



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

(11) PI 0919174-7 B1



(22) Data do Depósito: 20/08/2009

(45) Data de Concessão: 17/11/2020

(54) Título: VÍRUS DA RAIVA RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E SEU USO

(51) Int.Cl.: A61K 39/205; C07K 14/145; C12N 15/86; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 17/09/2008 US 61/097,748.

(73) Titular(es): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.

(72) Inventor(es): CHARLES RUPPRECHT; XIANFU WU.

(86) Pedido PCT: PCT US2009054502 de 20/08/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/033337 de 25/03/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/03/2011

(57) Resumo: VÍRUS DA RAIVA RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA COMPREENDIDO O DITO VÍRUS, BEM COMO USO DA DITA COMPOSIÇÃO. A presente invenção refere-se a vírus da raiva recombinante que compreendem uma sequência de ácido nucleico heteróloga que codifica uma proteína imun contraceptiva, tal como hormônio de liberação da gonadotropina (GnRH) ou zona pelúcia 3 (ZP3). Os vírus da raiva recombinantes aqui apresentados são recuperados por genética reversa, se reproduzem eficientemente, geram anticorpos neutralizantes do vírus da raiva e anticorpos específicos para peptídeos imun contraceptivos nos animais vacinados, e protegem os animais vacinados contra estímulos com vírus da raiva tipo selvagem. É ainda fornecido um método de imunização de um animal não humano contra infecção pelo vírus da raiva e inibição da fertilidade do animal simultaneamente, cujo método compreende a administração de uma composição imunogênica que compreende um ou mais dos vírus da raiva recombinantes aqui descritos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VÍRUS DA RAIVA RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E SEU USO "**.

REFERÊNCIA CRUZADA AO PEDIDO RELACIONADO

[001] Este pedido reivindica o benefício do pedido provisório U.S. Nº 61/097.748, depositado em 17 de setembro de 2008, que está aqui incorporado, por referência, em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a vírus da raiva recombinantes como composições imun contraceptivas para o controle do crescimento da população de animais selvagens e domésticos, assim como a proteção dos animais contra infecção pelo vírus da raiva.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] A raiva é uma grande ameaça à saúde pública causando entre 50.000 e 60.000 mortes de seres humanos a cada ano (World Health Organization, abril de 2003). Os seres humanos se infectam com o vírus da raiva principalmente através da mordida de animais selvagens e domésticos raivosos. Nos países em desenvolvimento, os cães são responsáveis por cerca de 94% das mortes por raiva de seres humanos. A raiva de cães ainda é epizootica na maioria dos países da África, Ásia e América do Sul e nestes países os cachorros são responsáveis pela maioria das mortes de seres humanos causadas pela doença. O controle da infecção pelo vírus da raiva em animais domésticos e de vida selvagem, portanto, não apenas reduz a mortalidade nestes animais, como também reduz os riscos de exposição humana.

[004] O vírus da raiva é transmitido através da pele rompida pela mordida ou arranhão de um animal infectado. A exposição ao vírus da raiva resulta na sua penetração nas terminações nervosas periféricas e não mielinizadas, seguida pelo espalhamento através de transporte

axonal retrógrado, a replicação ocorrendo exclusivamente nos neurônios, e finalmente, chegada no sistema nervoso central (SNC). A infecção do SNC causa disfunção celular e morte (Rupprecht e Dietzschold, *Lab Invest.* 57:603, 1987). Uma vez que o vírus da raiva se espalha diretamente de célula para célula, ele evita grandemente o reconhecimento imune (Clark e Prabhakar, Rabies, In: Olson *et al.*, eds., "Comparative Pathology of Viral Disease," 2:165, Boca Raton, FL, CRC Press, 1985).

[005] O controle populacional de cachorros com métodos superados de captura, contenção e eutanásia são desumanos e inaceitáveis pelo público. A prevenção e o controle da raiva canina, e o manejo adequado da população de cachorros de rua são as medidas mais importantes para a eventual eliminação da doença. Várias abordagens foram propostas para interromper os ciclos reprodutivos dos cães, incluindo a esterilização/castração cirúrgica dos animais, esterilização química, e imun contracepção. Por exemplo, o hormônio de liberação da gonadotropina (GnRH) foi considerado, em uma abordagem, como um peptídeo imun contraceptivo para cães. Entretanto, estudos até o presente momento mostraram que o GnRH precisa ser sintetizado e conjugado a uma proteína carreadora (ou adjuvante) para ser imunogênico. O aumento em escala da produção necessário para atingir as demandas regulatórias e econômicas para o suprimento moderno de vacinas pode se tornar problemático. Desta forma, é desejável construir uma vacina que possa induzir respostas imunológicas duplas adequadas contra o vírus da raiva e os alvos imun contraceptivos, após uma única administração nos animais.

[006] Além disso, ao longo dos últimos 30 anos, os estudos imun contraceptivos não geraram um único produto comercial. As limitações técnicas são um dos principais fatores. Portanto, há uma necessidade nunca sentida de uma nova vacina contra o vírus da raiva,

manipulada com a capacidade de expressar um gene imun contraceptivo adequado. Este tipo de vacina seria um candidato ideal para a prevenção da raiva e para o controle populacional de animais selvagens e domésticos, inclusive cachorros.

SUMÁRIO DA DESCRIÇÃO

[007] Na presente invenção são descritos vírus da raiva recombinantes que compreendem sequências de ácido nucleico heterólogas que codificam proteínas imun contraceptivas. Os vírus da raiva recombinantes são recuperados com o uso de genética reversa, se reproduzem eficientemente em cultura, e geram altos títulos de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva, geram anticorpos específicos para proteínas imun contraceptivas e conferem proteção contra estímulo com vírus da raiva nos animais vacinados.

[008] É aqui fornecido um vírus da raiva recombinante no qual o genoma do vírus da raiva recombinante inclui uma sequência de ácido nucleico heteróloga que codifica uma proteína imun contraceptiva. Em algumas modalidades, a proteína imun contraceptiva é o hormônio de liberação da gonadotropina (GnRH) ou zona pelúcida 3 (ZP3), tal como ZP3 de cachorro. Em algumas modalidades, o genoma do vírus da raiva recombinante compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica ZP3 e uma sequência de ácido nucleico que codifica GnRH.

[009] Também são fornecidas composições imunogênicas que compreendem um ou mais dos vírus da raiva recombinantes aqui descritos. É ainda fornecida uma composição imunogênica que compreende um primeiro vírus da raiva recombinante e um segundo vírus da raiva recombinante, em que o genoma do primeiro vírus da raiva recombinante compreende uma sequência de ácido nucleico de GnRH e o genoma do segundo vírus da raiva recombinante compreende uma sequência de ácido nucleico de ZP3.

[0010] São ainda fornecidos métodos de imunização de um animal

não humano contra infecção pelo vírus da raiva e inibição da fertilidade do animal, através da administração ao animal de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição imunogênica que compreende um ou mais dos vírus da raiva recombinantes aqui descritos.

[0011] Estas e outras características e vantagens se tornarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada de várias modalidades, que se dá com referência aos desenhos em anexo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0012] A figura 1 é uma representação esquemática de quatro vírus ERAZP3 recombinantes. G* denota a mutação no aminoácido 333 da glicoproteína (G). ZP- indica um gene da zona pelúcida de cachorro.

[0013] A figura 2A é uma representação esquemática da glicoproteína do vírus da raiva. As setas indicam os locais onde uma ou duas cópias de GnRH foram inseridas. Os vírus recombinantes com GnRH inserido em cada um destes locais foram recuperados com sucesso por genética reversa (Ecto = ectodomínio; SP = peptídeo de sinal; TM = transmembrana; IIb, II, IIa, WB+ e III referem-se os sítios antigênicos). A figura 2B é uma representação esquemática do vírus da raiva recombinante ERA-3-GnRH.

[0014] A figura 3A é uma tabela listando vírus da raiva recombinantes exemplificadores que compreendem ZP3 de cachorro (DZP3), GnRH ou ambos. As descrições do vírus indicam o local de inserção de ZP3 e/ou GnRH no genoma do vírus (G3 = glicoproteína com a mutação G333). A figura 3B é um gráfico mostrando a sobrevivência de camundongos não vacinados (controle) ou camundongos vacinados com ERA-N-GnRH (vírus nº 5), ERA-3-GnRH (vírus nº 7) ou ERA-G3-2GnRH (vírus nº 8). Cada grupo de camundongos foi estimulado subsequentemente com uma dose letal de vírus da raiva.

[0015] A figura 4 é uma imagem de um gel de proteínas mostrando

o peptídeo GnRH ou 2GnRH conjugado à hemocianina do molusco keyhole limpet (KLH). As proteínas foram separadas em géis de SDS-PAGE a 4 a 12%. GnRH-KLH e 2GnRH-KLH são mostrados nas colunas 2 e 4, respectivamente. As colunas 1 e 6 contêm marcadores de peso molecular. As colunas 3 e 5 mostram o padrão de KLH.

[0016] A figura 5A é um esquema dos genomas de ERA parental e ERAg3p rearranjado. Para gerar ERAg3p, o gene G no genoma de ERA foi realocado para frente do gene P, e foi mutado no resíduo de aminoácido 333 de AGA (referido como G) para GAG (referido como G*). A figura 5B é uma curva de crescimento em uma etapa mostrando as características de crescimento do vírus ERAg3p rearranjado. O vírus ERAg3p recuperado cresceu assim como o vírus ERA parental. A figura 5C é um gráfico de linhas comparando a virulência de ERA e ERAg3p. ERAg3p não causou morte em nenhum dos camundongos de 3 semanas de idade após injeção intracerebral.

[0017] A figura 6 é um esquema mostrando os sítios de inserção da sequência codificante de GnRH ou 2GnRH no genoma de G no vírus da raiva ERAg3p. SP = peptídeo de sinal; TM = transmembrana; CT = cauda citoplasmática; N = terminação amino da glicoproteína; e C = terminação carboxila da glicoproteína.

[0018] A figura 7A é um esquema mostrando os sítios de inserção de GnRH no genoma de ERAg3p para gerar ERA-N-GnRH, ERA-N-2GnRH, ERA-IIa-GnRH e ERA-C-GnRH. A figura 7B é um gráfico de linhas mostrando as características de recuperação e crescimento dos vírus ERAg3p transportando GnRH. O vírus recombinante foi recuperado com sucesso de 4 dos 12 construtos. Os vírus recuperados continham GnRH inserido na terminação amino imediatamente após a sequência de sinal, o sítio antigênico IIa, ou a junção entre o ectodomínio e o domínio transmembrana da glicoproteína.

[0019] A figura 8A é uma imagem de um gel eletroforético

mostrando ERA-N-2GnRH purificado (coluna 1), ERA-N-GnRH (coluna 2) e ERA-IIa-GnRH (coluna 3). O vírus purificado foi separado em géis de SDS-PAGE a 4-12%. As colunas 4 e 5 contêm glicoproteína purificada e nucleoproteína purificada do vírus da raiva ERA como controles. A figura 8B é uma imagem de um Northern blot de ERA-N-2GnRH purificado (coluna 2) e ERA-N-GnRH (coluna 3). As colunas 1 e 4 contêm marcador de peso molecular de RNA.

[0020] A figura 9 é um gráfico de linhas mostrando a segurança e a potência dos vírus ERAg3p transportando GnRH em um modelo de camundongo. Nenhum efeito colateral óbvio foi observado após a injeção intramuscular de ERA-N-2GnRH, ERA-N-GnRH ou ERA-IIa-GnRH em camundongos. Três semanas após a inoculação, todos os camundongos sobreviveram ao estímulo com uma dose letal de aproximadamente 2,5 a 10,0 MICLD₅₀ de vírus da raiva de cachorro/cão de rua. Os camundongos de controle (injetados com placebo) morreram entre 8 e 10 dias após o estímulo. Os camundongos que sobreviveram permaneceram saudáveis antes do término do experimento em 2 meses.

[0021] As figuras 10A a 10D são Western blots mostrando a reação de conjugados de GnRH-KLH e 2GnRH-KLH contra soro de camundongo imunizado com vírus ERA transportando GnRH e soro GonaCon™. Para cada blot, as colunas 1 e 2 contêm GnRH-KLH e 2GnRH-KLH, respectivamente. São mostrados soros de camundongo de imunização com vírus da raiva ERA-IIa-GnRH (A); soro de camundongo da imunização com RV ERA-N-GnRH (B); soro de camundongo da imunização com ERA-N-2GnRH (C); e soro de coelho contra GonaCon™ (D). Nenhuma diferença foi detectada entre o soro de camundongo e de coelho contra os conjugados de GnRH.

Listagem de sequências

[0022] As sequências de ácido nucleico e aminoácido mencionadas

na listagem de sequências em anexo são mostradas com o uso de abreviações de letras padrão para bases de nucleotídeos, e códigos de três letras para os aminoácidos, como definido em 37 C.F.R. 1.822. Apenas uma fita de cada sequência de ácido nucleico é mostrada, mas entende-se que a fita complementar está incluída por referência à fita apresentada. Na listagem de sequências em anexo:

[0023] **SEQ ID NO: 1** é a sequência de nucleotídeo do vírus da raiva recombinante ERA recuperado por genética reversa. A mutação dos nucleotídeos 4370 a 4372 de aga para gag introduz uma alteração de aminoácido de Arg para Glu na proteína G.

[0024] **SEQ ID NO: 2** é a sequência de aminoácido da proteína N do vírus da raiva ERA.

[0025] **SEQ ID NO: 3** é a sequência de aminoácido da proteína P do vírus da raiva ERA.

[0026] **SEQ ID NO: 4** é a sequência de aminoácido da proteína M do vírus da raiva ERA.

