

(11) Número de Publicação: **PT 1553979 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/295 (2006.01) **A61K 39/205** (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) **A61K 39/145** (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **2003.09.16**

(30) Prioridade(s): **2002.09.17 GB 0221552**
2002.09.17 GB 0221553

(43) Data de publicação do pedido: **2005.07.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.08.22**
130/2007

(73) Titular(es):

NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL **CH**

(72) Inventor(es):

NATHALIE C. SIMARD **CA**
LINDA M. BOOTLAND **CA**

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PROTEÍNA G DE IHNV PARA ESTIMULAÇÃO IMUNITÁRIA**

(57) Resumo:

RESUMO

"PROTEÍNA G DE IHNV PARA ESTIMULAÇÃO IMUNITÁRIA"

Uma vacina que compreende uma porção da proteína G de IHNV e uma porção de uma segunda proteína de um patogénio de peixes ou as suas respectivas sequências de codificação de ácido nucleico. A presença da proteína G de IHNV reforça a resposta imunitária à segunda proteína, resultando num efeito protector contra infecção pelo patogénio de peixes do qual é derivada a segunda proteína.

DESCRIÇÃO

"PROTEÍNA G DE IHNV PARA ESTIMULAÇÃO IMUNITÁRIA"

Campo do Invento

O presente invento refere-se à utilização de uma nova classe de vacinas para prevenção de doenças infecciosas, particularmente em peixes. O invento refere-se também a uma vacina compreendendo uma porção de uma sequência de ácido nucleico codificando a proteína G de IHNV (Vírus Infeccioso de Necrose Hematopoiética) e uma porção da sequência de ácido nucleico codificando um segundo péptido, sendo o segundo péptido derivado de um patogénio.

Antecedentes do Invento

As vacinas recombinantes são ocasionalmente empregues em medicina humana e veterinária como alternativa a abordagens mais tradicionais baseadas em patogénios mortos ou atenuados. Muitos antigénios estranhos distribuídos sistemicamente ao corpo deste modo são capazes de activar apenas um braço do sistema imunitário, através da estimulação da resposta imunitária humoral para gerar anticorpos através da via do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II. No entanto, uma

vacina ideal deve também induzir uma resposta celular através da destruição de células infectadas através da activação da via do MHC de classe I. A última resposta é alcançada através da degradação citosólica de proteínas estranhas em células infectadas, de modo que os fragmentos do material estranho ficam associados a moléculas do MHC de classe I e são transportados para a superfície celular para apresentação a células T citotóxicas (CTL) CD8⁺.

As vacinas de ácido nucleico (VANs) são uma forma de tecnologia relativamente nova que é útil para distribuição de antígenos de patógenos, especialmente antígenos virais. Uma vez que as proteínas virais codificadas pelas vacinas são expressas *in situ* pelo aparelho celular do hospedeiro, a teoria sugere que devem desencadear uma resposta imunitária mediada por células capaz de proteger animais quando confrontados. No entanto, os resultados foram mistos: em peixes, as VANs expressando a proteína G (glicoproteína de superfície) do vírus infeccioso de necrose hematopoiética (IHNV) e a proteína G do vírus da septicemia hemorrágica são eficazes contra infecções de IHNV e VHSV, respectivamente. No entanto, foi difícil demonstrar uma protecção convincente dos peixes utilizando VANs baseadas noutros antígenos virais.

Por exemplo, Bondinot *et al.*, *Virology* 249: 297-306, 1998 foram duplamente imunizados através de co-expressão de proteínas G de IHNV e VHSV em plasmídeos separados. A cinética e a intensidade da resposta à combinação das

proteínas G foram semelhantes às induzidas pela expressão de uma única proteína G.

É um objectivo do presente invento proporcionar vacinas melhoradas eficazes contra uma variedade de doenças em peixes e outros animais causadas por infecção com patogénios.

Sumário do Invento

Num primeiro aspecto, o invento proporciona um vector de expressão compreendendo uma porção da sequência de ácido nucleico de codificação da proteína G de IHNV fundida enquadrada com uma sequência de codificação de uma segunda proteína de um organismo patogénico diferente de IHNV. A porção da proteína G de IHNV é opcionalmente a sequência líder isolada da proteína G de IHNV. A segunda proteína é de preferência um antigénio de um patogénio de peixes, opcionalmente um vírus. A porção da sequência de codificação da proteína G de IHNV é fundida com a sequência de codificação da segunda proteína.

O invento proporciona também uma composição de vacina compreendendo um primeiro vector de expressão transportando uma porção da sequência de ácido nucleico codificando a proteína G de IHNV fundida enquadrada com uma porção da sequência de ácido nucleico de codificação de um segundo antigénio diferente de um antigénio de IHNV transportada no referido primeiro vector de expressão,

juntamente com um transportador farmacêuticamente aceitável. Numa concretização, a composição de vacina compreende um adjuvante.

Noutro aspecto, o invento proporciona a utilização de uma composição no fabrico de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença infecciosa num animal, em que a referida composição compreende um primeiro vector de expressão compreendendo uma porção da sequência de codificação da proteína G de IHNV fundida enquadrada com uma porção de uma sequência de codificação de uma segunda proteína de um organismo patogénico responsável pela referida doença infecciosa, em que IHNV não é um agente causador da doença infecciosa.

