



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

(11) PI 0822947-3 B1

(22) Data do Depósito: 19/11/2008

(45) Data de Concessão: 18/09/2018



(54) Título: VACINA RECOMBINANTE.

(51) Int.Cl.: A61K 39/145

(73) Titular(es): LABORATORIO AVI-MEX, S.A. DE CV

(72) Inventor(es): DAVID SARFATI-MIZRAHI; BERNARDO LOZANO-DUBERNARD; JESÚS ALEJANDRO SUÁREZ-MARTÍNEZ; MANUEL JOAQUÍN GAY-GUTIÉRREZ; ERNESTO SOTO-PRIANTE

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/05/2011

"VACINA RECOMBINANTE"

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se às técnicas utilizadas na prevenção e tratamento de doenças, preferivelmente de tipos de aves e, mais particularmente, a invenção refere-se às vacinas recombinantes compreendendo um vetor viral inativada, tendo inserida uma sequência de nucleotídeos exógenos codificantes para uma proteína tendo uma atividade antigênica; e, um veículo farmacêuticamente aceitável, adjuvante ou excipiente.

Antecedentes da invenção

[002] Como é bem conhecido, vacinas contra agentes patógenos virais são formuladas a partir de vírus correspondentes, que são isolados para serem utilizados, posteriormente, na produção de vacinas, que serão administradas aos animais ou aos humanos por meio de diversas formulações.

[003] Por outro lado, existem formulações de vacinas que utilizam todo o vírus e os vírus ativos, as quais têm demonstrado baixa patogenicidade no campo, ou com uma patogenicidade laboratorial atenuada, a qual, entretanto, quando administrada, causa uma reação antigênica suficiente para prover a proteção contra a mesma espécie de cepa viral que têm maior patogenicidade.

[004] Por exemplo, a doença Newcastle (ND por suas iniciais em Inglês) é de origem viral e altamente contagiosa, inclusive podendo ser letal. A referida doença afeta os pássaros domésticos e selvagens, causando alta morbidade e mortalidade. A ND é causada por um vírus pertencente à

família *Paramyxoviridae*, do gênero *Avulavirus*. De acordo com sua patogenicidade e sua extensão virulenta (de virulência), as cepas são classificadas como: lentogênica, mesogênica e velogênica, ou seja, baixa, média e alta patogenicidade, respectivamente ("Office International des Epizooties", 2008). "Newcastle Disease" - "OIE Manual of diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals", - Office International des Epizooties, France, p.576-589.

[005] Existem múltiplas fontes de transmissão para o vírus ND (NDV). Por exemplo, diretamente através dos pássaros vivos ou mortos e seus produtos ou subprodutos, ou indiretamente através de vetores, tais como, insetos infectados ou outros animais, incluindo o homem. O período de incubação para o tipo velogênica de NDV (VNDV, por suas iniciais em Inglês) causa alta mortalidade, e é de cerca de 21 dias, demonstrando sinais nervosos e/ou respiratórios, tais como, ofegar, espirros e falta de coordenação, eriçamento das asas ("bristled wings"), arraste das pernas, cabeça e pescoços deformados, tiques, deslocamento circular, depressão, falta de apetite, e paralisia completa. Adicionalmente, uma interrupção parcial ou completa da produção de ovos é demonstrada, ou ovos deformados ou tendo casca fina e áspera, contendo albumina aquosa.

[006] Uma das estratégias para controlar e prevenir a ND é o uso de vacinas antivirais, tipicamente produzidas a partir das cepas lentogênicas. As vacinas vivas contra a ND induzem proteção ao nível da mucosa respiratória, e têm sido utilizadas pela indústria por mais de 50 anos. Estas vacinas anti-virais são principalmente baseadas na utilização de

vírus lentogênicos obtidos das cepas Hitchner B1 e LaSota, a última sendo a vacina mais popular (*Op. Cit., Office International dês Epizzoties (2008) Newcastle*).

[007] Entretanto, os vírus ativos podem ser inativados através de componentes de uma emulsão, a estabilidade das vacinas ativas emulsionadas é limitada. Assim, elas são comumente utilizadas em outro tipo de formulações, ou, elas são liberadas para misturas *in situ*, o que dificultam sua aplicação na avicultura em ampla escala.

[008] O principal problema com os vírus ativos é que eles nem sempre podem ser utilizados como vacinas, devido a sua alta capacidade de variação genética, recombinação com outros vírus ativos, ou predisposição para alteração de sua patogenicidade, tal como o vírus influenza. O influenza é um vírus que causa uma doença respiratória que afeta a ambos, mamíferos e pássaros. A ocorrência de uma cepa de vírus influenza em uma determinada população pode ser severas consequência s para os indivíduos, para ambos, os pássaros domésticos e para os humanos ou outros animais. Quando o vírus infecta galinhas e mamíferos, ele muda rapidamente para se auto-adaptar a nova população, e durante dita adaptação desenvolvendo o processo, ele pode causar importantes mudanças biológicas no mesmo vírus, conduzindo aos resultados fatais para o hospedeiro e para a população de animais e de humanos.

[009] Particularmente, o influenza de aves (AI, por suas iniciais em inglês) é uma doença tendo uma etiologia viral altamente contagiosa causada por um vírus do tipo A, da família *Orthomyxoviridae*. Muitos vírus AI (AIV, por suas

iniciais em inglês) têm sido isolados de pássaros silvestres, particularmente, de pássaros aquáticos agindo como um reservatório e sendo veículos dos vírus AI de baixa patogenicidade (LPAIV, por suas iniciais em inglês). Quando estes vírus infectam um viral não natural, tal como, aves domésticas, principalmente *gallinaceae* (ou seja, galinhas, perus e codorna, entre outros), o vírus sofre mutações, para a forma altamente patogênica (HPAIV, por suas iniciais em inglês), através de um processo de adaptação.

[010] O AIV pode ser classificado de acordo com duas proteínas externas virais. A primeira é a hemaglutinina, de maior importância, como ele é responsável pela neutralização da resposta do anticorpo nos pássaros infectados ou vacinados, com 16 subtipos diferentes ou sorotipos tendo sido relatados. A segunda proteína é a neuraminidase, com 9 subtipos diferentes tendo sido relatados. Particularmente, o vírus mais importante para os pássaros são aqueles tendo os sorotipos hemaglutinina H5 e H7, os quais quando alterados para alta patogenicidade são capazes de produzir uma mortalidade próxima a 100%.

[011] Igualmente, a doença AI em pássaros demonstrou duas formas clínicas: a primeira sendo um influenza aviário de baixa patogenicidade (LPAI, por suas iniciais em inglês) causando uma doença intermediárias, algumas vezes expressas com um aspecto de penas defeituosas, uma diminuição na produção de ovos. Mas, AI é principalmente importante para os pássaros devido à capacidade de alta mutagenicidade do vírus, invariavelmente resultando na segunda forma clínica sendo um influenza aviário de alta patogenicidade (HPAI, por suas

iniciais em inglês) capaz de causar uma mortalidade próxima a 100%.

[012] Particularmente, os sinais clínicos de AI são variáveis, e são influenciados pelo subtipo viral envolvido, sua patogenicidade, o estado imune e a espécie de ave afetada. O período de incubação para o HPAIV é de 21 dias, e os sinais clínicos variam de conjuntivite, temperatura crescente caracterizada pelo eriçamento das asas, depressão, prostração e morte. Os danos mais frequentemente descritos são congestão de pulmão, hemorragias e edemas.

[013] Uma vez que AIV foi introduzida em uma fazenda de aves domésticas, isto é excretado para o meio através das fezes e fluidos respiratórios. A transmissão do vírus e difusão para outros pássaros é principalmente realizada através do contato direto com as secreções dos pássaros contaminados, especialmente, pelas fezes contaminadas, alimento, água, equipamento e roupas. A suscetibilidade para infecção e manifestação de sinais clínicos da doença é altamente variável.

[014] Para estes tipos de doenças, tendo um controle difícil e sendo uma vacina anti-viral pode envolver um risco para os animais e mesmo para a saúde dos humanos no caso do controle ser perdido durante sua administração, é preferido utilizar vacinas de vírus inativados, tipicamente emulsificados.

[015] Várias vacinas foram desenvolvidas na técnica para prevenir diversas doenças virais, tais como, acima descrita AI. Com relação a esta última doença já existe vacinas emulsificadas incluindo todo o vírus AI, e as quais são

produzidas em embriões de galinha. Este vírus é inativado e emulsificados em água-óleo para sua administração subcutânea ou intramuscular em pássaros comerciais ("*Office International dês Epizzoties*" (2008)). *Avian Influenza. OIE - Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties France, p. 465-481.*

[016] Mais particularmente, as vacinas feitas com o vírus AI inativadas, estimulam uma forte resposta imune ao nível sistêmico, e elas tem tido resultados positivos para controlar ambas as formas de AI. A vacinação é utilizada para ambos, prevenir os sinais clínicos da doença e, também, para reduzir, quanto possível, a excreção viral do pássaro infectado para o meio. A redução da excreção viral diminui a disseminação viral oportunista onde os pássaros vacinados tornam-se infectados, para pássaros suscetíveis não-infectados (Swayne, D., y Kapczynski, D (2008). *Vaccines, Vaccination and Immunology for avian influenza viruses in poultry. In Avian Influenza. Ed. By David Swayne. Blacwell Publishing, USA, p. 407-451*).

[017] Em adição, as vacinas de vírus inativadas emulsificadas têm uma estabilidade aumentada, permitindo um melhor manejo da vacina, e uma vida de prateleira mais longa. Portanto, as vacinas ND têm sido também formuladas como vírus inativado emulsificado.

[018] É importante considerar que uma das principais diferenças entre uma vacina de vírus ativos e uma vacina de vírus inativado é a quantidade de vírus requerida para se conseguir uma resposta antigênica quando administrado.

[019] Uma vez que o vírus ativo tenha sua capacidade intacta para replicar em célula, a quantidade do vírus relativa requerida na vacina é menor que a dose causadora de uma resposta antigênica, isto para prevenir que o vírus irá replicar naturalmente e uma vez dentro do organismo, ele reagirá em uma quantidade suficiente para se conseguir a resposta antigênica desejada.

[020] Por outro lado, as vacinas de vírus inativados requerem uma concentração muito maior do vírus que aquelas de vírus ativo geralmente, pelo menos 10 vezes maior, para se conseguir a mesma atividade antigênica, uma vez que o vírus tenha sido manipulado para remover sua capacidade de replicação, tal que, a quantidade total de antígeno requerida para causar a resposta imune deveria estar presente no período em que a vacina é administrada, quando o organismo não replica normalmente o vírus e, conseqüentemente, esta quantidade não aumente.

[021] Por outro lado, uma das muitas vantagens significantes no campo biotecnológico foi o uso de vacinas recombinantes. A capacidade para isolar e combinar (ou recombinar) os fragmentos específicos de DNA de um organismo, com um tamanho de gene, e para transferir eles a outros organismos por meio de um vetor ou plasmídeo de DNA para estimular uma produção de antígeno capaz induzir a formação de anticorpos protetores, conduziu à introdução de novas vacinas. Ao contrário das vacinas convencionas, a tecnologia recombinante provê muitas vantagens importantes em relação a doenças, tal como, o AI acima descrito, sendo que não existe a possibilidade de utilizar todo o vírus ativo, devido à sua

alta capacidade mutagênica e sendo que o uso de todo o vírus inativado sempre envolve um risco se o processo de inativação foi inadequadamente realizado. As vacinas recombinantes, em suas formas ativas, tiveram inserido os nucleotídeos necessários para expressar antígenos contra a doença relativa, pode ser administrado seguramente para induzir uma imunidade local ao nível da mucosa respiratória em um vetor viral ativo de uma doença de baixa patogenicidade, o que seria impossível utilizando um vírus vivo não-recombinante devido aos riscos envolvidos.

[022] Uma outra vantagem das vacinas recombinantes é que o vetor viral empregado, tipicamente não corresponde a doença da qual ela tem que proteger, o que facilita seu uso no campo do diagnóstico veterinário e, nas técnicas de prevenção do tipo que permite diferenciar os animais vacinados dos animais infectados, a mais conhecidas são a estratégia DIVA (Capua, I., et al., *"Development of a Diva (differentiating infected from vaccinated animals) usando uma vacina contendo uma neuraminidase heteróloga para o controle do influenza de aves"*. Avian Pathology 32 (1) PP. 47-55).

