro foram coletadas no dia da primeira vacinação, no dia da segunda vacinação e no dia da infecção por desafio.

[182] No dia anterior à primeira vacinação, todos os porcos foram pesados e os porcos dos grupos positivos para anticorpos N1-clássicos foram injetados por via subcutânea com uma dose de 2 mL/kg de soro hiperimune N1-clássico (título de anticorpo anti-NI de 1:2560 ao antígeno N1-clássico).

TABELA 4: Grupos de tratamento com cepa desafiada de H1N1 como no Exemplo 3

Grupo	Status do Anticorpo N1-clássico	Vacina (+XSolve)	RPs Dose por 1 mL
1	Positivo	NA-RP Quádrupla	10^6
2	Negativo	NA-RP Quádrupla	10^6
3	Positivo	Placebo	---
4	Negativo	Placebo	---

(n = 10 porcos por grupo)

[183] A infecção por desafio foi administrada aos porcos 3 semanas após a segunda vacinação. Os materiais de desafio do H1N1 (H1-*gama*-N1-clássico) foram formulados com a dose alvo de $10^{6,5}$ TCID₅₀/porco (volume de 6 mL). O material de desafio foi administrado pela via intratraqueal. As doses do vírus de desafio foram confirmadas por titulação de retorno do material de inoculação retido. Os esfregaços nasais foram coletados de todos os porcos aos -1, 1, 3 e 5 dias após o desafio.

[184] A necropsia foi realizada 5 dias após o desafio. Os porcos foram sacrificados por overdose de barbitúricos a 5 DPC sob a supervisão de um veterinário licenciado. Os pulmões foram coletados e observados, a fim de documentar a área de superfície de cada lobo afetado por lesões macroscópicas, resultando em uma porcentagem abrangente do escore da lesão pulmonar. A lavagem broncoalveolar e os esfregaços nasais foram coletados de todos os porcos para medir os títulos do vírus. As seções pulmonares foram coletadas para análise histopatológica da lesão microscópica.

Análise da resposta imune:

[185] Os anticorpos específicos para IAV-S em amostras de soro de porco foram determinados pelo teste de NI. Os soros foram inativados pelo calor por 30-60 minutos a 56°C. O teste de NI foi realizado com pequenas modificações no método de Sandbulte & Eichelberger (*Methods Mol Biol* 1161: 337-45, 2014). Resumidamente, diluições de soro de duas vezes em série foram misturadas com o antígeno proteico expresso em volumes iguais em placas de 96 poços revestidas com fetuína e incubadas durante a noite à 37°C. O conjugado de aglutinina de amendoim e peroxidase de rábano silvestre foi adicionado por 2 horas à temperatura ambiente para ligar moléculas de fetuína desprovidas de ácido siálico. O sinal foi obtido com substrato colorizador TMB e os resultados foram lidos a 650 nm. A densidade (OD) óptica média do controle negativo, que

não possuía antígeno NA, foi subtraída de todos os poços. Em seguida, os valores de OD das amostras de teste foram normalizados em uma escala de 0-100%, em que a OD média dos poços de controle positivo (contendo antígeno NA, mas sem soro) foi definida como 100%. O título de anticorpo de NI foi definido como a maior diluição da amostra que inibiu $\geq 50\%$ da atividade da neuraminidase.

Exame patológico dos pulmões

[186] Lesões macroscópicas observadas no exterior de todos os lobos pulmonares (consolidações de cor roxa a cor de ameixa demarcadas por poço) foram registradas em diagramas de grade do pulmão anterior e posterior. Escores abrangentes (porcentagem de lesão pulmonar) para cada porco foram calculados de acordo com o número de grades afetadas pela lesão.

Excreção viral

[187] Os esfregaços nasais e os fluidos de BAL foram diluídos em série 10 vezes com o meio infeccioso [meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado com albumina sérica bovina a 0,3%, fração V; L-glutamina 2 mM; 25 µg/mL de gentamicina; 2 µg/mL de tripsina IX] e 100 µL de cada diluição foram adicionados a poços quadruplicados de células MDCK confluentes em uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e observado após 72 horas para a presença de vírus infeccioso por testes de hemaglutinação de sobrenadantes provenientes de cada poço. Os títulos de IAV-S foram calculados pelo método de Spearman-Kärber e expressos como Log₁₀ TCID₅₀ por mL.

Resultados

[188] As respostas imunes de porcos vacinados com NA-RP multivalente estão representadas na Figura 3. É digno de nota que:

- Os porcos transferidos passivamente com soro hiperimune N1-clássico no dia anterior à primeira vacinação tinham títulos de anticorpo N1-clássico de 40-80 no momento da vacinação.

- Após duas vacinações da vacina quádrupla de NA-RP com adjuvante XSolve, os porcos soronegativos e soropositivos para o anticorpo N1 mostraram um aumento significativo de seus títulos de anticorpos N1 clássicos. Isto indicou que a vacinação de RP com adjuvante de óleo era eficaz mesmo em animais alvo positivos para anticorpos contra o antígeno codificado por RP.

- O título de NI dos porcos no grupo vacinado com N1-clássico negativo/placebo permaneceu soronegativo.

[189] A eficácia da vacina quádrupla de NA-RP contra infecções provocadas por desafio, em relação às lesões pulmonares, é representada na Figura 4. É notável que vacinação quádrupla de NA-RP foi altamente eficaz na redução de lesões pulmonares tanto quando vacinando porcos com ou sem anticorpos de N1-clássico no momento de sua primeira vacinação. Em ambos os grupos, a porcentagem de lesões pulmonares foi significativamente reduzida em comparação com os dois grupos vacinados com placebo.

