



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0708354-8 B1

(22) Data do Depósito: 28/02/2007

(45) Data de Concessão: 19/04/2016
(RPI 2363)



(54) Título: ANTÍGENO VACINAL QUIMÉRICO CONTRA O VIRÚS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA E COMPOSIÇÃO DE VACINA CAPAZ DE PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA O VIRÚS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA

(51) Int.Cl.: A61K 39/12; C07K 14/18; C07K 19/00; C07K 14/705

(30) Prioridade Unionista: 28/02/2006 CU 2006-0052

(73) Titular(es): CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA. CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA

(72) Inventor(es): JORGE ROBERTO TOLEDO ALONSO, OLIBERTO SÁNCHEZ RAMOS, MARITZA ISIDRA BARRERA VALLE, NANCY ELENA FIGUEROA BAILE, YANET PRIETO CARRATALÁ, MARÍA PILAR RODRÍGUEZ MOLTÓ, MARÍA TERESA FRÍAS LEPOUREAU, CARLOS GUILLERMO BORROTO NORDELO

“ANTÍGENO VACINAL QUIMÉRICO CONTRA O VÍRUS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA E COMPOSIÇÃO DE VACINA CAPAZ DE PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA O VÍRUS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA”

5 **Campo da técnica**

A presente invenção se refere ao campo da saúde animal, particularmente com novos antígenos quiméricos que compreendem subunidades virais do vírus que causa a doença da Peste Suína Clássica (VPPC) acoplados à moléculas protéicas estimuladoras do sistema imune
10 celular e humoral, e desenvolvem nos porcos uma resposta imune potente e rápida contra o referido vírus.

Estado da técnica Anterior

A Peste Suína Clássica (PPC), também conhecida como cólera suína por seu caráter altamente infeccioso e sua ampla distribuição mundial, é
15 considerada a doença mais importante do porco, daí sua inclusão na lista de doenças notificáveis da Organização Internacional de Saúde Animal. O agente etiológico desta doença, o VPPC, é um vírus do gênero Pestivirus da família *Flaviviridae*. Sabe-se que é um vírus envolto, de um diâmetro de 40 a 60 nm, e simetria hexagonal, com ácido ribonucléico (RNA) de simples cadeia como
20 material genético (Kümmerer et al. (2000) The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 77:117-128; Moennig et al. (2003) Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet. Journal* 165:11-20.)

A PPC é uma doença altamente contagiosa, em sua forma
25 aguda se apresenta com febre, degeneração dos vasos capilares, necrose dos órgãos internos e morte. Os primeiros signos clínicos aparecem depois de um período de incubação de 2 a 6 dias, produzindo-se inicialmente febre, redução dos movimentos e diminuição do apetite, que vão se agravando nos dias seguintes e a temperatura pode atingir os 42°C. Desenvolve-se, além disso,

uma leucopenia com valores da série branca menores de 8000/mm³ de sangue. Os porcos desenvolvem também conjuntivites, constipação seguida por diarreias, vômitos, descoordenação de movimentos, convulsões e paresias musculares na fase terminal. Evidencia-se uma coloração vermelha da pele estendida em todo o abdômen, focinho, orelhas, e parte interna das patas. Na maioria dos casos fatais a histopatologia do cérebro mostra uma encefalite não supurativa com abundante vascularização. (Moennig et al. (2002) Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new Knowledge. *Vet Journal* 161:1-10).

O VPPC se comporta como um imunossupressor durante a infecção (Susa et al. (1992) Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol.* 66:1171-1175) e começa-se a detectar os anticorpos neutralizantes nas semanas 2 e 3, depois da infecção (Laevens et al. (1998) An experimental infection with a classical swine fever virus in weaner pigs. II. The use of serological data to estimate the day of virus introduction in natural outbreaks. *Vet Q.* 20: 46-49). O estado terminal da infecção está associado com uma marcada diminuição de linfócitos B no sistema circulatório, assim como em tecidos linfóides (Susa et al. (1992) Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol.* 66:1171-1175). A maioria dos porcos doentes morrem entre 10 e 20 dias posteriores à infecção, com uma mortalidade superior a 95%. As lesões pós morte características da PPC correspondem à diátese hemorrágica com petéquias na maioria dos sistemas de órgãos. Estas são mais constantes nos rins, bexiga urinária e gânglios linfáticos, embora também possam aparecer no baço, laringe, pele, mucosas e serosas (Mouwen et al. (1983) Atlas of Veterinary Pathology. Bunge, Utrecht, Países Baixos).

Outra forma clínica de apresentação da doença é a infecção transplacentária, na qual o vírus é capaz de atravessar a placenta das porcas

gestantes e infectar o feto. As consequências desta infecção podem ser abortos, crias mortas ao nascer, mumificações, malformações, nascimento de porcos débeis e afecções na diferenciação de órgãos. Das porcas reprodutoras, em dependência do tempo de gestação em que ocorre a infecção, podem
5 nascer crias imunotolerantes ao vírus, pois pode ocorrer uma infecção através da mãe (transmissão vertical). As crias permanecem infectadas e virêmicas até sua morte, o que gera um foco estável de disseminação do vírus na população (Moennig et al. (2003) Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet. Journal* 165:11-20). A
10 mortalidade associada à PPC constitui um problema econômico para os países afetados, influenciando na deterioração da situação econômica e social das nações em via de desenvolvimento. Por estas razões em países com uma alta densidade suína e uma elevada prevalência do vírus, faz-se imprescindível aplicar programas de controle baseados na vacinação. Em países
15 desenvolvidos cuja produção suína é majoritariamente subsidiada pelo estado, como Europa, Estados Unidos e Canadá, aplica-se o método de erradicação por sacrifício. No entanto, os custos são muito elevados e estes países são susceptíveis ainda a possíveis re-emergências.

A União Européia (UE) é considerada como uma zona de alto
20 risco de re-emergência da doença devido à alta densidade da população suína, à política de não vacinação e a sua proximidade geográfica com os países de Europa do Leste, onde a doença é enzoótica. Um dos problemas que se associaram à re-emergência da doença nesta região, é a presença de porcos selvagens com infecções endêmicas de PPC (Laddomada (2000) Incidence
25 and control of CSF in wild boar in Europe. *Vet. Microbiol*, 73:121-30). Estas re-emergências ocorreram apesar dos sólidos programas de controle que foram implementadas dentro da UE, que incluem o sacrifício sanitário de toda a população contagiada e a restrição do comércio de porcos de áreas afetadas a zonas livres da doença (vão Oirschot (2003) Vaccinology of classical swine

fever: from lab to field. *Vet. Microbiol*, 96:367-384). Urge, por tanto, a necessidade de desenvolver vacinas que induzam uma resposta imune rápida e segura que garanta a proteção ante a infecção e a transmissão viral.

Desenvolveram-se vacinas contra o VPPC baseadas em vírus completo: vacinas com vírus inativo com cristal violeta ou formalina (Biront et al. (1988) Classical swine fever and related infections. Liess B. M. Edit. Martinus Nijhoff Publishing, Boston: 181- 200), vacinas com vírus atenuados mediante passes em coelho como a cepa Sinlak (Baibikov et al. RU 2182495) e a cepa chinesa Lapinizada (Dahle et al. (1995) Assesment of safety and protective avaliei of a cell culture modified strain C vaccine of hog cholera/classical swine fever virus. *Berl- Munch. Tierarztl. Wsch.*, 108: 20 - 25), ou vacinas com vírus atenuados em cultivos celulares de coelho, porquinho-da-índia e porco (Kachiku et al. JP 73001484; Terpstra et al. (1990) Development and properties of a cell culture produced vaccine for hog cholera based on the Chinese strain. *Ditsh. tierarztl. Wsch.* 97: 77-79). Estes tipos de vacinas constituem um risco pela possibilidade de conter frações de vírus ativo que, inoculadas em animais susceptíveis, produziriam novos surtos de PPC. Além disso, são necessárias repetidas imunizações para conseguir a resposta imunológica protetora porque a inativação altera as propriedades imunogênicas do vírus.

No caso específico das vacinas vivas com virulência atenuada têm, potencialmente, o risco de que ocorra uma atenuação parcial ou de que ocorra uma reversão à virulência, em qualquer destes casos se produzirão partículas virais patogênicas que, inoculadas em animais susceptíveis, provocam a infecção, a doença clínica e a disseminação da doença nos rebanhos. Isto acarreta um risco maior para as porcas gestantes pois o vírus pode passar para os fetos, que são altamente susceptíveis e as crias infectadas disseminam a doença.

Existem vacinas baseadas em cepas de VPPC que

demonstraram estar atenuadas como são a cepa chinesa C, a cepa PAV 250, a cepa Thiverval e a cepa IFFA/A-49 (Bjorlund. H.JV. et al. (1998) Molecular characterization of the 3'noncoding of classical swine fever virus vaccine strains. *Virus Genes* 16: 307-312; Launais et al. (1978) Hog Cholera Virus: Active immunization of piglets with the Thiverval strain in the presence and absence of calostrual passive immunity. *Vet. Microbiology* 3: 31-43). Estas cepas somente são usadas em países onde a doença é enzoótica, porque têm como inconveniente não permitirem diferenciar os animais vacinados dos infectados com o vírus nativo. Os animais vacinados com estas cepas produzem respostas idênticas, nas provas sorológicas, que os animais enfermos. Os anticorpos específicos anti-VPVC que são gerados com as vacinas baseadas em vírus atenuados interferem com o diagnóstico de infecção da PPC. O diagnóstico é realizado mediante imunodeteccção do vírus infectivo nas amídalas e a cepa viral vacinal se multiplica precisamente nas amídalas. Por estas causas, as cepas atenuadas não são idôneas para serem utilizadas nos programas de erradicação. Outro exemplo é a vacinação com a cepa LK-VNIIWM e hiperimunização adicional com a cepa purificada Shi-Myng, formulada com adjuvante de Freund, em 40-45 lugares é impraticável em uma campanha de vacinação onde se devem vacinar centenas de animais diariamente (Balashova et al. RU2183972).

