

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

(22) Data de pedido: 1995.05.08	(73) Titular(es): BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC. 2621 NORTH BELT HIGHWAY ST. JOSEPH, MO 64506 US
(30) Prioridade(s): 1994.05.10 US 240373	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.08.22	(72) Inventor(es): HSIEN-JUE CHU US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.07.03 193/2013	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA VIVA MODIFICADA MELHORADA CONTRA BRSV**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA UMA COMPOSIÇÃO MELHORADA DE VACINA CONTRA BRSV, A QUAL PROPORCIONA DE FORMA VANTAJOSA IMUNIDADE RELATIVAMENTE À INFECÇÃO APÓS UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO. A COMPOSIÇÃO COMPREENDE UM VÍRUS BRS VIVO MODIFICADO E UM ADJUVANTE, OS QUAIS EM COMBINAÇÃO PROPORCIONAM IMUNIDADE FACE À INFECÇÃO COM BRSV APÓS UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO E ESTIMULAM UMA RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA PARA O BRSV E QUE INCLUI IMUNIDADE MEDIADA POR CÉLULA E LOCAL (IGA SEGREGADA). NUMA FORMA DE REALIZAÇÃO PREFERIDA, O VÍRUS BRS PERTENCE À ESTIRPE 375 E O ADJUVANTE COMPREENDE UM HIDROCARBONETO INSATURADO DE TEREBENTINA, DE UM MODO PREFERIDO, ESQUALENO OU ESQUALANO, E UM COPOLÍMERO EM BLOCO DE POLIOXIPROPILENO E POLIOXIETILENO, DE UM MODO MUITO PREFERIDO, UM EM QUE O COPOLÍMERO TENHA UMA COMPONENTE DE POLIOXIPROPILENO (POP) COM UMA MASSA MOLECULAR MÉDIA DE ENTRE CERCA DE 3250 E 4000, E A COMPONENTE DE POLIOXIETILENO (POE) COMPREENDA CERCA DE 10 - 20% DA MOLÉCULA TOTAL. O ADJUVANTE PODE INCLUIR OPCIONALMENTE UM TENSIOACTIVO, DE UMA FORMA PREFERIDA, UM MONO-OLEATO DE POLIOXIETILENOSSORBITANO.

RESUMO

"VACINA VIVA MODIFICADA MELHORADA CONTRA BRSV"

A invenção proporciona uma composição melhorada de vacina contra BRSV, a qual proporciona de forma vantajosa imunidade relativamente à infecção após uma única administração. A composição compreende um vírus BRS vivo modificado e um adjuvante, os quais em combinação proporcionam imunidade face à infecção com BRSV após uma única administração e estimulam uma resposta imune específica para o BRSV e que inclui imunidade mediada por célula e local (IgA segregada). Numa forma de realização preferida, o vírus BRS pertence à estirpe 375 e o adjuvante compreende um hidrocarboneto insaturado de terebentina, de um modo preferido, esqualeno ou esqualano, e um copolímero em bloco de polioxipropileno e polioxietileno, de um modo muito preferido, um em que o copolímero tenha uma componente de polioxipropileno (POP) com uma massa molecular média de entre cerca de 3250 e 4000, e a componente de polioxietileno (POE) compreenda cerca de 10 - 20% da molécula total. O adjuvante pode incluir opcionalmente um tensoactivo, de uma forma preferida, um mono-oleato de polioxietilenossorbitano.

DESCRIÇÃO

"VACINA VIVA MODIFICADA MELHORADA CONTRA BRSV"

Campo da Invenção

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

Antecedentes da Invenção

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

O BRSV infecta gado de todas as idades, incluindo vitelos em aleitamento. O BRSV é considerado o patogénico viral mais comum na pneumonia enzoótica dos vitelos e também tem sido associado ao enfisema pulmonar em vitelos que terminaram recentemente a fase de aleitação. Desta forma, existe uma necessidade de uma profilaxia eficaz contra este vírus, para os rebanhos de gado de carne e de leite.