[023] Assim, as vacinas atualmente utilizadas para controlar AI (emulsificadas em óleo, com todo vírus inativado), e outras doenças similares, previnem a mortalidade causada pelo HPAIV, mas não evita a infecção e replicação do AIV em pássaros, portanto, a diminuição em excreção e disseminação do vírus é parcialmente conseguida.

[024] Portanto, os vetores virais foram desenvolvidos na técnica anterior em doenças de baixa patogenicidade, tal como Newcastle, tendo inserido genes codificantes para sítios

antigênicos de difícil controle da doença, tal como influenza de aves. Este é o caso do documento Ge. Deng. Tian et al., "Newcastle disease vírus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice", J. Vir. Vol. 81, No. 1, p. 150-158", o qual descreve uma vacina recombinante na forma ativa. Particularmente, dito documento descreve o resultado das triagens clínicas utilizando a cepa LaSota tendo um gene de influenza de aves de subtipo H5N1.

[025] Um outro documento da técnica anterior, a partir do mesmo campo é Park, Man Seong et al. "Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian Influenza and Newcastle disease". PNAS Vol. 103, No. 21, 12 de maio de 2006, p. 8203-8208. O referido documento está relacionado a uma tecnologia que aumenta a expressão do gene influenza de aves, a referida tecnologia aqui descrita é chamada de "ancoragem".

[026] Apesar de algumas vacinas recombinantes terem sido substituídas por vacinas de vírus ativo devido às vantagens acima mencionadas, as vacinas recombinantes não têm alcançado ainda as vantagens de vacinas com todos vírus inativado e, acima de tudo, elas não têm sido capazes de prover uma imunidade própria com relação ao gene exógeno inserido, principalmente, devido ao fato de que as vacinas recombinantes, tais como Newcastle com influenza acima descrita, causam atividade antigênica contra ambas as doenças, mas requerem uma exposição maior dos sítios antigênicos exógenos sendo inseridos no vetor. Como uma consequência, o desenvolvimento de tecnologias tem sido perseguido, tal como ancoragem, por meio de modificações

genéticas como no caso do vírus influenza acima descrito, resultando em uma melhora expressão do antígeno, no vetor viral. Entretanto, as referidas tecnologias não tem sido um sucesso total.

[027] Assim, as vacinas recombinantes obtidas de vírus ativos são tipicamente formuladas com uma concentração viral de cerca de 10 vezes maior que aquela utilizada para a vacina não-recombinante obtida do vírus ativo, correspondendo ao vetor viral sendo utilizado, com o propósito de alcançar uma exposição apropriada dos sítios antigênicos do micro-organismo em questão.

[028] Da mesma forma, as vacinas recombinantes não têm sido utilizadas na forma inativada, uma vez que implicaria em se conseguir concentrações de vetor viral, 100 vezes maiores que àquelas requeridas para o vírus normal (10 vezes maior que a do vírus ativo recombinante), o que seria muito complicado a nível industrial. Consequentemente, em geral, estas vacinas de vírus ativo recombinante têm tanto sido utilizadas como emulsões, devido a sua estabilidade limitada quanto devido à emulsão não ser vantajosa neste sentido, devido à natureza ativa do vetor viral ativo.

[029] Resumidamente, pode ser visto a partir da descrição acima, que há uma necessidade maior para vacinas contra diversas doenças pela tecnologia recombinante, de uma maneira segura e eficiente, de modo que uma estabilidade melhor seja conseguida nas vacinas produzidas, com controle apropriado e resultados eficazes.

Breve descrição da invenção

[030] Apesar do desenvolvimento da presente invenção, foi

inesperadamente descoberto que uma vacina compreendendo um vetor viral recombinante inativado, tendo inserido uma sequência de nucleotídeo exógena, codificante pra um sítio antigênico, de uma doença relacionada; e, um veículo emulsificado farmaceuticamente aceitável, um adjuvante ou excipiente, provêem a devida proteção contra a referida doença relacionada pelo uso de um título similar de um vetor viral que é requerido para uma vacina de vírus ativo recombinante com base no mesmo vetor viral.

[031] Em uma concretização da invenção, a sequência de nucleotídeo exógena é selecionada a partir de sequências de sítios antigênicos contra influenza, laringotraqueítes infecciosas, bronquite infecciosa, infecção da bursa de Fabrícus (Gumboro), hepatite, rinotraqueíte viral, coriza infecciosa, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pasteurelosi, Síndrome respiratória e reprodutiva de suínos (PRRS), circovírus, bordelose, parainfluenza, ou qualquer outro antígeno cujo tamanho permita sua inserção dentro do vetor viral correspondente. Preferivelmente, é utilizado um antígeno selecionado do vírus influenza, laringotraqueítes, bronquite infecciosa, infecção da bursa de Fabrício (Gumboro), hepatite, PRRS, e circovírus.

[032] Em uma concretização específica da presente invenção, a sequência de nucleotídeos exógena consiste do gene codificante para hemaglutinina (HÁ) do vírus influenza de aves, selecionado a partir de 16 subtipos de hemaglutinina ou de uma variante imunogênica do vírus influenza, o qual mais preferivelmente codifica pelo menos um dos subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7 ou H9 da referida proteína.

[033] Em uma concretização específica da invenção, a proteína do gene H5 é obtida do subtipo H5N2 do vírus influenza de ave do México, ou a partir do subtipo H5N1 originado na Ásia, observando a proteção excelente de ambos os subtipos contra a mortalidade induzida pelo subtipo H5N2, de HPAIV.

[034] Com relação ao vetor viral da presente invenção, na concretização preferida, sendo que o vírus da doença Newcastle (rNDV) corresponde ao vetor viral tendo inserido a sequência de nucleotídeos exógena, dito vetor viral sendo preferivelmente selecionado de cepas de vacinas, tais como as cepas LaSota, Ulster, QV4, B1, CA2002, Roakin, Kimarov, Clone 30, ou VGGA, ou cepas obtidas de grupos genéticos de doenças Newcastle: grupos I a V. Preferivelmente, o vírus recombinante é a cepa LaSota (rNDV/LS).

[035] Igualmente, em uma concretização específica adicional, onde o vetor viral é um adenovírus, o adenovírus é selecionado de adenovírus de aves e de suínos e, mais preferivelmente, de um adenovírus tipo 9 de ave (rFAdV/9) e do adenovírus tipo 5 de suínos (rSAdV/5).

[036] De acordo com os resultados obtidos detalhados abaixo, é concluído que por meio da presente invenção é possível utilizar uma sequência de nucleotídeo exógeno codificante para os determinantes antigênicos específicos de uma doença relacionada, em um vetor viral para produzir uma vacina de vírus inativado recombinante em uma emulsão ou em outros adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis.

[037] O resultado conseguido com a vacina da presente invenção (rNDV/LS-H5) é inesperado, uma vez que

tradicionalmente acredita-se no case das vacinas recombinantes no vetor viral, a replicação do vetor viral em células hospedeiras é requerida para se conseguir expressão de proteína recombinante suficiente para estimular uma resposta imunogênica apropriada, entretanto, na presente invenção, o resultado obtido mostra que a proteína antigênica da doença relativa é suficiente e adequadamente expressa na superfície do vírus do vetor, e apenas sua presença na forma inativa capacita uma resposta antigênica e protetora apropriada contra a referida doença relacionada.

[038] Particularmente, no caso de alta patogenicidade e dificuldade em controlar as doenças, tais como influenza de aves, uma vantagem da vacina recombinante da presente invenção é que o vírus todo não é utilizado, suprimindo, desse modo, o risco de um ataque de uma inativação inapropriada do vírus vacinal. Além disso, a vacina da presente invenção consegue uma resposta imune local ao nível da mucosa respiratória de pássaros, bem como uma resposta imune ao nível sistêmica, capaz de ser diferenciado através dos testes de laboratório específico, a partir das respostas imunes induzidas pelo contato do pássaro com todo o vírus, tanto de vacina quanto do tipo selvagem, representando um avanço importante no campo epidemiológico.

[039] A vacina é formulada para ser administrada subcutaneamente, entretanto, qualquer rota sistêmica tal como intramuscular ou intradérmica pode ser utilizada como sucesso. Um veículo líquido para a vacina é preferivelmente utilizado, mais preferivelmente, uma emulsão água-óleo é utilizada, mas ela tem também sucesso na utilização de outro

tipo de adjuvante de resposta imune ou moduladores.

[040] Com a vacina recombinante da presente invenção, diminui a excreção do vírus do tipo selvagem ao meio, contribuindo, desse modo, para reduzir grandemente a disseminação do vírus.

Breve descrição das figuras

[041] Os novos aspectos considerados característicos da presente invenção serão particularmente representados nas reivindicações anexas. Entretanto, a vacina da presente invenção, junto com outros objetivos e vantagens da mesma, serão melhor entendidos a partir da descrição detalhada a seguir de determinadas concretizações específicas, quando lidas com relação aos desenhos anexos, nos quais:

[042] A figura 1 ilustra uma organização dos resultados de mortalidade (M) e do índice de mortalidade (MI), do Exemplo 6A, produzido pela infecção com uma velogênica NDV (VNDV);

[043] A figura 2 ilustra uma organização dos resultados de mortalidade (M) e do índice de mortalidade (MI) do Exemplo 6A, produzido pelo experimento com um vírus de alta patogenicidade (HPAIV) do subtipo H5N2;

[044] A figura 3 ilustra uma organização dos resultados de mortalidade (M) e o índice de morbidez (MI), do exemplo 6B, produzido pelo experimento com um VNDV;

[045] A figura 4 ilustra uma organização dos resultados de mortalidade (M) e do índice de morbidez (MI), a partir do exemplo 6B, produzido através de uma infecção com um HPAIV, do sub-tipo H5N2;

[046] A figura 5 ilustra uma organização dos resultados

de mortalidade (M) e do índice de morbidez (MI), a partir do exemplo 6C, produzido através da infecção com um VNDV;

[047] A figura 6 ilustra uma organização dos resultados de mortalidade (M) e do índice de morbidez (MI), a partir do exemplo 6C, produzido através da infecção com um HPAIV, subtipo H5N2;

[048] A figura 7 ilustra uma organização dos resultados de mortalidade (M) e do índice de morbidez (MI), a partir do exemplo 6D, produzido através da infecção com um VNDV;

[049] A figura 8 ilustra uma organização dos resultados de mortalidade (M) e do índice de morbidez (MI), a partir do exemplo 6D, produzido por meio de uma infecção com um HPAIV, subtipo H5N2;

[050] A figura 9 ilustra uma organização dos resultados da neutralização vírus-soro (VSN), a partir do exemplo 13A, produzido por meio de uma infecção com um adenovírus, subtipo 5;

[051] A figura 10 ilustra uma organização dos resultados da titulação da neutralização vírus-soro (VSN), a partir do exemplo 13A, produzido por meio da infecção com uma cepa do vírus GET Purdue; e

[052] A figura 11 ilustra uma organização dos resultados da neutralização vírus-soro (VSN), a partir do exemplo 13A, produzido por meio de uma infecção com um adenovírus, subtipo 5 e uma cepa do vírus GET Purdue.

Descrição detalhada da invenção

[053] Apesar do desenvolvimento da presente invenção, foi inesperadamente verificado que uma vacina compreendendo um vetor viral inativado, tenso inserido uma sequência de

nucleotídeo codificante de uma doença relacionada; e, um veículo farmacêuticamente aceitável, adjuvante ou excipiente, providos devido a proteção contra a doença relacionada pelo uso de uma titulação similar do vetor viral àquela requerida para uma vacina de vírus ativo com base no mesmo vetor viral.

[054] Na presente invenção é essencial que o vetor viral seja inativado, inativado significando que o vírus recombinante haja como um vetor viral e contendo a sequência de nucleotídeo codificante para o sítio antigênico da doença relacionada, tendo perda da propriedade de replicação. A inativação é conseguida pelos procedimentos físicos ou químicos bem conhecidos do estado da técnica; preferivelmente, pela inativação química com formaldeído ou beta-propiolactona (Office International des Epizooties (2008)). Newcastle Disease - OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties. France. P. 576-589. Ao contrário, um vírus vivo ou ativo significa manter sua capacidade de replicação.