A imunização com estas vacinas, que contêm o vírus completo, interfere também com o diagnóstico diferencial entre infecções causadas pelo VPVC e as causadas por outros integrantes do gênero Pestivirus que podem infectar o porco, como são os vírus da diarreia viral bovina (em inglês "Bovine Virus Diarrhoea Vírus", abreviado BVDV) e o vírus da doença da fronteira (em inglês "Border Diseases Virus", abreviado BDV), (Dahle et al. (1991) Clinical Post mortem and virological findings after simultaneous inoculation of pigs with hog cholera and BVD virus. *J. Med. Vet.* 38: 764- 772).

Para evadir os inconvenientes das vacinas baseadas em vírus completos resulta idôneo utilizar vacinas totalmente inócuas, como as variantes baseadas em subunidades, ou em proteínas virais obtidas por via recombinante. Estas variantes devem proteger os rebanhos da reintrodução de cepas virulentas, e, além disso, permitir a diferenciação entre os animais vacinados e os infectados, por métodos sorológicos simples. Neste sentido desenvolveu-se vacinas baseadas em subunidades virais. As vacinas que contêm somente uma proteína do vírus, como a glicoproteína E2 do envoltório viral (Bouma et al. (2000) Duration of the onset of the herd immunity induced by the e2 subunit vaccine against classical swine fever virus. *Vaccine* 18:1374-1381), são seguras, pois seu emprego não implica risco algum de reversão à virulência e não interferem com o diagnóstico. Estas permitem diferenciar entre animais infectados e vacinados, pois os anticorpos que são gerados são reativos somente contra um segmento viral. Por isso, resultam idôneas para um programa de erradicação da PPC.

Desenvolveu-se vacinas recombinantes que expressam a proteína E2 em procariontes e vacinas baseadas em peptídeos sintéticos da referida proteína (Chen et al. WO 200232453). Nestes casos a proteína não é glicosilada, por isso afeta sua imunogenicidade e capacidade protetora. Outros candidatos vacinais utilizam vetores virais para a expressão do gene heterólogo da E2 em células eucariotas como são os vírus da pseudorabia suína (Peeters et al. (1997). Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. *J. Gene. Virol.* 78: 3311-3315), o vírus da varíola suína (Gibbs et al. US6217882) e o adenovírus suíno (Nagy et al. WO200183737). Nestes casos, os anticorpos gerados por infecções naturais contra vírus da mesma espécie que os vetores virais neutralizam a infecção com o vetor e portanto afetam a indução de resposta imune contra o VPPC. Além disso, os vetores baseados no vírus da pseudorabia suína e o da varíola suína não podem ser

aplicados nos países declarados livres destes vírus, por problemas regulatórios. Também foi usado o vírus *vaccinia* como vetor mas as regulações da Organização Mundial da Saúde impedem seu uso (Meyers et al. EP 1087014).

5 As vacinas baseadas em ácido desoxirribonucléico (DNA) nu para a expressão da proteína E2 nos miócitos e osteócitos têm o inconveniente de requererem altas concentrações de DNA para induzir a uma resposta, pois a transfecção com DNA nu é muito ineficiente. Este tipo de vacina está sujeita a fortes controles regulatórios que dificultam sua aplicação de forma expedita
10 (Audonnet et al. WO 200152888).

 O uso do sistema de expressão em células de inseto, mediado por Baculovirus, para a produção da E2 como vacina resultou uma alternativa viável (Van-Rijn et al. (1999). An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic teste both based on enveloped
15 glycoprotein E2 of classical swine fever virus. *Vaccine*, 17: 433-440; Kretzdom et al. US 20040028701). Neste sistema a proteína recombinante se expressa em sua forma glicosilada, o que incrementa sua imunogenicidade em relação às variantes aglicosiladas. Não se produzem anticorpos contra o baculovírus, pois este se inativa e não resulta patogênico para o porco. No
20 entanto, a resposta efetiva frente à infecção é induzida depois de três semanas pós-vacinação e não há uma proteção completa frente à infecção intrauterina.

 Portanto, um importante problema na prevenção da PPC é que não existem até a data vacinas por subunidades que, ao mesmo tempo em que permitam um diagnóstico diferencial entre os animais vacinados e os
25 infectados, sejam capazes de produzir uma proteção rápida depois da vacinação, e que eliminem a transmissão trasplacentária de gestantes para sua descendência.

Explicação da invenção

A presente invenção resolve o problema anteriormente

mencionado, proporcionando antígenos quiméricos de interesse vacinal que compreendem subunidades virais acopladas a moléculas estimuladoras do sistema imune, o que propicia o desenvolvimento de uma resposta rápida que protege os porcos da infecção pelo VPPC. Outra vantagem da solução proposta é que elimina a transmissão do vírus das porcas gestantes que contraem a PPC para suas crias, devido ao efeito imunopotenciador das moléculas que são encontradas fazendo parte dos antígenos quiméricos, junto aos antígenos virais.

Particularmente, a invenção se refere a antígenos quiméricos contra a PPC que têm como base a proteína E2 do envoltório do VPPC. Utiliza-se como imunogênio o segmento extracelular da glicoproteína E2, à que se encontra unida a uma proteína estimuladora do sistema imune (chamado no contexto desta invenção “adjuvante molecular”) para favorecer a estimulação de uma resposta imune celular rápida, assim como altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o VPPC.

Em uma realização particular da invenção, a proteína estimuladora do sistema imune é o interferón alfa ou o segmento extracelular da molécula CD154. Em uma realização preferida, o interferón alfa ou o segmento extracelular da molécula CD 154 podem provir de qualquer mamífero.

Os antígenos vacinais da presente invenção, baseados em proteínas quiméricas, garantem uma proteção nos porcos vacinados a partir da primeira semana posterior à vacinação, quando são enfrentados a uma ameaça com 10^5 DL50 (Dose de vírus que causa a morte do 50% dos animais infectados pelo VPPC). A referida proteção está mediada por uma forte resposta imune de tipo celular contra o VPPC, que se encontra diretamente relacionada com a combinação dos elementos que conformam o antígeno quimérico. Também se observa um encurtamento no tempo o que induz os anticorpos neutralizantes, os que aparecem a partir da segunda semana

posterior à vacinação. Isto contribui para incrementar a proteção contra o VPPC nos porcos vacinados. Os animais vacinados não apresentam evidências da doença clínica, nem se pôde isolar VPPC dos fluidos corporais em nenhum dos dias posteriores à confrontação com o referido vírus.

5 Os antígenos quiméricos E2-adjuvante molecular permitem deter a transmissão vertical do VPPC das mães para os fetos. Estas proteínas induzem uma proteção rápida em porcas gestantes, que impede o desenvolvimento da doença clínica e não permite a multiplicação viral, tanto nas mães quanto nos fetos, depois de uma ameaça com 10^5 DL50 do VPPC.

10 Em uma realização preferida, o antígeno vacinal quimérico se caracteriza por conter essencialmente a seqüência aminoacídica do segmento extracelular da glicoproteína E2 do VPPC, que aparece na Listagem de Seqüências como Identificação de Seqüência (Id. Sec.) No. 1; e o segmento extracelular de molécula CD154 de porco identificado na Listagem de
15 Seqüências como Id Sec. No. 2. O antígeno vacinal quimérico compreende essencialmente as referidas seqüências aminoacídicas, mas pode compreender o segmento extracelular da E2 de qualquer isolamento do VPPC.

Outro aspecto da presente invenção é que os antígenos vacinais quiméricos podem ser obtidos por via recombinante, sintética ou
20 mediante a conjugação química. Em uma realização particular da invenção, gerou-se uma variante baseada em uma proteína quimérica contendo a E2his (segmento extracelular da E2 fusionado a uma fila de seis histidinas) e um adjuvante molecular, como proteína de fusão. Para isso, adicionou-se no extremo C-terminal da E2his um peptídeo espaçador composto por quatro
25 unidades repetidas de Gly₄Ser (4G₄S) e uma molécula estimuladora do sistema imune. A incorporação do peptídeo 4G₄S tem a função de trazer um determinado grau de relaxamento à cadeia polipeptídica. Isto garante o correto dobramento tridimensional da estrutura protéica para obter as proteínas fusionadas com uma conformação tridimensional, similar à nativa.

Um dos antígenos vacinais objeto desta invenção possui fusionado em seu extremo C-terminal o domínio extracelular da molécula CD154 suína, como adjuvante molecular (E2his-CD154).

Até o presente momento, não se tinham explorado os sistemas de expressão em animais como biorreatores para a produção de candidatos vacinais recombinantes contra o VPPC. No entanto, a capacidade da glândula mamária para expressar proteínas recombinantes glicosiladas e com um correto dobramento de sua estrutura tridimensional, constitui um sistema de expressão adequado para produzir a glicoproteína E2 com uma elevada imunogenicidade e capacidade protetora. O sistema de expressão **transiente** na glândula mamária de ruminantes, mediado por vetores adenovirais, constitui uma ferramenta para obter altos níveis de expressão de proteínas recombinantes de forma rápida e simples (Toledo et al., WO 2004/034780). Este método resulta muito útil para a produção de E2 recombinante com o fim de aplicar programas de vacinação dirigidos à erradicação da PPC.