EXEMPLO 4

UM ADJUVANTE DE ÓLEO MELHORA A MAGNITUDE DE RESPOSTA DE ANTICORPOS EM SUÍNOS PARA UMA CODIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS DE REPLICON DE RNA DE ALFAVÍRUS ANTÍGENO DE VÍRUS DA DIARRÉIA EPIDÊMICA PORCINA, RELATIVO A UM ADJUVANTE DE ALUMÍNIO OU ÁGUA

[190] Nove leitões, com aproximadamente três semanas de idade, foram randomizados em grupos de três animais cada. Foi preparada e liofilizada em tubos de 20 doses uma vacina de partículas de replicon de RNA de alfavírus expressando a glicoproteína da espícula do vírus da diarreia epidêmica porcina (PEDV). No dia 0 do estudo, os porcos foram vacinados por via intramuscular com 1,0 mL da vacina de partículas de replicon de RNA de alfavírus que foram reidratados com água, adjuvante de hidróxido de alumínio ou adjuvante XSolve. No dia 21 do estudo, o processo foi repetido com tubos de vacina novos. O título

final da partícula de replicon de RNA de alfavírus por dose após a reidratação foi determinado pelo ensaio de imunofluorescência e foi de aproximadamente 7×10^6 RP/dose para todos os grupos. Os soros coletados durante o estudo foram testados para anticorpos neutralizantes de PEDV, vide a Tabela 5.

TABELA 5: O Efeito de Diferentes Adjuvantes no Desenvolvimento de Anticorpos neutralizantes

Adjuvante	Porco #	Título de Ab neutralizante de PEDV				
		<i>Pré-sangramento</i>	20 DPV	6 DPV2	13 DPV2	20 DPV2
sem adjuvante	154	<20	<20	20	40	20
	157	20	<20	<20	20	<20
	158	<20	<20	<20	<20	<20
Xsolve	151	<20	<20	160	320	160
	155	<20	<20	40	80	20
	159	<20	<20	160	160	160
gel de hidróxido de alumínio	152	<20	<20	<20	<20	20
	153	20	<20	<20	<20	40
	156	<20	20	<20	<20	40

[191] Os porcos tratados com vacina não adjuvada apresentaram anticorpos neutralizantes baixos ou indetectáveis após duas doses da vacina. Todos os porcos tratados com a vacina adjuvante com hidróxido de alumínio desenvolveram anticorpos neutralizantes que estavam logo acima do limite de detecção. Em contraste, a vacina adjuvante com XSolve induziu anticorpos neutralizantes mais altos após duas doses da vacina, e todos os três porcos atingiram um título mínimo de anticorpos mais alto que o pico observado nos outros grupos de teste. A utilização de hidróxido de alumínio como adjuvante foi assim ineficaz e foi substancialmente superada pelo adjuvante de óleo.

EXEMPLO 5

UM ADJUVANTE DE ÓLEO MELHORA A EFICÁCIA DA VACINAÇÃO EM GALINHAS DE UMA PARTÍCULA DE REPLICON DE RNA ALFAVÍRUS CODIFICANDO UM ANTÍGENO DE INFLUENZA

[192] Pintos de um dia foram randomizados em grupos de dez aves. Preparou-se uma vacina de partículas de replicon de RNA de alfavírus expressando o antígeno de hemaglutinina de uma cepa de influenza suína H3N2 com um título de 1×10^8 RP/dose. Imediatamente antes da vacinação, a vacina para o grupo recebendo apenas RP foi diluída 1:1 (v/v) com diluente estéril de PBS, enquanto a partícula de replicon de RNA de alfavírus *mais* a vacina do grupo adjuvante foi diluída 1:1 (v/v) com adjuvante XSolve. Os soros dos pintos foram testados quanto ao título de inibição da hemaglutinação (HI) nos dias de estudo 0, 7 e 14 após a vacinação.

TABELA 6: O Efeito do adjuvante de óleo no título de HI

Vacina	Número de pássaros	Média geométrica de título de HI		
		Dia 0	Dia 7	Dia 14
Somente RP	10	25	25	18
RP + adjuvante de óleo	10	25	35	55
Placebo	10	25	27	14

[193] A adição de adjuvante XSolve à vacina de partículas de replicon de RNA de alfavírus induziu um claro aumento nos títulos de HI das aves após uma única vacinação, em contraste com as vacinas não adjuvadas e placebo.

EXEMPLO 6

UM ADJUVANTE DE ÓLEO MELHORA A EFICÁCIA DE UMA VACINA DE PARTÍCULA DE REPLICON DE RNA ALFAVÍRUS EM GALINHAS EXPRESSANDO UM ANTÍGENO IBDV

[194] Este experimento de desafio de vacinação testou o efeito de um adjuvante de óleo na eficácia da vacinação de um RP expressando o antígeno da

poliproteína VP2-4-3 do vírus da Doença Infecciosa Bursal (IBDV) da cepa Faragher 52/70. Os animais de teste eram galinhas SPF (livres de patógeno específico) negativas para anticorpos contra IBDV. O tamanho do grupo foi de 5 ou 10 aves. A vacinação foi realizada por via subcutânea em um dia de idade (dia da eclosão); um grupo (n = 5) foi vacinado de modo simulado com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Um grupo vacinado recebeu a vacina de RP em solução tampão aquosa, o outro grupo vacinal recebeu a vacina RP misturada 1:1 com adjuvante XSolve. Aos 28 dias após a vacinação, todos os grupos receberam uma infecção por desafio com a cepa virulenta IBDV CS89, por via de colírio. A eficácia da vacinação foi monitorada por necropsia realizada 10 dias após o desafio, pontuando tecidos Bursais para lesões macroscópicas e por histopatologia, de acordo com critérios bem conhecidos para infecção por IBDV.