É problemático estabelecer-se imunidade protectora eficaz contra o BRSV. Como em outras doenças mediadas por vírus, os níveis séricos de anticorpos contra o BRSV não se correlacionam necessariamente com a protecção face à doença. Este fenómeno pode reflectir um papel da IgA localmente produzida contra o BRSV (Kimman *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 25: 1097-1106, 1987) e/ou a necessidade de imunidade mediada por células para ser montada uma defesa eficaz contra este vírus. O estabelecimento de uma imunidade eficaz em vitelos apresenta obstáculos adicionais, uma vez que os anticorpos contra o BRSV provenientes da mãe podem aniquilar o imunogénio injectado e neutralizar a vacina de forma eficaz. Por último, o custo e a inconveniência de vacinações múltiplas tornam desejável a existência de uma vacina numa dose única. Existe, portanto, uma necessidade na técnica, de formulações de vacina contra o BRSV numa dose única, que originem uma resposta imunológica vigorosa e multifacetada.

O regime de administração padrão para as vacinas da técnica anterior contra o BRSV, é de duas doses (Stott *et al.*, *J. Hyg. Camb.* 93: 251-261, 1984; Thomas *et al.*, *Agri-Practice* 5: 1986; e Syvrud *et al.*, *Vet. Med.* 83: 429-430, 1988; Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals, Edição 8 1993/94, págs. 484, 740-741, 956-960, 982-983). Como se descreve em Kucera *et al.* (*Agri-Practice, Vet. Med.*, Vol. 78, Outubro de 1983, págs. 1599-1604, 1983), uma vacinação única experimental contra o BRSV induzia níveis relativamente baixos de título de anticorpos de neutralização do BRSV no soro (SN), enquanto que duas doses da vacina originavam títulos de anticorpos SN entre 1:10 e 1:320. Além disto, em rebanhos aparentemente expostos ao BRSV durante ensaios no campo, aproximadamente 48% dos animais não vacinados necessitavam de tratamento para doenças respiratórias, em comparação com 27% e com 21%, respectivamente

para os animais vacinados com uma única dose e com duas doses. No entanto não se demonstrou de forma conclusiva nos ensaios de campo que o agente que provocava a doença respiratória fosse o BRSV. De notar também que uma vacina numa só dose não parecia ser muito imunogénica. Avaliações posteriores concluíram que seriam essenciais duas doses desta vacina para proporcionar uma boa protecção (*Bovine Veto Forum* 1: N° 2 págs. 2-16, 1986; Syvrud, et al., *Vet. Med.* 429-430, 1988).

No *Vet. Immunol. Immunopathol.* vol. 22, N° 2, 1989 NL, páginas 145-60, Kimman et al. descrevem a administração e as respostas locais e sistémicas de anticorpos devidas a memória contra o Vírus Sincicial Respiratório de bovino e os efeitos da quantidade de vírus da replicação do vírus, da via de administração e dos anticorpos maternos. No *J. Clin. Microbiol.* vol. 25, N° 6, 1987, páginas 1097-1106, Kimman et al. descrevem repostas locais e sistémicas contra a infecção por Vírus Sincicial Respiratório de bovino e re-infecção, em vitelos com e sem anticorpos maternos. Em *Vet Q.*, vol. 13, N° 1, 1991 NL, páginas 47-59, Baker divulga mecanismos imunopatológicos humanos e bovinos do Vírus Sincicial Respiratório de bovino. Em *Semin. Immunol.*, vol. 2, N° 5, 1990 EUA, páginas 360-374, Allison et al. divulgam formulações adjuvantes e o seu modo de actuação.

O Pedido de Patente Europeia N° 129923 (publicado a 1 de Fevereiro de 1985 e concedido como patente a 9 de Julho de 1988), descreve um método de preparação de uma vacina viva contra BRSV que envolve a dissolução da vacina viva numa vacina inactivada contendo um ou mais antigénios (particularmente vírus da gripe inactivado) formulada como uma emulsão de óleo em água. Obteve-se uma resposta sorológica em animais jovens que ainda possuíam imunidade materna. O pedido também descreve uma

preparação viva modificada contendo BRSV e adjuvante. No entanto, não foram apresentados nenhuns dados quanto à eficácia da protecção de qualquer vacina de BRSV contra um desafio por BRSV.

Um objectivo da invenção é proporcionar uma vacina eficaz contra o BRSV, que estimule imunidade preventiva e que previna uma doença causada por este vírus.

Um outro objectivo da invenção é proporcionar um adjuvante adequado para utilização numa vacina de BRSV, em que o adjuvante aumente a imunogenicidade do vírus de forma a originar uma imunidade protectora após uma única dose de vacina.

Sumário da Invenção

A invenção inclui utilizações como definidas nas reivindicações que lhe estão anexas.