[0027] **SEQ ID NO: 5** é a sequência de aminoácido da proteína G do vírus da raiva ERA. Uma alteração de Arg para Glu no resíduo de aminoácido 333 é uma mutação atenuante.

[0028] **SEQ ID NO: 6** é a sequência de aminoácido da proteína L do vírus da raiva ERA.

[0029] **SEQ ID NOs: 7 e 8** são as sequências de nucleotídeo e aminoácido, respectivamente, de zona pelúcida de cachorro 3 (ZP3).

[0030] **SEQ ID NOs: 9 a 26** são as sequências de nucleotídeo dos oligonucleotídeos usados para gerar o fragmento A de ZP3 de cachorro.

[0031] **SEQ ID NOs: 27 a 46** são as sequências de nucleotídeo dos oligonucleotídeos usados para gerar o fragmento B de ZP3 de cachorro.

[0032] **SEQ ID NOs: 47 e 48** são as sequências de nucleotídeo e aminoácido, respectivamente, de GnRH.

[0033] **SEQ ID NOs: 49 e 50** são as sequências de nucleotídeo e

aminoácido, respectivamente, da proteína G do vírus da raiva ERA com uma única cópia de GnRH inserida imediatamente após a sequência de sinal da proteína G de 19 aminoácidos. Este construto é chamado de G-N-GnRH.

[0034] **SEQ ID NOs: 51 e 52** são as sequências de nucleotídeo e aminoácido, respectivamente, da proteína G do vírus da raiva ERA com duas cópias de GnRH inseridas imediatamente após a sequência de sinal da proteína G de 19 aminoácidos. Este construto é chamado de G-N-2GnRH.

[0035] **SEQ ID NOs: 53 e 54** são as sequências de nucleotídeo e aminoácido, respectivamente, da proteína G do vírus da raiva ERA com uma única cópia de GnRH inserida imediatamente após o aminoácido 221 da proteína G (sítio IIa). Este construto é chamado de GnRH-p3 ou G-IIa-GnRH.

[0036] **SEQ ID NO: 55** é a sequência de aminoácido do peptídeo 1780 de GnRH.

[0037] **SEQ ID NO: 56** é a sequência de aminoácido do peptídeo 1781 de GnRH.

[0038] **SEQ ID NO: 57** é a sequência de nucleotídeo de 2GnRH (duas cópias em tandem da sequência codificante de GnRH).

[0039] **SEQ ID NOs: 58 e 59** são as sequências de nucleotídeo dos iniciadores usados para a inserção da sequência codificante de GnRH no gene G do vírus da raiva.

[0040] **SEQ ID NOs: 60 e 61** são as sequências de nucleotídeo dos iniciadores usados para a inserção da sequência codificante tandem de GnRH (2GnRH) no gene G do vírus da raiva.

[0041] **SEQ ID NO: 62** é a sequência de nucleotídeo de ZP3 de cachorro, depositada sob o nº de Acesso no Genbank NM_001003224 em 5 de agosto de 2004.

[0042] **SEQ ID NOs: 63 e 64** são as sequências de nucleotídeo e

aminoácido, respectivamente, da proteína G do vírus da raiva ERA com uma cópia de GnRH inserida na junção do ectodomínio e do domínio transmembrana (após o nucleotídeo 1374, aminoácido 458) da glicoproteína. Este construto é chamado de G-C-GnRH.

DESCRIÇÃO DETALHADA

1 - Introdução

[0043] A raiva é uma importante preocupação na saúde pública em todo o mundo. Na maioria dos casos, os seres humanos são infectados com o vírus da raiva através da mordida de um animal doméstico ou selvagem raivoso. Nos países em desenvolvimento, os cães são responsáveis por aproximadamente 94% das mortes por raiva de seres humanos. Cachorros de rua ou não vacinados são o principal reservatório para a raiva em países da América Latina, Ásia e África. Além disso, nos Estados Unidos, há atualmente milhões de gatos de rua ou selvagens. Desta forma, há uma necessidade global de evitar raiva e controlar a população de animais suscetíveis à raiva, particularmente cães.

[0044] Métodos anteriores de controle da população de animais incluíram o uso de vacinas imun contraceptivas. A imun contracepção envolve a estimulação de respostas imunes contra gametas ou hormônios reprodutores para evitar a concepção. A imun contracepção é um método humano para o controle populacional de pragas e populações excessivamente grandes de mamíferos de vida selvagem (como guaxinins ou cervos). Inúmeros estudos focaram no uso da glicoproteína 3 da zona pelúcida (ZP3), que é o principal receptor usado pelo esperma para a fertilização de um ovo. Entretanto, a administração de ZP3, ou outra proteína imun contraceptiva, exigia anteriormente a coadministração de um adjuvante e/ou doses de reforço para gerar uma resposta imunológica suficiente contra a proteína para que a fertilização seja inibida. Desta forma, os métodos atuais de imun contracepção

possuem limitações significativas, particularmente para populações de animais selvagens.

[0045] As composições imunogênicas e métodos aqui descritos fornecem um meio para proteger simultaneamente animais vacinados contra raiva e controlar as populações de animais pela inibição da fertilidade. São descritos aqui vírus da raiva recombinantes que compreendem pelo menos uma sequência de ácido nucleico heteróloga que codifica uma proteína imunocontraceptiva. Em exemplos particulares, a proteína imunocontraceptiva é GnRH ou ZP3. Em alguns casos, os vírus da raiva recombinantes compreendem tanto GnRH quanto ZP3. Alternativamente, os animais podem ser imunizados com dois vírus da raiva recombinantes diferentes, um compreendendo GnRH, e um segundo compreendendo ZP3. Pelo fato da proteína imunocontraceptiva ser codificada no genoma do vírus da raiva, quando as partículas do vírus da raiva recombinante são produzidas, os peptídeos imunocontraceptivos são incorporados ao vírion (proteína estrutural) ou são contidos no interior do vírion (proteína não estrutural). Pela incorporação da proteína imunocontraceptiva na partícula do vírus da raiva, um adjuvante não é necessário para gerar uma resposta imune suficiente contra o vírus da raiva e a proteína imunocontraceptiva.

II. Abreviações

CMV	Citomegalovírus
CTVT	Tumor venéreo transmissível canino
DFA	Teste fluorescente direto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERA	Evelyn-Rokitnicki-Abelseth
FFU	Unidades formadores de focos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Glicoproteína do vírus da raiva

G*	Glicoproteína com uma alteração de Arg para Glu no resíduo 333
GnRH	Hormônio de liberação da gonadotropina
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
i.c.	Intracerebral
i.m.	Intramuscular
IRES	Sítio interno de entrada do ribossomo
KLH	Hemocianina do molusco keyhole limpet
L	RNA polimerase dependente de RNA do vírus da raiva
LH	Hormônio luteinizante
M	Proteína de matriz do vírus da raiva
MALDI	Ionização / dessorção a laser assistida por matriz
MICLD50	Dose intracerebral letal 50 de camundongo
N	Nucleoproteína do vírus da raiva
NA	Anticorpo neutralizante
NLS	Sinal de localização nuclear
P	Fosfoproteína do vírus da raiva
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
pZP	Zona pelúcida de suíno
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RV	Vírus da raiva
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UV	Ultravioleta
VNA	Anticorpo neutralizante de vírus
ZP	Zona pelúcida

III. Termos

[0046] Exceto onde especificado em contrário, os termos técnicos são usados de acordo com o uso convencional. As definições de termos

comuns em biologia molecular podem ser encontradas em Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado pela Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado pela Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado pela VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

[0047] De modo a facilitar a análise das várias modalidades da descrição, são fornecidas as seguintes explicações de termos específicos:

[0048] **Adjuvante:** Uma substância ou veículo que intensifica inespecificamente a resposta imune a um antígeno. Os adjuvantes podem incluir uma suspensão de minerais (alume, hidróxido de alumínio, ou fosfato) sobre os quais o antígeno é adsorvido; ou uma emulsão água em óleo na qual a solução de antígenos é emulsionada em óleo mineral (por exemplo, adjuvante incompleto de Freund), algumas vezes com as inclusões de micobactérias mortas (adjuvante completo de Freund) para acentuar ainda mais a antigenicidade. Oligonucleotídeos imunoestimulatórios (como os que incluem um motivo CpG) podem também ser usados como adjuvantes (por exemplo, consulte patente US Nº 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; 6.339.068; 6.406.705; e 6.429.199). Os adjuvantes incluem, também moléculas biológicas, como moléculas coestimulatórias. Adjuvantes biológicos exemplificadores incluem IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L e 41 BBL.

[0049] **Administrar:** Para uso na presente invenção, administrar uma composição a um indivíduo significa fornecer, aplicar ou colocar a composição em contato com o indivíduo. A administração pode ser realizada por qualquer via, como, por exemplo, tópica, oral, subcutânea,

intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intratecal e intramuscular. Em algumas modalidades aqui descritas, uma composição imunogênica é administrada a um animal por uma via oral.

[0050] **Animal:** Organismos vertebrados vivos multi-celulares, uma categoria que inclui, por exemplo, mamíferos e aves. O termo mamífero inclui tanto os mamíferos humanos como não humanos. O termo "animal" inclui tanto indivíduos humanos como veterinários, por exemplo, seres humanos, primatas não humanos, cachorros, gatos, cavalos, guaxinins, morcegos, ratos, camundongos, raposas, esquilos, gambás, coiotes, lobos e vacas. Para uso na presente invenção, "indivíduo" é intercambiável com "animal." Para uso na presente invenção, um "animal doméstico" refere-se a qualquer animal que foi domesticado por seres humanos, frequentemente para uso como animais de trabalho, uma fonte alimentar ou como animais de estimação. Muitos animais domésticos são reproduzidos seletivamente de modo a diferir dos animais selvagens. Para uso na presente invenção, "animal selvagem" refere-se a qualquer animal que vive em um estado natural, não domesticado.

[0051] **Anticorpo:** Uma proteína (ou complexo de proteína) que inclui um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina ou fragmentos de genes de imunoglobulina. Os genes de imunoglobulina reconhecidos incluem os genes das regiões constantes kappa, lambda, alfa, gama, delta, épsilon, e mu, assim como a diversidade de genes de região variável de imunoglobulina. As cadeias leves são classificadas como kappa ou lambda. As cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou épsilon, que, por sua vez, definem as classes de imunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

[0052] A unidade estrutural básica da imunoglobulina (anticorpo) é, geralmente, um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares

idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "luz" (cerca de 25 kDa) e uma "pesada" (cerca de 50 a 70 kDa). A terminação N de cada cadeia define uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos responsável, principalmente, pelo reconhecimento do antígeno. Os termos "cadeia leve variável" (V_L) e "cadeia pesada variável" (V_H) referem-se, respectivamente, a estas cadeias leve e pesada.

[0053] Para uso na presente invenção, o termo "anticorpo" inclui imunoglobulinas intactas assim como vários fragmentos bem caracterizados. Por exemplo, Fabs, Fvs, e Fvs de cadeia única (SCFvs) que se ligam a uma proteína-alvo (ou epítipo no interior de uma proteína ou proteína de fusão) também seriam agentes de ligação específicos para aquela proteína (ou epítipo). Estes fragmentos de anticorpo são os seguintes: (1) Fab, o fragmento que contém um fragmento de ligação ao antígeno monovalente de uma molécula de anticorpo produzido por digestão do anticorpo inteiro com a enzima papaína para produzir uma cadeia leve intacta e uma porção de uma cadeia pesada; (2) Fab', o fragmento de uma molécula de anticorpo obtido pelo tratamento do anticorpo inteiro com pepsina, seguido de redução, para produzir uma cadeia leve intacta e uma porção da cadeia pesada; dois fragmentos Fab' são obtidos por molécula de anticorpo; (3) (Fab')₂, o fragmento do anticorpo obtido pelo tratamento do anticorpo inteiro com a enzima pepsina sem redução subsequente; (4) F(ab')₂, um dímero de dois fragmentos Fab' unidos por duas ligações de dissulfeto; (5) Fv, um fragmento manipulado geneticamente contendo a região variável da cadeia leve e a região variável da cadeia pesada expressas como duas cadeias; e (6) anticorpo de cadeia única, uma molécula manipulada geneticamente contendo a região variável da cadeia leve, a região variável da cadeia pesada, ligadas por um ligante de polipeptídeo adequado como uma molécula de cadeia única fundida geneticamente.

Os métodos de preparo destes fragmentos são usuais (vide, por exemplo, Harlow e Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1999).

[0054] Os anticorpos para uso nos métodos e composições desta descrição podem ser monoclonais ou policlonais. Apenas a título de exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser preparados a partir de hibridomas murinos de acordo com o método clássico de Kohler e Milstein (*Nature* 256:495-97, 1975) ou métodos derivados do mesmo. Os procedimentos detalhados para produção de anticorpo monoclonal são descritos em Harlow e Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1999.

[0055] **Afinidade de ligação do anticorpo:** A força da ligação entre um único sítio de ligação do anticorpo e um ligante (por exemplo, um antígeno ou epítipo). A afinidade de um sítio de ligação do anticorpo X por um ligante Y é representada pela constante de dissociação (K_d), que é a concentração de Y que é necessária para ocupar metade dos sítios de ligação de X presentes em uma solução. Uma (K_d) menor indica uma interação mais forte ou de maior afinidade entre X e Y e uma concentração mais baixa de ligante é necessária para ocupar os sítios. Em geral, a afinidade de ligação do anticorpo pode ser afetada pela alteração, modificação e/ou substituição de um ou mais aminoácidos no epítipo reconhecido pelo parátipo do anticorpo.