TABELA 7: O efeito de adjuvante de óleo na eficácia de vacinação de RP contra desafio com IBDV graves

Grupo	Vacina	Número de pássaros	% de proteção	
			Com Base em Lesões Bursais Macroscópicas	Com Base em Lesões Microscópicas
1	Poliproteína RP-IBDV	10	0%	0%
2	Poliproteína RP-IBDV + XSolve	10	100%	100%
3	Placebo	5	0%	0%

[195] Evidentemente, a adição de adjuvante de óleo à vacina de RP teve um efeito positivo dramático na eficácia da vacinação contra uma infecção por desafio grave: melhorando a resposta imune da galinha de zero para totalmente protetora.

EXEMPLO 7

UM ADJUVANTE DE ÓLEO TAMBÉM MELHORA A EFICÁCIA DE UMA PARTÍCULA DE REPLICON DE RNA DE ALFAVÍRUS VACINA EM PEIXES

[196] Uma vacina de partículas de replicon de RNA de alfavírus expressando a principal proteína do capsídeo do iridovírus de sargo (RSIV) foi preparada por métodos padrão, como aqui descrito. A Tilápia foi vacinada por via intramuscular com 0,05 mL de vacina e depois desafiada em diferentes momentos após a vacinação. Trinta peixes por tratamento e por tempo de desafio foram usados no estudo. As vacinas de partículas de replicon de RNA de alfavírus foram misturadas 1:1 (v/v) com PBS, ou com SVEA, com o adjuvante de óleo não mineral duplo, pouco antes da vacinação. O título de RP por tratamento foi de 1×10^7 RP/dose. Os peixes de controle foram vacinados com uma vacina placebo.

TABELA 8A: O Efeito do Adjuvante de óleo na Sobrevivência Percentual de Tilápias

Grupo de tratamento de vacinas	Porcentagem de sobrevivência em 14 dias após o desafio			
	Desafio de dose baixa de 3 semanas	Desafio de dose alta de 3 semanas	Desafio de dose baixa de 6 semanas	Desafio de dose alta de 6 semanas
RP-Irido sem adjuvante	77%	47%	83%	47%
RP-Irido com adjuvante de óleo	90%	43%	83%	70%
Controle não vacinado	43%	27%	67%	37%

TABELA 8B: O Efeito do Adjuvante de óleo na Sobrevivência Percentual Relativa de Tilápias

Grupo de tratamento de vacinas	Porcentagem relativa de sobrevivência versus controles			
	Desafio de dose baixa de 3 semanas	Desafio de dose alta de 3 semanas	Desafio de dose baixa de 6 semanas	Desafio de dose alta de 6 semanas
RP-Irido sem adjuvante	58.8	27.3	50.0	15.8
RP-Irido com adjuvante de óleo	82.4	22.7	50.0	52.6
Controle não vacinado	n/a	n/a	n/a	n/a

[197] Em ambos os desafios de “dose baixa de três semanas” e “dose alta de seis semanas”, o adjuvante melhorou fortemente a sobrevivência relativa de peixes vacinados com RP. Os outros dois tratamentos de desafio produziram

resultados equivalentes. A vacina RP de RNA de alfavírus com adjuvante foi assim consideravelmente mais eficaz em comparação com a vacina RP sem adjuvante, e forneceu vacinação eficaz mesmo com uma única dose de vacinação.

EXEMPLO 8

EFICÁCIA DO USO SIMULTÂNEO E DO USO CONCOMITANTE DE RP E ADJUVANTE DE ÓLEO

[198] Foi realizado um experimento em suínos, utilizando a vacina quádrupla de NA do vírus da influenza suína de partículas de replicon de RNA de alfavírus, como descrito no Exemplo 3. Isso serviu para ilustrar a eficácia dos diferentes tipos de uso dos componentes da vacina: RP e adjuvante de óleo.

Materiais e métodos

[199] Os porcos foram vacinados com aproximadamente 4 e 7 semanas de idade. A vacina NA de quatro maneiras era uma mistura das construções de RP de gene duplo N1 e N2, como descrito no Exemplo 3, cada uma administrada a aproximadamente 2×10^6 RP/dose. Todos os grupos continham 4 porcos. A disposição do protocolo de teste é apresentada na Tabela 9. O grupo 2 recebeu os RPs de NA misturados com o adjuvante XSolve, em uso simultâneo.

[200] Os grupos 3 e 4 testaram o efeito do uso concomitante da RP e do adjuvante de óleo: as administrações foram feitas com uma diferença de 10 minutos uma da outra, e no mesmo lado do pescoço (>5 cm de distância) ou em lados opostos do pescoço.

[201] Um grupo de controle, grupo 5, foi incluído usando um RP codificando um antígeno HA H1 da influenza suína. Isto foi administrado a cerca de 1×10^7 RP/dose.