Ainda noutro aspecto, o invento proporciona a utilização de uma composição no fabrico de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença infecciosa em peixes diferente de IHNV, em que a referida composição compreende uma porção da sequência de codificação da proteína G de IHNV, e compreende ainda uma porção de uma sequência de codificação de uma segunda proteína de um organismo patogénico responsável pela referida doença infecciosa transportada no mesmo vector de expressão.

Descrição Detalhada do Invento

O invento baseia-se na observação de que a presença da proteína G de IHNV ou da sua sequência líder

(também designada sequência sinal) expressa a partir da uma vacina de ácido nucleico enquadrada com um segundo antígeno pode reforçar a resposta imunitária, estimulando deste modo a protecção contra o patógeno do qual é derivado o segundo antígeno. A explicação para este efeito não foi ainda elucidada, mas pode estar relacionada com a existência de motivos imunoestimuladores na proteína G. É também plausível que a fusão da proteína antigénica com a proteína G ou a sua sequência líder resulte na translocação do antígeno para a superfície celular, aumentando assim a exposição do péptido ao sistema imunitário do hospedeiro. Alternativamente, um aumento na protecção pode ser devido a sinergia através de uma combinação destes efeitos.

A proteína G de IHNV foi utilizada na forma recombinante como base para a vacinação de peixes contra IHNV (US 5534555). As sequências de aminoácidos e de ácido nucleico da proteína G são conhecidas, por exemplo, de Koener *et al.*, *J. Virol.* 61: 1342-1349, 1987, que é aqui incorporado por referência.

O IHNV é um membro da família dos rabdovírus, que partilham a glicoproteína "G". Os rabdovírus incluem os vesiculovírus (e.g., vírus da estomatite vesicular (VSV)), os lissavírus (e.g., vírus da raiva), os efemovírus (e.g., vírus da febre efémera bovina) e os novirabdomovírus.

O efeito de reforço imunitário das sequências da proteína G de rabdovírus pode ser aplicado a tratamento ou

prevenção de doença em qualquer animal possuindo ambos os ramos humoral e celular do sistema imunitário. Tais animais incluem mamíferos de todas as variedades (incluindo humanos), peixes, aves e répteis.

Relatamos uma experiência (Exemplo 1) na qual a proteína G de IHNV e o antigénio VP2 de IPNV (Vírus Infeccioso da Necrose Pancreática) são expressos juntos como uma proteína de fusão num único plasmídeo de ADN *in vivo* em peixes. VP2 de IPNV recombinante foi anteriormente expressa em organismos tais como *E. coli* e utilizada para vacinação de peixes contra IPNV, com um certo grau de sucesso. A US 5165925 refere-se a uma vacina contra IPNV compreendendo o polipéptido VP2.

Esta vacina de ácido nucleico (VAN) de combinação foi injectada em peixes, que foram subsequentemente confrontados com IPNV, tal como descrito no Exemplo 1. Observámos uma marcada melhoria na sobrevivência em comparação com a imunização utilizando uma preparação viral convencional, nomeadamente um vírus morto adjuvado com óleo. De facto a percentagem relativa de sobrevivência (PRS) com a VAN de fusão proteína G-proteína VP2 foi superior a 50% em comparação com o controlo negativo de PBS, enquanto o vírus morto teve uma PRS de cerca de 25%.

A construção possuindo a proteína VP2 de IPNV sem a proteína G de IHNV resultou numa PRS média de apenas 31% relativamente ao controlo negativo de PBS. Portanto, a

inclusão da proteína G de IHNV na construção teve o efeito de reforçar a resposta imunitária à proteína VP2 de IPNV para gerar um nível de protecção 67% mais forte que com a proteína VP2 sozinha.

O efeito de estimulação imunitária da proteína G de IHNV foi verificado numa segunda experiência (Exemplo 2) na qual a sequência líder da proteína G de IHNV foi fundida a 5' com o gene da hemaglutinina (HA) de ISAV num vector de expressão de ADN e o vector foi utilizado para vacinar peixes contra infecção por ISAV num ensaio de confronto. A presença da sequência líder da proteína G de IHNV reforça significativamente o efeito protector do antigénio HA de ISAV numa vacina de ADN.

O invento engloba tanto vacinas de ácido nucleico como vacinas baseadas em antigénios recombinantes. Uma vacina de antigénio recombinante compreende uma proteína G de IHNV isolada ou purificada (ou uma porção desta) e uma porção isolada ou purificada de um segundo antigénio de um patogénio de peixe diferente de IHNV. A porção da proteína G de IHNV e a porção do segundo antigénio são proporcionadas juntas na forma de uma proteína de fusão.

Uma proteína "isolada" ou "purificada" é definida como estando substancialmente isenta de material celular ou de outras proteínas contaminantes da fonte celular ou tecidular da qual a proteína é derivada, ou substancialmente isenta de precursores químicos ou de outros químicos quando sintetizada quimicamente.

Uma vacina preferida é uma vacina de ácido nucleico possuindo uma porção do gene da proteína G de IHNV fundida enquadrada com uma porção de um segundo gene de um patógeno diferente de IHNV no mesmo vector de expressão de ADN. A sequência de ácido nucleico codificando a porção da proteína G, ou um fragmento desta, e o segundo antígeno, ou um fragmento deste, é fundida enquadrada.