Em uma materialização da invenção, os antígenos vacinais objeto desta invenção são expressos nas células epiteliais mamárias de mamíferos geneticamente modificados, durante o processo de lactação e são secretados no leite. As moléculas quiméricas recombinantes são produzidas no leite de mamíferos transgênicos ou mediante a transformação direta do epitélio glandular mamário, de mamíferos não transgênicos, com o emprego de vetores adenovirais. Em outra materialização da invenção os antígenos vacinais quiméricos são produzidos em fermentos modificados geneticamente. Os referidos antígenos são obtidos no meio de cultivo dos fermentos transformados com os genes quiméricos e seqüências reguladoras que permitem a expressão e secreção das proteínas recombinantes por meio de cultivo.

A proteína E2 do VPPC nativa é disposta formando homodímeros no envoltório viral, estabilizados por pontes dissulfeto

catenarias. Isto determina que os anticorpos neutralizantes e protetores são gerados contra epítomos conformacionais presentes no homodímero. Os antígenos vacinais desenvolvidos durante a presente invenção são produzidos em sistemas de expressão que permitem o correto dobramento destas proteínas recombinantes. O desenho das construções genéticas garante que não se altere a conformação tridimensional das proteínas de fusão. Os antígenos vacinais recombinantes descritos são facilmente purificados mediante um simples passo cromatográfico de afinidade com íons metálicos.

O desenho das construções genéticas, a utilização de sistemas de expressão adequados e a relativa simplicidade do procedimento de purificação utilizado, fazem com que os antígenos vacinais contra o VPPC, descritos na presente invenção, conservem as propriedades antigênicas e imunogênicas similares à proteína E2 viral. A imunização com as moléculas quiméricas, produzidas em sistemas de expressão como *Pichia pastoris* ou a glândula mamária de cabra, conduz a uma resposta imune potente e rápida. O segmento extracelular da E2 forma homodímeros que contribuem os epítomos conformacionais para a geração de anticorpos neutralizantes e protetores. O segmento proveniente de CD154 atua como adjuvante molecular que estimula o sistema imune dos porcos vacinados, produzindo uma resposta imune celular que protege os animais do VPPC a partir da primeira semana posterior à vacinação. A combinação de ambas moléculas na proteína quimérica, que contém um peptídeo espaçador, garante o correto dobramento de cada molécula de forma independente. Os sistemas de expressão utilizados permitem que as proteínas recombinantes se expressem em sua forma glicosilada, o que favorece também a obtenção das moléculas com a estrutura tridimensional adequada.

Outro aspecto da presente invenção são as composições vacinais capazes de produzir uma resposta imune protetora contra o VPPC, que se caracterizam por compreender os antígenos quiméricos anteriormente

descritos e que contêm o segmento extracelular da E2 e um adjuvante molecular. As referidas composições vacinais podem ser administradas aos animais por rota sistêmica ou mucosal, com o objetivo de prevenir a PPC, e evitar assim as quantas perdas materiais e econômicas que ocorrem depois da
5 infecção da massa suína com o VPPC.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1. Análise mediante SDS-PAGE da expressão da E2his em células PK-15 transduzidas com o vetor adenoviral Ad-E2his-sec em condições redutoras. (A) SDS-PAGE, Raia 1: meio de cultivo de células
10 transdúcidas, Raia 2: meio de cultivo de células não tratadas, PPM: padrão de peso molecular. (B) imuno-identificação da E2his mediante “Western-blotting” utilizando um anticorpo monoclonal dirigido contra a fila de His, Raia 1: meio de cultivo de células transdúcidas, Raia 2: meio de cultivo de células não tratadas, Raia 3: controle positivo para a fila de histidina, PPM:
15 padrão de importância molecular. (C) imuno-identificação da E2his mediante “Western-blotting” utilizando um soro policlonal de porcos infectados com o VPPC, Raia 1: meio de cultivo de células não tratadas, Raia 2: meio de cultivo de células transdúcidas com o Ad-E2his, PPM: padrão de importância molecular.

Figura 2. Análise das condições de expressão da E2his e a E2his-CD154 em células PK-15 transdúcidas com os vetores adenovirais Ad-E2his-sec e Ad-E2hisCD154-sec. As proteínas presentes no meio de cultivo se separaram mediante SDS-PAGE em condições não redutoras. A imuno-identificação das moléculas de interesse foi realizada mediante “Western-
25 blotting” utilizando um anticorpo monoclonal contra a proteína E2 do VPPC (AcM-1G6). Raia 1: meio de cultivo de células transdúcidas com o vetor Ad-E2his-sec, Raia 2: meio de cultivo de células transdúcidas com o vetor Ad-E2hisCD154-sec, PPM: padrão de importância molecular.

Figura 3. Cinética de expressão da E2his no leite de cabras

transdúcidas com o vetor Ad-E2his-sec. As proteínas presentes nas amostras de soro de leite correspondentes a cada dia de ordenha são separadas mediante SDS-PAGE em condições não redutoras. A imuno-identificação da E2his foi realizada mediante “Western-blotting” com o AcM-1G6. Carril PK: controle positivo de E2his expressa no meio de cultivo de células PK-15 transdúcidas com o vetor Ad-E2his-sec, Raia C-: soro de leite proveniente de cabras não tratadas, Raias 1-8: soros de leite das cabras transduzida com o vetor adenoviral Ad-E2his-sec, correspondentes a cada um dos 8 dias de ordenha posteriores à infusão adenoviral.

Figura 4. Cinética de expressão da E2his-CD154 no leite de cabras transdúcidas com o vetor Ad-E2hisCD154-sec. As proteínas presentes nas mostras de soro de leite correspondentes a cada dia de ordenha são separadas mediante SDS-PAGE em condições não redutoras. A imuno-identificação da molécula de E2his-CD154 foi realizada mediante “Western-blotting” com o AcM-1G6. Raias 1-5: soros de leite das cabras transduzidas com o vetor adenoviral Ad- E2hisCD154-sec, correspondentes a cada um dos 5 dias de ordenha posteriores à infusão adenoviral, Raia C-: soro de leite proveniente de cabras não tratadas, Raia PK: controle positivo de E2his-CD154 expressa no meio de cultivo de células PK-15 transdúcidas com o vetor Ad-E2hisCD154-sec.

Figura 5. Análise da pureza e identidade da E2his separada em SDS-PAGE em condições não redutoras. A proteína foi expressa no leite de cabras transdúcidas com o vetor Ad-E2his-sec e a purificação foi realizada mediante cromatografia de afinidade com íons metálicos. (A) SDS-PAGE dos diferentes passos de purificação. (B) imuno-identificação mediante “Western-blotting” com o AcM- 1G6. Raia 1: controle positivo de E2his expresso no meio de cultivo de células PK-15 transdúcidas com o vetor Ad-E2his-sec, Raia 2: soro de leite proveniente de cabras não tratadas, Raia 3: soro de leite das cabras transduzidas com o vetor adenoviral Ad-E2his-sec tomado como

material inicial da cromatografia, Raia 4: material não unido à matriz, Raia 5: lavagem com 20 mM de imidazol, Raia 6: lavagem com 50 mM de imidazol, Raia 7: eluição a 200 mM de imidazol.

Figura 6. Comparação do reconhecimento antigênico de duas isoformas do antígeno vacinal E2his pelos anticorpos presentes no soro de porcos infectados com uma cepa virulenta do VPPC. A E2his purificada a partir do leite de cabras, transformadas com o vetor adenoviral Ad-E2his-sec, foi analisada mediante eletroforese e “Western-blotting” em condições redutoras (monômero) e condições não redutoras (homodímero). (A) SDS-PAGE. (B) “Western-blotting” utilizando um soro policlonal de porcos enfermos, Raia 1: E2his separada em condições não redutoras, Raia 2: E2his separada em condições redutoras.

Figura 7. Cinética de anticorpos neutralizantes obtidos em dois grupos de porcos vacinados com uma única dose do antígeno vacinal E2his, os títulos de anticorpos foram determinados mediante um ensaio de neutralização da peroxidase. O grupo A foi inoculado com uma dose de 30 µg/animal e o grupo B com uma dose de 50 µg/animal. Ambos grupos foram atacados com 10^5 DL50 três semanas depois da vacinação. Os resultados foram mostrados como a média geométrica do inverso dos títulos.

Figura 8. Ensaio de linfoproliferação de linfócitos de porco isolados no dia 5 posterior à vacinação com os antígenos E2-CD154 (Grupos D e E) e E2his (Grupo F). Os resultados foram expressos em índices de estimulação (IE), definido como a relação entre os valores de contagens por minuto (cpm) do cultivo estimulado e os valores de cpm do cultivo controle não tratado. A resposta linfoproliferativa que induziu um $IE \geq 2$ foi considerada como positiva. Avaliou-se a proliferação nos diferentes cultivos tratados com o VPPC, assim como a inibição da proliferação nos cultivos tratados com o VPPC e um AcM contra o domínio CD4 suíno.

Figura 9. Ensaio de atividade antiviral induzida pelos soros

dos porcos vacinados com os antígenos E2-CD154 (Grupos D e E) e E2his (Grupo F), em células PK-15. Os resultados foram expressos como a média geométrica do inverso do título.