[202] Os soros foram coletados no dia da 1ª vacinação, no dia da segunda vacinação e 7 dias após a segunda vacinação. Estes soros foram testados em ensaios de NI homólogos separados para cada um dos 4 tipos de NA.

[203] Os títulos de NI resultantes medidos são apresentados nas Figuras 5 e 6, por meio de que a Figura 5 apresenta os títulos de NI contra o antígeno NA clássico N1 nos três instantes medidos ao longo do tempo, incluindo os desvios padrão. A Figura 6 representa os títulos médios de NI do grupo dos 4 tipos de NA combinados, 7 dias após a segunda vacinação.

TABELA 9: Protocolo Experimental do Exemplo 8

Grupo	RP	Adjuvante	Administração
1	NA quádrupla de SIV	Nenhum	Injeta-se IM, dose de 1 mL
2		Xsolve	Mistura e injeção IM, dose de 1 mL
3			Injeta-se RP e adjuvante de óleo separadamente: 0,5 mL de cada, IM, do mesmo lado do pescoço
4			Injeta-se RP e adjuvante separadamente: 0,5 mL cada, IM, lados opostos do pescoço
5	HA H1 de SIV	Nenhum	Mistura-se e injeta-se IM, dose de 1 mL

Resultados e Conclusões

[204] A partir dos resultados medidos no Exemplo 8, vários efeitos podem ser observados:

- Os padrões dos títulos de NI para os quatro tipos de NA nos três instantes medidos foram quase idênticos; portanto, os resultados apresentados na Figura 5 do NA N1-clássico são indicativos dos padrões de título contra os outros três tipos de NA.

- Além disso, os padrões de resposta de título de NI para os 4 tipos de NA a 7 dpv2, conforme apresentado na Figura 6, são praticamente os mesmos.

- Os resultados do título de NI do controle de RP de HA H1 (grupo 5) conforme o esperado, não induziram um título de NI; isso define o limiar de título para uma resposta específica.

– Exceto por algumas variações experimentais, a maioria dos títulos de NI nos grupos 2 - 4, que receberam RP e adjuvante de óleo, foram significativamente maiores do que aqueles do grupo que recebeu apenas RP (grupo 1). Isto ilustra que o adjuvante de óleo aumenta fortemente a imunização por RPs.

– O grupo que recebeu RP e adjuvante de óleo em uso simultâneo (grupo 2) confirmou o forte efeito do adjuvante de óleo já observado nos Exemplos anteriores.

– O efeito imunizante do uso concomitante de RP e de adjuvante de óleo (grupos 3 - 4) se aproximou muito do uso simultâneo: uma forte estimulação da resposta imune de RP. Não houve um efeito claro de diferença no local de administração.

[205] A presente invenção não deve ser limitada em escopo pelas modalidades específicas descritas na presente invenção. De fato, várias modificações da invenção em adição às descritas na presente invenção, se tornarão evidentes aos técnicos no assunto a partir da descrição anterior. Tais modificações também se destinam a ser englobadas no escopo das reivindicações anexas.

[206] Deve-se entender ainda que todos os tamanhos base ou tamanhos de aminoácidos e todos os valores de peso molecular ou massa molecular, dados para ácidos nucleicos ou polipeptídeos, são aproximados e fornecidos para fins de descrição.

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma partícula de replicon de RNA de alfavírus que codifica um antígeno originário de um patógeno de animal, em que a vacina também compreende um adjuvante de óleo.

2. Vacina, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o adjuvante de óleo compreende um óleo mineral e um ou mais óleos não minerais selecionados a partir do grupo que consiste em esqualano, esqualeno, um tocoferol, e um óleo vegetal.

3. Vacina, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o tocoferol é selecionado a partir do grupo que consiste em vitamina E, acetato de vitamina E e uma combinação dos mesmos, e em que o óleo vegetal é selecionado a partir do grupo que consiste em oleato, oleato de etila e uma combinação dos mesmos.

4. Vacina, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **caracterizada** pelo fato de que o óleo mineral é um óleo de parafina líquida.

5. Vacina, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, **caracterizada** pelo fato de que o adjuvante de óleo compreende esqualano e acetato de vitamina E.

6. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de que a quantidade de óleo mineral no adjuvante de óleo é de 1 a 70% v/v do adjuvante de óleo.

7. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelo fato de que a quantidade total de óleo não mineral no adjuvante de óleo é de 0,1 a 30% p/v do adjuvante de óleo.

8. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizada** pelo fato de que o adjuvante de óleo é formulado como uma emulsão óleo em água.

9. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8,

caracterizada pelo fato de que a partícula de replicon de RNA de alfavírus é uma partícula de replicon de RNA de alfavírus de Encefalite Equina Venezuelana (VEE).

10. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de que o patógeno de animal é um patógeno de um animal selecionado a partir do grupo que consiste em um peixe, uma ave e um mamífero.

11. Vacina, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o mamífero é um porcino.

12. Vacina, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que a ave é uma galinha ou um peru.

13. Vacina, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o peixe é um membro da família Cichlidae.

14. Kit, **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos dois recipientes, em que pelo menos um recipiente compreende uma partícula de replicon de RNA de alfavírus de Encefalite Equina Venezuelana (VEE) que codifica um antígeno originário de um patógeno de animal, e pelo menos um recipiente compreende um adjuvante de óleo compreendendo um óleo mineral e um ou mais óleos não minerais selecionados a partir do grupo que consiste em esqualano, esqualeno, um tocoferol e um óleo vegetal.