Quando os genes são fundidos enquadrados entenda-se que o registo do código de tripletos nas sequências de ácido nucleico reconhecido pelas moléculas de ARNt é idêntico ao registo nos genes de ocorrência natural, de modo a que a sequência de aminoácidos traduzida resultante seja um péptido compreendendo uma porção da proteína G de IHNV e uma porção do segundo péptido. De preferência, estes dois genes ou fragmentos de genes são fundidos directamente, sem qualquer sequência interveniente. Quando as sequências génicas da proteína G de IHNV e da segunda proteína ou porções destas são fundidas em cadeia, a sequência da proteína G de IHNV ou uma porção desta pode estar a 5' da sequência da segunda proteína, a 3' da sequência da segunda proteína ou embebida dentro dessa sequência.

Para os presentes fins uma "porção" de uma proteína entende-se como qualquer molécula peptídica possuindo pelo menos 7, opcionalmente pelo menos 15, ou pelo menos 25, ou pelo menos 50, ou pelo menos 100

aminoácidos contíguos da proteína de referência. Uma "porção" de um gene ou de uma sequência de ácido nucleico é qualquer parte dessa sequência génica compreendendo pelo menos 20, opcionalmente pelo menos 50, ou pelo menos 100, ou pelo menos 200 nucleótidos consecutivos da sequência de codificação completa. Uma "porção" de um gene ou de uma proteína pode ser a sequência génica inteira ou a sequência de aminoácidos. Numa concretização preferida a porção da proteína G de IHNV utilizada no invento compreende a sequência líder de direccionamento para a membrana externa da proteína G ou a sua sequência nucleotídica de codificação. Opcionalmente, esta porção compreende a sequência líder para a exclusão do resto da proteína G. A sequência líder completa (lendo a partir do seu terminal N) é: MDTMITTPLILILITCGANS (SEQ ID NO: 1). Pode ser empregue uma versão truncada mas funcional da sequência líder em vez da sequência líder completa.

Quando é feita referência à proteína G de IHNV ou à segunda proteína, ou às suas respectivas sequências de codificação, deve entender-se que este termo incorpora proteínas ou sequências de codificação com substancial homologia. "Substancialmente homóloga" neste contexto significa que uma sequência, quando comparada com uma sequência de referência, tem pelo menos 60% de homologia, de preferência pelo menos 70% de homologia, de maior preferência pelo menos 80% de homologia, ainda de maior preferência pelo menos 90% de homologia e ainda de maior preferência pelo menos 95% de homologia com a sequência de referência.

Para determinar a percentagem de homologia de duas sequências de aminoácidos ou de duas sequências de ácido nucleico, as sequências são alinhadas para fins de uma comparação óptima (*e.g.*, podem ser introduzidos intervalos na sequência de uma primeira sequência de aminoácidos ou de ácido nucleico para um alinhamento óptimo com uma segunda sequência de aminoácidos ou de ácido nucleico e a sequência não homóloga interveniente no intervalo pode não ser considerada para fins de comparação).

Quando uma posição na primeira sequência (referência) é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleótido que a posição correspondente na sequência, as moléculas são homólogas nessa posição (*i.e.*, há identidade nessa posição). No caso da comparação de sequências de ácido nucleico existe também homologia numa certa posição quando o triplete do codão incluindo o nucleótido codifica o mesmo aminoácido em ambas as moléculas a comparar, devido à degenerescência do código genético.

A percentagem de homologia entre duas sequências é uma função do número de posições homólogas partilhadas pelas sequências (*i.e.*, % de homologia = $\text{n}^\circ \text{ de posições homólogas} / \text{n}^\circ \text{ total de posições}$). Opcionalmente, a comparação de sequências e a determinação da percentagem de homologia pode ser alcançada utilizando um algoritmo matemático. Tais algoritmos estão incorporados nos programas

NBLAST e XBLAST de Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 430-10, 1990.

Para além disso, aminoácidos com cargas idênticas podem ser substituídos uns pelos outros. Por exemplo, a lisina e a arginina podem ser substituídas uma pela outra. O ácido glutâmico e o ácido aspártico podem ser substituídos um pelo outro. O glutamato e o aspartato podem também ser substituídos um pelo outro. Tais mudanças neutras de carga dos aminoácidos de uma proteína são reconhecidas no campo e a proteína resultante estará ainda coberta por este invento.

Existem muitos isolados geográficos diferentes de IHNV e de outros patogénios. Existe um certo grau de variação na sequência de ácido nucleico destes patogénios e nas sequências de aminoácidos das proteínas que expressam. A proteína G de IHNV e a segunda proteína utilizada no invento não estão restringidas a qualquer fonte específica de isolado. Pode haver vantagem em fazer coincidir a variante da segunda proteína com os isolados prevalentes numa determinada zona geográfica ao conceber uma vacina para essa área.

Numa concretização do invento é proporcionado um vector de expressão de ADN no qual as sequências de ácido nucleico para a proteína G de IHNV e a segunda proteína estão operativamente ligadas a sequências reguladoras da transcrição, e uma vacina de ácido nucleico compreendendo o

vector de expressão de ADN e um transportador farmacêuticamente aceitável. As sequências de ácido nucleico para a proteína G de IHNV e a segunda proteína podem ser ligadas para serem expressas sob o controlo da mesma sequência ou sequências reguladoras da transcrição, ou podem ser expressas independentemente uma da outra sob o controlo de sequências reguladoras da transcrição separadas. Tal como aqui se utiliza, o termo "vector de expressão de ADN" refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. De preferência, o vector de expressão de ADN é um vector de expressão eucariótico. Um tipo de vector é um "plasmídeo", que se refere a uma volta de ADN de cadeia dupla circular no qual podem ser ligados segmentos de ADN adicionais. Outro tipo de vector é um vector viral, em que os segmentos adicionais de ADN podem ser ligados no genoma viral. Dentro de um vector de expressão recombinante, "operativamente ligado" pretende significar que a sequência nucleotídica de interesse está ligada à sequência ou sequências reguladoras de um modo que permita a expressão da sequência nucleotídica.