[0056] Em um exemplo, a afinidade de ligação do anticorpo é medida por titulação de ponto final em um ensaio ELISA-Ag. A afinidade de ligação do anticorpo é substancialmente reduzida (ou reduzida de forma mensurável) pela modificação e/ou substituição de um ou mais aminoácidos no epítipo reconhecido pelo parátipo do anticorpo se a titulação de ponto final de um anticorpo específico para o epítipo modificado/substituído diferir em pelo menos 4 vezes, tal como pelo menos 10 vezes, pelo menos 100 vezes ou mais, em comparação ao

epítopo inalterado.

[0057] **Antígeno:** Um composto, uma composição, ou uma substância que pode estimular a produção de anticorpos ou uma resposta de células T em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas em um animal. Um antígeno reage com os produtos da imunidade humoral ou celular específica, inclusive aqueles induzidos por imunógenos heterólogos.

[0058] **Atenuados:** No contexto de um vírus vivo, como um vírus da raiva, o vírus é atenuado caso sua capacidade de infectar uma célula ou indivíduo e/ou sua capacidade de produzir doença seja reduzida (por exemplo, eliminada). Tipicamente, um vírus atenuado retém pelo menos alguma capacidade de gerar uma resposta imune após a administração a um indivíduo imunocompetente. Em alguns casos, um vírus atenuado é capaz de gerar uma resposta imune protetora sem causar quaisquer sinais ou sintomas de infecção.

[0059] **cDNA (DNA complementar):** Um pedaço de DNA que não possui os segmentos não codificantes internos (íntrons) e as sequências regulatórias que determinam a transcrição. O cDNA é sintetizado no laboratório por transcrição reversa a partir de RNA mensageiro extraído das células.

[0060] **Epítopo:** Um determinante antigênico. Eles são grupos químicos particulares, tais como sequências de peptídeo contíguas ou não contíguas, em uma molécula que são antigênicos, isto é, que geram uma resposta imune específica. Um anticorpo se liga a um epítopo antigênico particular com base na estrutura tridimensional do anticorpo e na estrutura tridimensional pareada (ou cognata) do epítopo.

[0061] **Fertilidade:** Refere-se à capacidade de um animal produzir prole. Para uso na presente invenção "inibição da fertilidade" refere-se à redução da taxa, ou prevenção, da reprodução.

[0062] **Fixo:** Um vírus da raiva fixo é uma cepa de vírus da raiva

que foi submetida à passagem seriada em um hospedeiro para estabilizar a virulência do vírus. Os vírus da raiva fixos incluem, mas não se limitam às cepas CVS, ERA, PV, SAD-B19 e HEP-Flury (Anilionis *et al.*, *Nature* 294:275-278, 1981; Morimoto *et al.*, *Virology* 173:465-477, 1989).

[0063] **Proteína de fusão:** Uma proteína gerada pela expressão de uma sequência de ácido nucleico manipulada a partir de sequências de ácido nucleico que codificam pelo menos uma porção de duas proteínas diferentes (heterólogas). Para criar uma proteína de fusão, as sequências de ácido nucleico devem estar na mesma fase de leitura e conter códons de parada internos.

[0064] **Hormônio de liberação da gonadotropina (GnRH):** Um hormônio peptídico responsável pela liberação de hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) da hipófise anterior. O GnRH é sintetizado e liberado pelo hipotálamo e vai até a hipófise para mediar a liberação de FSH e LH. A proteína precursora do GnRH tem 92 aminoácidos e é processada em um decapeptídeo em mamíferos. O GnRH também é conhecido como GNRH1, hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), pró-gonadoliberina-1 e precursor de pró-gonadoliberina-1. O termo "GnRH" inclui análogos e variantes de GnRH, incluindo moléculas de GnRH contendo substituições, deleções, ou inserções. As sequências de nucleotídeo e aminoácido do GnRH de mamífero são descritas aqui como SEQ ID NOs: 47 e 48, respectivamente.

[0065] **Heterólogo:** Para uso na presente invenção, uma "sequência de ácido nucleico heteróloga" é uma sequência de ácido nucleico que é derivada de uma fonte ou espécie diferente. Em algumas modalidades aqui descritas, a sequência de ácido nucleico heteróloga é uma sequência de ácido nucleico que codifica ZP3. Em outras modalidades, a sequência de ácido nucleico heteróloga é uma

sequência de ácido nucleico que codifica GnRH. No contexto de um vírus da raiva recombinante, uma sequência de ácido nucleico heteróloga é qualquer sequência de ácido nucleico que não é derivada do vírus da raiva.

[0066] **Hibridização:** Oligonucleotídeos e seus análogos hibridizam por ligação de hidrogênio, que inclui ligação de hidrogênio de Watson-Crick, Hoogsteen ou de Hoogsteen reversa, entre bases complementares. Em geral, o ácido nucleico consiste em bases nitrogenadas que são pirimidinas (citosina (C), uracila (U), e timina (T)) ou purinas (adenina (A) e guanina (G)). Estas bases nitrogenadas formam ligações de hidrogênio entre uma pirimidina e uma purina, e a ligação da pirimidina à purina é chamada de "pareamento de base." Mais especificamente, A irá fazer ligação de hidrogênio com T ou U, e G se ligará a C. "Complementar" refere-se ao pareamento de base que ocorre entre duas sequências de ácido nucleico distintas ou duas regiões distintas da mesma sequência de ácido nucleico.

[0067] "Especificamente hibridizável" e "especificamente complementar" são termos que indicam um grau suficiente de complementaridade de modo a ocorrer ligação estável e específica entre o oligonucleotídeo (ou seu análogo) e o alvo de DNA ou RNA. O oligonucleotídeo ou análogo de oligonucleotídeo não precisa ser 100% complementar à sua sequência alvo para ser especificamente hibridizável. Um oligonucleotídeo ou análogo é hibridizável de forma específica quando a ligação do oligonucleotídeo ou análogo à molécula de DNA ou RNA alvo interfere com a função normal do DNA ou RNA alvo, e há um grau suficiente de complementaridade para evitar ligação inespecífica do oligonucleotídeo ou análogo a sequências não alvo sob condições nas quais a ligação específica é desejada, por exemplo, sob condições fisiológicas no caso de testes ou sistemas *in vivo*. Tal ligação é chamada de hibridização específica.

[0068] As condições de hibridização que resultam em graus particulares de estringência variarão dependendo da natureza do método de escolha para a hibridização e da composição e comprimento das sequências de ácido nucleico que estão hibridizando. Em geral, a temperatura da hibridização e a força iônica (especialmente a concentração de Na^+ e/ou Mg^{++}) do tampão de hibridização determinarão a estringência da hibridização, embora os tempos de lavagem também influenciem a estringência. Os cálculos com relação às condições de hibridização necessários para atingir graus particulares de estringência são discutidos por Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 e 11; e Ausubel *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

[0069] Para os propósitos da presente descrição, "condições estridentes" abrangem condições sob as quais a hibridização ocorrerá se houver menos de 25% de pareamento errado entre a molécula de hibridização e a sequência alvo. "Condições estridentes" podem ser decompostas em níveis particulares de estringência para uma definição mais precisa. Desta forma, para uso na presente invenção, condições de "estringência moderada" são aquelas sob as quais as moléculas com mais de 25% de pareamento errado de sequência não hibridizarão; condições de "estringência média" são aquelas sob as quais moléculas com mais de 15% de pareamento errado não hibridizarão e condições de "alta estringência" são aquelas sob as quais sequências com mais de 10% de pareamento errado não hibridizarão. As condições de "estringência muito alta" são aquelas sob as quais sequências com mais de 6% de pareamento errado não hibridizarão.

[0070] "Hibridização específica" refere-se a ligação, formação de duplexes, ou hibridização de uma molécula apenas ou

substancialmente apenas a uma sequência de nucleotídeo particular quando esta sequência está presente em uma mistura complexa (por exemplo, DNA ou RNA celular total). A hibridização específica pode, também, ocorrer sob condições de estringência variada.

[0071] **Resposta imune:** Uma resposta de uma célula do sistema imune, tal como uma célula B, célula T, macrófago ou célula polimorfonuclear, a um estímulo, tal como um antígeno. Uma resposta imune pode incluir qualquer célula do corpo envolvida em uma resposta de defesa do hospedeiro, incluindo, por exemplo, uma célula epitelial que secreta um interferon ou uma citocina. Uma resposta imune inclui, mas não se limita a uma resposta imune inata ou inflamação. Para uso na presente invenção, uma resposta imune protetora refere-se a uma resposta imune que protege um indivíduo da infecção (evita infecção ou evita o desenvolvimento de doença associada com a infecção).

[0072] **Imunizar:** Tornar um indivíduo protegido contra uma doença (por exemplo, uma doença infecciosa), tal como, por vacinação.

[0073] **Proteína imun contraceptiva:** Refere-se a uma proteína ou fragmento de proteína (também chamado de um "antígeno") capaz de gerar uma resposta imune em um indivíduo que resulta na inibição ou perda de fertilidade no indivíduo.

[0074] **Imunógeno:** Um composto, composição, ou substâncias que é capaz, sob condições adequadas, de estimular uma resposta imune, tal como a produção de anticorpos ou uma resposta de células T em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas em um animal.

[0075] **Composição imunogênica:** Um termo usado na presente invenção para significar uma composição útil para estimular ou gerar uma resposta imune específica (ou resposta imunogênica) em um vertebrado. A composição imunogênica inclui um vírus da raiva recombinante, tal como um vírus da raiva recombinante que expressa

uma proteína heteróloga (como ZP3 e/ou GnRH). Em algumas modalidades, a resposta imunogênica é protetora ou fornece imunidade protetora, em que ela permite que o animal vertebrado resista melhor à infecção ou à progressão de doença causada pelo organismo contra o qual a composição imunogênica é direcionada (por exemplo, o vírus da raiva). Quando as composições imunogênicas compreendem um peptídeo imun contraceptivo, a resposta imunogênica gerada evita ou reduz o risco de gravidez em animais do sexo feminino.

[0076] Sem desejar estar restrito a uma teoria específica, acredita-se que uma resposta imunogênica induzida por uma composição imunogênica pode surgir da geração de um anticorpo específico para um ou mais dos epítopos fornecidos na composição imunogênica. Alternativamente, a resposta pode compreender uma resposta à base de célula T auxiliar ou célula citotóxica para um ou mais dos epítopos fornecidos na composição imunogênica. Todas estas três respostas podem se originar de células naïve ou de memória. Um exemplo específico de um tipo de composição imunogênica é uma vacina.

[0077] Em algumas modalidades, uma "quantidade eficaz" ou "quantidade imunoestimulatória" de uma composição imunogênica é uma quantidade que, quando administrada a um indivíduo, é suficiente para produzir uma resposta imune detectável. Tal resposta pode compreender, por exemplo, a geração de um anticorpo específico para um ou mais dos epítopos fornecidos na composição imunogênica. Alternativamente, a resposta pode compreender uma resposta à base de célula T auxiliar ou CTL para um ou mais dos epítopos fornecidos na composição imunogênica. Todas estas três respostas podem se originar de células naïve ou de memória. Em outras modalidades, uma "quantidade eficaz protetora" de uma composição imunogênica é uma quantidade que, quando administrada a um animal, é suficiente para conferir imunidade protetora ao animal.

[0078] **Inibição ou tratamento de uma doença:** Inibição do desenvolvimento completo de uma doença ou condição, por exemplo, em um indivíduo que está em risco para uma doença. Um exemplo específico de doenças é raiva. "Tratamento" refere-se a uma intervenção terapêutica que melhora um sinal ou sintoma de uma doença ou condição patológica após ela ter começado a se desenvolver. Para uso na presente invenção, o termo "melhorar," com relação a uma doença, condição patológica ou sintoma, refere-se a qualquer efeito benéfico observável do tratamento. O efeito benéfico pode ser evidenciado, por exemplo, por um início mais tardio dos sintomas clínicos da doença em um indivíduo suscetível, uma redução na severidade de alguns ou de todos os sintomas clínicos da doença, uma progressão mais lenta da doença, uma redução no número de recaídas da doença, um aprimoramento na saúde ou bem-estar geral do indivíduo, ou por outros parâmetros bem conhecidos na técnica que são específicos para a doença específica.

[0079] **Isolado:** Um componente biológico "isolado" ou "purificado" (tal como um ácido nucleico, peptídeo, proteína, complexo de proteína, ou partícula) foi substancialmente separado, produzido longe de, ou purificado longe de outros componentes biológicos na célula do organismo no qual o componente ocorre naturalmente, isto é, outro DNA ou RNA cromossômico e extracromossômico, e proteínas. Os ácidos nucleicos, peptídeos e proteínas que foram "isolados" ou "purificados" incluem, desta forma, ácidos nucleicos e proteínas purificadas por métodos de purificação padrão. O termo também abrange ácidos nucleicos, peptídeos e proteínas preparadas por expressão recombinante em uma célula hospedeira, assim como ácidos nucleicos ou proteínas sintetizadas quimicamente. O termo "isolado" ou "purificado" não exige pureza absoluta; ao contrário, ele é entendido como um termo relativo. Desta forma, por exemplo, um componente

biológico isolado é um no qual o componente biológico é mais enriquecido do que o componente biológico no seu ambiente natural no interior de uma célula, ou outro recipiente de produção. De preferência, uma preparação é purificada de modo que o componente biológico represente pelo menos 50%, tal como pelo menos 70%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais, do conteúdo total de componente biológico da preparação.

[0080] **Marcador:** Um composto ou composição detectável que é conjugada diretamente ou indiretamente a outra molécula para facilitar a detecção daquela molécula. Alguns exemplos específicos, não limitadores de marcadores incluem etiquetas fluorescentes, ligações enzimáticas, e isótopos radioativos.