[055] O vetor viral, preferivelmente selecionado de adenovírus ou paramixovírus, é inativado e tem inserida uma sequência de nucleotídeo exógena codificante para pelo menos um sítio antigênico de uma doença relacionada, preferivelmente, pelo menos uma doença selecionada de influenza, laringotraqueíte infecciosa, bronquite infecciosa, infecção da bursa de Fabricius (Gumboro), hepatite, rinotraqueíte viral, coriza infecciosa, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pasteurelose, síndrome respiratória e reprodutiva de suínos (PRRS), circovírus, bordetelose, parainfluenza ou qualquer outro antígeno que o tamanho

permita sua inserção dentro do vetor viral correspondente. Mais preferivelmente, um antígeno selecionado de influenza de aves, laringotraqueítes, bronquite infecciosa, infecção da bursa de Fabricius (Gumboro), hepatite, PRRS, e circovírus, forem utilizados.

[056] Em uma concretização específica da presente invenção, a sequência de nucleotídeo exógena consiste de um gene codificante de hemaglutinina (HÁ) do vírus influenza de aves, selecionado de 16 subtipos de hemaglutinina ou variante imunogênica do vírus influenza, que mais preferivelmente codifica para pelo menos um subtipo H1, H2, H3, H5, H6, H7 ou H9, da referida proteína.

[057] Com relação ao vetor viral da presente invenção, na concretização preferida, onde o vírus da doença Newcastle (rNDV) corresponde ao vetor viral onde a sequência de nucleotídeo exógena é inserida, dito vetor viral é preferivelmente selecionado de cepas de vacinas, tais como as cepas de LaSota, Ulster, QV4, B1, CA 2002, Roakin, Komarov, Clone 30, e cepas VGGA, ou cepas de grupos genéticos I a V da doença Newcastle. Preferivelmente, o vírus recombinante é da cepa LaSota (rNDV/LS).

[058] Igualmente, em uma concretização adicional, onde o vetor viral é um adenovírus, o adenovírus é selecionado de adenovírus de aves e suínos, e mais preferivelmente, de um adenovírus de ave do tipo 9 (rFAdV/9) e um adenovírus de suíno do tipo 5 (rSAdV/5).

[059] Com relação ao sítio antigênico, quando o influenza é a doença relacionada, o sítio antigênico correspondente à proteína da hemaglutinina (HA) do influenza de ave é

preferido, preferivelmente obtendo um gene do vírus influenza de aves, e codificante de qualquer um dos 16 subtipos existentes, preferivelmente H5, H7 e H9, preferivelmente, codificante para o subtipo H5, o qual é, preferivelmente, obtido das cepas Bive, 435 e Viet (VT), descritas abaixo. Neste sentido, pode ser deduzido que a cepa fonte do gene codificante para HA, subtipo H5, não é crítica para a presente invenção uma vez que os resultados experimentais demonstram que qualquer cepa pode prover o material genético útil para se conseguir os resultados da presente invenção.

[060] Com relação as fontes de gene preferidas, é importante mencionar que o gene H5 obtido da cepa Bive corresponde ao LPAIV-H5N2 isolado no México em 1994, a partir de amostras biológicas de frangos para consumo ("broilers"), e tendo sido identificados pelo governo Mexicano como (A/chicken/Mexico/232/CPA). A referida cepa de vírus é autorizada pela "Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SABARPA, por seu acrônimo Espanhol)", por seu uso na fabricação de vacinas inativadas emulsificadas, assim, a recombinação deste vírus co o gene relativo também garante uma biossegurança na vacina recombinante da presente invenção.

[061] Com relação a segunda fonte de material genético preferida, o gene H5-435, este foi obtido a partir do isolamento de uma amostra LPAIV-H5N2, isolado no México em 2005, a partir de amostras biológicas de frangos para consumo ("broilers").

[062] O vetor viral da vacina da presente invenção pode ser preparado por uma amplificação de PCR da sequência de

nucleotídeos de interesse, por meio da identificação dos sítios antigênicos de um isolamento do patógeno de origem, para ser inserido adicionalmente, amplificado no vetor viral, preferivelmente, selecionado de adenovírus ou paramixovírus. A inserção é feita utilizando técnicas de biologia molecular padrão, tal como enzimas de restrição e DNA ligases, entre outras. O clone infeccioso assim produzido é introduzido dentro de uma linha celular para a produção do vírus recombinante de acordo com o vetor viral.

[063] Dependendo da natureza do vetor viral, o vírus replica em qualquer sistema de crescimento apropriado, tal como embriões de galinha SFP, ou linhas de células comerciais, ou um meio especificamente construído para o crescimento do vírus.

[064] Uma vez que a concentração do vírus requerida para se conseguir a resposta antigênica é conseguida, preferivelmente entre 10^2 e 10^{10} EID₅₀ por ml (10^2 e 10^{10} DI₅₀/ml), dependendo do vetor viral utilizado, a inativação do vírus procede. Preferivelmente, a inativação é realizada por meio de procedimentos físicos ou químicos bem conhecidos do estado da técnica, preferivelmente, por inativação química com formaldeído ou beta-propiolactona.

[065] Os veículos farmacêuticamente aceitáveis para as vacinas da presente invenção são preferivelmente soluções aquosas ou emulsões. Mais particularmente, o uso de um veículo em emulsão água em óleo é preferido. A formulação de vacina específica irá depender do vetor viral utilizado, bem como da sequência de nucleotídeos exógena tendo sido inserida. Entretanto, na concretização preferida, sendo o

vetor viral um vírus da doença Newcastle, a dose preferida está entre 10^4 e 10^{10} EID₅₀ por ml (10^4 e 10^{10} DIEP50%/ml). Na concretização onde um adenovírus é o vetor viral, a dose preferida está entre 10^2 e 10^8 EID₅₀ por ml (10^2 e 10^8 DIEP50%/ml).

[066] Com relação à administração da vacina, esta é preferivelmente administrada por meio de rota subcutânea na porção intermediária próxima do pescoço do pássaro. A vacina da presente invenção é administrada às galinhas, tais como, frangos, pássaros de postura ("laying birds"), pássaros de reprodução, perus, galos de briga, ave doméstica da Guiné, perdiz, codorna, patos, ganso, cisne ou avestruz. Preferivelmente, a vacina é administrada subcutaneamente, apesar de em determinadas espécies ela poder ser administrada intramuscularmente, em pássaros de qualquer idade.

[067] Quando a vacina é aplicada em galinhas em vetor Newcastle emulsificado, a vacina contém, preferivelmente, de 10^8 a 10^9 EID₅₀ por ml (10^8 a 10^9 DIEP50%/ml) por galinha e, mais preferivelmente, a vacina contém $10^{8,5}$ EID₅₀ por 0,5 ml ($10^{8,5}$ DIEP50%/0,5 ml) por galinha. A vacinação nas galinhas pode ser facilmente feita com 10 dias de idades.

[068] A presente invenção provê vantagens competitivas muito importantes. A vacina inativa recombinante da presente invenção torna possível estabelecer o programa de vacinação exclusivamente utilizando vacinas recombinantes em vetor viral e com a inserção de genes dos agentes patógenos de difícil controle, o que resulta em um método de identificação dos animais infectados dos animais tendo recebido apenas uma vacina (DIVA), útil no controle da doença e da erradicação,

compreendendo:

(a) submeter a um primeiro método de detecção de anticorpos, pelo menos uma amostra de pelo menos um animal tendo recebido uma vacina recombinante do vetor viral inativado tendo inserida uma sequência de nucleotídeos exógena codificante para um antígeno de uma doença causada por um patógeno, para detectar se existem anticorpos presentes na referida amostra correspondente ao citado antígeno;

(b) submeter a um segundo método de detecção de anticorpos, pelo menos uma amostra obtida do mesmo animal que a amostra que foi submetida ao primeiro método de detecção de anticorpos, para detectar se existem anticorpos presentes na citada amostra correspondente ao patógeno causador da doença; e

(c) determinar se o animal foi infectado ou vacinado a partir dos resultados do primeiro e do segundo métodos de detecção.

[069] Por exemplo, quando o patógeno for difícil de controlar, tal como AIV, principalmente H5 e H7, causando alta mortalidade em aves domésticas, com a vacina inativada recombinante da presente invenção, um excelente nível sistêmico de proteção é conseguido, oferecendo também uma biossegurança de alto grau comparada com o uso de todo o vírus A1 constituindo um risco severo no caso de não ter sido propriamente inativado. Este risco aumenta durante o processo de fabricação onde o vírus está ativo. A presente invenção também permite a diferenciação epidemiológica dos pássaros vacinados de outros pássaros expostos a todo o vírus (sistema DIVA), uma vez que quando apenas o gene da hemaglutinina (HA)

do vírus influenza de ave foi inserido, o teste de laboratório utilizado para detectar os anticorpos induzidos por vacina contra o influenza de ave é a inibição da hemaglutinação (HI). Os testes imunológicos atuais, tal como ELISA e outros testes como difusão em agar gel, são negativos para a detecção de anticorpos contra o influenza de aves induzido pela vacina recombinante da presente invenção, quando eles são construídos para detectar os anticorpos induzidos por outros tipos de antígenos contidos no vírus todo. Quando os pássaros vacinados com a vacina recombinante da presente invenção são infectados com o vírus do tipo selvagem, estes testes são positivos para detecção dos anticorpos contra o vírus influenza de aves, desse modo, os pássaros infectados podem ser distinguidos.

[070] Adicionalmente, a presente invenção permite estabelecer programas ligados exclusivamente utilizando as vacinas recombinantes em uma forma inativa e ativa, o primeiro irá resultar em uma imunidade sistêmica acima mencionada, e a vacina ativa recombinante irá complementar a imunogenicidade ao nível da mucosa, resultando em proteções iguais ou próximas a 100% em um nível selvagem. Com este programa, o sistema DIVA, acima mencionado, também é utilizado.

[071] Na concretização preferida da presente invenção, onde o vetor recombinante da vacina inativada emulsificada é Newcastle com um gene influenza inserido, para ambos os experimentos, com VNDV e HPAIV, esta pode ser administrado simultaneamente com uma vacina ativa com o mesmo vetor e antígeno, diretamente à mucosa respiratória, tanto por rota

ocular, quanto por pulverização, ou em água de beber, de modo que o nível da resposta local seja altamente estimulado (no mucosa respiratória ou digestiva) produzindo uma imunoglobulina secretora, tipo A (IgA), diminuindo, significativamente, desse modo, a replicação viral do tipo selvagem, reduzindo, significativamente, sua excreção e disseminação.

[072] Por outro lado, a vacina da presente invenção permite estabelecer os programas de controle e possível erradicação por diferenciação dos vacinados a partir de pássaros infectados, uma vez que é possível, quando administrada a vacina inativada recombinante da presente invenção, para diferenciar os pássaros vacinados dos pássaros infectados com o vírus do tipo selvagem (Sistema DIVA), uma vez que as vacinas recombinantes contêm apenas a hemaglutinina AIV como antígeno, permitindo o uso de testes de diagnósticos, tais como, ELISA, o qual detecta os anticorpos induzidos por outros antígenos virais, e não apenas aqueles induzidos pela hemaglutinina.

[073] A vacina recombinante contra influenza da presente invenção será mais claramente ilustrada por meio da descrição a seguir de exemplos específicos, os quais são providos apenas como o propósito ilustrativo, e não para limitar a invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1:

Produção do vetor Newcastle-LaSota

[074] De modo a clonar o genoma da cepa de LaSota do vírus Newcastle e desse modo produzir um vetor viral,

primeiramente, um vetor intermediário chamado "pNDV/LS" foi produzido. Uma extração de RNA viral total foi realizada para a cepa Newcastle-LaSota por meio do método triazol. A síntese do cDNA (DNA complementar) foi feita a partir do RNA purificado do genoma viral, usando o RNA total previamente purificado como um padrão. Com o propósito de clonar todos os genes do genoma Newcastle (15, 183 pares de base (bp)), 7 fragmentos tendo "sobreposição" finais e sítios de restrição coesos foram amplificados por PCR. O fragmento 1 (F1) compreende de 1-1755 nucleotídeos (NT), F2 de 1-3321 nucleotídeo, F3 compreende de 1755-6580 nt, F4 de 6, 151-10.210, F5 compreende de 7.381-11,351 nt, F6 de 11,351-14.995 nt e F7 compreende de 14.701-15.186 nt. O arranjo dos 7 fragmentos foi realizado em um vetor de clonagem chamado pGEM-T usando técnicas de ligação padrão, reconstruindo desse modo o genoma Newcastle-LaSota, o que após a clonagem tem um sítio de restrição único SacII, entre os genes P e M, servindo para clonar qualquer gene relacionado nesta região do vetor viral.