Figura 10. Cinética de anticorpos neutralizantes obtidos em dois grupos de porcos vacinados com uma dose de 50 µg/animal com os antígenos E2-CD154 (Grupo H) e E2his (Grupo I), os títulos de anticorpos foram determinados mediante um ensaio de neutralização da peroxidase. Os resultados foram mostrados como a média geométrica do inverso dos títulos.

Exposição detalhada de modos de realização / Exemplos

Exemplo 1: Obtenção dos segmentos genéticos que codificam para os domínios extracelulares da E2 do VPPC e do CD154 suíno, e clonagem do plasmídeo pMOS- E2his-CD154.

O segmento do gene que codifica para a porção extracelular da E2, de 363 aminoácidos foi obtido mediante amplificação por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (TR-RCP), a partir do genoma viral do isolamento cubano “Margarida” do VPPC anotados na base de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia dos Estados Unidos (em inglês “National Center for Biotechnology Information”, abreviado NCBI), número de acesso AJ704817. No oligo 3’, incluiu-se a sequência codificante para uma fila de 6 histidinas, para permitir a fácil purificação do antígeno.

A sequência nucleotídica codificante para o domínio extracelular do CD154 suíno, de 210 aminoácidos foi obtida mediante síntese química tomando como padrão de sequência o gene do CD154 de porco “*sus scrofa*” anotados na base de dados do NCBI (AB040443). No extremo 5’ do fragmento codificante para a referida molécula foi incluído em uma região que codifica para um peptídeo composto por quatro unidades repetidas de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (4G₄S). Mediante uma subclonagem no plasmídeo pMOS-BLUE (Amersham, EEUU) inseriu-se a sequência sintetizada (4G₄S-CD154) imediatamente depois da fila de 6 histidinas na sequência codificante

da E2his. Obteve-se o plasmídeo pMOS- E2his-CD154.

Exemplo 2: Construção das variantes de E2his e E2his-CD154 secretáveis para células de mamíferos.

A seqüência correspondente à E2his obtida por TR-RCP foi inserida nos lugares *Bgl* II - *Eco*R V do plasmídeo pAEC-SPT (Herrera et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:548-551). Obteve-se o vetor resultante PE2his-sec que contém a seqüência codificante para a E2his precedida pelo sinal de secreção do ativador tissular do plasminogênio humano (em inglês, “human tissue Plasminogen Activator”, abreviado htPA) e sob o controle transcripcional do promotor imediato rápido do citomegalovírus humano (PCMV).

A seqüência correspondente à E2his-CD154, subclonada no vetor pMOS-BLUE, foi inserida nos lugares sensíveis a corte com as endonucleases de restrição *Bgl* W-*Sal* I do plasmídeo pAEC-SPT. Obteve-se o vetor resultante PE2hisCD154- sec que contém a seqüência codificante para a E2his-CD154 precedida pelo sinal de secreção do htPA e sob o controle transcripcional do promotor PCMV.

Exemplo 3: Construção dos vetores adenovirais recombinantes, contendo as seqüências codificantes para a E2his e a E2his-CD154 secretáveis.

Os vetores adenovirais com replicação defectiva (Ad- Δ E1, Δ E3) foram construídos baseados no sistema AdEasy (AdEasy™-Vector System, Quantum Biotechnologies, EEUU). Como vetor de transferência empregou-se o plasmídeo pAdTrack-CMV.

A seqüência codificante para a E2his, com o sinal de secreção do htPA (E2his- sec), foi extraída do plasmídeo PE2his-sec mediante digestão enzimática com as endonucleases de restrição *Nco* I-*Eco*R V e se inseriu no lugar sensível a corte com a endonuclease de restrição *Eco*R V presente no vetor de transferência adenoviral pAdTrack. Obteve-se o plasmídeo pAdT-E2his-sec onde a variante secretável da E2his se encontra sob o controle

transcricional do promotor PCMV.

A sequência codificante para a E2his-CD154 secretável foi extraída do plasmídeo PE2his-CD154-sec mediante digestão enzimática com as endonucleases de restrição *Neo* I e *Sal* I e se inseriu nos lugares sensíveis a corte com as endonucleases de restrição *Kpn* I -*Xho* I do vetor pAdTrack. Obteve-se o plasmídeo recombinante pAdT-E2hlsCD154-sec onde a variante secretável da E2his-CD154 se encontra sob o controle transcricional do promotor PCMV.

Para gerar os genomas adenovirais recombinantes linealizou-se os vetores de transferência adenoviral pAdT-E2his-sec e pAdT-E2hisCD154-sec mediante digestão enzimática com a endonuclease de restrição *Pme* I. Cada um dos vetores lineares em separado foi coeletroporado com o vetor pAdEASY-1 na cepa de *Escherichia coli* BJ5183. Por recombinação de homólogos obtive-se os genomas recombinantes dos dois vetores adenovirais recombinantes pAd-E2his-sec e o pAd-E2hisCD154-sec contendo um a sequência codificante para a E2his-sec e o outro a sequência codificante para a molécula de E2his-CD154-sec, em ambos casos sob o controle do PCMV. Os genomas adenovirais recombinantes foram então digeridos com a endonuclease *Pac* I e transfectados em separado na linha celular complementar HEK-293A onde foram obtidos os vírions infectivos. Geraram-se 2 vetores virais: Ad-E2his-sec e Ad-E2hisCD154-sec. Os vetores foram amplificados de forma independente na linha celular HEK-293A, até obter títulos de 1×10^{12} unidades formadoras de colônias (UFC)/ml. Os vírions amplificados foram purificados mediante uma dupla centrifugação em gradiente de CsCl, foram dialisados contra buffer de armazenamento (10 mM Tris pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 4% sacarose) e se conservaram a -70°C.

A capacidade dos vetores adenovirais Ad-E2his-sec e Ad-E2hisCD154-sec para transformar células de mamíferos e mediar a expressão e secreção das moléculas de E2his e E2his-CD154 por meio de cultivo foi

corroborada mediante a infecção da linha celular suína PK15 com os vetores adenovirais. As mostras de proteínas presentes no meio de cultivo das células infectadas foram separadas mediante eletroforeses em gel desnaturizante de poliacrilamida (em inglês “Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”, abreviado SDS-PAGE) em condições não redutoras e foram analisadas mediante “Western-blotting” com um anticorpo monoclonal contra a E2 do VPPC (α E2-1G6) (Fig. 1 e 2). Ao analisar os tamanhos moleculares da E2his e E2his-CD154 comprovou-se que se correspondiam com isoformas diméricas e triméricas das proteínas. Na mostra da Raia 1, Figura 2, observam-se as duas bandas correspondentes ao dímero (180 kDa) e a isoforma trimérica da E2-CD154, de aproximadamente 270 kDa.

Exemplo 4: Transdução *in situ* do epitélio glandular mamário de cabras para a produção das variantes de E2his e E2his-CD154 no leite.

Para a transformação do epitélio mamário com os **cassetes** de expressão das moléculas de E2his e E2his-CD154 se utilizaram os vetores adenovirais recombinantes Ad-E2his-sec e Ad-E2hisCD154-sec. Em ambos casos os vetores foram inoculados na glândula mamária de cabras lactantes mediante a infusão direta da teta através do canal do mamilo. Os vetores adenovirais infectaram as células epiteliais secretoras que conformam o epitélio mamário o que produziu a expressão das proteínas recombinantes.

Empregaram-se cabras no segundo mês da lactância natural, com uma produção média de 1 litro de leite por dia. Para efetuar a transdução adenoviral os animais foram inicialmente ordenhados até eliminar o leite das tetas, posteriormente infundiu-se solução salina isosmótica às **cisternas** mediante infusão direta através do canal do mamilo, realizando massagens suaves da teta para garantir a lavagem total da glândula mamária. Eliminou-se a solução salina mediante uma ordenha exaustiva da teta e repetiu-se o procedimento. Posteriormente infundiu-se o inóculo adenoviral a um título de 10^9 UFC/ML em solução salina, contendo 36 mM de EGTA. O volume

infundido em cada teta foi variável, e garantiu-se o enchimento total das **cisternas**, em dependência da capacidade da teta. Depois da infusão, aplicou-se massagens à teta para facilitar que o inóculo adenoviral fosse distribuído de modo homogênea na glândula e chegasse até as células epiteliais secretoras dos alvéolos. A solução infundida foi removida 24 h depois mediante ordenha. As glândulas mamárias foram lavadas novamente mediante a infusão de solução salina com o objetivo de eliminar os vetores adenovirais remanescentes na cisterna e os condutos mamários.

Decorridas 24 h, começou-se a coletar o leite dos animais transformados mediante ordenha manual. Realizaram-se duas ordenhas diárias a intervalos de 12 h. O leite coletado foi armazenado a -70°C. Tomaram-se mostras de cada ordenha para analisar a cinética de expressão das proteínas recombinantes E2his e E2his-CD154 ao leite (Fig. 3 e 4). Comprovou-se que os tamanhos moleculares das proteínas recombinantes correspondiam-se com isoformas diméricas e triméricas. Obteve-se uma média de expressão de 1.03 g/L da E2his nos dias 2-8 posteriores à inoculação, com um rendimento médio de 5.22 g por cada animal. Para a molécula recombinante E2his-CD154, obteve-se uma média de expressão de 0.73 g/L, com um rendimento médio de 3.04 g por animal.

Exemplo 5: Purificação dos antígenos E2his e E2his-CD154 a partir do leite de cabras.