As sequências reguladoras da transcrição incluem promotores e sequências de poliadenilação. A resposta imunitária pode ser estimulada utilizando outras sequências nucleotídicas tais como oligonucleótidos imuno-estimuladores possuindo dinucleótidos CpG não metilados ou sequências nucleotídicas que codifiquem para outras proteínas antigénicas ou citocinas adjuvantes. As sequências

reguladoras incluem as que dirigem expressão constitutiva ou indutível de uma sequência nucleotídica em muitos tipos de células hospedeiras e as que dirigem a expressão da sequência nucleotídica apenas em certas células hospedeiras (e.g., sequências reguladoras específicas de tecidos). O ADN pode estar presente na forma nua ou pode ser administrado juntamente com um agente facilitador da tomada celular (e.g., lipossomas ou lípidos catiónicos). A tecnologia de vacinação de ADN é revista por exemplo em WO 90/11092, aqui incorporada por referência.

Para uma expressão *in vivo* óptima em peixes pode ser preferido seleccionar sequências reguladoras da transcrição endógenas dos peixes a vacinar. Por exemplo, podem ser considerados promotores de genes endógenos de citocinas ou da actina, ou podem ser derivadas outras sequências reguladoras de vírus de ADN de peixes. A vacinação de ADN tal como aplicada aos peixes é explicada em mais pormenor na Patente U.S. N° 5780448.

O IHNV recombinante e outras proteínas patogénicas foram expressas com sucesso numa variedade de organismos, incluindo *E. coli* e *Pichia pastoris*, utilizando vectores contendo promotores constitutivos e indutíveis. Numa vacina recombinante podem ser misturadas uma com a outra para co-administração, a proteína G de IHNV e uma segunda proteína. Alternativamente, um vector de expressão compreendendo uma fusão de porções destes dois genes pode ser construído e expresso numa célula hospedeira através de

técnicas padrão, para preparar uma proteína de fusão recombinante purificada. Métodos convencionais de purificação de proteínas podem ser empregues para preparar a proteína recombinante para utilizar numa vacina. Opcionalmente, pode ser utilizado um lisado de células hospedeiras expressando a proteína recombinante em vez da proteína recombinante que sofreu mais procedimentos de purificação.

Com base nos resultados aqui demonstrados, descrevemos um método de tratamento ou prevenção de doença infecciosa num animal tal como um peixe, compreendendo a administração ao animal de uma composição compreendendo uma porção da sequência nucleotídica da proteína G de IHNV (ou a sequência proteica codificada) e uma porção da sequência nucleotídica de um segundo antigénio do patógeno causador da doença infecciosa (ou a sequência proteica codificada). Reivindicamos também a utilização de uma composição compreendendo uma porção da proteína G de IHNV, ou a sua sequência nucleotídica de codificação, e uma porção de uma segunda proteína de um organismo patogénico, ou a sua sequência nucleotídica de codificação, no fabrico de um medicamento (vacina) para o tratamento ou prevenção de uma doença infecciosa num animal (e.g., um peixe) causada pelo referido organismo patogénico, e/ou para o tratamento ou prevenção de infecção com o referido organismo patogénico.

A "segunda" proteína (heteróloga) do invento pode ser uma proteína (ou péptido ou antigénio) de um patógeno

de peixe diferente de IHNV. A segunda proteína pode ser de um patógeno de peixe fúngico, viral, protozoário ou bacteriano que cause síndromas de doença infecciosa. A segunda proteína é opcionalmente de um vírus diferente de um rabdovírus ou diferente de VHSV. Por exemplo, a segunda proteína pode ser derivada do Vírus Infeccioso da Anemia de Salmão (ISAV), Vírus Infeccioso da Necrose Pancreática (IPNV), Iridovírus, Vírus da Necrose Nervosa (NNV), Vírus da Doença Pancreática do Salmão (SPDV), Vírus da Viremia Primavera da Carpa (SVCV), Vírus da Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV), *Renibacterium salmoninarum* (agente causador da Doença Renal Bacteriana), *Piscirickettsia salmonis* (agente causador da Septicemia Riquetsiana de Salmonídeo), *Vibrio* sps., *Aeromonas* sps., *Yersinia ruckeri*, *Nocardia* sps., *Pseudomonas* sps., *Photobacterium damsela*, etc. Numa concretização preferida a segunda proteína é de origem viral. Um grande e crescente número de polipéptidos destes e de outros organismos patogênicos foi purificado e/ou clonado e expresso e está disponível para ser proporcionado em conjunto com a proteína G de IHNV ou a sua sequência de codificação numa composição de vacina. Exemplos preferidos incluem as proteínas de IPNV VP1, VP2, VP3 e NS e suas sequências nucleotídicas de codificação; as proteínas de ISAV divulgadas em WO 01/10469 incluindo as proteínas hemaglutinina, nucleocápside, polimerase e P4 e P5 do segmento 7, e suas sequências nucleotídicas de codificação; as proteínas de *P. salmonis* divulgadas em WO 01/68865 incluindo OspA e IcmE e suas sequências nucleotídicas de codificação; proteínas de nodavírus tais como a

nucleocápside; e polipéptidos estruturais de SPDV e suas sequências nucleotídicas de codificação (divulgadas em WO 99/58639). Uma composição de vacina preferida de acordo com o invento compreende um vector de expressão de ADN possuindo uma porção da sequência nucleotídica da proteína G de IHNV fundida enquadrada com uma porção da sequência de VP2 de IPNV ou uma porção da sequência líder da proteína G de IHNV fundida enquadrada com uma porção da sequência da hemaglutinina de ISAV.