Exemplo 2:

Clonagem do gene HA dos subtipos H5N2 435 do AIV 435

[075] A extração do RNA viral total foi realizada para clonar o gene HA da cepa AIV 435 pelo método triazol. Este RNA total purificado foi utilizado depois para sintetizar o cDNA (DNA complementar), e pela técnica de PCR, o gene HÁ do vírus AI foi amplificado utilizando oligonucleotídeos específicos. O gene HA do 435 foi então inserido dentro do vetor pGEM-T, usando técnica de clonagem padrão e produção de plasmídeo: p-GEMT-435.

Exemplo 3:

[076] Clonagem do gene HA de AI 435 dentro do sítio SacII do vetor pNDV/LS para produzir o plasmídeo: pNDV/LS-435

A. Produção do vetor intermediário pSacIIGE/GS.

[077] Um novo vetor intermediário chamado pSacIIGE/GS foi construído para introduzir as sequências de transcrição do Newcastle chamado GE/GS na extremidade 5' do gene HA 435, através da amplificação inicial PCR das sequências GE/GS, tomando o genoma Newcastle como um padrão e a última inserção destas sequências no pGEM-T.

B. Subclonagem do gene HA para o vetor pSacIIGE/GS.

[078] O plasmídeo pGEMT-435 foi digerido com HpaI-NdeI e clonado ainda dentro de pSacIIGE/GS, para produzir o plasmídeo pSacIIGE/GS-HA435.

C. Subclonagem de GE/GS-HA435 para o vetor pNDV-LS.

[079] Ambos os plasmídeos: pSacIIGE/GS-HA435 e pNDV/LS, foram digeridos com SacII, os produtos de digestão foram purificados e a região do GE/GS-HA435 foi purificada e inserida dentro do sítio SacII de pNDV/LS, produzindo, desse modo, o clone infectivo chamado pNDV/LS-435.

Exemplo 4:

Produção de vírus recombinante rNDV/LS-HA435 em cultura de célula

[080] As células Hep-2 e A-549 foram inicialmente infectadas com vírus MAV-7 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1. Após incubação por 1 hora a 37°C em 5% de atmosfera CO₂, as células foram transfectadas com 1 micrograma (µg) do DNA do clone pNDVLS-435, com 0,2 µg do DNA a partir dos plasmídeos de expressão: pNP, PP e pL, os quais

codificam para as proteínas virais P, NP e L, necessárias para produzir o recombinante em ambos os tipos de célula. 12 horas após a transfecção, o vírus recombinante produzido em ambos os tipos de célula foi recolhido e injetado em embriões de galinha SPF com 10 dias de idade para amplificar o vírus produzido. O alantóide líquido recolhido 48 horas mais tarde, foi titulado pelo ensaio de placas em células Vero, produzindo desse modo o vírus recombinante final, utilizado para preparar a vacina.

[081] O vírus recombinante tendo os genes obtidos a partir das cepas Bive e Viet foram produzidos como descrito acima.

Exemplo 5:

[082] Método de fabricação para vacina inativada emulsificada com o vírus recombinante Newcastle-LaSota tendo H5 inserido no vírus influenza de ave: rNDV/LS-H5.

Produção de antígeno:

[083] Iniciando na produção de semente, os ovos embrionados de galinhas, livres de patógenos específicos (SPF), foram inoculados com a dose de infecção previamente determinada. Os embriões foram incubados a 37°C por 72 horas, checando a mortalidade diária. Após este período, os embriões vivos foram refrigerados de um dia ao próximo dia, preferivelmente, durante 24 horas, e o fluido aminioalantóide (FAA, por seu acrônimo em espanhol) foi recolhido assepticamente. O FAA foi clarificado por centrifugação e foi inativado com formaldeído, apesar de qualquer outro agente conhecido de inativação, poder ser comumente utilizado na produção deste tipo de vacinas. O FAA foi submetido aos

testes de confirmação, sua inativação, pureza, esterilidade e titulação para ambos, o DIEP e HA.

Produção de emulsão:

[084] A vacina foi preparada em um tipo de emulsão água em óleo. O óleo mineral e surfactantes tipo Span 80 e Tween 80 foram utilizados na fase oleosa. Para preparar a fase aquosa, o FAA foi misturado com uma solução conservante (timerosol). Para preparar a emulsão, a fase aquosa foi adicionada lentamente para a fase oleosa com agitação constante. Um moinho homogeneizador ou coloidal foi utilizado para alcançar o tamanho de partícula especificado.

Conteúdo antigênico:

[085] A vacina foi formulada para resultar em um mínimo de $10^{8,5}$ EID₅₀ por 0,5 ml ($10^{8,5}$ DIEP50%/0,5 ml), de modo a utilizar uma dose de 0,5 ml por pássaro.

[086] Com base na produção acima, seis vacinas recombinantes foram produzidas: três tendo o vetor com a cepa Newcastle-LaSota (rNDV/LS) com HA ancorando para o vírus AI, chamado (Rd), e três mais tendo o mesmo vetor, mas sem a ancoragem, chamada (Re); os genomas Rd e Re de cada um foi clonado com três genes HA diferentes indicados abaixo para obter as 6 vacinas:

1) Gene H5-Bive: Obtido a partir da cepa LPAIV, subtipo H5N2 (A/galinha/Mexico/232/CPA), isolado no México em 1994 a partir das amostras biológicas grelhadas, e correspondentes a cepa viral autorizada por SABARPA para produzir as vacinas inativadas emulsificadas.

2) Gene H5-435: obtido de um isolamento de HPAIV, subtipo H5N2, isolado no México em 2005, a partir de amostras

biológicas grelhadas, a cepa 435 mostrou características antigênicas diferenciais nos testes de inibição de hemaglutinina (HI) com a cepa Bive, e mudanças importantes no sequenciamento de nucleotídeos.

3) Gene H5-Vt: Este gene foi isolado no Vietnã e corresponde ao gene H5 de um vírus AI, subtipo H5N1.

EXEMPLO 5A:

[087] Uma emulsão, inativada, recombinante, com ancoramento (Rd), e gene H5-Bive, no vetor (rNDV/LS, da vacina experimental foi produzido de acordo com o método descrito no Exemplo 5, como uma fórmula farmacêutica água/óleo, a qual foi chamada Emi Rd-Bive.

EXEMPLO 5A:

[088] Uma emulsão, inativada, recombinante, com ancoramento (Rd), e gene H5-Bive, no vetor (rNDV/LS), da vacina experimental foi produzido de acordo com o método descrito no Exemplo 5, como uma fórmula farmacêutica água/óleo, a qual foi chamada Emi Rd-Bive.

EXEMPLO 5B:

[089] Uma emulsão, inativada, recombinante, com ancoramento (Rd), e gene H5-435, no vetor (rNDV/LS), da vacina experimental foi produzido de acordo com o método descrito no Exemplo 5, como uma fórmula farmacêutica água/óleo, a qual foi chamada Emi Rd-435.

[090] EXEMPLO 5C:

[091] Uma emulsão, inativada, recombinante, com ancoramento H5-Vt, no vetor (rNDV/LS), da vacina experimental foi produzido de acordo com o método descrito no Exemplo 5, como uma fórmula farmacêutica água/óleo, a qual foi chamada

Emi Rd-Vt.

EXEMPLO 5D:

[092] Uma emulsão, inativada, recombinante, sem ancoramento e gene H5-Bive, no vetor (rNDV/LS), da vacina experimental foi produzido de acordo com o método descrito no Exemplo 5, como uma fórmula farmacêutica água/óleo, a qual foi chamada Emi Re-Bive.

EXEMPLO 5E:

[093] Uma emulsão, inativada, recombinante, sem ancoramento e gene H5-435, no vetor (rNDV/LS), da vacina experimental foi produzido de acordo com o método descrito no Exemplo 5, como uma fórmula farmacêutica água/óleo, a qual foi chamada Emi Re-435.

EXEMPLO 5F:

[094] Uma emulsão, inativada, recombinante, sem ancoramento e gene H5-Vt, no vetor (rNDV/LS), da vacina experimental foi produzido de acordo com o método descrito no Exemplo 5, como uma fórmula farmacêutica água/óleo, a qual foi chamada Emi Re-Vt.

Exemplo 6:

[095] Análise da potência *in vivo* para as vacinas recombinantes, no vetor ND-LaSota com e sem ancoramento para o gene HA do vírus AI.

[096] De modo a determinar se a eficácia das vacinas inativadas recombinantes emulsificadas da presente invenção tenha sido determinada, e demonstrar que estas podem ser produzidas com diferentes genes de hemaglutinina clonados a partir de diferentes subtipos antigênicos e variantes do vírus AI, sua eficácia para prevenir a mortalidade causada

pelo vírus HPAI, subtipos H5N2 e VNDV nos pássaros SPF e, por outro lado, em frangos para consumo comercial tendo imunidade parental para AIV e NDV, foi testada.

[097] As cepas utilizadas nos diferentes experimentos de interesse para medir a eficácia da vacina foram como a seguir:

(1) Influenza de ave (HPAIV-H5N2): vírus de alta patogenicidade, subtipo H5N2, cepa A/galinha/Querétaro/14588-19/95 com titulação de $10^{8,0}$ EID₅₀ por ml ($10^{8,0}$ DIEP50%/ml), equivalente a 100 DL₅₀ por 0,3 ml por galinha (100 DLP50%/0,3 ml/galinha).

(2) Vírus VNDV: Cepa Chimalhuacan contendo $10^{8,0}$ EID₅₀ por ml ($10^{8,0}$ DIEP50%/ml), equivalente a $10^{6,5}$ EID₅₀ por 0,3 ml por galinha ($10^{6,5}$ DIEP50%/0,3ml/galinha).

[098] Os experimentos de interesse foram feitos em galinhas com 35 dias de idade (21 dias pós-vacinação -DPV-) em unidades de isolamento a INIFAP-CENID-Microbiologia, em cabines de isolamento acrílicas tendo um nível de biossegurança 3. Para os experimentos, cada grupo experimental foi dividido em dois subgrupos, e cada subgrupo foi designado em uma unidade de isolamento correspondente para o procedimento de biossegurança pré-estabelecido.

[099] HPAIV-H5N2 foi diluído em uma proporção de 1:10, com PBS em pH 7,2 e 0,06 ml (2 gotas) foi administrada a cada uma das galinhas em cada olho, e 0,09 ml (3 gotas) em cada narina, equivalente a 0,3 ml ou 100 EID₅₀. (100 DLP50%).

[100] O experimento de interesse do vírus VNDV foi feito por administração via ocular a cada galinha, de 0,03 ml de uma suspensão viral contendo $10^{8,5}$ EID₅₀ ($10^{8,5}$ DIEP50%),

equivalente a $10^{6,5}$ EID₅₀ por pássaro ($10^{6,5}$ DLP50%/pássaro).

[101] Para a análise pós-experimento (PC), todos os grupos foram diariamente checados para registrar a mortalidade e morbidade, incluindo a severidade de sinais clínicos, monitoramento de pássaros individualmente em cada um dos grupos a cada dia de PC (DPC), designando a eles valores numéricos de acordo com o critério na Tabela 1:

TABELA 1

Valores para registro da mortalidade e morbidade

Sinais clínicos	Medianos	Severos
Sem sinais clínicos aparentes	0	
Conjuntivite	1	2
Conjuntivite + penas eriçadas	3	4
Conjuntivite + penas eriçadas + prostração	5	6
Morte	7	

[102] A análise PC com VNDV foi realizada por 14 dias, enquanto a análise PC com HPAIV-H5N2 foi realizada por 10 dias de acordo com o gui sugerido por OIE.

[103] O índice de Morbidade (MI) para cada grupo foi calculado por uma equação obtida dos dados correspondentes para o dia dos sinais clínicos mais severos durante o período de observação PD.

$$MI = \frac{(A) (100)}{B}$$

Onde:

A = a soma de todos os valores individuais para os danos severos em um dia de observação

B = valor máximo possível de severidade da condição clínica em um dia.

Os experimentos como realizado estão descritos abaixo.