As amostras de leite de cada um dos dias de ordenha que continham os antígenos vacinais recombinantes E2his e E2his-CD154, respectivamente foram misturados e centrifugados a 15000 g, durante 30 min a 4°C. Posteriormente, separou-se a fase solúvel (soro) e eliminou-se a fase sólida que continha majoritariamente gorduras. Ao soro foi adicionado uma solução tampão de separação (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂) em uma proporção soro-solução tampão de 1:4. A mistura foi incubada em gelo durante 30 min e posteriormente foi centrifugada a 15 000 g durante 30 min, a

4°C.

Os sobrenadantes e os precipitados foram analisados mediante SDS-PAGE e “Western- blotting”, e se pôde determinar que uma porcentagem majoritária das referidas proteínas recombinantes encontrava-se na fase solúvel e que o precipitado continha majoritariamente caseínas. As frações de soro que continham os antígenos recombinantes de interesse (E2his e E2his-CD154) clarificaram-se mediante filtragem seriada com membranas de 0.8 µM e 0.4 µM (Milliporo) e foram aplicados em uma coluna de purificação XK16 (Amersham, EEUU) empacotada com uma matriz de agarosa Ni-NTA (Qiagen, EEUU). Realizou-se dois passos de lavagem com tampão fosfato 100 mM e imidazol 20 mM (primeira lavagem) e fosfato 100 mM e imidazol 50 mM (segunda lavagem). Na continuação, a proteína de interesse foi extraída com tampão fosfato 100 mM, 200 mM imidazol, pH 7.2. O pico correspondente à fração pura foi dialisado contra tampão fosfato (Fig. 5).

O procedimento para a purificação da E2his e a E2his-CD154 a partir do leite de cabra foi igual para ambos antígenos vacinais. As duas proteínas foram obtidas com um nível de pureza superior a 90%. A E2his foi obtida com um recobrado de 70% e no caso da E2his-CD154 obteve-se um recobrado de 58%. As proteínas purificadas foram analisadas mediante SDS-PAGE e “Western-blotting” para determinar a formação de agregados protéicos. Pôde-se determinar que a isoforma dimérica (homodímero) da E2his produzida no leite é reconhecida mais eficientemente pelo soro policlonal de porcos infectados com o VPPC, o que indica que esta conformação específica da molécula favorece um maior grau de antigenicidade da mesma (Fig. 6).

Exemplo 6: Construção dos vetores de expressão no fermento metilotrófica *Pichia pastoris*.

O vetor de expressão em *P. pastoris* pPS10 foi digerido com a

endonuclease de restrição *Nae* I para incorporar as seqüências codificantes de interesse para o extremo 3' do sinal de secreção da sacarose invertase (Suc2) de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 A seqüência codificante para a E2his foi inserida no lugar sensível a corte com a endonuclease de restrição *Nae* I do plasmídeo pPS10 a partir da amplificação por RCP. A seqüência codificante para a molécula E2his-CD154 foi extraída do plasmídeo pMOS-E2his-CD154, mediante digestão enzimática com as endonucleases de restrição *Sma* I-*EcoR* V e se inseriu no lugar de restrição *Nae* I do plasmídeo pPS10. Obtiveram-se os
10 plasmídeos pPS-E2his e pPS-E2his-CD154 onde as seqüências codificantes para ambas moléculas se encontram acopladas ao sinal de secreção de Suc2 de *S. cerevisiae* e sob o controle do promotor AOX1 da enzima álcool oxidase do fermento *P. pastoris*.

A partir dos plasmídeos pPS-E2his e pPS-E2his-CD154 se
15 geraram clones da cepa MP36 de *P. pastoris* estavelmente transformados. Os plasmídeos recombinantes foram linearizados com a endonuclease de restrição *Pvu* II e foram eletroporados na cepa MP36 eletrocompetente. Esta cepa é um mutante auxotrófico para a histidina, os transformantes adquirem um fenótipo His⁺, que permite sua seleção.

20 Os transformantes positivos, identificados mediante Dot Blot, foram analisados, além disso, mediante a técnica de Southern Blot para determinar o padrão de integração, que pode ser por substituição do gene *AOX1* de *P. pastoris*, gerando um fenótipo Mut^S-His⁺ (baixa utilização do metanol). A substituição genética de *AOX1* ocorre por entrecruzamentos da
25 região do promotor de *AOX1* e a região 3'*AOX1* presentes no genoma do fermento e no plasmídeo, como resultado elimina-se a região codificadora do gene *AOX1*. As cepas recombinantes com fenótipo Mut^S baseiam a produção do álcool oxidase (AOX) no gene *AOX2* e sua taxa de crescimento em metanol é baixa. Também se pode obter um padrão de integração por

substituição, fenótipo Mut⁺-His⁺.

As seqüências codificantes para as variantes de E2his e E2his-CD154 estão sob a regulação do promotor AOX1, o qual é induzível por metanol. *P. pastoris* secreta somente baixos níveis de proteínas próprias e seu meio de cultivo não necessita de suplementos protéicos, portanto, pode-se esperar que uma proteína heteróloga que se secrete, constitua a maioria do total de proteínas no meio (até mais de 80%). A produção das proteínas recombinantes foi realizada em fermentadores de 5 L. A indução da expressão foi realizada mediante a adição de metanol ao cultivo durante 5 dias. As proteínas recombinantes foram obtidas a partir do meio de cultivo da fermentação. A E2his foi secretada no meio de cultivo do fermento transformada em níveis de 0.143 mg/ML. No caso da E2his-CD154 obteve-se níveis de expressão de 0.122 mg/ML.

Exemplo 7: Purificação dos antígenos E2his e E2his-CD154 a partir do meio de cultivo de *Pichia pastoris*.

O produto da fermentação foi centrifugado a 10 000 g durante 30 min, a 4°C para separar a biomassa da fase líquida. O meio de cultivo foi filtrado em membranas de 0.8 µm e 0.2 µm (Milliporo) e aplicado em uma coluna de purificação XK16 (Amersham, EEUU) empacotada com uma matriz de agarosa Ni-NTA (Qiagen, EE. UU). Realizou-se um movimento de lavagem com tampão fosfato 100 mM e 30 mM imidazol, pH 7.2, e em continuação a proteína de interesse foi extraída com tampão fosfato 100 mM, 200 mM imidazol, pH 7.2. A fração pura foi dialisada contra 10 mM de tampão fosfato. O procedimento para a purificação da E2his e a E2his-CD154 a partir do sobrenadante da fermentação do fermento *P. pastoris*, geneticamente transformado, foi igual para ambos antígenos vacinais. As duas proteínas foram obtidas com um nível de pureza superior a 95%. A E2his foi obtida com um recobrado de 83% e no caso da E2his-CD154 obteve-se um recobrado de 78%.

Exemplo 8: Ensaio de proteção de porcos vacinados com a variante de E2his secretável.

Selecionaram-se 24 porcos sãos, de 20 kg de peso, sorologicamente negativos ao VPPC, procedentes de uma unidade sem antecedentes da doença e sem vacinar nos 3 anos precedentes. Os porcos foram distribuídos em grupos de 8 animais cada um, em três quartos experimentais (A, B, C) com água e ração *ad limitum*.

Aos animais do grupo A e grupo B foram aplicados uma composição vacinal que continha o antígeno E2his, em uma dose única de 30 µg (grupo A) e 50 µg (grupo B) por animal, e o grupo C foi imunizado com placebo. O antígeno vacinal foi formulado em uma emulsão de adjuvante oleosa e foi inoculada mediante injeção de 2 mL por via intramuscular (IM) na altura do pescoço. O placebo constituído por adjuvante e solução salina fosfatada em uma proporção 1:1 (V/V), foi inoculado de forma similar. Os animais foram confrontados com o VPPC mediante inoculação por via IM com 10^5 DL50 do isolamento “Margarita”. A confrontação foi realizada na terceira semana posterior à imunização.

A inoculação com a composição vacinal baseada na E2his não provocou reações adversas, já que não se observou nenhuma alteração dos parâmetros clínicos normais. A partir da segunda semana de imunização, obteve-se títulos de anticorpos neutralizantes, nos grupos vacinados, superiores a 1/50 (considerados protetores), e depois da terceira semana, antes do ataque, elevaram-se os títulos até 1/1 600 - 1/6 400 (Fig. 7). Não se observou diferenças na resposta entre ambos grupos vacinados (A e B). Os animais vacinados não desenvolveram febre, nem sintomas clínicos da doença, nem se obtiveram isolamentos virais a partir dos linfócitos nos dias posteriores ao ataque. O grupo placebo desenvolveu todos os sintomas clínicos da doença incluindo febre, hemorragias e encefalite não purulenta, obteve-se isolamentos virais a partir do quarto dias pós-ataque em todos os

animais placebo e até o dia do sacrifício. Demonstrou-se que a composição de E2his em dose de 30 µg administrado a porcos desmamados com o esquema empregado protege dos sintomas clínicos e da infecção pelo VPPC.

Exemplo 9: Ensaio de proteção vertical em porcas gestantes vacinadas com o antígeno E2his secretável.