[0081] **Molécula de ácido nucleico:** Uma forma polimérica de nucleotídeos, que pode incluir ambas as fitas senso e antissenso de RNA, cDNA, DNA genômico, e formas sintéticas e polímeros mistos dos acima. Um nucleotídeo refere-se a um ribonucleotídeo, desoxinucleotídeo ou uma forma modificada de qualquer um dos tipos de nucleotídeo. O termo "molécula de ácido nucleico", para uso na presente invenção tem o mesmo significado de "ácido nucleico" e "polinucleotídeo." Uma molécula de ácido nucleico tem geralmente pelo menos 10 bases de comprimento, exceto onde especificado em contrário. O termo inclui formas de fita simples e dupla de DNA. Um polinucleotídeo pode incluir nucleotídeos de ocorrência natural e modificados ligados juntos por ligações de nucleotídeo de ocorrência natural e/ou que não tem ocorrência natural.

[0082] **Fase aberta de leitura (ORF):** Uma série de trincas de nucleotídeos (códon) que codificam aminoácidos sem qualquer códon de terminação interno. Estas sequências geralmente podem ser traduzidas em um peptídeo/polipeptídeo/proteína/poliproteína.

[0083] **Operacionalmente ligado:** Uma primeira sequência de

ácido nucleico é operacionalmente ligada a uma segunda sequência de ácido nucleico quando a primeira sequência de ácido nucleico é colocada em uma relação funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor é operacionalmente ligado a uma sequência codificante caso o promotor afete a transcrição ou expressão da sequência codificante. Em geral, as sequências de DNA operacionalmente ligadas são contíguas e, onde necessário para unir duas regiões codificantes de proteína, estão na mesma fase de leitura. Caso íntrons estejam presentes, as sequências de DNA operacionalmente ligadas podem não ser contíguas.

[0084] **Veículos farmacologicamente aceitáveis:** Os veículos farmacologicamente aceitáveis úteis nesta descrição são convencionais. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edição (1975), descreve composições e formulações adequadas para liberação farmacêutica de um ou mais compostos ou moléculas terapêuticas, proteínas ou anticorpos que se ligam a estas proteínas, e agentes farmacêuticos adicionais.

[0085] Em geral, a natureza do veículo dependerá do modo de administração particular sendo empregado. Por exemplo, as formulações parenterais geralmente compreendem fluidos injetáveis que incluem fluidos farmacologicamente e fisiologicamente aceitáveis como água, solução salina fisiológica, solução salina balanceada, dextrose aquosa, glicerol ou similares como um veículo. Para composições sólidas (por exemplo, formas em pó, pílula, comprimido, ou cápsula), os veículos sólidos atóxicos convencionais podem incluir, por exemplo, manitol, lactose, amido, ou estearato de magnésio de grau farmacêutico. Além dos veículos biologicamente neutros, as composições farmacêuticas a serem administradas podem conter quantidades pequenas de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes umectantes ou de emulsificação, conservantes, e agentes de

tamponamento de pH e similares, por exemplo, acetato de sódio ou monolaurato de sorbitano.

[0086] **Plasmídio:** Uma molécula de ácido nucleico circular capaz de replicação autônoma em uma célula hospedeira.

[0087] **Polipeptídeo:** Um polímero no qual os monômeros são resíduos de aminoácido unidos juntos através de ligações de amida. Quando os aminoácidos são alfa-aminoácidos, ou o isômero óptico-L ou o isômero óptico-D podem ser usados, os isômeros-L sendo preferenciais para muitos usos biológicos. Os termos "polipeptídeo" ou "proteína", para uso na presente invenção, se destinam a abranger qualquer molécula de aminoácido e incluem moléculas de aminoácido modificadas. O termo "polipeptídeo" se destina especificamente a abranger proteínas de ocorrência natural, assim como as que são produzidas de forma recombinante ou sintética.

[0088] Substituições de aminoácido conservativas são as substituições que, quando feitas, interferem pouco com as propriedades da proteína original, isto é, a estrutura e, especialmente, a função da proteína é conservada e não alterada significativamente por estas substituições. Exemplos de substituições conservativas são mostrados abaixo.

Resíduo original	Substituições conservativas
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln

Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0089] As substituições conservativas geralmente mantêm (a) a estrutura da cadeia principal do polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) a carga ou capacidade hidrofóbica da molécula no sítio alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral.

[0090] Os aminoácidos são classificados tipicamente em uma ou mais categorias, incluindo polar, hidrofóbicos, ácidos, básicos e aromáticos, de acordo com suas cadeias laterais. Exemplos de aminoácidos polares incluem aqueles que têm grupos funcionais de cadeia lateral, como hidroxila, sulfidril, e amida, assim como os aminoácidos ácidos e básicos. Os aminoácidos polares incluem, mas não se limitam a asparagina, cisteína, glutamina, histidina, selenocisteína, serina, treonina, triptofano e tirosina. Exemplos de aminoácidos hidrofóbicos ou não polares incluem os resíduos que têm cadeias laterais alifáticas não polares, como, sem limitação, leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, prolina, metionina e fenilalanina. Exemplos de resíduos de aminoácido básicos incluem aqueles que possuem uma cadeia lateral básica, como um grupo amina ou guanidino. Os resíduos de aminoácido básicos incluem, mas não se limitam a arginina, homolisina e lisina. Exemplos de resíduos de

aminoácido ácidos incluem aqueles que possuem um grupo funcional de cadeia lateral ácida, como um grupo carbóxi. Os resíduos de aminoácido ácidos incluem, mas não se limitam a ácido aspártico e ácido glutâmico. Os aminoácidos aromáticos incluem aqueles que possuem um grupo de cadeia lateral aromática. Exemplos de aminoácidos aromáticos incluem, mas não se limitam a bifenilalanina, histidina, 2-naftilalanina, pentafluorofenilalanina, fenilalanina, triptofano e tirosina. Observa-se que alguns aminoácidos são classificados em mais de um grupo, por exemplo, histidina, triptofano, e tirosina são classificados como aminoácidos polares e aromáticos. Aminoácidos adicionais que são classificados em cada um dos grupos acima são conhecidos dos versados na técnica.

[0091] As substituições que geralmente são esperadas produzindo as maiores alterações nas propriedades da proteína serão não conservativas, por exemplo, alterações nas quais (a) um resíduo hidrofílico, por exemplo, serila ou treonila, é substituído por um resíduo hidrofóbico, por exemplo, leucila, isoleucila, fenilalanila, valila ou alanila; (b) uma cisteína ou prolina é substituída por qualquer outro resíduo; (c) um resíduo que possui uma cadeia lateral eletropositiva, por exemplo, lisila, arginila ou histadila, é substituído por um resíduo eletronegativo, por exemplo, glutamila ou aspartila; ou (d) um resíduo que possui uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenilalanina, é substituído por um que não possui uma cadeia lateral, por exemplo, glicina.

[0092] **Sondas e iniciadores:** Uma sonda compreende uma molécula de ácido nucleico isolada ligada a um marcador detectável ou outra molécula repórter. Marcadores típicos incluem isótopos radioativos, substratos enzimáticos, cofatores, ligantes, agentes quimioluminescentes ou fluorescentes, haptenos, e enzimas. Os métodos para marcação e instruções sobre a escolha dos marcadores adequados para vários propósitos são discutidos, por exemplo, em

Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 e Ausubel *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

[0093] Os iniciadores são moléculas de ácido nucleico curtas, por exemplo, oligonucleotídeos de DNA com 6 nucleotídeos ou mais de comprimento, por exemplo, que hibridizam a nucleotídeos complementares contíguos ou uma sequência a ser amplificada. Oligonucleotídeos de DNA mais longos podem ter cerca de 10, 12, 15, 20, 25, 30, ou 50 nucleotídeos ou mais de comprimento. Os iniciadores podem ser anelados a uma fita de DNA alvo complementar por hibridização de ácido nucleico para formar um híbrido entre o iniciador e a fita de DNA alvo, e, então, o iniciador é estendido ao longo da fita de DNA alvo por uma enzima DNA polimerase. Pares de iniciadores podem ser usados para amplificação de uma sequência de ácido nucleico, por exemplo, pela reação em cadeia de polimerase (PCR) ou outros métodos de amplificação de ácido nucleico conhecidos na técnica. Outros exemplos de amplificação incluem amplificação por deslocamento de fita, como descrito na patente US N° 5.744.311; amplificação isotérmica sem transcrição, como descrito na patente US N° 6.033881; amplificação por reação de reparo em cadeia, como descrito em WO 90/01069; amplificação por reação em cadeia da ligase, como descrito em EP-A-320 308; amplificação por reação em cadeia da ligase para preenchimento de lacunas, como descrito em 5.427.930; e amplificação sem transcrição de RNA NASBA[®], como descrito na patente US No. 6.025.134.

[0094] Os métodos para preparar e usar sondas e iniciadores de ácido nucleico são descritos, por exemplo, em Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel *et al.*

Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999; e Innis *et al. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990. Os pares de iniciadores de amplificação podem ser derivados de uma sequência conhecida, por exemplo, com o uso de programas de computador destinados a este propósito, como Primer (Versão 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). Um versado na técnica apreciará que a especificidade de uma sonda ou iniciador particular aumenta com seu comprimento. Desta forma, de modo a obter maior especificidade, pode-se selecionar sondas e iniciadores que compreendem pelo menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou mais nucleotídeos consecutivos de uma sequência de nucleotídeo alvo.

[0095] **Proteína:** Uma molécula biológica, particularmente um polipeptídeo, expressa por um gene e que compreende aminoácidos.

[0096] **Purificado:** O termo "purificado" não exige pureza absoluta; ao contrário, ele é entendido como um termo relativo. Desta forma, por exemplo, uma preparação de proteína purificada é uma na qual a proteína em questão é mais pura do que no seu ambiente natural no interior de uma célula. Em geral, uma preparação de proteína é purificada de modo que a proteína represente pelo menos 50% do conteúdo de proteína total da preparação.

[0097] **Vírus da raiva (RV):** Um membro da família Rhabdoviridae que tem um genoma de RNA não segmentado com polaridade de sentido negativo. O vírus da raiva é o protótipo do gênero *Lyssavirus*. A cepa Evelyn-Rokitnicki-Abelseth (ERA) do vírus da raiva é uma cepa derivada da cepa Street-Alabama-Dufferin (SAD), primeiramente isolada a partir de um cachorro com raiva no Alabama (EUA) em 1935. A cepa ERA foi originada após várias passagens de SAD RV em cérebro de camundongo, células de rins de hamster bebê (BHK), e embriões de galinha. A sequência genômica completa da cepa ERA é apresentada

na publicação PCT nº WO 2007/047459, e a sequência da cepa ERA recuperada por genética reversa é descrita aqui como SEQ ID NO: 1.

[0098] **Recombinante:** Um ácido nucleico, proteína ou vírus recombinante é um que tem uma sequência que não tem ocorrência natural ou tem uma sequência que é produzida por uma combinação artificial de dois segmentos de sequência que são de outro modo separados. Esta combinação artificial é frequentemente obtida por síntese química ou, mais comumente, pela manipulação artificial de segmentos isolados de ácidos nucleicos, por exemplo, por técnicas de engenharia genética. Em algumas modalidades, o vírus da raiva recombinante é gerado com o uso de genética reversa, como o sistema de genética reversa descrito na publicação PCT nº WO 2007/047459. Em alguns exemplos, os vírus da raiva recombinantes compreendem uma ou mais mutações em um fator de virulência viral, tal como uma glicoproteína. Em outros exemplos, os vírus da raiva recombinantes compreendem um gene heterólogo, tal como uma sequência que codifica um peptídeo imun contraceptivo (por exemplo, ZP3 ou GnRH).

[0099] **Genética reversa:** Refere-se ao processo de introduzir mutações (tais como deleções, inserções ou mutações pontuais) no genoma de um organismo ou vírus de modo a determinar o efeito fenotípico da mutação. Por exemplo, a introdução de uma mutação em um gene viral específico permite que se determine a função do gene.

[00100] **Identidade de sequência:** A similaridade entre duas sequências de ácido nucleico, ou duas sequências de aminoácido, é expressa em termos da similaridade entre as sequências, chamada também de identidade de sequência. A identidade de sequência é medida frequentemente em termos de porcentagem de identidade (ou similaridade ou homologia); quanto maior a porcentagem, mais similares são as duas sequências.

[00101] Os métodos de alinhamento de sequências para

comparação são bem conhecidos na técnica. Vários programas e algoritmos de alinhamento são descritos em: Smith e Waterman (*Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981); Needleman e Wunsch (*J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970); Pearson e Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:2444, 1988); Higgins e Sharp (*Gene*, 73:237-44, 1988); Higgins e Sharp (*CABIOS*, 5:151-53, 1989); Corpet *et al.* (*Nuc. Acids Res.*, 16:10881-90, 1988); Huang *et al.* (*Comp. Appls. Biosci.*, 8:155-65, 1992); e Pearson *et al.* (*Meth. Mol. Biol.*, 24:307-31, 1994). Altschul *et al.* (*Nature Genet.*, 6:119-29, 1994) apresenta uma consideração detalhada sobre métodos de alinhamento de sequência e cálculos de homologia.