As espécies de peixes candidatas em primeiro lugar para receber a vacina do invento são os peixes salmonídeos, incluindo espécies de salmão e de truta, particularmente o salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*), truta das fontes (*Salvelinus fontinalis*), truta sapeira (*Salmo trutta*), salmão real (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmão japonês (*Oncorhynchus masou*), salmão rosa (*Oncorhynchus gorbuscha*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), salvelino-ártico (*Salvelinus alpinus*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*). No entanto, qualquer outra espécie de peixe susceptível a doença infecciosa pode beneficiar, tais como espécies de peixes ornamentais, koi, peixe-dourado, carpa, peixe-gato, solha dos mares do norte, dourada, robalo, lúcio, alabote, cantarilho, tilápia, pregado, peixe-lobo e por aí adiante.

A "segunda" proteína (heteróloga) do invento pode também ser um antígeno de um patógeno de animais diferentes de peixe, especialmente mamíferos tais como

humanos. A segunda proteína pode ser de um patógeno fúngico, viral, protozoário ou bacteriano que cause síndromas de doença infecciosa em animais. Uma lista não limitante de possíveis patógenos inclui: vírus de hepatite (e.g., HBV, HCV), VIH e outros genes de vírus de imunodeficiência, vírus da gripe, vírus do sarampo, coronavírus, herpesvírus, poliovírus, rinovírus, rotavírus, adenovírus, papilomavírus, hantavírus, parvovírus e os vírus específicos Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Herpesvírus Bovino (BHV), Vírus da Doença da Língua Azul, Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV), Vírus *Parainfluenza* de tipo 3 (PI3), Vírus Infeccioso da Rinotraqueíte Bovina (IBR), Vírus do Síndrome Respiratório e Reprodutor Suíno (PRRSV); espécies de *Giardia*, *Yersinia*, *Leishmania*, *Amoeba*, *Entamoeba*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Cryptosporidia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Listeria*, *Campilobacter*, *Chlamydia*, *Elmeria*, *Clostridia*, *Pasteurella*, *Brachyspira*, *Salmonella*, *Legionella*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma* (e.g., *M. bovis*, *M. hyopneumoniae*), *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Neospora*, *Fusobacterium*, *E. coli*, *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus somnus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Anaplasma*, etc.

Qualquer animal vertebrado pode ser imunizado com as vacinas do invento. Pode ser feita menção particular a humanos, às principais espécies de animais terrestres de

quinta, nomeadamente gado, cavalos, ovelhas, suínos e aves de capoeira, e animais de companhia.

As vacinas de dois componentes podem ser preparadas em conjunto numa única composição de vacina ou podem ser preparadas separadamente para administração separada ou para co-administração. Opcionalmente, os componentes individuais são proporcionados na forma de um estojo, para administração sequencial, separada ou simultânea. Os dois componentes podem ser misturados um com o outro imediatamente antes da administração.

Para peixes, a via de administração preferida das vacinas do invento é através de injeção no músculo (em particular, no músculo epaxial). As opções alternativas são a injeção na cavidade peritoneal (para os peixes maiores), oralmente na alimentação, ou através de imersão em água do mar ou em água doce. É recomendado que os peixes tenham 2 gramas ou mais de peso corporal para administração da vacina do invento através de injeção, de preferência 10 gramas ou mais. Para administração por imersão ou oral é preferível que os peixes tenham um peso corporal de pelo menos 0,1 g, opcionalmente pelo menos 0,5 g habitualmente pelo menos 2 gramas.

Noutros animais para além dos peixes as vacinas, em particular as vacinas de ácido nucleico, são frequentemente distribuídas através de injeção intramuscular ou através de distribuição às membranas mucosas; as técnicas

de distribuição incluem, mas não se limitam a: electroporação, injeção subcutânea ou transdérmica, microinjeção, injeção por jacto, co-precipitação com fosfato de cálcio-ADN, transfecção mediada por DEAE-dextrano, transfecção mediada por polibreno, fusão de lipossomas, lipofecção, fusão de protoplastos, infecção viral, micropartículas, transportadores bacterianos e biolística (bombardeamento de partículas, e.g., utilizando um canhão de genes).

A vacina do invento pode ser administrada a animais para fins profilácticos ou terapêuticos. A vacina é capaz de induzir protecção a longo prazo contra a doença infecciosa alvo. Protecção a "longo prazo" no caso dos peixes significa uma resposta imunitária protectora para mais de 7 dias, de preferência para mais de 20 dias, e de maior preferência para mais de 70 dias após a vacinação.