15. Uso de uma partícula de replicon de RNA de alfavírus que codifica um antígeno originário de um patógeno de animal, **caracterizado** pelo fato de ser para a fabricação de uma vacina definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13 para imunizar um animal.

16. Partícula de replicon de RNA de alfavírus de Encefalite Equina Venezuelana (VEE) que codifica um antígeno originário de um patógeno de animal, **caracterizada** pelo fato de ser para uso na proteção de um animal contra

infecção ou doença causada pelo patógeno de animal, em que a partícula de replicon de RNA de alfavírus é administrada no ou sobre o corpo do animal alvo em uso simultâneo ou em uso concomitante com um adjuvante de óleo compreendendo um óleo mineral e um ou mais óleos não minerais selecionados a partir do grupo que consiste em esqualano, esqualeno, um tocoferol e um óleo vegetal.

17. Invenção de produto, processo, sistema, kit ou uso, **caracterizada** pelo fato de que compreende um ou mais elementos descritos no presente pedido de patente.

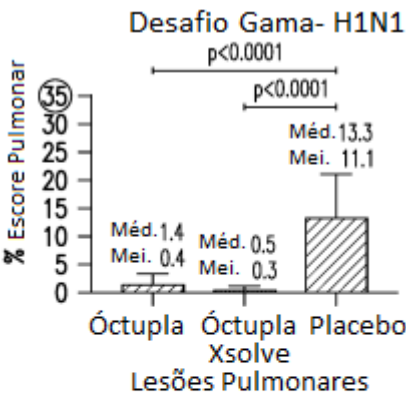


FIG. 1A

Desafio H1- Gama

Ótupla RTU
Ótupla Xsolve
Placebo- Xsolve

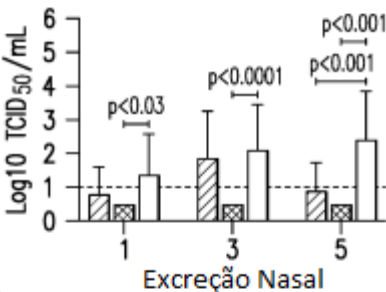


FIG. 1C

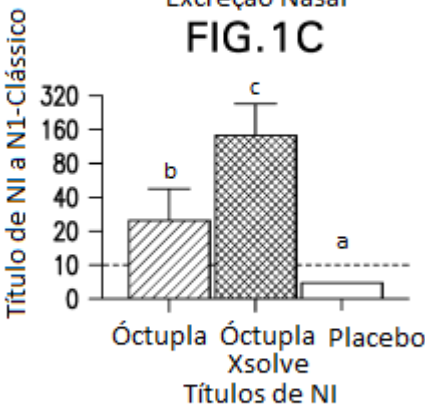


FIG. 1E

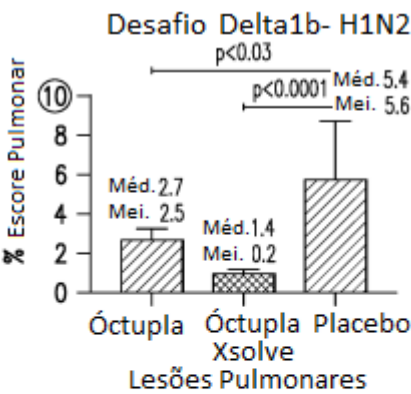


FIG. 1B

Desafio H1- Delta1a

Ótupla RTU
Ótupla Xsolve
Placebo- Xsolve

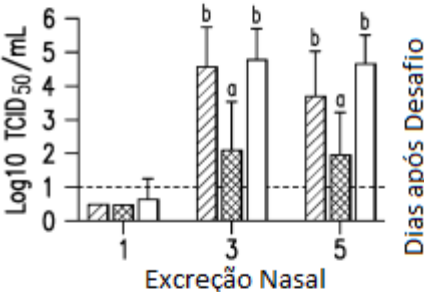


FIG. 1D

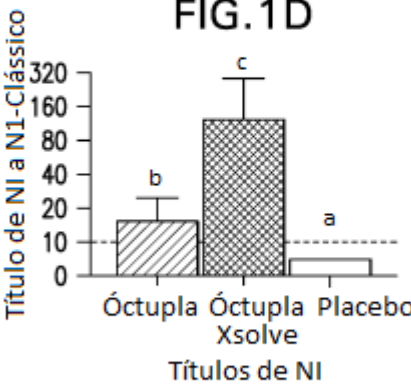
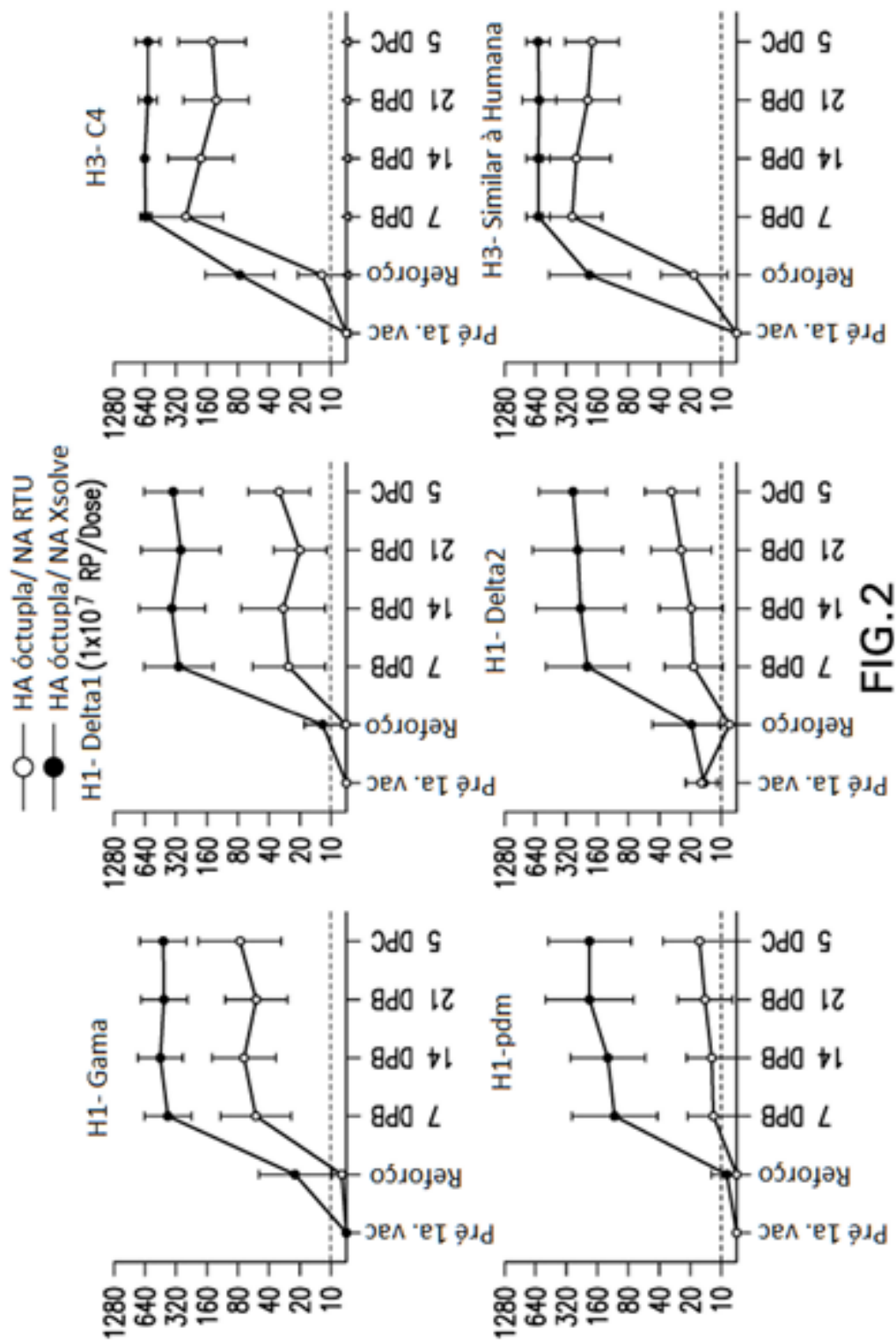
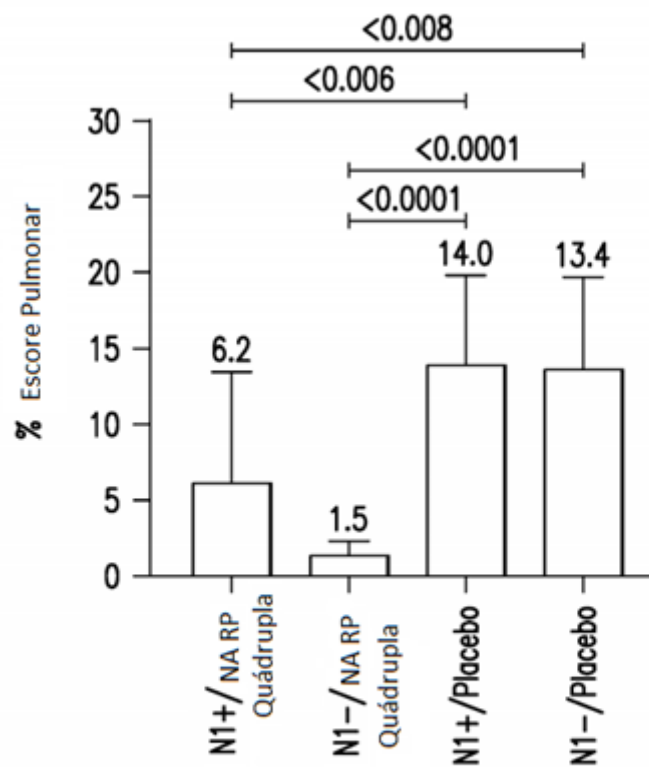
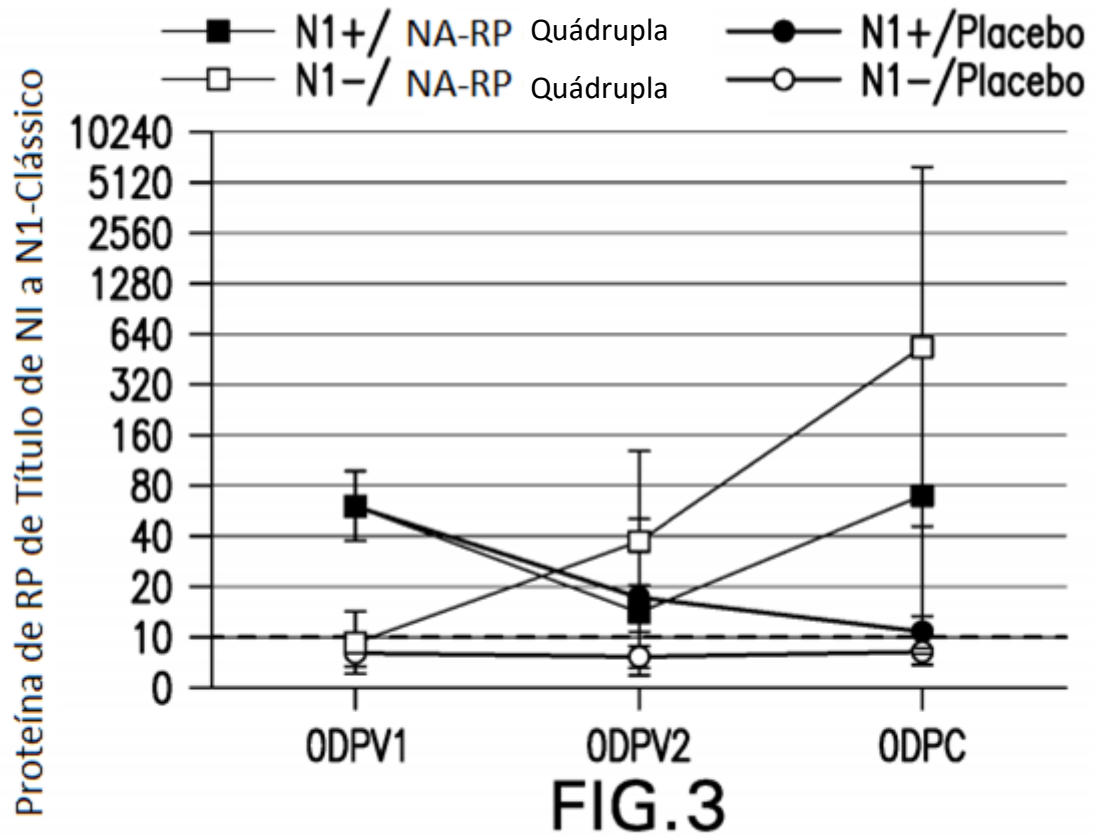