A invenção refere-se também a uma composição para estimular respostas imunes, compreendendo um copolímero em bloco, tal como um copolímero em bloco de polioxipropileno e polioxietileno (POP-POE), de um modo preferido, Pluronic® L121 (e. g., Patente U.S. 4772466), e um óleo metabolizável, e. g., um hidrocarboneto insaturado de terpeno, de um modo preferido, esqualano (2,6,10,15,19,23-hexametiltetracosano) ou esqualeno. A composição também pode incluir um detergente ou um tensioactivo não iónico, de um modo preferido, um mono-oleato de polioxietileno-sorbitano, tal como um detergente Tween®, de um modo muito preferido Tween®-80, i. e., mono-oleato de polioxietileno(20)-sorbitano.

Nesta mistura de adjuvante de partida, o copolímero em bloco, o óleo orgânico e o tensioactivo, podem estar presentes em quantidades desde cerca de respectivamente, 10 a cerca de 40 mL/L, cerca de 20 a cerca de 80 mL/L e cerca de 1,5 a cerca de 6,5 mL/L. Numa forma de realização preferida da mistura adjuvante de partida, a componente orgânica é esqualano presente numa quantidade de cerca de 40 mL/L, o tensioactivo é mono-oleato de polioxietileno-sorbitano (Tween®-80) presente numa quantidade de cerca de 3,2 mL/L e o copolímero em blocos POP-POE é Pluronic® L121 presente numa quantidade de cerca de 20 mL/L. O Pluronic® L121 é um copolímero líquido a 15-40 °C, em que a componente de polioxipropileno (POP) tem uma massa molecular de entre 3250 e 4000 e a componente de polioxietileno (POE) compreende cerca 10 e 20%, de um modo preferido, 10% da molécula total.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a uma composição imunogénica para imunizar um animal contra uma infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório de Bovino (BRSV), compreendendo um vírus BRS modificado vivo, em combinação com o adjuvante acima e um estabilizador, veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. O adjuvante está presente nesta composição para vacina, a uma concentração final de cerca de 1-25% (v/v), de um modo preferido a 5% (v/v). A composição também pode incluir outros vírus, tais como o Vírus Infeccioso da Rinotraqueíte de Bovino (IBRV), o da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e o vírus Parainfluenza 3 (PI-3V), e pode ser administrada pela via intramuscular ou subcutânea.

Noutro aspecto ainda, é descrito um método para proteger um animal contra uma doença provocada pelo Vírus Sincicial Respiratório de Bovino, por administração de uma única dose da

vacina acima, compreendendo BRSV vivo modificado e um adjuvante.

Descrição pormenorizada da Invenção

Como aqui utilizado, "vacina viva modificada" é uma vacina compreendendo o vírus que foi alterado, tipicamente por passagem por células de tecido em cultura, para atenuar a sua capacidade de provocar doença, mas que mantém a sua capacidade de proteger contra a doença ou infecção quando é administrado a animais.

"Adjuvante" significa uma composição compreendida por uma ou mais substâncias, que estimula a imunogenicidade e a eficácia de BRSV quando é misturada com BRSV numa composição de vacina.

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

A presente invenção também se refere a vacinas contra BRSV que são adequadas para uma administração em dose única. As vacinas são do tipo de vírus vivo modificado. Isto proporciona a vantagem de conservação da imunogenicidade e/ou da eficácia do vírus, enquanto diminui a sua virulência.

A vacina pode ser preparada partir de culturas virais recentemente recolhidas, por métodos que são convencionais na técnica (veja-se o Exemplo 1 a seguir). Isto é, o vírus pode ser propagado em culturas de células de tecido, tais como fibroblastos diplóides humanos ou, de um modo preferido, MDBK (de Rim de Bovino Madin-Darby), ou em outras células de bovino. O crescimento do vírus é monitorizado por técnicas convencionais

(observação do efeito citopático, imunofluorescência ou outros testes baseados em anticorpos) e recolhido quando se obtém um título viral suficientemente elevado. As reservas virais podem ser ainda concentradas, ou liofilizadas, utilizando os métodos convencionais, antes de serem incluídos na formulação de vacina. Podem empregar-se outros métodos, tais como os que se descreveram em Thomas, et al., *Agri-Practice*, V.7 N° 5, págs. 26-30.