De uma unidade de cria sem antecedentes da doença, nem vacinação contra a PPC nos 3 anos precedentes, selecionaram-se 10 porcas reprodutoras, sorologicamente negativas à PPC. No momento posterior ao desmame lhes foi realizada a indução do cuidado por tratamento hormonal e três dias mais tarde foram inseminadas. A um grupo de 5 porcas foi aplicado a composição vacinal mencionada no Exemplo 7 (Grupo B), mediante injeção de 2 mL (via IM) na altura do pescoço. A imunização foi realizada de forma simultânea à inseminação. O grupo de cinco porcas restantes foi tomado como grupo controle negativo e lhes foi aplicado um placebo constituído por 2 mL de adjuvante e solução salina em uma proporção 1:1 (V/V). No grupo previamente imunizado foi realizado uma segunda imunização 21 dias depois. As porcas foram estudadas mediante a medição da tríade clínica (temperatura, pulso cardíaco e frequência respiratória) e foram realizadas extrações de sangue semanais para hematologia e detecção de anticorpos neutralizantes contra o VPPC. Aos 2 meses de gestação as porcas foram trasladadas para a unidade experimental, onde foram confrontadas com o VPPC1 mediante inoculação por via IM com 10^5 DL50 do isolamento “Margarita”. A presença do VPPC em linfócitos foi analisada mediante isolamento viral das mostras de sangue aos 3 e 5 dias após confrontação. Duas semanas depois as porcas foram sacrificadas e os fetos extraídos para análises virológica, morfológica e anatomo- patológica. Durante o curso do ensaio as porcas tiveram acesso à água e ração *ad libitum*.

A vacina resultou inócua para as porcas gestantes, nos dias posteriores às imunizações não apresentaram abortos, nem alterações clínicas

e desenvolveram títulos de anticorpos neutralizantes específicos contra o VPPC de 1:50 a 1:51 200. Depois da confrontação nas porcas do grupo vacinado não se observou febre, nem outros sinais clínicos próprios da PPC, também não se detectou leucopenia nem trombocitose. A análise dos fetos mediante morfometria e anatomia patológica permitiu determinar que os fetos procedentes das mães vacinadas tinham um tamanho normal e não apresentavam lesões histopatológicas. Não se isolou o VPPC dos leucócitos, a partir das mostras de sangue das mães nas extrações posteriores à confrontação. Tampouco foi isolado no sangue ou nos órgãos dos fetos sacrificados.

As porcas do grupo placebo apresentaram febre e leucopenia depois da confrontação, uma das porcas abortou aos 8 dias posteriores à confrontação, por isso sacrificada aos 9 dias posteriores à confrontação. Nestes fetos e nos das outras quatro porcas do grupo placebo, que foram sacrificadas às 2 semanas posteriores à confrontação, observou-se um menor tamanho, mumificação, esplenomegalia, numerosas petéquias em rins e bexiga, e focos de encefalite não purulenta. Isolou-se o VPPC de todos os órgãos e sangue dos fetos deste grupo.

A vacinação das porcas com a composição vacinal baseada em E2his impediu a transmissão do VPPC das mães para sua descendência.

Exemplo 10: Ensaio de proteção rápida em porcos vacinados com a composição vacinal baseada em E2his-CD154 secretável.

Tomou-se quatro grupos de porcos (em condições idênticas ao Exemplo 8) de 6 animais cada um e a cada animal foi aplicado a composição vacinal com as seguintes quantidades de antígeno: 50 µg de E2his-CD154 (Grupo D), 80 µg de E2his- CD154 (Grupo E), 50 µg de E2his (Grupo F). Tomou-se como placebo o Grupo G. Os antígenos foram formulados em uma emulsão de adjuvante oleoso e foram inoculados mediante injeção de 2 mL por via IM. O grupo tomado como placebo foi inoculado somente com

adjuvante. Realizou-se somente uma imunização. Os animais foram confrontados com o VPPC1 mediante inoculação por via IM com 10^5 DL50 do isolamento “Margarita”. A confrontação foi realizada no dia 8 posterior à imunização. Realizou-se uma análise diária de sinais clínicos durante todo o período do experimento e uma extração de sangue semanal para análise hematológica e de anticorpos neutralizantes. Além disso, tomaram-se amostras de sangue nos dias 1, 3, 5 e 7 posteriores à vacinação para avaliar a resposta imunológica celular mediante um ensaio de linfoproliferação e um ensaio de atividade antiviral em soro. Depois da vacinação foram registrados sinais clínicos normais e não se observou respostas indesejadas no lugar de inoculação. Nos animais vacinados com o antígeno E2-CD154 (Grupos D e E) detectou-se um aumento da resposta dos linfócitos tanto ao mitogênio fito-hemaglutinina quanto ao VPPC durante o ensaio de linfoproliferação. Esta resposta foi bloqueada com um anticorpo monoclonal dirigido contra o domínio CD4, o que indica que a resposta imune esteve mediada por linfócitos T (resposta tipo T cooperadora). As amostras de linfócitos de animais dos grupos F e G (placebo) não responderam à estimulação nem com o mitogênio nem ao VPPC durante o ensaio (Fig. 8).

Observou-se títulos elevados de interferón alfa nas mostras dos dias 3, 5 e 7 posteriores à vacinação com o antígeno E2-CD154 nos grupos D e E, no entanto nos animais vacinados com o antígeno E2his (Grupo F) e o grupo placebo (G) não se detectou incrementos nos níveis de interferón alfa em nenhum dos dias amostrados. Realizou-se um ensaio de atividade antiviral em células de rim de porco PK-15 contra o vírus da gastroenterite transmissível suína. Nos grupos D e E foram obtidos títulos de atividade antiviral de até 1/512, no entanto não se detectou proteção antiviral nas mostras dos animais imunizados com a E2his, nem no grupo placebo (Fig. 9).

Com estes experimentos, determinou-se que o antígeno E2 acoplado à molécula CD154 potencia uma resposta imune celular contra o

VPPC que está relacionada com a atividade imunoestimuladora da molécula CD154.

Exemplo 11: Comparação da cinética de anticorpos neutralizantes em porcos vacinados com doses únicas das composições vacinais que contêm E2his e E2his-CD154.

Tomaram-se três grupos de porcos de aproximadamente 20 kg de peso, sorologicamente negativos ao vírus PPC procedentes de uma unidade sem antecedentes da doença e sem vacinar nos 3 anos precedentes. Os porcos foram distribuídos em grupos de 6 animais, cada um com água e ração *ad limitum*.

A cada animal foi aplicado 50 µg de E2his-CD154 (Grupo H), 50 µg de E2his (Grupo I) e foi tomado como placebo o Grupo J. Os antígenos foram formulados em uma emulsão de adjuvante oleoso e inoculados mediante injeção de 2 mL por via IM. O grupo tomado como placebo foi inoculado somente com adjuvante. Realizou-se somente uma imunização e foram medidos os níveis de anticorpos neutralizantes desenvolvidos nos animais nas 5 semanas posteriores à imunização mediante um ensaio de neutralização da peroxidase.

Nos dois grupos de porcos vacinados com as formulações contendo os antígenos E2-CD154 e E2his (H e I) detectaram-se anticorpos neutralizantes a partir da segunda semana de imunização, com títulos superiores a 1/50 (considerados protetores). Nos animais do grupo placebo não foram detectados anticorpos em nenhuma das amostras tomadas durante o ensaio. Na segunda semana posterior à imunização nos animais do Grupo H (antígeno E2-CD154) detectaram-se títulos de anticorpos neutralizantes muito superiores aos do grupo imunizado com o antígeno E2his, o que sugere uma estimulação superior da resposta humoral nos animais do Grupo H (Fig. 10).

Com este ensaio, conclui-se que a composição vacinal que contém o antígeno de E2his-CD154 em uma dose de 50 µg é inócua,

imunogênica e induz a uma resposta humoral mais rápida nos porcos vacinados quando comparada com a composição vacinal que contém o antígeno E2his.

Exemplo 12: Ensaio de proteção vertical em porcas gestantes vacinadas com a composição vacinal que contém E2his-CD154 secretável.

Selecionaram-se 10 porcas reprodutoras com idênticas condições de saúde e procedência das porcas utilizadas no Exemplo 8. No momento posterior ao desmame lhes foi induzido cuidado mediante tratamento hormonal. Três dias depois, as porcas foram inseminadas e simultaneamente, selecionou-se um grupo de 5 que foi vacinado com a composição vacinal de E2his-CD154 a 80 µg/animal (composição utilizada no Exemplo 10 para o grupo E) mediante injeção de 2 mL, por via IM, na altura do pescoço. O grupo de cinco porcas restantes foi tomado como grupo controle negativo, já que lhes foi aplicado como placebo o adjuvante oleoso. As porcas foram monitoradas mediante a tomada da tríade clínica e extrações de sangue semanais para hematologia e detecção de anticorpos neutralizantes contra o VPPC. Aos 2 meses de gestação as porcas foram trasladadas para a unidade experimental, onde foram confrontadas com o VPPC selvagem mediante inoculação por via IM com 10^5 DL50 do isolamento “Margarita”. A viremia foi analisada por extração de sangue nos dias 3 e 5 posteriores à confrontação viral. Duas semanas depois, as porcas foram sacrificadas e os fetos extraídos para análises virológica, morfológica e anatomo-patológica. Durante o experimento as porcas tiveram acesso à água e ração *ad libitum*.

A composição vacinal baseada em E2his-CD154, em uma só imunização, resultou inócua para as porcas gestantes, pois nos dias posteriores não foi apresentado casos de aborto, nem outro sinal clínico. Os animais vacinados desenvolveram títulos de anticorpos neutralizantes específicos contra VPPC de 1:50 a 1:16 000.

Depois da confrontação não foi observada febre, leucopenia

nem trombocitose no grupo das porcas vacinadas. Não tiveram abortos e as análises de morfometria e anatomia patológica permitiram determinar que os fetos procedentes das mães vacinadas tinham um tamanho normal e não apresentavam lesões histopatológicas. Nas amostras de sangue tomadas
5 depois da confrontação, não foi isolado vírus dos leucócitos das mães vacinadas, nem no sangue, nem os órgãos dos fetos sacrificados.