[00102] As ferramentas de alinhamento ALIGN (Myers e Miller, *CABIOS* 4:11-17, 1989) ou LFASTA (Pearson e Lipman, 1988) podem ser usadas para executar comparações de sequência (Programa disponível na Internet © 1996, W. R. Pearson e Universidade da Virginia, "fasta20u63" versão 2.0u63, data de lançamento dezembro de 1996). O programa ALIGN compara sequências inteiras, enquanto que o programa LFASTA compara regiões de similaridade local. Estas ferramentas de alinhamento e seus respectivos tutoriais estão disponíveis na Internet na página do NCSA. Alternativamente, para comparações de sequências de aminoácido de mais de cerca de 30 aminoácidos, a função "Blast 2 sequences" pode ser empregada com o uso da matriz padrão BLOSUM62 ajustada para os parâmetros predefinidos, (custo por existência de lacuna (gap existence cost) de 11, e custo de lacuna por resíduo (per residue gap cost) de 1). Ao alinhar peptídeos curtos (menos que cerca de 30 aminoácidos), o alinhamento deve ser feito com o uso da função "Blast 2 sequences", empregando a matriz PAM30 ajustada para os parâmetros predefinidos (penalidade por lacuna aberta (open gap) de 9, por extensão da lacuna (extension gap) de 1). O sistema de comparação de sequências BLAST está disponível, por exemplo, na página da Internet do NCBI; vide também

Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-10, 1990; Gish e States, *Nature Genet.*, 3:266-72, 1993; Madden *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 266:131-41, 1996; Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402, 1997; e Zhang e Madden, *Genome Res.*, 7:649-56, 1997.

[00103] Ortólogos (equivalentes a proteínas de outras espécies) de proteínas são, em alguns casos, caracterizados por possuir mais de 75% de identidade de sequência calculada com relação ao alinhamento de extensão completa com a sequência de aminoácido da proteína específica com o uso de ALIGN ajustado para os parâmetros padrão. Proteínas com similaridade ainda maior a uma sequência de referência mostrarão porcentagens de identidade crescentes quando avaliadas por este método, como pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% de identidade de sequência. Além disso, a identidade de sequência pode ser comparada com relação à extensão completa de um ou ambos os domínios de ligação das proteínas de fusão apresentadas.

[00104] Quando significativamente menos que a sequência inteira está sendo comparada para avaliação da identidade de sequência, as sequências homólogas possuirão tipicamente pelo menos 80% de identidade de sequência ao longo de janelas curtas de 10 a 20, e podem possuir identidades de sequência de pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% dependendo da sua similaridade à sequência de referência. A identidade de sequência com relação a estas janelas curtas pode ser determinada com o uso de LFASTA; os métodos são descritos na página da Internet da NCSA. Um versado na técnica apreciará que estas faixas de identidade de sequência são fornecidas apenas para orientação; é totalmente possível a obtenção de homólogos muito mais significativos fora das faixas fornecidas. Conceitos de homologia similares se aplicam para ácidos nucleicos assim como são descritos para proteínas. Uma indicação alternativa de

que duas moléculas de ácido nucleico são intimamente relacionadas é que as duas moléculas hibridizam uma a outra sob condições estridentes.

[00105] Entretanto, sequências de ácido nucleico que não mostram um alto grau de identidade podem codificar sequências de aminoácido similares, por causa da degeneração do código genético. Entende-se que alterações na sequência de ácido nucleico podem ser produzidas com o uso desta degeneração para produzir várias sequências de ácido nucleico que codificam, cada, substancialmente a mesma proteína.

[00106] **Quantidade terapeuticamente eficaz:** Uma quantidade de um agente especificado suficiente para obter um efeito desejado em um indivíduo que está sendo tratado com aquele agente. Por exemplo, esta pode ser a quantidade de um vírus da raiva recombinante útil para gerar uma resposta imune em um indivíduo e/ou para prevenir infecção pelo vírus da raiva. De forma ideal, no contexto da presente descrição, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vírus da raiva recombinante é a quantidade suficiente para aumentar a resistência a, prevenir, melhorar ou e/ou tratar infecção causada pelo vírus da raiva em um indivíduo sem causar um efeito citotóxico substancial no indivíduo. A quantidade eficaz de um vírus da raiva recombinante útil para aumentar a resistência a, prevenir, melhorar e/ou tratar infecção em um indivíduo dependerá, por exemplo, do indivíduo que está sendo tratado, da forma de administração da composição terapêutica e de outros fatores. Em algumas modalidades, os vírus da raiva recombinantes aqui descritos compreendem uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína imun contraceptiva. Para estas composições, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode, também, se referir à quantidade do vírus da raiva recombinante necessária para inibir a fertilidade, tal como prevenir ou reduzir a taxa de gravidez nos animais do sexo feminino.

[00107] **Vetor:** Uma molécula de ácido nucleico quando introduzida

em uma célula hospedeira produzindo, assim, uma célula hospedeira transformada. Um vetor pode incluir sequências de ácido nucleico que permitem que ele replique em uma célula hospedeira, tal como uma origem de replicação (sequências de DNA que participam no início da síntese de DNA). Um vetor pode, também, incluir um ou mais genes marcadores selecionáveis e outros elementos genéticos conhecidos na técnica.

[00108] **Vírus:** Organismo infeccioso microscópico que se reproduz dentro de células vivas. Tipicamente, um vírus consiste essencialmente em um núcleo contendo um único ácido nucleico circundado por um revestimento proteico, e tem a capacidade de replicar apenas dentro de uma célula viva. A "replicação viral" é a produção de vírus adicional pela ocorrência de pelo menos um ciclo de vida viral. Um vírus pode subverter as funções normais das células hospedeiras, fazendo com que a célula se comporte de uma forma determinada pelo vírus. Por exemplo, uma infecção viral pode resultar na produção de uma citocina por uma célula, ou na resposta de uma célula a uma citocina, quando a célula não infectada normalmente não o faz.

[00109] **Zona pelúcida 3 (ZP3):** Uma glicoproteína expressa sobre a superfície de um ovo que serve como o receptor primário para a fertilização pelo espermatozóide. A ZP3 é também conhecida como glicoproteína da zona pelúcida 3, proteína da zona pelúcida C (ZPC), receptor de espermatozóide e proteína de ligação ao espermatozóide da zona pelúcida 3. Para uso na presente invenção, ZP3 refere-se a uma ZP3 de qualquer espécie de animal, incluindo, mas não se limitando a seres humanos, cachorro, porco, camundongo ou rato. Sequências exemplificadoras de ZP3 são fornecidas aqui, incluindo ZP3 de cachorro (SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 62). O termo "ZP3" inclui análogos e variantes de ZP3, incluindo ZP3 mutada ou truncada.

[00110] A menos que seja explicado de outro modo, todos os termos

técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme compreendido pelo versado na técnica à qual a invenção pertence. Os termos no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem referências no plural a menos que o contexto claramente determine de outro modo. De modo similar, o termo "ou" se destina a incluir "e", a menos que o contexto claramente determine de outro modo. Deste modo, "compreendendo A ou B" significa incluindo A, ou B, ou A e B. Deve ser ainda entendido que todos os tamanhos de base ou tamanhos de aminoácidos, e todos os valores de peso molecular ou massa molecular fornecidos para ácidos nucleicos ou polipeptídeos são aproximados, e são fornecidos para descrição. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente descrição, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências mencionadas na presente invenção estão aqui incorporadas a título de referência em suas totalidades. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as explicações dos termos, irá comandar. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a limitar a invenção.

IV. Visão geral das várias modalidades

[00111] É aqui descrito que vírus da raiva recombinantes que compreendem uma sequência heteróloga que codifica um peptídeo imun contraceptivo podem ser recuperados com sucesso com o uso de um sistema de genética reversa descrito anteriormente. Em alguns exemplos, o peptídeo imun contraceptivo é GnRH ou ZP3. Estudos em animais não humanos demonstram que os vírus da raiva recombinantes aqui descritos geram altos títulos de anticorpos neutralizantes específicos para o vírus da raiva, induzem anticorpos específicos peptídeos imun contraceptivos, protegem animais contra estímulo com vírus da raiva e não produzem efeitos colaterais adversos. Acredita-se

que eles irão fornecer efeitos contraceptivos nos animais aos quais eles forem administrados.

[00112] É aqui fornecido um vírus da raiva recombinante, sendo que o genoma do vírus da raiva recombinante compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga que codifica uma proteína imun contraceptiva. Em algumas modalidades, a proteína imun contraceptiva é o hormônio de liberação da gonadotropina (GnRH) ou zona pelúcida 3 (ZP3). Em algumas modalidades, o genoma do vírus da raiva recombinante compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica GnRH e uma sequência de ácido nucleico que codifica ZP3. Em geral, os vírus da raiva recombinantes são gerados com o uso de um sistema de genética reversa, tal como o sistema descrito na publicação PCT nº WO 2007/047459. Entretanto, qualquer vírus da raiva recombinante que compreende uma sequência de ácido nucleico heteróloga que codifica um peptídeo imun contraceptivo é contemplado.

[00113] Em algumas modalidades, o genoma do vírus da raiva recombinante é derivado da cepa ERA do vírus da raiva. Em exemplos particulares, a cepa ERA compreende a sequência de nucleotídeo apresentada como SEQ ID NO: 1. Embora a cepa ERA seja exemplificada na presente invenção, qualquer cepa adequada de vírus da raiva pode ser usada. Uma cepa adequada de vírus da raiva pode ser selecionada por um elemento versado na técnica. Exemplos de cepas do vírus da raiva incluem, mas não se limitam a CVS, ERA, PV, SAD-B19 e HEP-Flury, SAG1, SAG2 e RC-HL.

[00114] Em algumas modalidades, o genoma do vírus da raiva recombinante é manipulado de modo que as sequências gênicas do vírus da raiva são rearranjadas. Em alguns exemplos, o gene da glicoproteína (G) é posicionado entre os genes N e P, de modo que os genes do vírus da raiva estão na seguinte ordem: 3'-N-G-P-M-L-5' (vide

figura 5A). Este tipo de vírus, quando derivado da cepa ERA, é chamado na presente invenção de ERAg3p. Embora o posicionamento do gene G seja exemplificado na presente invenção, quaisquer outros rearranjos dos genes do vírus da raiva estão contemplados, contanto que o vírus recombinante possa ser recuperado com o uso de genética reversa.

[00115] Em algumas modalidades, a cepa do vírus da raiva é uma cepa atenuada. Em alguns exemplos, a glicoproteína do vírus da raiva recombinante compreende uma Glu na posição de aminoácido 333 (SEQ ID NO: 5). Outras mutações atenuantes do vírus da raiva são conhecidas na técnica e podem ser usadas com a composição e métodos aqui fornecidos.

[00116] A sequência de ácido nucleico de ZP3 pode ser uma sequência de ZP3 de qualquer espécie de animal, como seres humanos, porco, rato, camundongo ou cachorro. Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico de ZP3 é uma sequência de ácido nucleico de ZP3 de cachorro. Em alguns exemplos, a sequência de ácido nucleico de ZP3 de cachorro é SEQ ID NO: 7. Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico de GnRH é SEQ ID NO: 47. A sequência de ácido nucleico de ZP3 incorporada no vírus da raiva recombinante não precisa ser 100% idêntica a uma sequência de ácido nucleico de ZP3 conhecida na técnica ou aqui apresentada. De modo similar, sequência de ácido nucleico de GnRH é incorporada no vírus da raiva recombinante pode ser proveniente de qualquer espécie de animal e não precisa ser 100% idêntica a uma sequência de ácido nucleico de GnRH conhecida na técnica ou aqui apresentada. Em contrapartida, a sequência de ácido nucleico de ZP3 ou GnRH precisa apenas ser capaz de gerar uma resposta imune no animal no qual o vírus da raiva recombinante é administrado. Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico de ZP3 é pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos

95%, pelo menos 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 7. Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico de GnRH é pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 47.

[00117] Em algumas modalidades, os vírus da raiva recombinantes compreendem uma única cópia da sequência de ácido nucleico de ZP3 ou GnRH, ou uma única cópia de cada sequência. Em outras modalidades, o vírus da raiva recombinantes compreende várias cópias da sequência de ácido nucleico de ZP3 ou GnRH (ou outro peptídeo imun contraceptivo), como duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito ou nove cópias de uma ou ambas as sequências de ácido nucleico ZP3 e GnRH. Quando várias cópias da sequência de ácido nucleico de ZP3 e/ou GnRH são usadas, as cópias podem ser inseridas no genoma do vírus da raiva recombinante de modo que as sequências sejam contíguas. Alternativamente, as várias cópias das sequências de ácido nucleico de ZP3 ou GnRH podem ser inseridas em diferentes posições dentro do genoma do vírus da raiva, tal como em diferentes genes, ou em diferentes locais dentro do mesmo gene.

[00118] Em algumas modalidades, a sequência heteróloga que codifica o peptídeo imun contraceptivo é inserida dentro do ou adjacente ao gene da glicoproteína do vírus da raiva. Em exemplos particulares, a sequência heteróloga é inserida após a sequência de sinal da glicoproteína. Em outras modalidades, a sequência heteróloga é inserida dentro ou próximo ao (tal como imediatamente após) sítio antigênico IIa da glicoproteína. Em outras modalidades, a sequência heteróloga é inserida entre o ectodomínio e o domínio transmembrana da glicoproteína. Em exemplos particulares, a sequência de ácido nucleico heteróloga é inserida após a sequência de sinal (nucleotídeos 1 a 57 da SEQ ID NO: 49) do gene da glicoproteína. Em alguns casos,

quando a sequência de GnRH é inserida neste local, o gene da glicoproteína compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 49 (cópia única de GnRH) ou SEQ ID NO: 51 (duas cópias em tandem de GnRH). Em alguns exemplos, quando a sequência de GnRH é inserida no sítio antigênico IIa (nucleotídeo 663 da SEQ ID NO: 53) do gene da glicoproteína, o gene da glicoproteína compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 53. Em alguns exemplos, quando a sequência de GnRH é inserida na junção do ectodomínio e do domínio transmembrana da glicoproteínas (após o nucleotídeo 1374 da SEQ ID NO: 63), o gene da glicoproteína compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 63. Em outros exemplos específicos, a sequência de ácido nucleico de ZP3 é inserida entre os genes P e M do vírus da raiva. Em algumas modalidades, o vírus da raiva recombinante é um vírus da raiva listado na figura 3A ou na tabela 3.