As vacinas compreendem o vírus vivo modificado combinado com um ou mais estabilizadores, veículos e adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis. Incluem-se nos veículos adequados para utilização soro fisiológico, soro fisiológico tamponado com fosfato, Meio Mínimo Essencial (MEM), ou MEM com tampão HEPES. Incluem-se nos estabilizadores, sem que estes se limitem a, sacarose, gelatina, peptona, extractos proteicos digeridos, tais como NZ-Amina ou NZ-Amina AS. Em particular, a presente invenção refere-se a um adjuvante que aumenta a imunogenicidade do vírus vivo modificado e que permite que uma única administração proporcione imunidade protectora.

Incluem-se nos adjuvantes adequados o esqualano e o esqualeno (ou outros óleos de origem animal); copolímeros em bloco, tais como Pluronic® (L121) Saponina; detergentes, tais como Tween®-80; Quil® A, óleos minerais, tais como Drakeol® ou Marcol®, óleos vegetais, tal como óleo de amendoim; adjuvantes derivados de *Corynebacterium*, tal como *Corynebacterium parvum*; adjuvantes derivados de *Propionibacterium*, tal como *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis* (*Bacillus Calmette e Guerin*, ou BCG); interleucinas, tais como a interleucina 2 e a interleucina-12; monocinas, tais como a interleucina 1; factor de necrose tumoral; interferões, tal como interferão gama;

combinações, tais como saponina e hidróxido de alumínio ou Quil® com hidróxido de alumínio; lipossomas; adjuvante iscom; extracto de paredes celulares de micobactérias; glicopéptidos sintéticos, tais como dipéptidos muramílicos ou outros derivados; Avridina; Lípido A; sulfato de dextrano; DEAE-Dextrano ou DEAE-Dextrano com fosfato de alumínio; carboxipolimetilenos, tal como Carbopol®; EMA e emulsões de copolímeros acrílicos, tais como Neocryl® A640 (e. g., como descrito na Patente U.S. 5047238); proteínas de vaccinia ou de vírus de varíola animal; adjuvantes de partículas subvirais, tal como orbivírus; toxina da cólera; brometo de dimetildiocledecilamónio; ou suas misturas.

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

Pode administrar-se a vacina da presente invenção, de um modo preferido, pela via intramuscular ou subcutânea, ou de um modo menos preferido, pelas vias intranasal, intraperitoneal, ou oral.

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

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

Exemplo 1: Crescimento e colheita de BRSV

A) Descrição das reservas de vírus: Pode obter-se o BRSV a partir de várias fontes facilmente acessíveis. Numa forma de realização, pode utilizar-se a estirpe 375 do BRSV. Esta estirpe virulenta de BRSV proveio da Iowa State University, Ames, Iowa. Considera-se e inclui-se na invenção qualquer estirpe de BRSV que seja adequada. De igual forma, os vírus BHV-1, BVDV e PI-3V estão facilmente acessíveis. Quando são obtidos nas formas virulentas, estes vírus podem ser atenuados, por métodos conhecidos, para se proporcionar vírus vivos modificados adequados para utilização em vacinas. Os vírus também podem ser mortos por métodos convencionais, para proporcionar vírus inactivados para utilização em vacinas. São bem conhecidos os métodos de atenuação e de inactivação dos vírus para utilização em vacinas. São conhecidas vacinas com vírus BRSV, BHV-1, BVDV e PI-3V modificados vivos e/ou mortos, e estão comercialmente disponíveis. Ver, por exemplo, Thomas, et al., supra, e *Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals*, supra e Apêndice 2, A-31 45.

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

Para a propagação do vírus, suplementou-se OptiMEM, MEM de Eagle, Meio 199 ou um meio equivalente com até 2% de soro bovino, até 0,5% de albumina de soro bovino, até 0,5% de hidrolisado de lactalbumina, até 30 mcg/mL de polimixina B e de neomicina, e até 2,5 mcg/mL de anfotericina B. Podem também adicionar-se piruvato de sódio, bicarbonato de sódio, glucose, L-glutamina e cloreto de cálcio, conforme necessário para assegurar o crescimento das células.

C) Inoculação de culturas: Inocularam-se culturas individuais subconfluentes de células MDBK com BRSV, BVDV, PI-3V ou BHV-1V, utilizando uma multiplicidade de infecções entre 1:5 e 1:5000 unidades infecciosas por célula. Rejeitou-se o meio de crescimento das células e substituiu-se por meio de propagação viral (ver acima), após o que se adicionou directamente o vírus semente ao vaso de cultura. Mantiveram-se as culturas infectadas com vírus a 36 °C.