EXEMPLO 6A:

[104] Os experimentos foram feitos com um VNDV e HPAIV-H5N2 em 21 DPV em grupos de pássaros SPF, os quais foram imunizados, como indicado na Tabela 2, com as vacinas inativadas da presente invenção obtidas de acordo com os Exemplos 5 A (Emi Rd-Bive), 5B (Emi Rd-435) e 5C (Emi Rd-Vt). Para o propósito comparativo, dois outros grupos foram imunizados com duas vacinas comerciais emulsificadas contra influenza de ave e a doença Newcastle, produzidos a partir de todo o vírus inativado emulsificado, chamado E. ND/AI-435 e E. ND/AI-Bive, respectivamente.

Tabela 2

[105] Potencia em pássaros SPF imunizados com vacinas inativadas produzidas com o vírus recombinante rNDV/LS-H5 com ancoramento (Rd).

Grupo	Número de pássaros	Vacina administrada Em 14 dias de idade pela rota SC	Pássaros SPF, número de cepas por experimento, administradas em 21 DPV	
			VAIAP-H5N2	VVENV
1	50	Emi-Rd-Bive	25	25
2	50	Emi-Rd-435	25	25
3	50	Emi-Rd-Vt	25	25
4	50	E. ND/AI435	25	25
5	50	E. ND/AI Bive	25	25
6	50	Controle positivo	25	25
7	50	Controle negativo	----	----

[106] Os resultados da potência contra VNDV e HPAIV-H5N2 foram graficamente mostrados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

[107] Os resultados mostram que todas as três vacinas recombinantes inativadas rNDV/LS-H5 com ancoramento da presente invenção são capazes de prover em galinhas SPF 100% de proteção contra mortalidade (M) induzida pelo vírus do

experimento VNDV. Igualmente, e com relação aos genes H5 com o qual eles foram clonados, todas as três vacinas inativadas recombinantes também proveram 100% de proteção contra a mortalidade (M) induzida por HPAIV-H5N2 (Figura 2) igualmente para as vacinas inativadas convencionais produzidas com todo o vírus atualmente autorizada no mundo, para ser utilizada no controle de ND e AI, as quais são produzidas tipicamente, incluindo na formula vírus da doença de Newcastle, a cepa LaSota, com uma titulação de $10^{8,6}$ EID₅₀ por ml ($10^{8,6}$ DIEP50%/ml), e baixa patogenicidade do vírus influenza de aves com uma titulação de $10^{8,0}$ EID₅₀ por ml ($10^{8,0}$ DIEP50%/ml), quimicamente inativado com formaldeído e emulsificado com óleo. O resultado de proteção mostrou que as vacinas inativadas recombinantes rNDV/LS-H5 com ancoramento preenche os padrões Mexicanos e Internacionais para seu uso para controlar ND e AI, então, esta versão recombinante com ancoramento da presente invenção provido é um sucesso.

Exemplo 6B:

[108] Como um segundo experimento para se determinar o efeito do ancoramento, as análises foram feitas com VNDV e HPAIV-H5N2 em 21 DPV em grupos de pássaros SPF, os quais foram imunizados, como mostrado na tabela 3, com duas vacinas emulsificadas comerciais contra o influenza de ave e a doença Newcastle, produzida com todo o vírus inativado emulsificado, chamado E.ND/AI-435 e E.ND/AI-Bive, bem como com três vacinas inativadas emulsificadas da presente invenção, sem ancoramento, obtidas dos Exemplos 5D (Emi-Re-Bive), 5E (Emi-Re-435) e 5F (Emi-Re-Vt).

Tabela 3

[109] Potência em pássaros SPF imunizados com as vacinas inativadas produzidas com o vírus recombinante rNDV/LS-H5 sem ancoramento (Re)

Grupo	Número de pássaros	Vacinas administradas com 14 dias de idade, através da rota SC	Número de Pássaros SPF por cepa de experimento, administrada com 21 DPV	
			HPAIV-H5N2	VVNDV
1	50	Emi Re-Bive	25	25
2	50	Emi Re-435	25	25
3	50	Emi Re-Vt	25	25
4	50	E. ND/AI-435	25	25
5	50	E. ND/AI-Bive	25	25
6	50	Controle positivo	25	25
7	20	Controle negativo	---	---

[110] Os resultados da potência contra VNDV e HPAIV-H5N2 são graficamente mostrados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

[111] Inesperadamente, os resultados mostram que todas as três vacinas inativadas recombinantes rNDV/LS-H5 sem ancoramento da presente invenção também são capazes de prover, em pássaros SPF, 100% de proteção contra a mortalidade (M) induzida pelo vírus do experimento VNDV. Igualmente, e com relação ao gene H5 com o qual eles foram clonados, todas as vacinas inativadas recombinantes também proveem 100% de proteção contra a mortalidade (M) induzida por HPAIV-H5N2, igualmente às vacinas inativadas recombinantes rNDV/LS-H5 com ancoramento, e as vacinas emulsionadas convencionais produzidas com todo o vírus inativado ND/AI-Bive e ND/AI-435.

[112] Os resultados dos Exemplos 6A e 6B demonstram que as vacinas inativadas recombinantes produzidas no vetor com ou sem ancoramento, e com os genes AIV-H5 de diferentes

origens e características antigênicas em testes HI (H5N2 ou H5N1), são capazes de prover a mesma proteção para os experimentos com HPAIV-H5N2. Os resultados sugerem que as vacinas inativadas recombinantes produzidas com qualquer gene-H5 podem prover proteção contra o experimento com HPAIV com qualquer um dos subtipos de vírus influenza tendo hemaglutinina H5, o tipo de neuraminidase não sendo relevante.

[113] Portanto, foi demonstrado que a presente invenção é eficaz inclusive para tipos diferentes de neuraminidasas, o que é consistente às descobertas para as vacinas tradicionais com todo vírus inativado (Soto et al., "Inactivated Mexican H5N2 avian influenza vaccine protects chickens from the asiatic highly pathogenic H5N1 avian influenza virus", - Proceedings of the 56th Western Poultry Disease Conference (WPDC), USA, p. 79 (2007) and Swayne, d. and Kapczynski, D. (2008). "Vaccines, Vaccination and Immunology for avian influenza viruses in poultry in Avian Influenza".., Ed. By David Swayne. Blackwell Publishing, USA, p. 407-451).

Exemplo 6C

[114] Um terceiro experimento foi realizado de modo a testar as vacinas da presente invenção em pássaros comerciais para simular as condições do campo, sendo que as infecções foram realizadas utilizando-se vírus VNDV e um HPAIV-H5N2 em 21 DPV, em frangos para consumo comerciais, com imunidade parental ao ND e AI, os quais foram imunizados como indicado na Tabela 4, com duas vacinas comerciais emulsificadas contra influenza de ave e a doença Newcastle, produzida com todo vírus inativado emulsificado, chamada E.ND/AI-435 e E.ND/AI-

Bive, bem como as vacinas inativadas da presente invenção obtidas de acordo com os exemplos 5A (Emi-Rd-Bive), 5B (Emi-Rd-435), e 5C (Emi-Rd-Vt).

Tabela 4

[115] Potência em frangos para consumo comercial com imunidade parental ao ND e AI, imunizados com vacinas inativadas produzidas com o vírus recombinante rNDV/LS-H5 com ancoramento (Rd)

Grupo	Número de galinhas	Vacinas administradas com 14 dias de idade através da rota SC	Número de frangos para consumo comercial com cepa de infecção, administrada em 21 DPV	
			VAIAP-H5N2	VVNDV
1	50	Emi Re-Bive	25	25
2	50	Emi Re-435	25	25
3	50	Emi Re-Vt	25	25
4	50	E.ND/AI-435	25	25
5	50	E.ND/AI-Bive	25	25
6	50	Controle positivo	25	25
7	20	Controle negativo	---	---

[116] A potência dos resultados contra VNDV e HPAIV-H5N2 estão graficamente mostradas nas figuras 5 e 6, respectivamente.

[117] Os resultados mostram que todas as três vacinas recombinantes inativadas rNVD/LS-H5 com ancoramento da presente invenção são capazes de prover nos frangos para consumo comercial, tendo imunidade parental aos vírus ND e AI, proteção igual a ou maior que 90% para a mortalidade (M) induzida pelo vírus de infecção VNDV (Figura 5). Em adição, e com relação ao gene H5, com o qual eles foram clonados, todas as três vacinas recombinantes inativadas também proveem

proteção igual a ou maior que 80% para a mortalidade (M) induzida por HPAIV-H5N2, igualmente as vacinas emulsificadas convencionais, produzidas com todo o vírus inativado, utilizadas para controle de ND e AI.

[118] Os resultados de proteção indicam que as vacinas inativadas recombinantes rNDV/LS-H5 com ancoramento da presente invenção, podem ser utilizadas com sucesso para controlar HPAI em frangos para consumo comercial com imunidade parental para os vírus AI e ND, com proteção similar para àquelas providas pelas vacinas convencionais produzidas com todo o vírus inativado de AI, mas tendo a vantagem adicional de que com o uso exclusivo de vacinas recombinantes ativas e inativas, a biossegurança é completa, e o sistema DIVA pode ser estabelecido permitindo o uso conjunto de programas de vacinação e erradicação de AI.

Exemplo 6D

[119] De modo a determinar o efeito do ancoramento em condições de campo reais, as infecções foram feitas utilizando-se um VNDV e um HPAIV-H5N2 em 21 DPV em grupos de frangos para consumo comercial com imunidade parental ao ND e AI, os quais foram imunizados como indicado na Tabela 5, com duas vacinas comerciais emulsificadas contra influenza de aves e a doença de Newcastle, produzidas com todo o vírus emulsificado inativado, chamada E.ND/AI-435 e E.ND/AI-Bive, bem como três vacinas inativadas emulsificadas da presente invenção, sem ancoramento, obtida de acordo com os exemplos 5D (Emi-Re-Bive), 5E (Emi-Re-435), e 5F (Emi-Re-Vt).

Tabela 5

[120] Potência em frangos para consumo comercial tendo

imunidade parental ao ND e AI, imunizados com vacinas inativadas produzidas com o vírus recombinante rNDV/LS-H5 com ancoramento (Re)

Grupo	Número de galinhas	Vacinas administradas com 14 dias de idade através da rota SC	Número de frangos para consumo comercial por cepa de infecção, administrada em 21 DPV	
			VAIAP-H5N2	VVNDV
1	50	Emi Re-Bive	25	25
2	50	Emi Re-435	25	25
3	50	Emi Re-Vt	25	25
4	50	E.ND/AI-435	25	25
5	50	E.ND/AI-Bive	25	25
6	50	Controle positivo	25	25
7	20	Controle negativo	---	---

[121] A potência dos resultados contra VNDV e HPAIV-H5N2 estão graficamente mostradas nas figuras 5 e 6, respectivamente.

[122] Inesperadamente, os resultados mostram que todas as três vacinas recombinantes inativadas rNVD/LS-H5 sem ancoramento, da presente invenção também são capazes de prover nos frangos para consumo comercial, tendo imunidade parental protege igual a ou maior que 90% contra mortalidade (M) induzida pela infecção com vírus VNDV (Figura 7), igualmente a, e com relação ao gene H5 com o qual todas as três vacinas inativadas recombinantes forma clonadas, todas também proveem proteção igual a ou maior que 80% para a mortalidade (M) induzida por HPAIV-H5N2, tal como as vacinas inativadas recombinantes produzidas com todo o vírus inativado ND/AI-Bive e ND/AI-435.

[123] Estes estudos confirmam o sucesso da presente invenção, uma vez que eles provam que as vacinas recombinantes contra AI na forma inativada, utilizando uma emulsão ou veículos farmacêuticamente aceitáveis, adjuvantes

ou excipientes para seu uso em pássaros suscetíveis, permitindo uma resposta imune excelente, capaz de prover proteção de 100% para as infecções com HPAIV em galinhas SPF e maior que 80% em frangos para consumo tendo imunidade parenteral aos vírus ND e AI, o que é contrário e não sugerido àquelas previsões com relação a replicação do vírus recombinante em pássaros imunizados sendo essencial para a proteína com relação a sua expressão em quantidades suficientes para produzir uma resposta imune apropriada no pássaro.

[124] O uso de vacinas inativadas é essencial para se conseguir uma proteção apropriada ao nível do campo, para prevenir a mortalidade causada por HPAIV e VNDV, uma vez sob condições de campo, na exploração industrial de aves, o uso único da vacina ativa convencional contra ND, ou ativo recombinante contra AI, pode não ser suficiente.