As porcas do grupo placebo apresentaram febre, leucopenia e falta de apetite depois da confrontação. Os fetos das porcas deste grupo tinham um tamanho reduzido e apresentavam lesões histopatológicas
10 compatíveis com a PPC, como esplenomegalia, petéquias em rins e bexiga, focos de necrose em intestino, numerosas hemorragias nos órgãos internos e focos de encefalite não purulenta. Isolou-se o VPPC de todos os órgãos e sangue dos fetos deste grupo. A vacinação das porcas prenhes com a composição vacinal E2his-CD154 no esquema avaliado, impediu a
15 transmissão do VPPC das mães para sua descendência.

REIVINDICAÇÕES

1. Antígeno vacinal quimérico contra o vírus da peste suína clássica (VPPC) caracterizado pelo fato de que contém o segmento extracelular da glicoproteína E2 do envoltório viral do VPPC ligado à 6 histidinas ligadas a um peptídeo espaçador composto por quatro unidades repetidas de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser ligado ao domínio extracelular do CD154.

2. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o segmento extracelular do CD154 pode provir de qualquer mamífero.

3. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que contém essencialmente a sequência de aminoácidos do segmento extracelular da glicoproteína E2 do VPPC (SEQ ID. No. 1) e do segmento extracelular do CD154 suíno (SEQ ID. No. 2).

4. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é obtido por via recombinante, sintética ou através de conjugação química.

5. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é obtido a partir do leite de mamíferos geneticamente modificados.

6. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que é obtido a partir do leite de mamíferos não transgênicos, por meio da transformação genética direta da glândula mamária.

7. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a transformação genética direta da glândula mamária se realiza mediante o emprego de vetores adenovirais.

8. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que é obtido a partir do leite de mamíferos transgênicos.

9. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que é obtido a partir de leveduras geneticamente modificadas.

5 10. Composição de vacina capaz de produzir uma resposta imune protetora contra o vírus da peste suína clássica (VPPC), caracterizada pelo fato de que contém os antígenos quiméricos como definidos nas reivindicações 1-9.

10 11. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que pode ser administrada aos animais por via intramuscular.

Figura 1

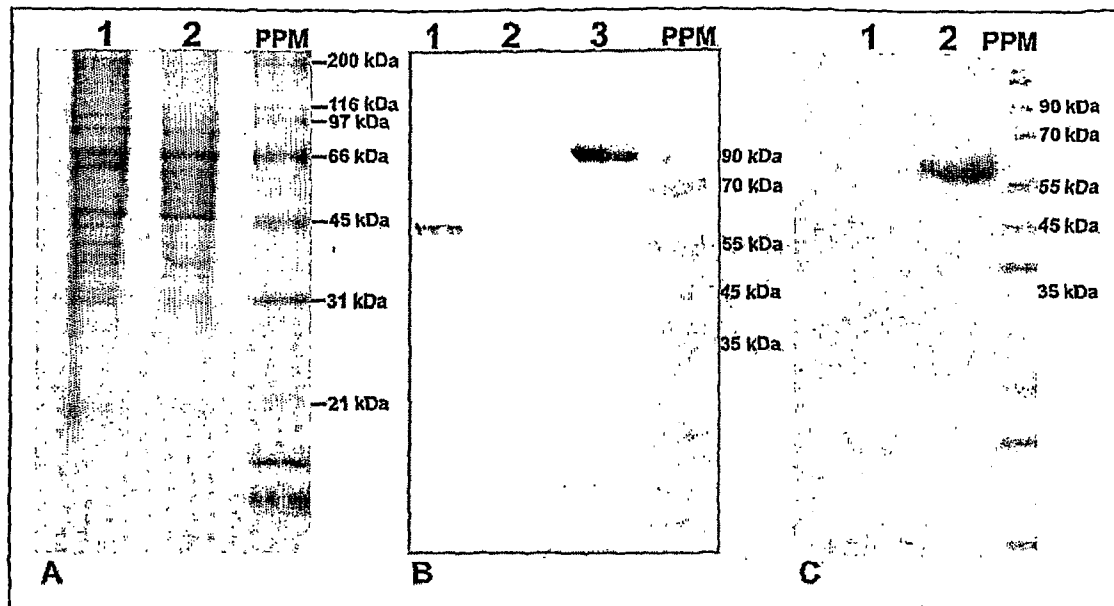


Figura 2

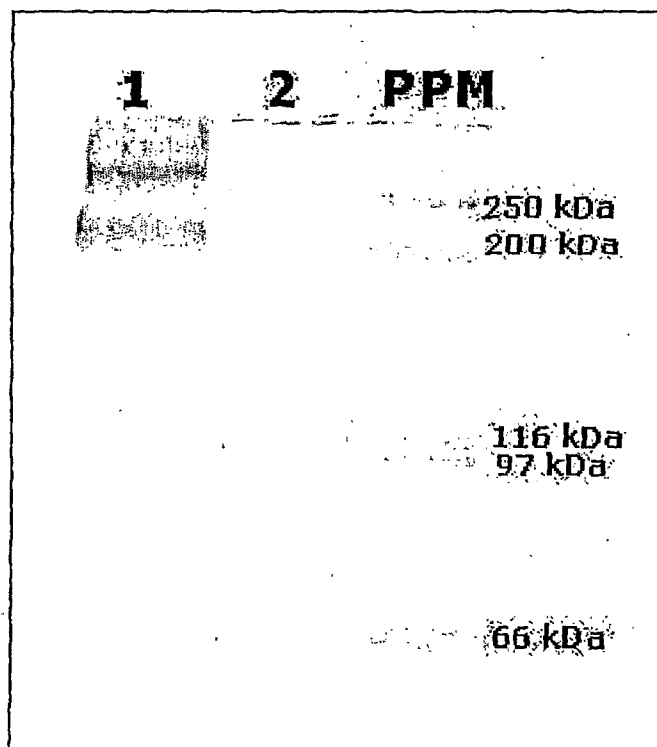


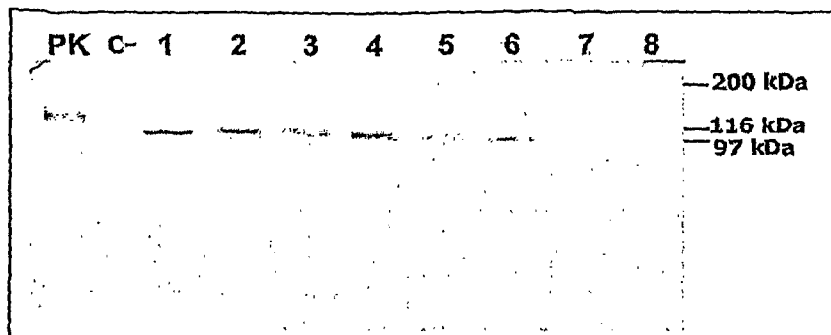
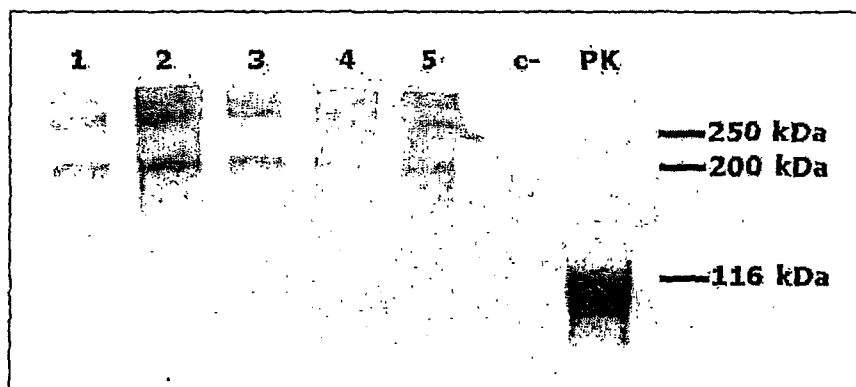
Figura 3**Figura 4**