FIG. 1F



**FIG.4**

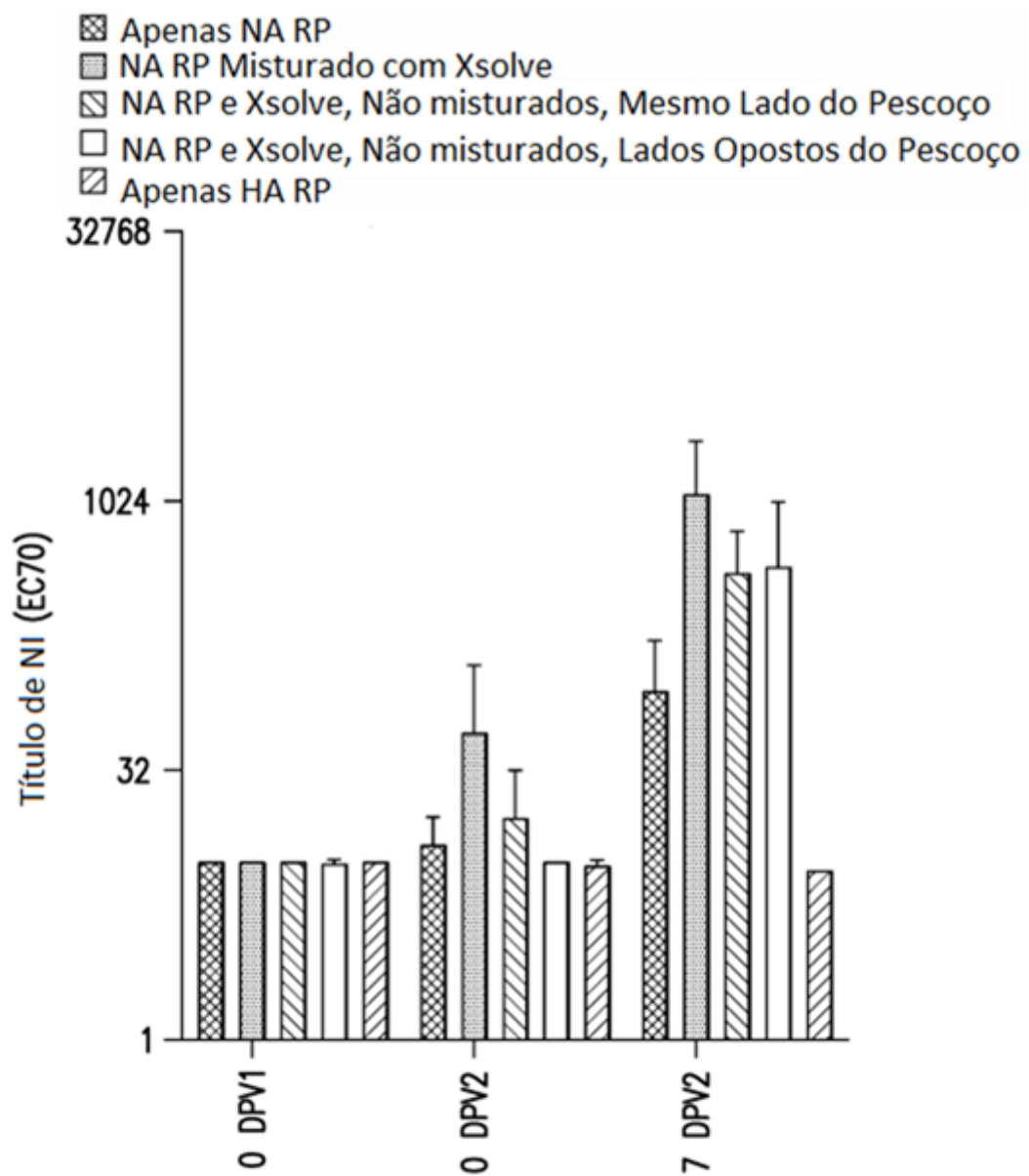


FIG.5

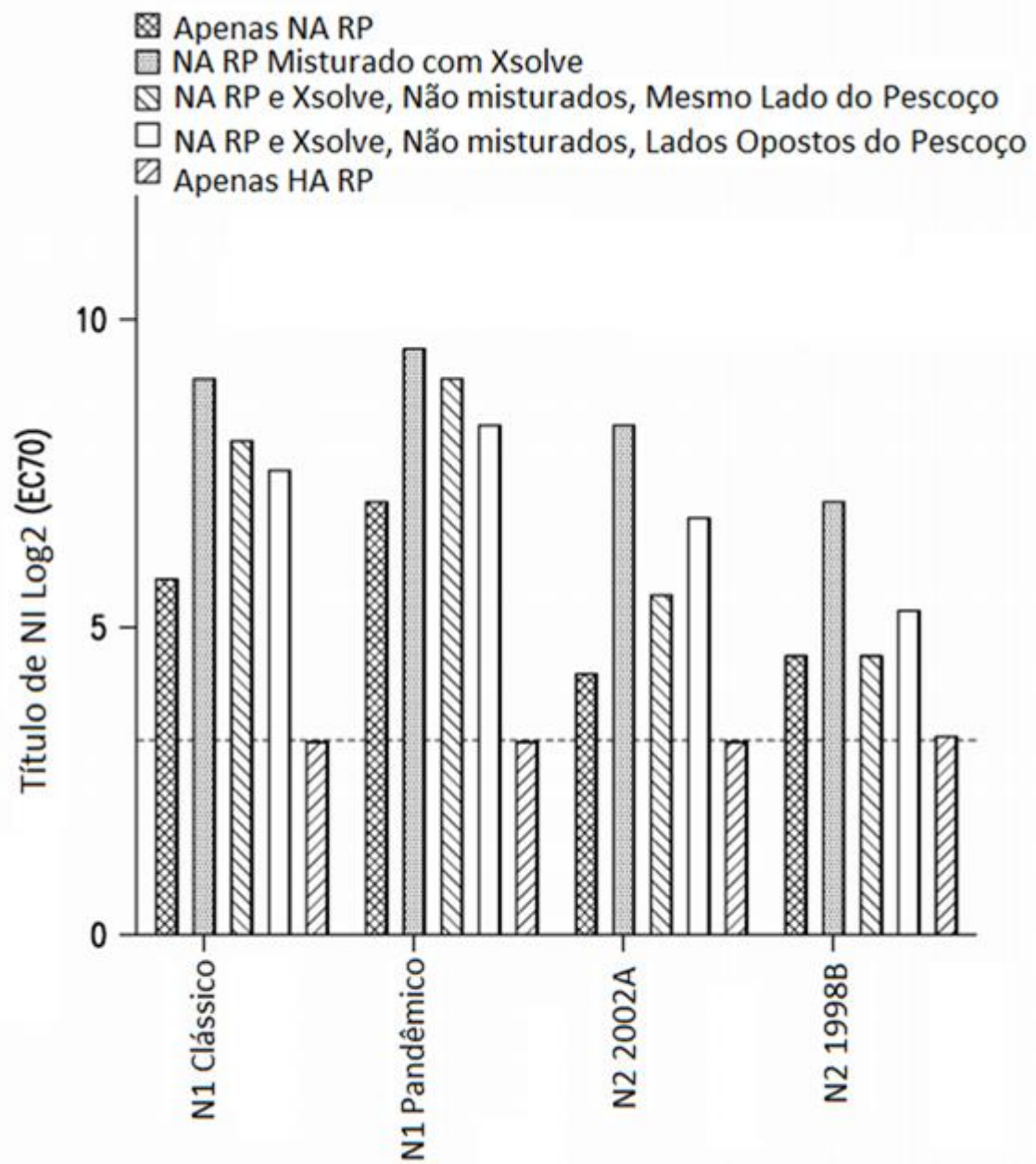


FIG.6

RESUMO

VACINAÇÃO COM PARTÍCULAS DE REPLICON E ADJUVANTE DE ÓLEO

A presente invenção refere-se à vacinação contra patógenos de animais usando partículas de RNA de replicon de alfavírus e adjuvantes de óleo. A uma vacina, e um kit de partes compreendendo as partículas de replicon e o adjuvante de óleo. Também a métodos e usos de fabricação e utilização da vacina e dos componentes do kit.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LPB02797_Sequence listing_(MDL)_(TC)_20200521.txt
- Data de Geração do Código: 01/06/2020
- Hora de Geração do Código: 17:16:12
- Código de Controle:
 - Campo 1: 40A8457D8B1B49F5
 - Campo 2: 357A9BA1EDE0AB6F