Exemplo 7

Produção do vetor de adenovírus suíno subtipo 5.

[125] Para clonar o genoma do adenovírus suíno, subtipo 5 (Ad5), e para produzir um vetor viral ou clone infeccioso do mesmo, amplificação por PCR das extremidades esquerda e direita do genoma foi realizada, a partir da forma do DNA extraído do vírus Ad5 crescido nas células ST. Ambas as extremidades amplificadas foram então clonadas no sitio PacI do vetor pBg. O novo plasmídeo pBg-Izq-Der foi então digerido e linearizado antes da recombinação com o DNA viral a partir do genoma Ad5 na bactéria BJ5183 através de um procedimento padrão de transformação bacteriana. O genoma Ad5 foi clonado desta maneira no plasmídeo pBg, resultando no novo vetor

adenoviral pBg-Ad5.

Exemplo 8

Produção do vetor intermediário de suínos para clonar os genes relacionados.

[126] Para clonar o gene S1 do vírus da gastroenterite suína (GET) dentro do vetor pBgAd5 adenoviral, primeiramente, é necessário construir um vetor intermediário. Para este propósito, o DNA viral de Ad5 foi digerido com a enzima MluI para isolar a banda "B" de 8 Kb, correspondente à região E3, a qual não é essencial para a replicação de Ad5 e, portanto, pode ser removida, ou neste caso "substituída" pelo gene relacionado. A banda "B" foi primeiramente clonada no plasmídeo pJET. Em seguida, foi sub-clonada no vetor pTRE tendo 2 sítios de restrição únicos nas extremidades (ICeu-I e PI-SceI), produzindo, assim, o vetor pTRE-B. Para ser capaz de clonar o gene relacionado ou o cassete de expressão do gene relacionado, um único sítio Swal foi introduzido dentro da banda "B", produzindo, desse modo, o plasmídeo pTRE-B-Swal.

[127] Com base neste procedimento, uma vacina inativada recombinante emulsificada no vetor (PadV5) foi produzida com o gene S1-Purdue (GET) em uma fórmula farmacêutica água/óleo/água, o qual foi chamado PadV5-S1GET.

Exemplo 9

Clonagem do gene S1 a partir do vírus da gastroenterite transmissível de suínos (GET).

[128] Para clonar o gene S1 do vírus GET, a extração total do RNA viral foi realizada por meio do método triazol. Este RNA total foi purificado para ser utilizado mais tarde

para sintetizar o cDNA (DNA complementar), e através do uso de oligonucleotídeos específicos com a técnica de PCR, 2,2 Kb do gene S1 a partir do vírus GET que foram amplificados. O gene S1 foi então inserido no vetor pGEM-T utilizando as técnicas de clonagem padrão, produzindo, desse modo, o plasmídeo pGMET-2,2 S1. Para construir um cassete de expressão para o gene S1 e provê-lo com um promotor (CMV) para dirigir a transcrição do gene S1 e um sinal poliA para a terminação do mesmo, dito gene S1 foi sub-clonado ao plasmídeo pVAX, produzindo desse modo o plasmídeo pVAX-2.2. S1.

Exemplo 10

Clonagem do gene S1 do vírus GET no genoma Ad5 por recombinação homóloga em *E. coli*.

A: Sub-clonagem do gene S1 no vetor intermediário pTRE-B-SwaI:

[129] O cassete de expressão formado pelo promotor CMV-2,2 Kb do gene S1 e o sinal poliA, foram digeridos e extraídos de pVAX-2,2 S1 e clonado no sítio SwaI do plasmídeo adenoviral intermediário para produzir o plasmídeo pTRE-B-SwaI-2,2 S1.

B: Inserção do cassete de expressão dentro do vetor pBgAd5 por recombinação homóloga em *E. coli*:

[130] O cassete de expressão CMV-2,2-PoliA junto com os braços pra recombinação com Ad5, foram obtidos por digestão do plasmídeo intermediário com as enzimas ICeu-1 e Pi-SceI. O fragmento digerido foi purificado e transformado junto com o plasmídeo pBgAd5, produzindo, desse modo, o clone infeccioso de Ad5 tendo o cassete de expressão com o gene GET S1 dentro

da região adenoviral E3, produzindo, desse modo, o clone pAd5-2,2S1.

Exemplo 11

Produção do vírus recombinante pAd5-2,2S1 na cultura de célula

[131] O crescimento de células ST para uma confluência de 90% em 37° C em atmosfera de 5% de CO₂, foram transfectados com 5 microgramas (µg) de DNA a partir do clone pAd5-2,2S1 previamente digerido com PacI, tal como apenas o Ad5 contendo o cassete de expressão com o gene S1, foi introduzido nas células. As células transfectadas foram observadas a cada 24 horas até a ocorrência do efeito citoplástico. No sexto dia, ambos os sobrenadantes e as células foram recuperadas e submetidas a 3 ciclos de congelamentos e descongelamentos. O sobrenadante foi recuperado e utilizado para infectar as células frescas. Duas passagens através das células ST foram realizadas até o vírus alcançar suficiente titulação viral para realizar os testes de PCR de modo a detectar ambos os insertos de 2,2 Kb bem como o vetor Ad5 (gene de fibra). Uma vez que os testes foram positivos, o vírus produzido e chamado padV5-S1GET, foi utilizado para a preparação da vacina.

Exemplo 12

[132] Método de produção para vacina inativada emulsificada com o vírus recombinante a partir de Ad5 com S1 inserido no vírus GET: PadV5-S1GET.

Produção de antígeno

[133] A partir da produção de sementes, a linha de célula ST foi inoculada com a dose de infecção previamente

determinada. A cultura de célula foi incubada a 37°C por um período de 5 dias, a confluência de célula foi diariamente checada e o ECP. Após este período, a colheita foi congelada a (-70°C) em três períodos diferentes e o fluido celular foi colhido em condições assépticas. O fluido celular foi clarificado por centrifugação e o sobrenadante foi tomado, titulado por DICC_{50} e inativado com formaldeído, apesar de qualquer outro agente de inativação física ou química, tipicamente utilizado nesse tipo de vacina, poder ser utilizado. O sobrenadante foi submetido aos testes para determinar sua inativação, pureza e esterilidade.

Produção da Emulsão

[134] A vacina foi preparada em uma emulsão do tipo água-óleo-água (WOW). Óleo mineral foi utilizado na preparação da fase oleosa, bem como surfactantes do tipo Span 80 e Tween 80. Para a preparação da fase aquosa, o sobrenadante foi misturado com uma solução conservante (timerosal). Para produzir a emulsão, a fase aquosa foi lentamente adicionada à fase oleosa sob agitação constante e adicionalmente, a segunda fase aquosa foi feita seguindo o mesmo procedimento. Para se conseguir o tamanho de partícula especificado, um moinho homogeneizador ou coloidal foi utilizado.

Conteúdo antigênico

[135] A vacina foi formulada para prover um mínimo de $10^{6,1}$ $\text{DICC}_{50}/\text{ml}$, de modo a utilizar uma dose de 2,0 ml por porco.

[136] Com base neste procedimento, uma vacina inativada recombinante emulsificada foi produzida, no vetor (PadV5) com o gene S1-Purdue (GET), em uma fórmula farmacêutica

água/óleo/água, a qual foi chamada pAdV5-S1GET.

Exemplo 13

[137] Avaliação da potência *in vivo* para vacinas recombinantes em vetor de adenovírus de suínos subtipo 5 (PadV5) para o gene S1 a partir de vírus gastroenterite de suínos transmissíveis (GET).

[138] Para determinar a eficácia das vacinas inativadas recombinantes emulsificadas para a presente invenção, e prover que elas possam ser produzidas com o gene S1 clonado do vírus GET da cepa Purdue, a eficácia deste foi testada para prevenir a mortalidade causada pelo vírus GET em suínos SPF.

[139] Os experimentos foram realizados em porcos com uma idade média de 98 dias (56 DPV) em unidades de isolamento de microbiologia INIFAP-CENID, com as facilidades do nível 2 de biossegurança. Para realizar a infecção, cada grupo experimental foi localizado na unidade correspondente de isolamento seguido pelos procedimentos de biossegurança pré-estabelecidos.

[140] O vírus GET foi diluído em uma proporção apropriada com PBS em pH 7,2, e em uma dose oral de 2,0 ml/porco foi administrada para cada porco, equivalente a $10^{5,0}$ DICC₅₀ por ml ($10^{5,0}$ DICC50%/ml).

[141] Para a análise PD, todos os grupos foram diariamente observados para registrar a mortalidade e a morbidez, incluindo a severidade das condições clínicas, portanto, os porcos de cada grupo foram individualmente checados cada um para DPD, designando para eles um valor numérico de acordo com o critério na Tabela 6.

Tabela 6

Registro dos valores para a mortalidade e morbidez

Sinais clínicos	Pontos designados
1. Aparência	
a) normal	0
b) deprimido	1
c) excitado	2
d) comatoso/morto	3
2. Respiração	
a) Normal	0
b) espirros	1
c) tosse	1
d) Rápida/curto	2
e) dispnéia	3
3. Fezes	
a) normal	0
b) seca	1
c) solta	2
d) fluida	3
4. Olhos	
a) normal	0
b) aquoso	1
c) seco	2
d) fundos	3
5. Narinas	
a) normal	0
b) liberação aquosa	1
c) vermelho/inflamado	2
d) coberto com cicatrizes/ulcerado	3
6. Boca	
a) normal	0
b) espumante	2
c) úlcera	3
7. Atividade	Não-aplicável
8. Appetite	
a) normal	0
b) diminuído	1
c) anorexia	2
9. Outros	Breve descrição

[142] A avaliação PD com o vírus GET foi feita por 15 dias, de acordo com as diretrizes sugeridas por OIE.

[143] O índice de morbidez (MI) para cada grupo foi calculado a partir dos valores médios das observações clínicas para cada grupo, expressas como a porcentagem e ajustada a 100%.

[144] Devido às características específicas do vírus GET e da doença, ele produz (ele não causa mortalidade por idade), o teste de potência foi realizado para detectar a neutralização dos anticorpos virais contra o vírus GET, e comparação deles versus àqueles produzidos por uma vacina recombinante vivo contra GET.. O teste foi considerado satisfatório quando os grupos vacinados apresentaram uma diferença de pelo menos 2 log na base 2 comparado ao grupo não-vacinado, igualmente foi determinada a existência de diferenças entre os grupos vacinados quando existiram diferenças de pelo menos 2 log na base 2.

Exemplo 13A

[145] As infecções foram feitas com o vírus GET da cepa Purdue em uma titulação de $10^{5,0}$ DICC₅₀ por ml ($10^{5,0}$ DICC50%/mL), 2,0 mL oral/suíno, no grupo de porcos SPF (livres dos patógenos específicos), os quais foram imunizados, como indicado na tabela 7, com a vacina inativada da presente invenção obtida de acordo com o exemplo 2.

Tabela 7

[146] Potência nos porcos imunizados com as vacinas inativadas produzidas com o vírus recombinante PadV5-S1GET (rGET)

Grupo	Número de porcos	Vacinas administradas em 21 e 35 dias de idade através da rota IM	Número de porcos por cepa de infecção, administrada em 56 DPV
			Cepa GET-Purdue
1	15	PadV5-S1GET	15
2	5	Não vacinado (controle negativo)	0
3	5	Não-vacinado (controle positivo)	5
4	10	rGET vivo	10

[147] Os resultados da potência contra o vírus GET são mostrados nas figuras 9, 10 e 11.

[148] Os resultados indicam que a vacina inativada recombinante rGET (PadV5-S1GET) da presente invenção é capaz de prover em porcos SPF uma proteção de 100% contra mortalidade (M) induzida pela infecção com o vírus GET da cepa Purdue, igualmente para as vacinas convencionais inativadas produzidas com todo o vírus atualmente autorizado mundialmente a ser utilizado para controlar GET, quando avaliado pelo teste de neutralização do vírus no soro - VSN (Figura 11 e Tabela 8). Os resultados da proteção indicam que a vacina inativada recombinante PadV5-S1GET cumpre com "Mexican and International Regulations" para ser utilizado como controle da gastroenterite transmissível aos porcos, provendo, desse modo que esta versão inativada recombinante da presente invenção é um sucesso.