[00119] Também são fornecidas aqui composições imunogênicas que compreendem um ou mais dos vírus da raiva recombinantes aqui descritos. É ainda fornecida uma composição imunogênica que compreende um primeiro vírus da raiva recombinante e um segundo vírus da raiva recombinante, em que o genoma do primeiro vírus da raiva recombinante compreende uma sequência de ácido nucleico de GnRH e o genoma do segundo vírus da raiva recombinante compreende uma sequência de ácido nucleico de ZP3. O primeiro vírus da raiva recombinante pode ser qualquer vírus da raiva recombinante que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica GnRH, conforme descrito na presente invenção. O segundo vírus da raiva recombinante pode ser qualquer vírus da raiva recombinante que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica ZP3, conforme descrito na presente invenção. Em algumas modalidades, as composições imunogênicas compreendem adicionalmente um veículo farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, as

composições imunogênicas compreendem um adjuvante.

[00120] É ainda fornecido um método de imunização de um animal não humano contra infecção pelo vírus da raiva e inibição da fertilidade do animal, cujo método compreende a administração ao animal de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição imunogênica que compreende um ou mais dos vírus da raiva recombinantes aqui descritos. A composição pode ser administrada com o uso de qualquer via adequada. Em algumas modalidades, a composição imunogênica é administrada oralmente, tal como através de iscas de alimento. O animal pode ser qualquer animal suscetível à infecção pelo vírus da raiva para o qual se deseja realizar controle populacional. Em algumas modalidades, o animal é um animal doméstico. Em outras modalidades, o animal é um animal selvagem. Em algumas modalidades, o animal é um cachorro, gato, rato, camundongo, morcego, raposa, guaxinim, esquilo, gambá, coiote ou lobo.

[00121] Também é aqui fornecido o uso de uma composição que compreende um ou mais vírus da raiva recombinantes com um genoma que codifica um ou mais peptídeos imunocontraceptivos, na fabricação de um medicamento para a imunização de um animal não humano contra infecção pelo vírus da raiva e inibição da fertilidade do animal. São ainda fornecidas composições que compreendem um ou mais vírus da raiva recombinantes com um genoma que codifica um ou mais peptídeos imunocontraceptivos para uso em um método de imunização de um animal não humano contra infecção pelo vírus da raiva e inibição da fertilidade do animal.

V. Determinantes da patogenicidade do vírus da raiva

[00122] O vírus da raiva (RV) é um rabdovírus – um vírus de RNA não segmentado com polaridade de sentido negativo. Dentro da família Rhabdoviridae, o vírus da raiva é o protótipo do gênero *Lyssavirus*. O RV é composto por dois componentes estruturais principais, um

nucleocapsídeo ou ribonucleoproteína (RNP), e um envelope sob a forma de uma membrana bicamada circundando o núcleo de RNP. O componente infeccioso de todos os rabdovírus é o núcleo de RNP, que consiste em um genoma de RNA de fita negativa encapsulado por nucleoproteína (N) em combinação com uma RNA polimerase dependente de RNA (L) e fosfoproteína (P). A membrana que circunda a RNP contém duas proteínas, a glicoproteína transmembrana (G) e a proteína de matriz (M), localizada no lado interno da membrana. Desta forma, o genoma viral codifica estas cinco proteínas: as três proteínas na RNP (N, L e P), a proteína de matriz (M), e a glicoproteína (G).

[00123] Os determinantes moleculares da patogenicidade de várias cepas do vírus da raiva ainda não foram completamente elucidados. A patogenicidade do RV foi atribuída a eventos multigênicos (Yamada *et al.*, *Microbiol. Immunol.* 50:25-32, 2006). Por exemplo, algumas posições no genoma do RV, se mutadas, afetam a transcrição ou replicação viral, reduzindo a virulência. Mutações no resíduo serina 389 do sítio de fosforilação no gene N (Wu *et al.*, *J. Virol.* 76:4153-4161, 2002) ou na sequência do núcleo GDN do motivo C altamente conservado no gene L (Schnell e Conzelmann, *Virol.* 214:522-530, 1995) reduziu dramaticamente a transcrição e replicação do RV.

[00124] A proteína G, também chamada de proteína "spike", está envolvida na fixação celular e fusão de membrana do RV. A região de aminoácidos na posição 330 a 340 (chamada de sítio antigênico III) da proteína G foi identificada como sendo importante para a virulência de determinadas cepas de RV. Vários estudos relatam o conceito de que a patogenicidade de cepas fixas de RV é determinada pela presença de arginina ou lisina no resíduo de aminoácido 333 da glicoproteína (Dietzschold *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 70-74, 1983; Tuffereau *et al.*, *Virol.* 172: 206-212, 1989).

[00125] Este fenômeno parece se aplicar pelo menos a vírus da raiva

fixos, como as cepas CVS, ERA, PV, SAD-B19 e HEP-Flury (Anilionis *et al.*, *Nature* 294:275-278, 1981; Morimoto *et al.*, *Virology* 173:465-477, 1989). Por exemplo, vacinas para o vírus da raiva que possuem um aminoácido diferente de Arg na posição 333 da glicoproteína são descritas, por exemplo, em WO 00/32755 (que descreve mutantes de RV nos quais todos os três nucleotídeos no códon da Arg₃₃₃ da proteína G são alterados em comparação ao vírus parental, de modo que a Arg na posição 333 é substituída por outro aminoácido); na patente europeia 350398 (que descreve um mutante de RV não virulento SAG1 derivado da cepa Bern SAD de RV, no qual a Arg na posição 333 da glicoproteína foi substituída por Ser); e no pedido de patente europeu 583998 (que descreve um mutante de RV atenuado, SAG2, no qual a Arg na posição 333 na proteína G foi substituída por Glu).

[00126] Outras cepas, como a cepa RC-HL, possuem um resíduo de arginina na posição 333 da proteína G, mas não causam infecção letal em camundongos adultos (Ito *et al.*, *Microbiol. Immunol.* 38:479-482, 1994; Ito *et al.*, *J. Virology* 75:9121-9128, 2001). Desta forma, toda a proteína G pode contribuir para a virulência de RV, embora os determinantes ou regiões não tenham sido identificados anteriormente.

[00127] O gene G codifica a única proteína que induz anticorpos neutralizantes virais. Pelo menos três estados da glicoproteína de RV são conhecidos: o estado nativo (N) que é responsável pela ligação ao receptor; um estado hidrofóbico ativos (A) necessário na etapa inicial do processo de fusão da membrana (Gaudin, *J. Cell Biol.* 150:601-612, 2000), e uma conformação de fusão inativa (I). O enovelamento e maturação corretos da proteína G desempenham papéis importantes para o reconhecimento imune. As três potenciais posições glicosiladas no domínio extracelular de G de ERA ocorrem nos resíduos Asn³⁷, Asn²⁴⁷ e Asn³¹⁹ (Wojczyk *et al.*, *Glycobiology* 8: 121-130, 1998). A não glicosilação de G afeta não apenas a conformação, mas também inibe

a apresentação da proteína na superfície celular.

[00128] Foi demonstrado anteriormente (vide a publicação PCT nº WO 2007/047459) que a expressão de G intensifica a resposta imune anti-RV. Além disso, a introdução de uma mutação de Arg para Glu na posição de aminoácido 333 da glicoproteína de RV ERA resulta em um vírus atenuado (chamado de ERAg3). Este vírus atenuado é capaz de gerar títulos significativos de anticorpos neutralizantes em animais e confere proteção contra estímulo com vírus selvagem. Além disso, conforme descrito na publicação PCT nº WO 2007/047459, um RV recombinante que compreende duas cópias da glicoproteína com a mutação G333 é particularmente útil como uma vacina devido a sua capacidade de gerar altos títulos de anticorpos neutralizantes sem morbidade ou mortalidade. Em alguns exemplos da presente invenção, um vírus da raiva recombinante que compreende a mutação G333 na glicoproteína é usado para manipular composições imun contraceptivas que compreendem ZP3 e/ou GnRH. Entretanto, um versado na técnica entenderá que qualquer um dentre vários vírus da raiva recombinantes podem ser usados para incorporar sequências heterólogas com o uso dos sistemas de genética reversa descritos na publicação PCT nº WO 2007/047459, e como resumido abaixo.

VI. Sistema de genética reversa do vírus da raiva

[00129] O RNA não pode ser facilmente manipulado diretamente por métodos de biologia molecular. As vacinas de vírus de RNA tradicionais são feitas a partir de isolados atenuados naturalmente, que são difíceis de controlar e fornecem resultados imprevisíveis. A tecnologia de genética reversa torna possível manipular vírus de RNA como DNA, que pode ser mutado, apagado ou reconstruído de acordo com projetos premeditados. Todas as funções gênicas podem ser estudadas cuidadosamente, independentemente, e em conjunto, o que beneficia o desenvolvimento da vacina. A genética reversa envolve a transcrição

reversa do genoma viral de RNA em cDNA, e clonagem do mesmo em um vetor, como um plasmídio. Após a transfecção das células hospedeiras, o vetor é transcrito em RNA para ser encapsulado por proteínas estruturais virais, que podem também ser fornecidas por plasmídios. O RNA encapsulado forma um complexo de ribonucleoproteína, que resulta em vírions que podem ser recuperados.

[00130] Um sistema de genética reversa eficaz baseado na cepa ERA do vírus da raiva é descrito na publicação PCT nº WO 2007/047459. Este sistema de genética reversa do vírus da raiva é útil para uma variedade de propósitos, inclusive para atenuar o vírus ERA de uma forma definida para o desenvolvimento de vacinas e para produzir vetores de vírus ERA para expressão de proteínas heterólogas, como proteínas para imunoprevenção, incluindo ZP3 e GnRH.

[00131] O sistema de genética reversa descrito na publicação PCT nº WO 2007/047459 se baseia em um plasmídio de transcrição de extensão completa mais uma pluralidade de plasmídios auxiliares (por exemplo, cinco plasmídios auxiliares). Os plasmídios auxiliares codificam as proteínas N, P, L e, opcionalmente, a proteína G, assim como a polimerase T7. Embora a proteína G não seja necessária para o resgate do vírus, ela otimiza a eficiência de recuperação do vírus ou o desenvolvimento do vírus quando incluída na transfecção.

[00132] A transcrição envolve a RNA polimerase II dependente de RNA celular, que está disponível em células de mamífero, e a RNA polimerase T7, que é fornecida pelos plasmídios pNLST7. As duas polimerases resultam em uma eficiência de recuperação do vírus alta e estável.

[00133] No plasmídio de transcrição, as ribozimas cabeça de martelo (hammerhead) e do vírus da hepatite delta flanqueiam um cDNA antígeno do vírus da raiva (por exemplo, da cepa ERA), permitindo a produção de extremidades 5' e 3' autênticas de RNA viral

antigenômico por transcrição. Os primeiros dez nucleotídeos da sequência da ribozima cabeça de martelo são projetados para serem complementares aos primeiros dez nucleotídeos da sequência genômica antissenso.

[00134] Dois construtos de RNA polimerase T7 modificados suportam a recuperação do vírus de maneira mais eficiente do que a RNA polimerase T7 selvagem aplicada anteriormente. Uma RNA polimerase T7 foi mutada do primeiro ATG para AT. A segunda RNA polimerase T7 possui um sinal de localização nuclear (NLS) de oito aminoácidos derivado do antígeno T grande do vírus SV40 fundido após o primeiro ATG da T7 parental. A adição do NLS resulta na RNA polimerase T7 estando presente predominantemente no núcleo. Após o mecanismo de transfecção do plasmídeo com NLS modificado, o complexo de DNA/reagente de transfecção se liga à superfície da célula. Através de endocitose, o complexo é absorvido pelo endossomo/lisossomo, e o DNA é liberado dentro do citosol. Na ausência do NLS, a maior parte dos plasmídios transfectados é retida no citosol e apenas uma pequena porcentagem do DNA liberado alcança o núcleo, onde ele é transcrito em RNA. Após a síntese de proteína, a RNA polimerase NLST7 é transportada de volta para o núcleo da célula, e os plasmídios auxiliares (com T7/promotor de CMV) no núcleo serão transcritos pela NLST7 e pela polimerase II celular. Desta forma, mais mRNAs dos plasmídios auxiliares e cRNA do pTMF de extensão completa ou seus derivados são sintetizados e resultam em alta eficiência de recuperação do vírus.

[00135] Após a expressão inicial de NLST7 pelo promotor de CMV, a polimerase NLST7 se liga ao pT7 para transcrição do gene de NLST7. Através da modificação dos transcritos no núcleo, mais mRNA de NLST7 é sintetizado, resultando em mais expressão da NLST7 polimerase. O pT7 da polimerase NLST7 assim como a unidade de

transcrição antígenômica de extensão completa estão sob o controle da polimerase NLST7, que age como um "autogene". Após a expressão da RNA polimerase T7 no núcleo, os construtos de T7 transfectados continuam a transcrever moldes de RNA de extensão completa para encapsulação da proteína N e/ou ligação da proteína L, acentuando a eficiência de recuperação do vírus.