Figura 5

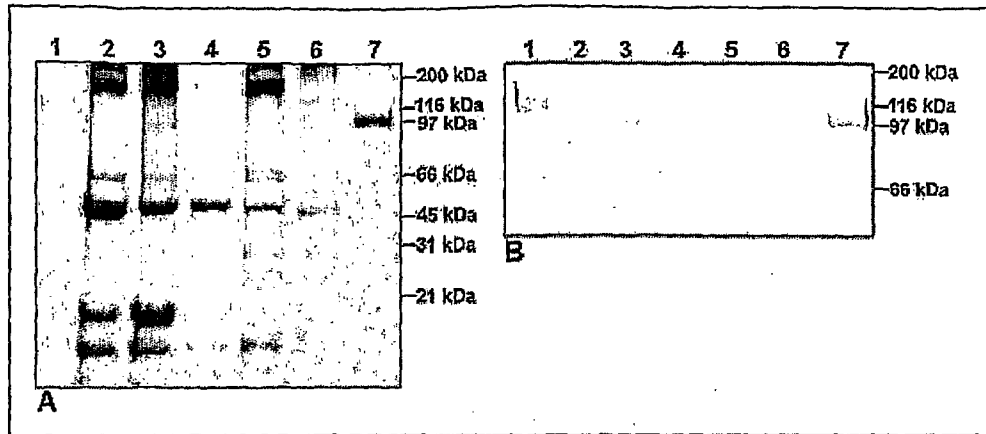


Figura 6

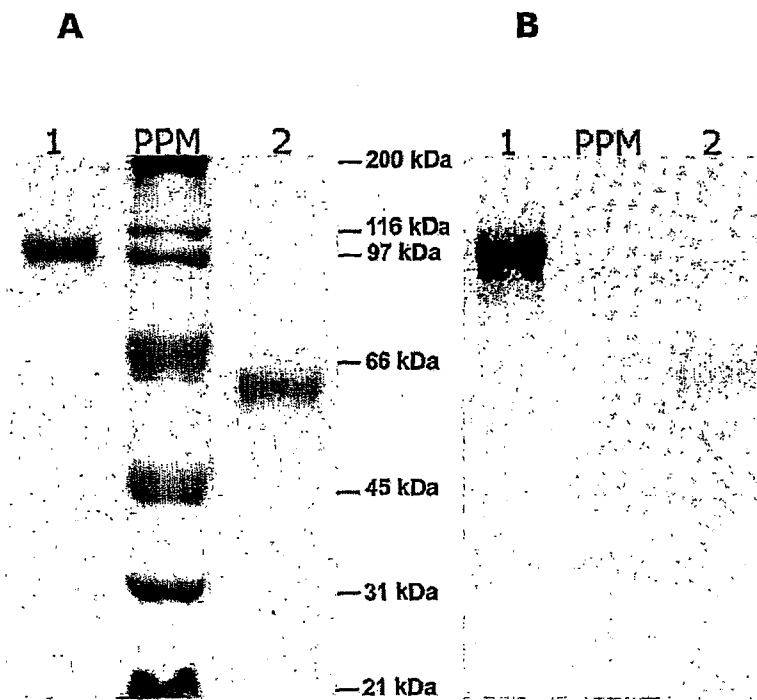


Figura 7

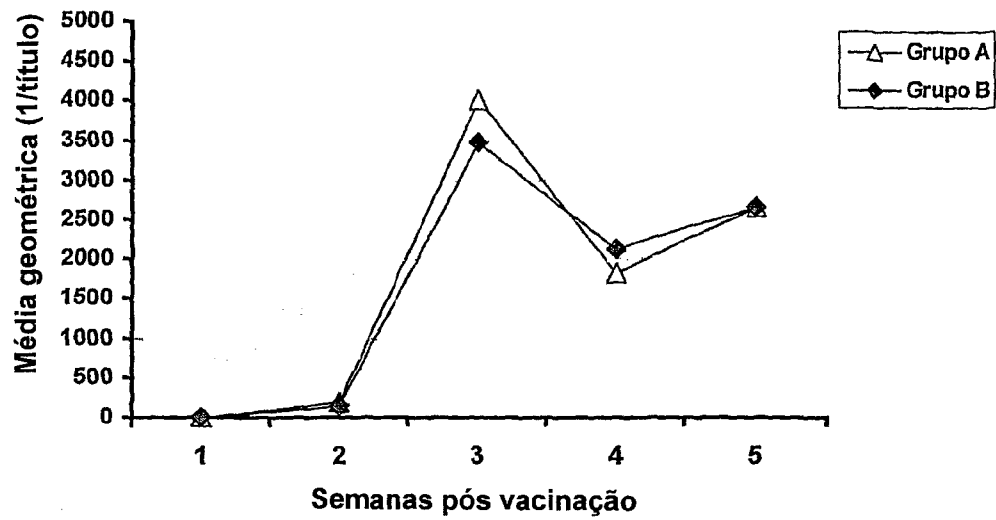


Figura 8

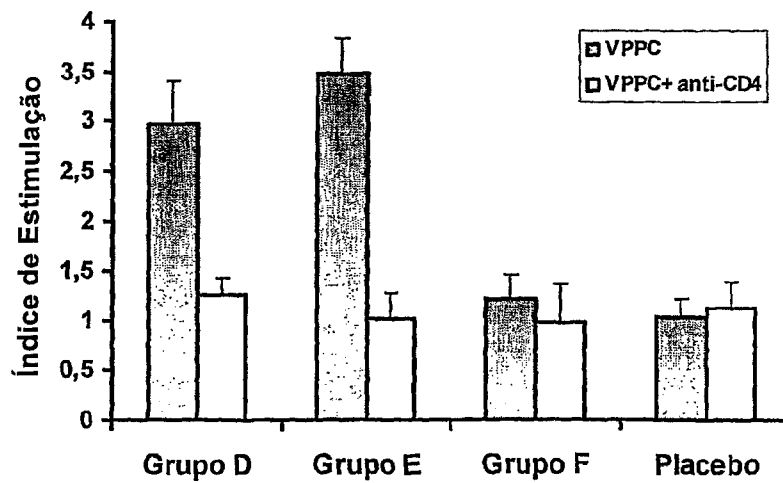


Figura 9

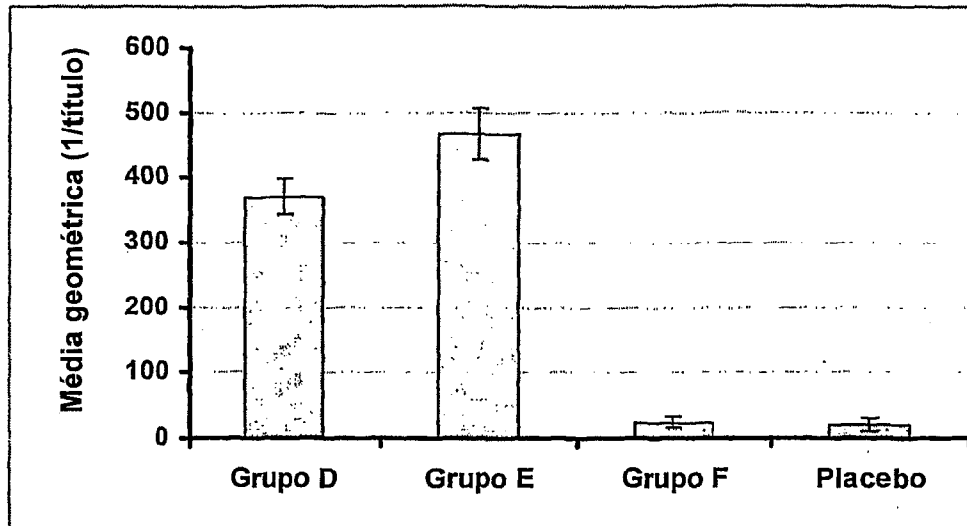
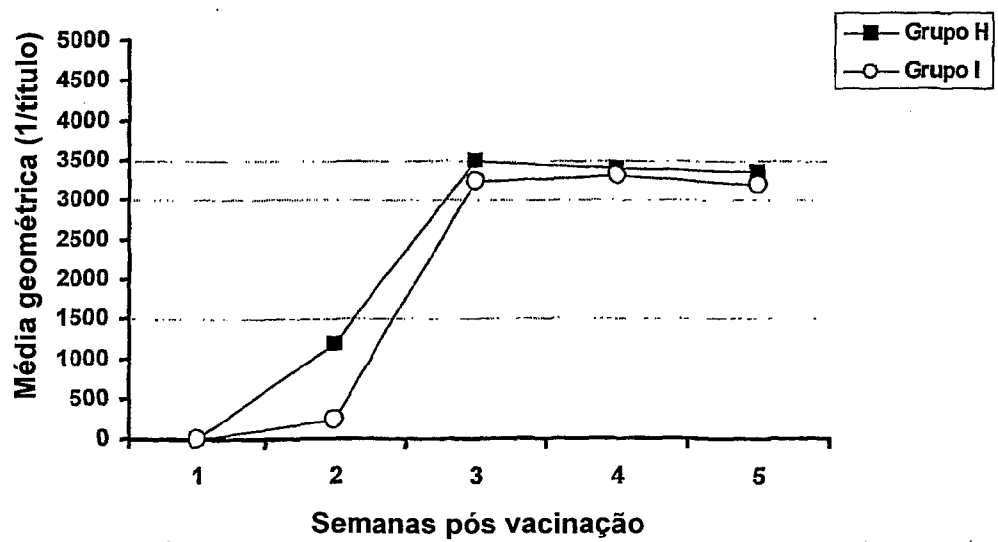


Figura 10



RESUMO

“ANTÍGENO VACINAL QUIMÉRICO CONTRA O VÍRUS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA E COMPOSIÇÃO DE VACINA CAPAZ DE PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA O VÍRUS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA”

A presente invenção descreve antígenos vacinais quiméricos contra o vírus que causa a doença da peste suína clássica (VPPC). Os referidos antígenos vacinais estão baseados em subunidades virais que estão acopladas a moléculas protéicas estimuladoras do sistema imune, tanto celular como humoral. Os antígenos quiméricos podem ser produzidos em sistemas de expressão que garantem um correto dobramento tridimensional das moléculas quiméricas que constituem a base da presente invenção. As composições vacinais que contêm os referidos antígenos quiméricos induzem uma resposta imune potente e temporã nos porcos vacinados, conferindo-lhes uma proteção total contra o VPPC. Além disso, as composições vacinais resultantes previnem a transmissão viral das mães a sua descendência. Os antígenos quiméricos, bem como as composições vacinais resultantes são aplicáveis à esfera da saúde animal, como vacinas para uso preventivo em suínos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



B55E41A2154CC532

Campo 2



D8E94EC0D2B7BBE6

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 099451e004.txt
- Data de Geração do Código: 21-08-2014
- Hora de Geração do Código: 13:37:51
- Código de Controle:
 - Campo 1: B55E41A2154CC532
 - Campo 2: D8E94EC0D2B7BBE6