A dosagem eficaz de vacina pode variar dependendo do tamanho e da espécie do sujeito e de acordo com o modo de administração. A dosagem óptima pode ser determinada através de tentativa e erro por um médico, veterinário ou especialista em aquacultura. Para peixes, as vacinas podem compreender entre 0,01 e 0,5 g, de preferência entre cerca de 0,05 e 0,2 g de proteína recombinante numa única dosagem. Um intervalo de dosagem adequado para vacinas de ácido nucleico pode ser de apenas picogramas até quantidades de miligramas, mas é normalmente de cerca de 0,01 a 100 µg, de preferência de 0,1 µg a 50 µg por dose

unitária, de maior preferência cerca de 1 µg a 20 µg e ainda de maior preferência de cerca de 5 µg a 10 µg por dose unitária. Devido ao stress sofrido pelos peixes em resposta à vacinação, é preferível que a vacina seja proporcionada numa vacina de toma única, numa forma de dosagem única. Para as vacinas injectáveis, uma unidade de dosagem única é adequadamente de 0,025 a 0,5 ml, de preferência 0,05 a 0,2 ml, opcionalmente cerca de 0,1 ml, de volume.

Tipicamente, as vacinas são preparadas como soluções, emulsões ou suspensões líquidas para injeção ou distribuição na água. Podem também ser preparadas formas sólidas (e.g. pó) adequadas para dissolução ou suspensão em veículos líquidos ou para mistura com alimentos sólidos, antes da administração. A vacina pode ser liofilizada, opcionalmente seca por congelação, numa forma pronta a utilizar para reconstituição com um diluente estéril. Por exemplo, a vacina liofilizada pode ser reconstituída em solução salina a 0,9% (proporcionada opcionalmente como parte do produto de vacina embalado). As vacinas de ácido nucleico são particularmente adequadas para liofilização devido à estabilidade e à longa duração de armazenamento das moléculas. Alternativamente, a vacina pode ser proporcionada em solução salina. As formas, líquida ou reconstituída, da vacina podem ser ainda mais diluídas num pequeno volume de água (e.g., 1 a 10 volumes) antes da adição a um recinto, tanque ou banho para administração a peixes através de imersão. As composições farmacêuticas da

vacina do invento podem ser administradas numa forma para libertação imediata ou libertação prolongada.

Transportadores ou veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem excipientes convencionais e podem ser, por exemplo, solventes tais como água, óleo ou solução salina, dextrose, glicerol, sacarose, tricaína, agentes de humidificação ou emulsionantes, agentes de volume, revestimentos, aglutinantes, enchimentos, desintegrantes, diluentes, lubrificantes, agentes de tamponamento do pH ou adjuvantes convencionais tais como muramil-dipéptidos, avridina, hidróxido de alumínio, óleos, saponinas, co-polímeros de blocos e outras substâncias conhecidas na arte. No caso de vacinas de ácido nucleico, o vector de expressão de ADN pode ser distribuído nu ou pode ser proporcionado na forma de complexos lípido catiónico-ADN, lipossomas, co-precipitados com fosfato de cálcio, adsorvido em micropartículas e por aí adiante.

Nalguns casos pode ser desejável combinar a vacina do invento com uma vacina convencional contra um patogénio infeccioso (vacina de patogénio morto ou de antigénio recombinante do patogénio ou vacina de ácido nucleico do patogénio) numa vacina de combinação, ou num estojo compreendendo ambos os componentes para administração separada, sequencial ou simultânea, para tratamento ou prevenção da doença infecciosa causada pelo patogénio.

Exemplo 1

Avaliação das vacinas de ácido nucleico contra o Vírus Infeccioso da Necrose Pancreática em salmão do Atlântico, *Salmo salar*.

Vacinação

Salmões do Atlântico jovens (peso corporal de 9-26 g) são mantidos em tanques circulares com 1 metro de diâmetro com água doce a 8°C e privados de alimento durante 24 horas antes da vacinação. Para a vacinação, os peixes são anestesiados em éster etílico do ácido 3-aminobenzóico (MS222, Sigma, Poole, UK) a uma concentração de aproximadamente 0,5 g/litro. As vacinas de ácido nucleico (10 µg de ADN/50 µl de dose) são administradas através de injeção intramuscular no flanco dorsal esquerdo, na área imediatamente abaixo da barbatana dorsal. A vacina de IPNV adjuvada com óleo e o controlo de PBS são administrados através de injeção intraperitoneal (100 µl). Cada grupo de tratamento tem 40 peixes e existem 2 replicados por vacina para cada uma das 6 vacinas.

Os grupos de teste recebem as seguintes composições:

1) o vector pUK: um vector de clonagem possuindo o gene de resistência à canamicina, o promotor inicial imediato de CMV, um local de clonagem múltipla e o

sinal de poliadenilação da hormona do crescimento bovina (BGH poliA).

2) pUK + VP2: o vector pUK incorporando a sequência de codificação inteira de VP2 de IPNV dentro do local de clonagem múltipla do vector.

3) pUK + IHNG: o vector pUK incorporando a sequência de codificação inteira da proteína G de IHN dentro do local de clonagem múltipla do vector.

4) pUK + IHNG + VP2: o vector pUK incorporando a sequência de codificação inteira da proteína VP2 de IPNV fundida enquadrada com a glicoproteína (G) do vírus IHN dentro do local de clonagem múltipla, de modo que a proteína G fique a 5' da VP2.

5) IPNV + óleo: uma preparação inactivada do vírus IPN, adjuvada com óleo.

6) PBS (controlo negativo).

Aproximadamente 6 semanas após a vacinação, os peixes são maturados durante um período de 5 dias. O fluxo de água do mar para dentro dos tanques dos peixes é gradualmente aumentado, ao mesmo tempo que o fluxo de água doce é reduzido, de modo a que no final dos 5 dias os peixes estejam em água do mar na máxima força.