Tabela 8

Tratamento	Titulação por VSN com log na base 2	Diferenças	
	GET	Controle negativo	Vacina viva recombinante
Não-vacinado (controle negativo)	3,04	NA	NA
Não-vacinado (controle positivo)	3,6	NA	NA
rGET vivo	5,3	2,26	NA
PadV5-S1GET inativado	7,46	4,42	2,16

[149] Apesar de concretizações da invenção, terem sido ilustradas e descritas, deve ser apreciado que várias modificações das mesmas são possíveis, como nas cepas de vírus AI ou nas cepas de adenovírus utilizadas, no tipo de emulsão ou de veículos empregados. Portanto, a presente invenção não deve ser construída como limitada, exceto pelos ensinamentos da técnica anterior e em relação às reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina recombinante, compreendendo um vetor viral e um veículo farmacêuticamente aceitável, adjuvante ou excipiente, caracterizada pelo fato de o vetor viral ser inativado e ter uma sequência exógena de nucleotídeo inserida que codifica para um antígeno de uma doença relacionada, sendo que o vetor viral é o vírus da doença Newcastle, e a sequência exógena de nucleotídeo codifica a hemaglutinina (HA) do vírus influenza de aves, e a referida vacina é eficaz contra pelo menos uma doença relacionada.
2. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o gene codificante para hemaglutinina (HA) ser selecionado de pelo menos um dos subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7 ou H9, de hemaglutinina (HA) do vírus influenza de aves.
3. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de o gene codificante para a hemaglutinina (HA) ser o subtipo H5.
4. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o vírus da doença Newcastle ser selecionado das cepas de LaSota, Ulster, QV4, B1, CA 2002, Roakin, Komarov, Clone 30, ou VGGA, ou cepas de grupos genéticos I a V da doença Newcastle.
5. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de os veículos farmacêuticamente aceitáveis para a vacina serem, preferivelmente, soluções ou emulsões aquosas.
6. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de a emulsão água-óleo ser utilizada

como veículo.

7. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a titulação requerida para o vetor viral ser similar àquela requerida para uma vacina de vírus ativo recombinante.

8. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de a concentração de vírus requerida para se conseguir a resposta antigênica estar entre 10^2 e 10^{10} EID₅₀ por ml.

9. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de a concentração de vírus requerida para se conseguir a resposta antigênica estar entre 10^4 e 10^{10} EID₅₀ por ml.

10. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de a concentração de vírus estar entre 10^8 e 10^9 EID₅₀ por 0,5 ml por galinha quando a vacina for preparada para ser administrada em galinhas.

11. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de a vacina ter $10^{8,5}$ EID₅₀ por 0,5ml por galinha.

12. Vacina recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a concentração viral requerida para se conseguir a resposta antigênica na vacina ser preparado para ser subcutaneamente ou intramuscularmente administrado.