[00136] A polimerase T7, e todos os outros plasmídios, exceto o plasmídio pTN que codifica a proteína N, são colocados sob o controle dos elementos regulatórios transcricionais de CMV e de T7. O ácido nucleico que codifica a proteína N está sob o controle de um promotor de T7 e é traduzido de forma independente do cap com base em um IRES (sítio interno de entrada do ribossomo). A RNA polimerase II celular sozinha pode ajudar na recuperação de RV caso todos os plasmídios tenham sido clonados sob o controle do promotor de CMV. No sistema de genética reversa de ERA descrito na publicação PCT nº WO 2007/047459, apenas pTN está sob o controle do promotor de T7 e é traduzido de forma independente do cap. Todos os outros construtos estão sob o controle dos elementos regulatórios transcricionais de CMV e de T7. Tipicamente, em RV, a síntese de N é abundante e a razão entre N, P e L é de aproximadamente 50:25:1. Para imitar a transcrição e montagem viral selvagem em genética reversa de RV, a expressão de N deve ser a mais elevada. Com o auxílio da polimerase NLST7 e do modo de tradução com IRES, a proteína N é expressa de forma eficaz após a transfecção do plasmídio. Isto reduz a competição pela transcrição com genes expressos constitutivamente nas células hospedeiras porque o sinal de início de transcrição de T7 não existe em células de mamífero, e resulta em eficiência aumentada da transcrição de T7.

[00137] Além disso, conforme descrito na publicação PCT nº WO 2007/047459, para intensificar a produção de proteínas virais,

plasmídios auxiliares podem ser construídos incorporando uma sequência de Kozak que foi otimizada para eficiência de translação para cada sequência codificante de proteína. Após cinco dias pós-transfecção no sistema de genética reversa de ERA, os vírus resgatados cresceram com segurança e de forma repetível até 10^7 FFU/ml sem amplificação adicional.

[00138] Os vírus da raiva recombinantes com propriedades favoráveis para vacinações podem ser desenhados com o uso, por exemplo, do sistema de genética reversa apresentado na publicação PCT nº WO 2007/047459. Cepas modificadas que possuem glicoproteínas mutadas são particularmente adequadas para uso como composições imunogênicas. Este sistema de genética reversa de RV também permite a expressão gênica externa (heteróloga) de um sistema de vetor do vírus da raiva. Uma unidade de transcrição adicional foi demonstrada sendo funcional em dois locais diferentes após a incorporação no genoma de ERA RV. Desta forma, o sistema de genética reversa de RV fornece um meio para introduzir proteínas heterólogas que servem como imun contraceptivos. Em alguns exemplos, a proteína heteróloga é ZP3, GnRH, ou ambas.

VII. Imunoconcepção

[00139] Na presente invenção são fornecidos vírus da raiva recombinantes que compreendem sequências de ácido nucleico heterólogas que codificam proteínas imun contraceptivas no seu genoma. Uma proteína imun contraceptiva refere-se a qualquer proteína ou fragmento de proteína (também chamado de um "antígeno") capaz de gerar uma resposta imune em um indivíduo que resulta na inibição ou perda de fertilidade no indivíduo a quem o antígeno é administrado. Os vírus da raiva recombinantes aqui descritos estão contemplados para vacinação de animais não humanos.

[00140] A imun contracepção envolve a vacinação contra

espermatozoides, ovos ou hormônios reprodutivos para evitar a fertilização ou a produção de gametas (Cooper e Larsen, *Reproduction* 132:821-828, 2006). Os imunógenos anteriormente testados como imun contraceptivos incluem antígenos de espermatozoides, espermatozoides inteiros, lactato desidrogenase (LDH-C4; uma proteína específica de espermatozóides), antígeno de fertilização-1 (FA-1; um antígeno específico de espermatozóides), proteína 56 de espermatozoides (sp56), epina (uma proteína do testículo/epidídimo), antígenos de oócitos (como zona pelúcida), proteína carreadora de riboflavina e gonadotropina, prolactina, proliferina, gonadotropinas e hormônios de liberação da gonadotropina (Delves *et al.*, *Trends Immunol.* 23:213-219, 2002; O'Hern *et al.*, *Vaccine* 15(16):1761-1766, 1997; Zhu e Naz, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(9):4704-4709, 1997; Hardy e Mobbs, *Mol. Reprod. Dev.* 52(2):216-224, 1999; Hardy *et al.*, *Reproduction Supplement* 60:19-30, 2002; O'Rand *et al.*, *Science* 306:1189-1190, 2004; Cooper e Larsen, *Reproduction* 132:821-828, 2006).

[00141] Inúmeros estudos imun contraceptivos focaram no uso da zona pelúcida (ZP) ou GnRH. Entretanto, em todos os casos, foi necessário administrar um adjuvante com as proteínas ZP ou GnRH de modo a gerar uma resposta imune suficiente para inibir a fertilidade dos animais tratados. É aqui apresentados que vírus da raiva recombinantes que compreendem ZP e/ou GnRH podem ser usados como composições imun contraceptivas. As características semelhantes a um superantígeno da partícula do vírus da raiva permitem o uso de vírus da raiva recombinantes que compreendem uma proteína imun contraceptiva na ausência de um adjuvante.

Hormônio de liberação da gonadotropina (GnRH)

[00142] O GnRH (também conhecido como hormônio liberador de hormônio luteinizante, ou LHRH) já foi reconhecido como tendo um papel central na regulação da fertilidade em animais. A forma

completamente processada do GnRH é um decapeptídeo que tem a mesma sequência de aminoácido em todos os mamíferos (SEQ ID NO: 48). Compostos de GnRH intimamente relacionados também foram identificados em outros não mamíferos, incluindo aves, e foram identificados receptores para GnRH em répteis e anfíbios. Em machos e fêmeas, o GnRH é liberado a partir do hipotálamo na corrente sanguínea e é transportado através do sangue para a hipófise, onde ele induz a liberação das gonadotropinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). Estas duas gonadotropinas, por sua vez, agem sobre as gônadas, induzindo a esteroidogênese e gametogênese. Em animais do sexo masculino em crescimento, as gonadotropinas estimulam o desenvolvimento dos testículos e a síntese de esteróides testiculares. Nos animais do sexo feminino em crescimento, o desenvolvimento dos ovários é estimulado e nele, o desenvolvimento dos folículos, síntese de esteróides ovarianos e ovulação. Os esteróides liberados das gônadas na circulação também agem sobre vários outros tecidos (publicação de patente US nº 2006/0013821).

[00143] Uma variedade de análogos imunogênicos de GnRH também foi descrita e é adequada ao uso com as composições e métodos aqui fornecidos. Os análogos imunogênicos de GnRH incluem compostos contendo uma substituição, deleção, ou inserção de um a cinco resíduos de aminoácido na sequência de aminoácido de GnRH, assim como dímeros ou polímeros da mesma, cujo composto retém a capacidade de induzir ou estimular a produção de anticorpos específicos para GnRH em um animal. As substituições e inserções podem ser feitas com aminoácidos naturais ou não naturais e as substituições são, de preferência, substituições conservativas produzidas com aminoácidos que mantêm substancialmente a mesma carga e capacidade hidrofóbica que o aminoácido original. Os análogos

imunogênicos de GnRH incluem os descritos, por exemplo, nas patentes US Nos. 5.484.592; 6.284.733; 4.608.251; 5.759.551; e 5.403.586, e na publicação PCT nº WO 88/05308.

Zona pelúcida (ZP)

[00144] A ZP é um revestimento de glicoproteína não celular em torno de ovos de mamífero que regula as interações espermatozoide-ovo durante a fertilização. A estrutura da ZP a torna um candidato ideal para um alvo contraceptivo, uma vez que a alteração da sua estrutura pode evitar a gravidez (publicação de patente nº US 2004/0202674).

[00145] A imunização com ZP têm sido eficaz em reduzir as taxas de fertilização de muitos mamíferos (Willis et al., *J. Equine Vet. Sci.* 14:364-370, 1994; Kirkpatrick et al., *J. Reprod. Immunol.* 35:43-51, 1996; Brown et al., *J. Reprod. Immunol.* 35:43-51, 1997; Brown et al., *J. Reprod. Immunol.* 35:53-64, 1997; patente US No 6.027.727). Dois relatos independentes indicaram que a zona pelúcida de porco (pZP) é um imun contraceptivo eficaz em gatos domésticos, entretanto, vários reforços são necessários (Ivanova et al., *Theriogenology* 43:969-981, 1995; Bradley et al., *J. Biochem.* 73:91-101, 1999).

[00146] A zona pelúcida suína também tem sido usada em vacinas imun contraceptivas à base de lipossomo para reduzir a fertilidade de determinados mamíferos em 90 a 100% com uma eficácia de vários anos (publicação PCT nº WO 93/25231). Entretanto, o uso de pZP em tal vacina à base de lipossomo como uma vacina de administração única não é eficaz em gatos (Gorman et al., *Theriogenology* 58:135-149, 2002).

[00147] As sequências de ZP3 de uma variedade de espécies diferentes são bem conhecidas na técnica, incluindo ZP3 de cachorro (nº de acesso no Genbank NM_001003224, depositada em 5 de agosto de 2004); ZP3 de suíno (nº de Acesso no Genbank D45065, depositado em 24 de janeiro de 1995; nº de Acesso no Genbank NM_213893,

depositado em 20 de maio de 2004); ZP3 de camundongo (nº de Acesso no Genbank BC103585, depositado em 22 de agosto 2005; nº de Acesso no Genbank BC099465, depositado em 21 de julho de 2005; nº de Acesso no Genbank BC103584, depositado em 22 de agosto de 2005); ZP3 de rato (nº de Acesso no Genbank BC127488, depositado em 22 de dezembro de 2006); e ZP3 humana (nº de Acesso no Genbank BC113949, depositado em 25 de fevereiro de 2006; nº de Acesso no Genbank X56777, depositado em 16 de junho de 1993; nº de Acesso no Genbank M60504, depositado em 4 de agosto de 1993; nº de Acesso no Genbank A18567, depositado em 21 de julho de 1994). Cada um dos números de acesso ao Genbank mencionados acima está aqui incorporado por referência. Em exemplos específicos da presente invenção, a sequência de ZP3 é uma sequência de ZP3 de cachorro (SEQ ID NO: 7). Entretanto, qualquer sequência de ZP3 capaz de gerar uma resposta imune no animal a ser vacinado pode ser usada com as composições e métodos aqui fornecidos.

VIII. Administração e uso de composições imun contraceptivas de vírus da raiva

[00148] Os vírus da raiva recombinantes aqui descritos compreendem pelo menos uma sequência de ácido nucleico heteróloga que codifica uma proteína imun contraceptiva. Desta forma, as composições imun contraceptivas que compreendem estes vírus da raiva recombinantes possuem uma função dupla: (i) proteger animais vacinados contra infecção pelo vírus da raiva e (ii) controlar o crescimento da população de animais pela inibição da fertilidade dos animais. Consequentemente, as composições imun contraceptivas aqui fornecidas estão contempladas para uso com animais não humanos. Em alguns casos, o vírus da raiva recombinante é administrado a animais domésticos. Em outros casos, o vírus da raiva recombinante é administrado a animais selvagens. Animais não

humanos para os quais as composições imun contraceptivas do vírus da raiva serão úteis podem incluir, mas não se limitam a cachorros, gatos, ratos, camundongos, morcegos, raposas, guaxinins, esquilos, gambás, coiotes ou lobos. Particularmente com animais selvagens, é preferencial administrar a composição imunogênica oralmente, tal como através de iscas de alimento.

[00149] As formulações imunogênicas podem ser convenientemente apresentadas em forma de dose unitária e preparadas com o uso de técnicas farmacêuticas convencionais. Estas técnicas incluem a etapa de colocar o ingrediente ativo em associação com o(s) veículo(s) farmacêutico(s) ou excipiente(s). Em geral, as formulações são preparadas por colocar o ingrediente ativo uniformemente e intimamente em associação com veículos líquidos. As formulações adequadas para administração parenteral incluem soluções para injeção estéreis aquosas e não aquosas, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos e solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do receptor pretendido; e suspensões aquosas e não aquosas estéreis que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As formulações podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou de múltiplas doses, por exemplo, ampolas e frascos lacrados, e podem ser armazenadas em uma condição seca por congelamento (liofilizada) que exige apenas a adição de um veículo líquido estéril, por exemplo, água para injeção, imediatamente antes do uso. As soluções e suspensões de injeção extemporânea podem ser preparadas a partir de pós estéreis, grânulos e comprimidos comumente usados por um versado na técnica.

[00150] Em certas modalidades, formulações em dose unitária são aquelas que contêm uma dose ou unidade, ou uma fração adequada da mesma, do ingrediente administrado. Deve-se compreender que além dos ingredientes particularmente mencionados acima, as formulações

abrangidas na presente invenção podem incluir outros agentes comumente usados por um versado na técnica.

[00151] As composições aqui fornecidas, inclusive aquelas para uso como composições imunogênicas, podem ser administradas através de diferentes vias, tal como oral, incluindo bucal e sublingual, retal, parenteral, aerossol, nasal, intramuscular, subcutânea, intradérmica, e tópica. Elas podem ser administradas de diferentes formas, incluindo, mas não se limitando a soluções, emulsões e suspensões, microesferas, partículas, micropartículas, nanopartículas e lipossomos. Em modalidades preferenciais, as composições imunogênicas são administradas oralmente. Em alguns exemplos, a administração oral compreende administrar as composições em iscas de alimento.

[00152] O volume de administração irá variar dependendo da via de administração. Os elementos versados na técnica saberão os volumes adequados para diferentes vias de administração.

[00153] A administração pode ser realizada por doses únicas ou múltiplas. A dose administrada a um animal no contexto da presente descrição deve ser suficiente para induzir uma resposta terapêutica benéfica ao longo do tempo, tal como evitar infecção por RV e evitar a reprodução. A dose necessária irá variar dependendo, por exemplo, da espécie do animal.