Confronto de co-habitação

807 graus-dia após a vacinação, um sobrenadante de segunda passagem congelado de vírus de IPN estirpe "Cole-Deep" é diluído cinco vezes em PBS estéril para dar uma concentração final de 1×10^7 TCID₅₀/ml. Os peixes são anestesiados em MS222 e confrontados em grupos através de injeção intraperitoneal de 100 µl de suspensão de vírus, de modo a que cada peixe receba uma dose de 10^6 TCID₅₀. A temperatura da água do mar no confronto é de cerca de 11°C e o caudal de água é de aproximadamente 5 litros por minuto em cada tanque.

Os mortos são removidos duas vezes ao dia à primeira observação. O ensaio terminou 8 semanas após o confronto.

Conclusões

Vacina	Mortalidade Média %	DP	PRS média relativamente a PBS
PBS	42,6	10,4	n/a
pUK	39,7	10,4	6,90
pUK + IHNG	35,3	8,3	17,24
pUK + VP2	29,4	4,2	31,03
pUK + IHNG + VP2	20,6	4,2	51,72
IPNV + óleo	31,7	5,1	25,65

O modelo de confronto baseado na co-habitação com

juvenis maduros de salmão do Atlântico injectados intraperitonealmente tem sucesso: a mortalidade cumulativa nos co-habitantes injectados intraperitonealmente atinge uma média de 41,25% e isto é replicado ao longo dos 4 tanques de confronto com um desvio padrão de 3,95%.

O desempenho da vacina de IPNV morto dada com óleo é avaliado em relação aos controlos vacinados com PBS. A vacina morta dá alguma protecção, com uma percentagem relativa de sobrevivência (PRS) em comparação com os controlos vacinados com PBS de mais de 25%.

O desempenho das vacinas de ácido nucleico é comparado com o plasmídeo vazio ou com o plasmídeo contendo o gene para a proteína G de IHN. Os plasmídeos de controlo são comparados com os controlos falsamente vacinados com PBS para determinar se o plasmídeo vazio ou o plasmídeo contendo a proteína G de IHN têm algum efeito protector. O vector plasmídico pUK dá um efeito protector insignificante. Quando a proteína VP2 de IPNV está incluída no vector, é dada uma protecção significativa (PRS de 31%) em comparação com os controlos vacinados com PBS. Quando o gene da proteína G de IHN é incluído no vector, sem genes de IPNV, o efeito protector contribui para uma PRS de 17% em comparação com PBS.

A vacina com o desempenho mais admirável é a VAN contendo o gene para a proteína G de IHN em cadeia com VP2 de IPNV. Os peixes vacinados com esta vacina mostram uma

percentagem relativa de sobrevivência ou PRS de 52% em comparação com os controlos vacinados com PBS.

Em conclusão, a preparação viral morta padrão com óleo adjuvante tem um desempenho adequado neste ensaio, mas o desempenho das VANs contendo VP2 é muito superior. Em particular, a VAN contendo VP2 em cadeia com a proteína G de IHNV é a mais eficaz.

Exemplo 2: Avaliação de vacinas de ácido nucleico contra ISAV

Juvenis de salmão do Atlântico com um peso médio de 10 g (<6 meses de idade) são aclimatizados durante no mínimo 7 dias a água a $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ a fluir a um caudal de 2,5 l/min. Os peixes são alimentados com uma dieta em pastilhas comercial a uma dose diária de 1,5% do peso corporal.

Antes da vacinação os peixes são anestesiados em 30 mg/l de benzocaína. As vacinas de ácido nucleico (10 µg de ADN/50 µl de dose) são administradas através de injeção intramuscular no músculo epaxial imediatamente anterior à barbatana dorsal. A vacina de emulsão em óleo é administrada através de injeção intraperitoneal (150 µl). Cada grupo de vacina replicado tem 55 peixes e existem 2 replicados por vacina para cada uma das 5 vacinas.

Os grupos de teste receberam as seguintes composições:

1) o vector pUK: um vector de clonagem possuindo o gene de resistência à canamicina, o promotor inicial imediato de CMV, um local de clonagem múltipla e o sinal de poliadenilação da hormona do crescimento bovina (BGH poliA).

2) pUK-HA: o vector pUK incorporando a sequência de codificação inteira da proteína hemaglutinina de ISAV no local de clonagem múltipla.

3) pUK-IHN_g: o vector pUK incorporando a sequência inteira da proteína G de IHN_V no local de clonagem múltipla.

4) pUK-HA-IHN_g: o vector pUK incorporando a sequência de codificação inteira da proteína hemaglutinina de ISAV no local de clonagem múltipla e fundida na sua extremidade 5' à sequência líder da proteína G de IHN_V.

5) ISAV + óleo: uma preparação inactivada do vírus ISA, adjuvada com óleo.

Os peixes são confrontados a 850,5 graus-dia. É utilizado um confronto de co-habitação no qual salmões da mesma reserva são marcados com agrafos na parte adiposa da barbatana, é-lhes dada uma injeção i.p. com 0,1 ml de ISAV cultivado (cerca de 10^4 TCDI₅₀ por peixe) e são adicionados a cada tanque de peixes tratados.