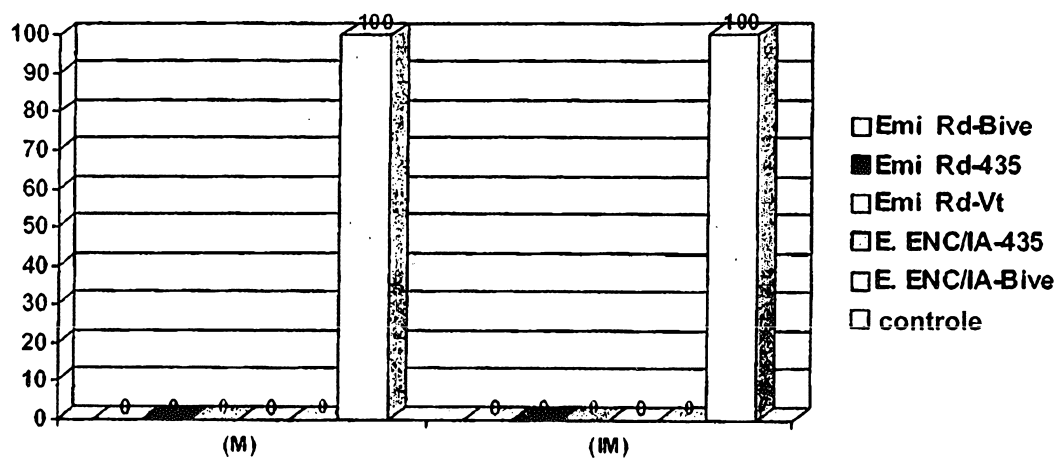


FIG.1

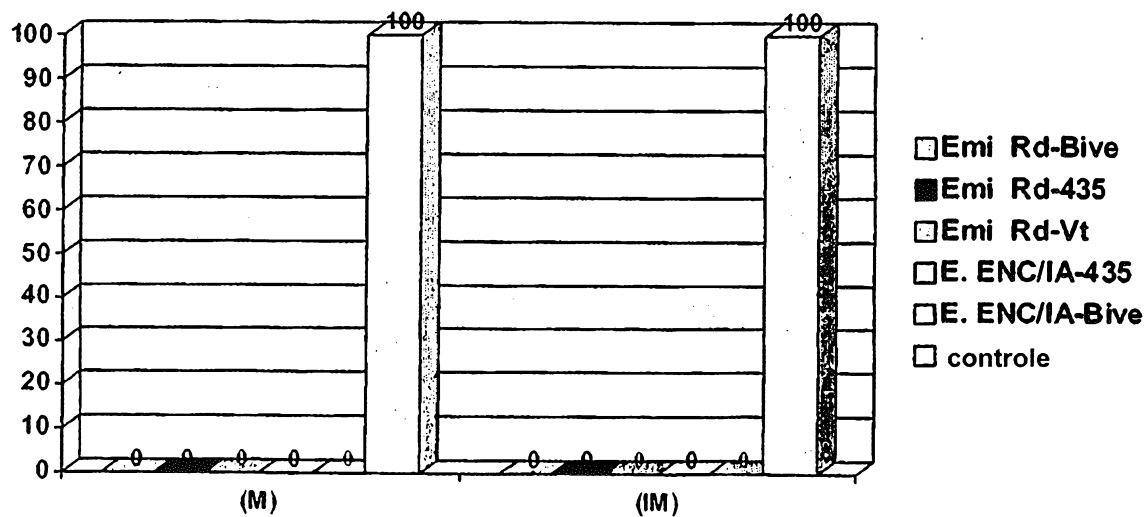


FIG.2

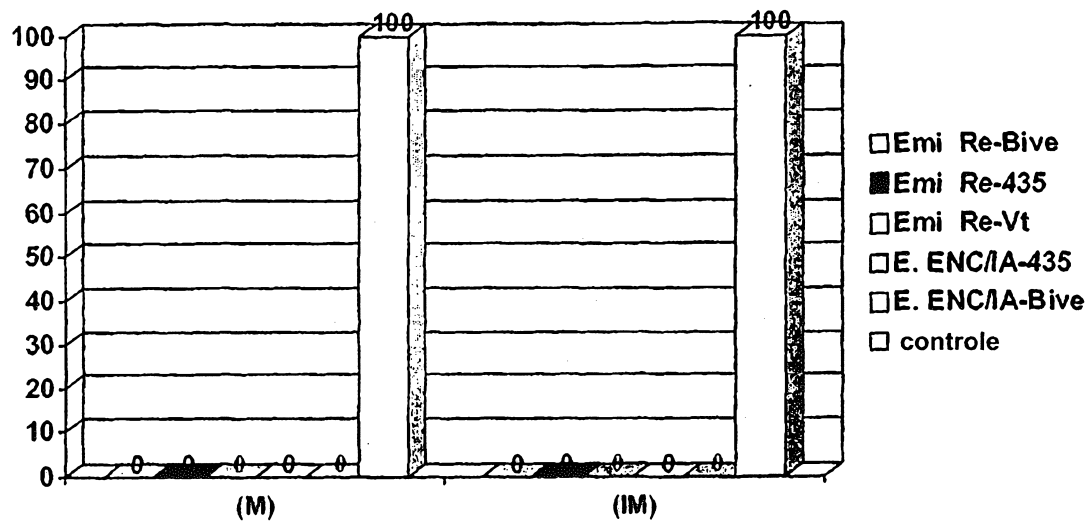


FIG.3

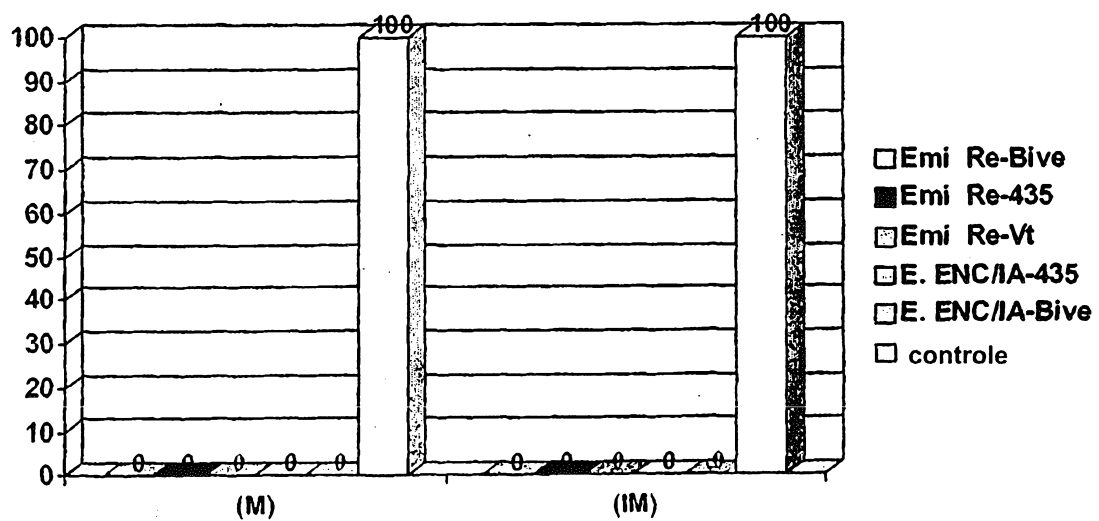


FIG.4

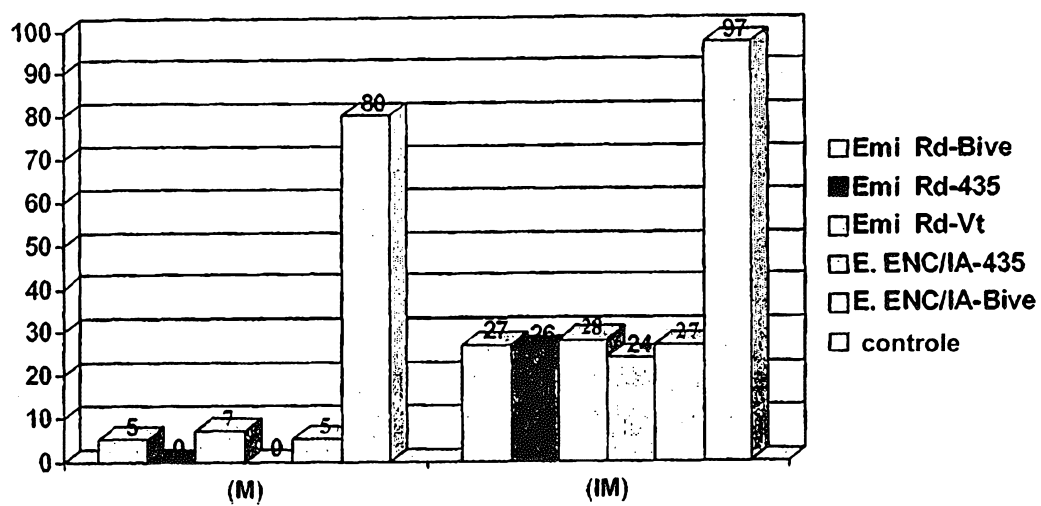


FIG.5

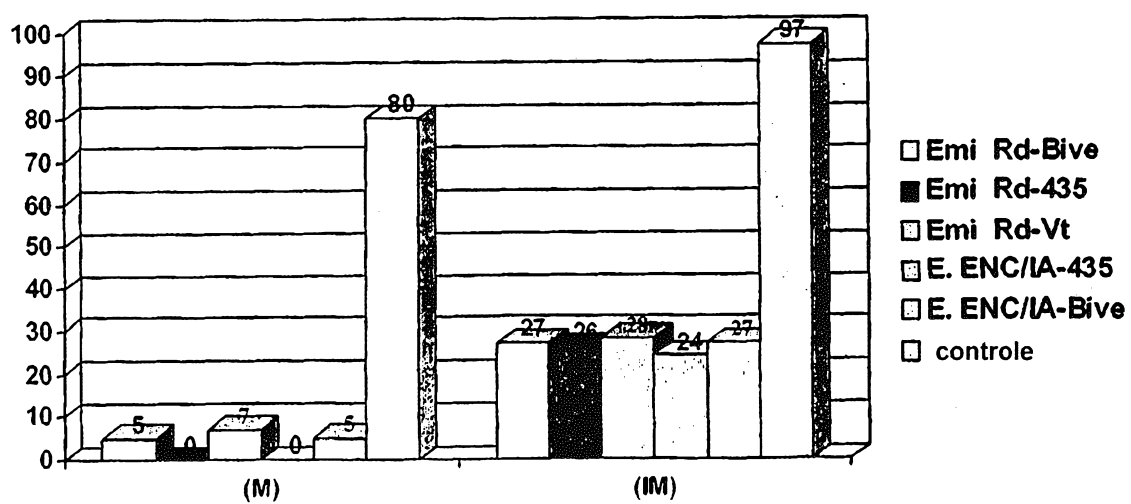


FIG.6

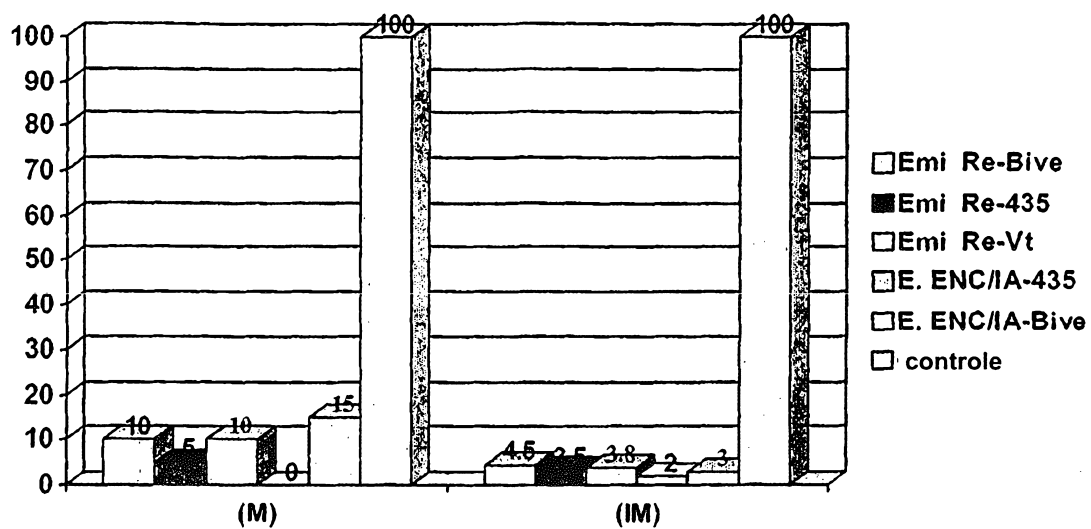


FIG.7

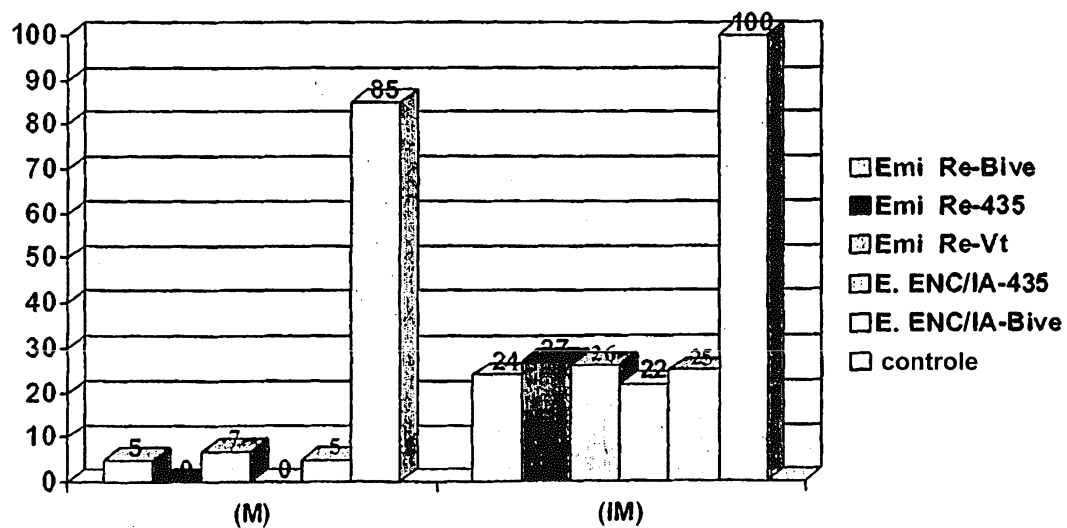


FIG.8

5/6

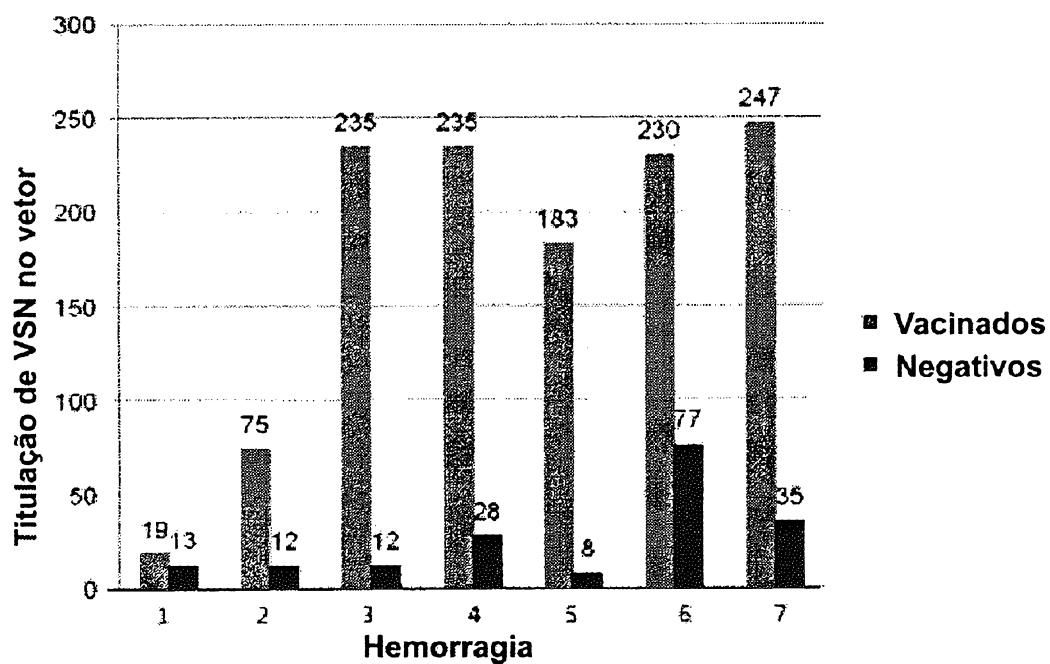


FIG.9

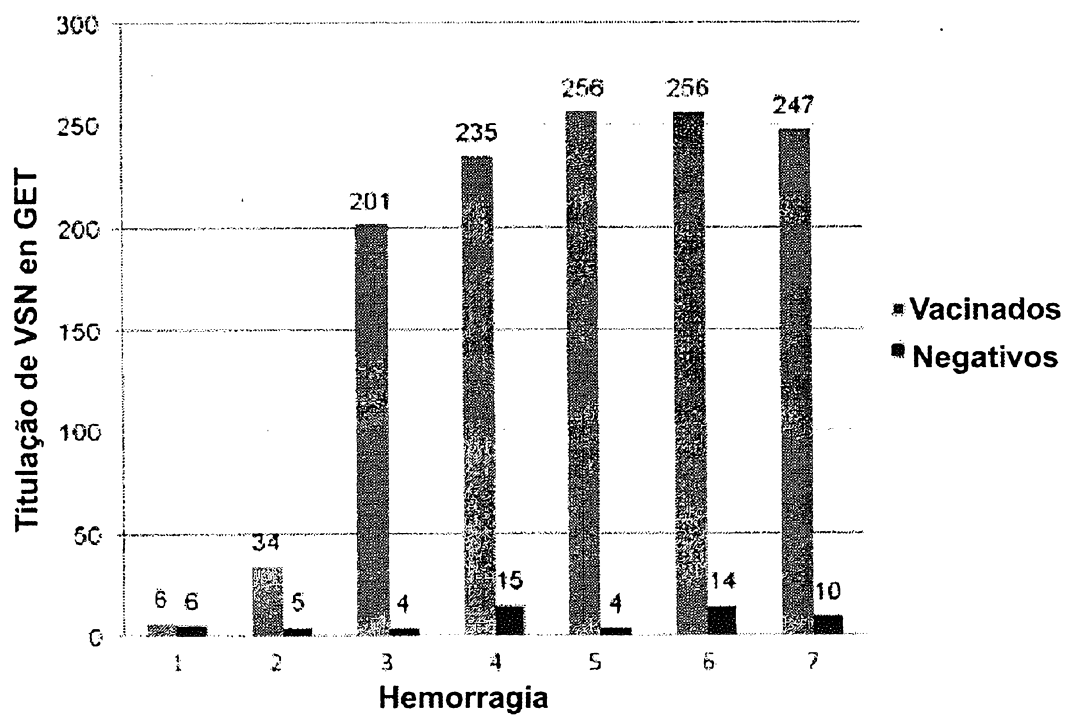


FIG.10

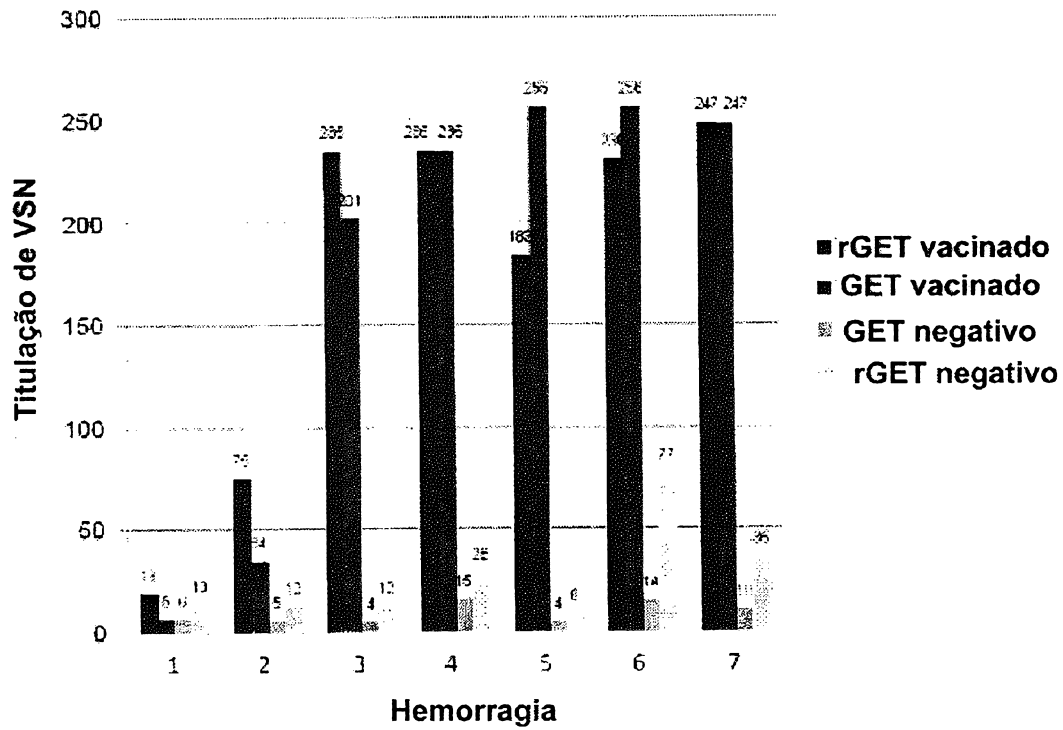


FIG.11