O crescimento viral foi determinado por exame microscópico do efeito citopático ou por coloração com anticorpos fluorescentes. Para o BRSV, as células infectadas evidenciaram a formação de sincícios e de células alongadas fusiformes, que progrediram até toda a folha estar essencialmente envolvida de células. Para o BHV-1V, as células infectadas exibiram granulação citoplásmica seguida de arredondamento e/ou aquisição de forma de balão das células infectadas. Para o BVDV, as células infectadas formaram vacúolos intracelulares, arredondaram-se e deixaram as áreas circunscritas isentas de células. As alterações citopáticas nas células infectadas com o PI-3V são semelhantes às evidenciadas pelas células infectadas pelo BHV-1V.

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

Para a preparação de uma vacina final, as reservas de vírus, isolados ou em combinação, são misturados com um adjuvante.

Quando se utilizam reservas virais líquidas, misturam-se 19 partes de reserva viral com uma parte de adjuvante, de um modo preferido, o adjuvante do Exemplo 2. Quando se utilizam reservas virais liofilizadas, prepara-se uma solução diluída a 5% (v/v) de adjuvante em soro fisiológico (mistura-se 1 parte de adjuvante com 19 partes de soro fisiológico). Reconstitui-se a reserva viral liofilizada (reidratada) com o adjuvante diluído, para se formar a composição final da vacina. Pode adicionar-se timerisol à formulação final, a uma concentração final de 1:10000.

Exemplo 2: Formulação de uma reserva de adjuvante preferido

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

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

Misturam-se os ingredientes e homogeniza-se até se formar uma massa ou uma emulsão estável. Antes da homogeneização, podem esterilizar-se num autoclave os ingredientes ou a mistura. Pode esterilizar-se ainda a emulsão por filtração. Pode adicionar-se formalina até uma concentração final de 0,2%. Pode adicionar-se timerosal a uma diluição final de 1:10000.

Exemplo 3: Melhoramento de uma Vacina de BRSV Modificado

Vivo

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

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

Os resultados deste estudo indicaram que 4 dos 5 vitelos inoculados com a vacina de BRSV contendo adjuvante mostravam evidência de anticorpos anti-BRSV (seroconversão), enquanto nenhum dos animais inoculados com a vacina de BRSV isenta de inoculante demonstrou evidência de anticorpos. Isto indica que o adjuvante descrito no Exemplo 2 tem a propriedade de aumentar a imunogenicidade das vacinas com BRSV modificado vivo.

Exemplo 4: Administração de uma Dose Única de Vacina de BRSV Melhorada

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

A) Vacinas Experimentais: Foi cultivado o Vírus Sincicial Respiratório de Bovino modificado vivo (BRSV), em cinco passagens após a sementeira de partida, em células de Rim Bovino Madin Darby (MDBK), à passagem 20 da reserva inicial de células. Em resumo, cultivaram-se células MDBK em frascos rotativos de 850 cm², a uma densidade de 3 x 10⁷ células por frasco rotativo, em Meio Mínimo Essencial (MEM) contendo 5% de soro bovino, 0,5% de LAH e 30 µg/mL de Gentamicina. Deixaram-se crescer as células a 37 °C durante 2 dias antes de se infectarem com vírus. Decantou-se o meio dos frascos rotativos e adicionou-se-lhes vírus a uma Multiplicidade de Infecção de 1:600 em 100 mL de meio de propagação de vírus por frasco (MEM contendo 2% de soro bovino, 0,5% de LAH e 30 µg/mL de Gentamicina). Sete dias depois da infecção, estava presente 100% de citopatologia e recolheram-se os fluidos sobrenadantes. Estabilizou-se o vírus com 25% (v/v) de estabilizador SGGK3 e liofilizou-se. No dia da vacinação, reconstituiu-se o vírus liofilizado com 5% (v/v) de adjuvante diluído em diluente salino (Ver Exemplo 2). Combinou-se o vírus BRSV reconstituído com vírus PI3, BVDV e BHV-I. Determinou-se o título de cada componente da vacina por titulação em replicado, no dia da vacinação.

B) Animais Experimentais Utilizados: Utilizou-se um total de 30 bovinos para este estudo. Estes bovinos eram susceptíveis ao BRSV, como indicado por um título de anticorpos neutralizantes no soro (SN) < 2 no dia da vacinação, para os animais de teste e no dia da infecção para os controlos. Alojaram-se os animais ao ar livre com acesso a um abrigo com três paredes, aberto a sul. Alojaram-se os controlos em separado dos animais vacinados antes da infecção, para evitar uma exposição ao vírus da vacina. Foi-lhes disponibilizada uma ração completa ao dia, palha e água foram fornecidos *ad libitum*.