Os peixes em cada tanque são monitorizados duas vezes ao dia quanto à mortalidade durante 31 dias. A percentagem relativa de sobrevivência (PRS) é calculada como se segue:

$$\text{PRS} = 1 - (\% \text{ de mortalidade dos vacinados} / \% \text{ de mortalidade dos de controlo com pUK}) \times 100$$

Resultados: A mortalidade cumulativa para o grupo de controlo negativo (plasmídeo pUK) é de 94%. A melhor protecção é induzida através de injeção da vacina de ISAV inactivada monovalente de controlo positivo (94% de PRS). A injeção do plasmídeo pUK-IHN_g como controlo negativo induz alguma protecção inespecífica (26% de PRS). pUK-HA confere um elevado nível de protecção (49% de PRS). Esta protecção é significativamente aumentada através da adição da sequência líder da proteína G de IHN_V na extremidade 3' (pUK-HA-IHN_g) (60% de PRS). Estes resultados proporcionam mais apoio aos benefícios de incluir a sequência da proteína G de IHN_V (ou minimamente, a sequência líder desta) numa vacina de ácido nucleico para reforçar a imunidade a uma doença infecciosa diferente de IHN_V. A sequência líder da proteína G pode ser responsável pelo direccionamento do antígeno heterólogo para a superfície celular dentro dos peixes ou podem existir motivos especiais dentro da proteína que estimulem de modo não específico o sistema imunitário dos peixes.

Grupo de teste	Mortalidade Média %	Erro padrão	PRS (relativamente a pUK)
pUK	94	2	-
ISAV-óleo	6	6	94
pUK-HA	48	4	49
pUK-IHN _g	70	6	26
pUK-HA-IHN _g	38	6	60

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Novartis AG

<120> Proteína G de IHN_V para Estimulação Imunitária

<130> 32647

<140> PCT/EP2003/10305

<141> 2003-09-16

<150> GB 0221552.3

<151> 2002-09-16

<150> GB 0221553.1

<151> 2002-09-16

<160> 1

<170> PatentIn Versão 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Vírus infeccioso da necrose hematopoiética

<400> 1

Met Asp Thr Met Ile Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ile Leu Ile Thr Cys
1 5 10 15

Gly Ala Asn Ser
20

Lisboa, 14 de Novembro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Vector de expressão de ADN compreendendo uma sequência codificando uma porção da sequência de codificação da glicoproteína G do vírus infeccioso da necrose hematopoiética IHNV e compreendendo ainda uma porção de uma sequência de codificação de uma segunda proteína de um organismo patogénico diferente de IHNV em que a porção da sequência de codificação da proteína G de IHNV e a porção da sequência de codificação da segunda proteína são fundidas enquadradas no mesmo vector de expressão de ADN.

2. Vector de expressão de ADN de acordo com a reivindicação 1 em que a referida sequência de codificação da segunda proteína é de um patógeno de peixes.

3. Vector de expressão de ADN de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 compreendendo a sequência líder da proteína G de IHNV.

4. Vector de expressão de ADN de acordo com a reivindicação 3 em que a sequência líder da proteína G de IHNV é SEQ ID NO: 1

5. Vector de expressão de ADN de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1-4 compreendendo a sequência de codificação completa da proteína G de IHNV.

6. Vector de expressão de ADN de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5 em que a referida segunda proteína é de um patógeno seleccionado de entre: ISAV, VHSV, IPNV, NNV, Iridovírus, SVCV, SPDV, *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis*, *Vibrio* sps., *Aeromonas* sps., *Yersinia ruckerii*, *Pseudomonas* sps., *Nocardia* sps. e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

7. Vector de expressão de ADN de acordo com a reivindicação 6 em que a segunda proteína é a proteína VP2 de IPNV ou a proteína hemaglutinina de ISAV.

8. Vacina de ácido nucleico compreendendo um vector de expressão de ADN de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7 com um transportador farmacêuticamente aceitável.

9. Proteína de fusão compreendendo uma porção da proteína G de IHNV e uma porção de uma segunda proteína derivada de um organismo patogénico de peixes diferente de IHNV.

10. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 9 em que a referida segunda proteína é um patógeno

seleccionado de entre: ISAV, IPNV, NNV, Iridovírus, SVCV, SPDV, *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis*, *Vibrio* sps., *Aeromonas* sps., *Yersinia ruckerii*, *Pseudomonas* sps., *Nocardia* sps. e *Photobacterium damsela* subesp. *piscicida*.

11. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 10 em que a segunda proteína é VP2 de IPNV.

12. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 11 em que a segunda proteína é hemaglutinina de ISAV.

13. Vacina de ácido nucleico compreendendo uma sequência codificando uma proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-12 com um transportador farmacêuticamente aceitável.

14. Utilização de um vector de expressão de ADN de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7 ou uma proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 9-12 na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de infecções patogénicas em peixes.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14 na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de infecções bacterianas, virais, fúngicas ou por protozoários em peixes.

16. Utilização de acordo com a reivindicação 14 ou a reivindicação 15 na preparação de um medicamento para reforço da resposta imunitária estimulando deste modo a protecção contra o patogénio do qual é derivada a segunda proteína.

Lisboa, 14 de Novembro de 2007

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 5534555 A
- US 5165925 A
- WO 9011692 A
- US 5780448 A
- WO 0110469 A
- WO 0168265 A
- WO 9956539 A
- EP 200310305 W
- GB 0221552 A
- GB 0221553 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- BOUDINOT et al. *Virology*, 1998, vol. 249, 297-306
- ALTSCHUL et al. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 430-49
- KOENER et al. *J. Virol.*, 1987, vol. 61, 1342-1349