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

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

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

F) Ensaios:

1. Ensaio de Anticorpos Neutralizantes no Soro (SN)

Misturaram-se diluições em série de soro termicamente inactivado com volumes iguais de suspensões virais, num teste de neutralização de vírus a soro constante, utilizando 100 a 500 TCID₅₀ de BRSV. Incubou-se durante 1 hora a 37 °C a mistura de vírus e soro, e depois inoculou-se em células VERO em placas de microtitulação com 96 poços. A presença dos títulos em anticorpos SN foi indicada pela ausência de vírus, como

detectado pelo efeito citopático. Para a determinação dos títulos de anticorpos SN, calcularam-se os pontos finais de 50% de neutralização de acordo com o método de Reed e Muench.

2. Titulação de Vírus na Diluição Final da Vacina

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

3. Titulação do Vírus do desafio

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

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

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

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

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

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

Em comparação, os sintomas respiratórios eram muito menos comuns nos animais vacinados. Só 40% dos animais vacinados apresentavam quaisquer sinais de doença respiratória e só dois (10%) apresentavam sinais clínicos em diversos dias. A classificação clínica média para o grupo vacinado foi de 1,0. Verificou-se existir uma diminuição significativa da doença clínica nos animais vacinados, em comparação com os do grupo de controlo, por uma Análise de Soma por Graus de Mann Whitney ($p < 0,05$).

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

Desta forma, a invenção refere-se a uma composição de vacina para imunizar um animal contra uma infecção por Vírus Sincicial Respiratório de bovino (BRSV). A vacina inclui um vírus BRS modificado vivo, um adjuvante e um veículo farmacologicamente aceitável, de tal forma que a combinação proporciona imunidade contra uma infecção por BRSV após uma única administração, e origina uma resposta imune específica contra o BRSV que é seleccionada entre imunidade mediada por células e imunidade local (IgA segregada).

A imunidade mediada por células inclui estimulação das Células T Auxiliares, das Células T Assassinas e das Células T de Hipersensibilidade Prolongada, bem como a estimulação de produção de macrófagos, monócitos e outras linfocinas e interferão. A presença de imunidade mediada por células pode ser determinada por testes convencionais *in vitro* e *in vivo*. A imunidade local, tal como a da IgA segregada, pode ser determinada por testes de ELISA ou IFA convencionais que demonstram um título de anticorpos neutralizantes no soro, de 1-2 ou maior. De acordo com a invenção, as consequências da imunidade mediada por células ou da imunidade local são específicas, ou associadas ao BRSV.

Lisboa, 1 de Outubro de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de vacina para utilização na imunização de um animal contra a infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório de Bovino (BRSV) compreendendo:

um Vírus BRS modificado vivo, um adjuvante compreendendo um copolímero em bloco e um óleo metabolizável e um veículo farmacologicamente aceitável, em que a composição de vacina contém de $10^{3,0}$ a $10^{6,0}$ TCID₅₀/mL de BRSV e é administrada como uma dose única.

2. Composição da reivindicação 1, em que o adjuvante compreende um copolímero em bloco de polioxipropileno-polioxietileno e um hidrocarboneto terpeno insaturado.
3. Composição da reivindicação 2, em que o hidrocarboneto terpeno insaturado é um de esqualeno e esqualano, e o copolímero possui um componente de polioxipropileno com um peso molecular médio de cerca de 3250 a 4000 e o componente de polioxietileno compreende cerca de 10-20% da molécula total.
4. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o copolímero está presente numa concentração final de cerca de 0,01 a 1% (v/v) e o componente hidrocarboneto está presente numa concentração final de cerca de 0,02 a 2% (v/v).
5. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o adjuvante compreende adicionalmente um tensoactivo.

6. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o adjuvante compreende também um tensioactivo presente numa concentração final de cerca de 0,0015 a 0,20% (v/v).
7. Composição de qualquer uma das reivindicações 5 ou 6, em que o tensioactivo é um mono-oleato de polioxietilenossorbitano.
8. Composição de qualquer das reivindicações 1 a 7, compreendendo ainda o Vírus da Rinotraqueíte Bovina (BHV-IV), Virus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e Vírus Parainfluenza 3 (PI-3V).
9. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a composição é administrada intramuscularmente, subcutaneamente, intraperitonealmente, oralmente ou intranasalmente.

Lisboa, 1 de Outubro de 2013