[00154] A quantidade de composição imunogênica em cada dose é selecionada como uma quantidade que induz uma resposta imunoestimulatória ou imunoprotetora sem efeitos colaterais adversos significativos. Esta quantidade irá variar dependendo de qual composição específica é empregada e como ela é administrada. As doses iniciais podem variar de cerca de 1 µg a cerca de 1 mg, com algumas modalidades tendo uma faixa de cerca de 10 µg a cerca de 800 µg, e ainda outras modalidades uma faixa de cerca de 25 µg a cerca de 500 µg. Após uma administração inicial da composição imunogênica,

os indivíduos podem receber uma ou várias administrações de reforço, adequadamente espaçadas. As administrações de reforço podem variar de cerca de 1 µg a cerca de 1 mg, com outras modalidades tendo uma faixa de cerca de 10 µg a cerca de 750 µg, e ainda outras, uma faixa de cerca de 50 µg a cerca de 500 µg. Reforços periódicos em intervalos de 1 a 5 anos, por exemplo, três anos, podem ser desejáveis para manter os níveis desejados de imunidade protetora. Em modalidades preferenciais, os animais recebem uma dose única de uma composição imunogênica.

[00155] A preparação das iscas de alimento contendo as composições imunogênicas também é conhecida pelo versado na técnica. Por exemplo, a preparação de iscas de alimento contendo vacinas de RV vivo é apresentada em Wandeler *et al.* (*Rev. Infect. Dis.* 10 (supl. 4):649-653, 1988), Aubert *et al.* (pp. 219-243, in *Lyssaviruses* (Rupprecht *et al.*, eds.), Springer-Verlag, New York, 1994), and Fu *et al.* (pp. 607-617, in *New Generation Vaccines* (2^a Edit.) (Levine *et al.*, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1997).

[00156] São aqui fornecidas composições farmacêuticas (também chamadas de composições imunogênicas ou imunoestimulatórias) que incluem uma quantidade terapeuticamente eficaz de um RV recombinante sozinho ou em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o RV recombinante compreende uma proteína heteróloga, tal como ZP3 e/ou GnRH.

[00157] Os veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não se limitam à solução salina, à solução salina tamponada, à dextrose, à água, a glicerol, a etanol, e a combinações dos mesmos. O veículo e a composição podem ser estéreis, e a formulação se adéqua ao modo de administração. A composição pode também conter quantidades secundárias de agentes umectantes ou de emulsificação, ou agentes de

tamponamento de pH. A composição pode ser uma solução líquida, suspensão, emulsão, comprimido, pílula, cápsula, formulação com liberação sustentada, ou pó. A composição pode ser formulada como um supositório, com aglutinantes e veículos tradicionais, como triglicerídeos. As formulações orais podem incluir veículos-padrão, como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose e carbonato de magnésio. Qualquer um dos veículos farmacêuticos comuns, como solução salina estéril ou óleo de gergelim, pode ser usado. O meio pode também conter materiais auxiliares farmacêuticos convencionais, como, por exemplo, sais farmacologicamente aceitáveis para ajustar a pressão osmótica, tampões, conservantes e similares. Outros meios que podem ser usados com a composição e métodos aqui fornecidos são solução salina normal e óleo de gergelim.

[00158] Os RVs recombinantes aqui descritos podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outros agentes terapêuticos para intensificar a antigenicidade. Por exemplo, os vírus recombinantes podem ser administrados com um adjuvante, como adjuvante incompleto de Freund ou adjuvante completo de Freund.

[00159] Opcionalmente, uma ou mais citocinas, como IL-2, IL-6, IL-12, RANTES, GM-CSF, TNF- α , ou IFN- γ , um ou mais fatores de crescimento, como GM-CSF ou G-CSF; uma ou mais moléculas como OX-40L ou 41 BBL, ou combinações destas moléculas, podem ser usadas como adjuvantes biológicos (vide, por exemplo, Salgaller *et al.*, 1998, *J. Surg. Oncol.* 68(2):122-38; Lotze *et al.*, 2000, *Cancer J. Sci. Am.* 6 (Supl 1):S61-6; Cao *et al.*, 1998, *Stem Cells* 16(Supl 1):251-60; Kuiper *et al.*, 2000, *Adv. Exp. Med. Biol.* 465:381-90). Estas moléculas podem ser administradas sistemicamente (ou localmente) ao hospedeiro.

[00160] Vários meios para induzir respostas celulares, tanto *in vitro*

quanto *in vivo*, são conhecidos. Lipídios foram identificados como agentes capazes de auxiliar a pré-ativação de CTL *in vivo* contra vários antígenos. Por exemplo, conforme descrito na patente U.S. nº 5.662.907, resíduos de ácido palmítico podem ser fixados aos grupos amino alfa e épsilon de um resíduo de lisina e, então, ligados (por exemplo, através de um ou mais resíduos de ligação, como glicina, glicina-glicina, serina, serina-serina, ou similares) a um peptídeo imunogênico. O peptídeo lipidado pode, então, ser injetado diretamente em uma forma de micela, incorporado em um lipossomo, ou emulsionado em um adjuvante. Como outro exemplo, lipoproteínas de *E. coli*, como a tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina, podem ser usadas para pré-ativar CTL tumor-específicas quando ligadas covalentemente a um peptídeo adequado (vide, Deres *et al.*, *Nature* 342:561, 1989). Adicionalmente, como a indução de anticorpos neutralizantes pode também ser pré-ativada com a mesma molécula conjugada a um peptídeo que apresenta um epitopo adequado, duas composições podem ser combinadas para gerar resposta humorais e mediadas por células, onde desejado.

[00161] Os exemplos apresentados a seguir são fornecidos para ilustrar determinadas características e/ou modalidades específicas. Estes exemplos não devem ser considerados como limitadores da descrição às características ou modalidades particulares descritas.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Estudos imun contraceptivos baseados no vírus da raiva ERA com o uso de ZP3 de cachorro

[00162] Este exemplo descreve o desenvolvimento de uma composição imun contraceptiva que compreende uma cepa ERA do vírus da raiva recombinante e zona pelúcida 3 de cachorro (ZP3). Estudos imun contraceptivos com base na glicoproteína zona pelúcida de suíno (pZP) foram tentados em diferentes animais, incluindo

cachorros. O complexo de pZP foi relatado como sendo eficaz em várias espécies como um imun contraceptivo. Entretanto, pelo fato do complexo de pZP ser uma mistura de ovário suíno inteiro, reações adversas não são incomuns. Portanto, uma glicoproteína ZP3 canina foi expressa em *E. coli* e um gene ZP3 de cachorro foi clonado como um candidato à vacina de DNA. O princípio foi desenvolver uma vacina imun contraceptiva à base do vírus da raiva ERA que pode controlar o vírus da raiva e a população de cachorros simultaneamente. O vírus da raiva ERA se mostrou um vetor ideal para expressão de genes heterólogos. Além disso, demonstrou-se que o vírus ERA modificado é eficaz como um candidato à vacina oral em várias espécies de animais (vide a publicação PCT nº WO 2007/047459).

[00163] A ZP3 de cachorro de extensão completa foi sintetizada quimicamente e montada por reação em cadeia de polimerase (PCR). A ZP3 de cachorro tem 1278 pares de base de comprimento e codifica uma proteína de 426 aminoácidos. O gene sintetizado é descrito aqui como SEQ ID NO: 7; a sequência de aminoácido é descrita como SEQ ID NO: 8. Para sintetizar o gene ZP3 de cachorro, o gene ZP3 de cachorro de extensão completa foi dividido em dois fragmentos para síntese, os quais são chamados como fragmentos A e B. O fragmento A (619 pares de base), que começa no códon de início ATG e termina com um único sítio de reconhecimento de *NdeI*, foi montado com 18 oligonucleotídeos (Tabela 1). O fragmento B (670 pares de base) começa no único sítio de reconhecimento de *NdeI* e continua até o códon de parada (TAA) e foi montado por 20 oligonucleotídeos (Tabela 1). O método para planejamento dos oligonucleotídeos se baseou em "inside-out gene synthesis" com o uso do programa DNAWorks (Hoover e Lubkowski, *Nucleic Acids Res.* 30(10):e43, 2002).

[00164] Após os fragmentos A e B terem sido sintetizados corretamente, eles foram sequenciados cuidadosamente para corrigir

quaisquer mutações potenciais introduzidas durante as reações de PCR. Uma mutação silenciosa (que não altera a sequência de aminoácidos) de C para T foi mantida intencionalmente para distinguir o gene sintetizado do gene molde (números de acesso ao Genbank NM_001003224, depositado em 5 de agosto de 2004, SEQ ID NO: 62). Os oligonucleotídeos para síntese dos fragmentos A e B são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos para síntese de ZP3 de cachorro

OLIGO	SEQUÊNCIA	SEQ. ID Nº:
1A	AAAAC TGCAGCCACCATG	9
2A	AACTGCAGCCACCATGGGGCTGAGCTATGGAAT TTTCATCTGTTTTCTGCTCCT	10
3A	TTTCATCTGTTTTCTGCTCCTGGGAGGCATGGAG CTGTGCTGCCCCCAGACCAT	11
4A	CTGCCCCCAGACCATCTGGCCAACTGAGACCTA CTACCCATTGACATCTAGGCC	12
5A	CCCATTGACATCTAGGCCCCAGTAATGGTGGA CTGTCTGGAGTCCCAGCTGGT	13
6A	GGAGTCCCAGCTGGTGGTCACTGTCAGCAAAGA CCTTTTTGGTACTGGGAAGCT	14
7A	CTTTTTGGTTACGGGAAGCTCATCAGGCCAGCA GACCTCACCTGGGTCCAGAG	15
8A	CACCCTGGGTCCAGAGAACTGTGAGCCCCTGGT CTCCATGGACACGGATGATGT	16
9A	CATGGACACGGATGATGTGGTCAGGTTTGAGGT TGGGCTGCACGAGTGTGGCAG	17
10A	GTGCTGTACACCAGAGCATTGTGAGTCACCTGC ACCCTGCTGCCACACTCGTGC	18
11A	CAGGTTGCCCGCAGGGCGGGGGCTGTGGATCA GGAAGGTGCTGTACACCAGAGC	19
12A	ACTCGATGGGGACCTCGGCACGATTAGTTCTCA GGATGGACAGGTTGCCCGCAG	20
13A	GGCCTGGCTGCTCACATTGCTGTGCCTGGGGTA GTGGCACTCGATGGGGACCTC	21

OLIGO	SEQUÊNCIA	SEQ. ID Nº:
14A	AGAGCATTGTGGTCCTGAAGGGCACCCAAGTGG GCAGGATGGCCTGGCTGCTCA	22
15A	CCATTAGGCGGAGAGAGAAAAGTAGCTTCTCCT CGAAGAGCATTGTGGTCCTGA	23
16A	ATGTGGGGGATTGCTTCTCGGAGCCCCAGTCCT CCTCCATTAGGCGGAGAGAGA	24
17A	CTTCAGCCTGGAGGTGGGCTATGTCTCCCAGCT GGAATGTGGGGGATTGCTTCT	25
18A	ACAAAAAGTCGCAGTGGCATATGGCTGCCAGTG TGGACTTCAGCCTGGAGGTG	26
1B	TGGCAGCCATATGCCACTGCGACTTTTTGTGGA CCTGT	27
2B	GACTTTTTGTGGACCACTGTGTGGCCACGCTGA CACCAGATCGGAATGCCTTCC	28
3B	CAGATCGGAATGCCTTCCCTCATCACAAAATTG TGGACTTCCATGGCTGTCTTG	29
4B	GACTTCCATGGCTGTCTTGTGGATGGTCTCTACA ATTCCTCTTCAGCCTTCAA	30
5B	AATTCCTCTTCAGCCTTCAAAGCCCCAGACCC AGGCCAGAGACTCTTCAGTTC	31
6B	GCCAGAGACTCTTCAGTTCACAGTGGATGTTTT CACTTTGCTAAGGACTCAAG	32
7B	CCACTTTGCTAAGGACTCAAGAAACACGATCTAT ATCACCTGCCATCTGAAGGT	33
8B	ACCTGCCATCTGAAGGTCACTCCGGCTGACCGA GTCCCAGACCAGCTAAACAAA	34
9B	CCCAGACCAGCTAAACAAAGCTTGTTCCCTTCATC AAGTCTACCAAGAGGTCCTA	35
10B	CAAGTCTACCAAGAGGTCTACCCTGTAGAAGG CTCGGCTGATATTTGTCGCTG	36
11B	ACCGGCCTGGAAGGCCACAGCTGCCTTTGTTAC AACAGCGACAAATATCAGCCG	37
12B	GACCTGCGCCACCCTCTCTAGGTGGGACAGC CTCCTGGACCGGCCTGGAAGG	38

OLIGO	SEQUÊNCIA	SEQ. ID Nº:
13B	TTCTTCAGTCACGTGCGCTGCGATTTCTAGTGTGG GAAACAGACCTGCGCCACCC	39
14B	TTCCCAGGAAGATCAGAGGCCCCACGGTGATCT CTGCTTCTTCAGTCACGTGCC	40
15B	AGAGGTTGACCCCTCTATACCATGATCACTAGC CTTTCCCAGGAAGATCAGAGG	41
16B	CCAGGCCTAAGCCCAACATCACAGAGGTGTGAG GAGAGGTTGACCCCTCTATAC	42
17B	CCAGGACAATGGTAGCTAGAGTCAGGGATACCA CCGTGGCCAGGCCTAAGCCCA	43
18B	GGGTGGGAAGCAGTACGATGCCTCTTGGCAAG GACCAGGACAATGGTAGCTAGA	44
19B	CGGTACCTTATTGGGAGACAGATGCAGGGCATA TCACAGGGTGGGAAGCAGTAC	45
20B	GACGGCGGTACCTTATTGGGAGAC	46

[00165] Após a síntese do gene ZP3 de cachorro, ele foi clonado no construto pTMF (construto de cDNA genômico completo de ERA, vide a publicação PCT nº WO 2007/047459) na região intergênica P-M para recuperação do vírus. Quatro vírus recombinantes ERA-ZP3 de cachorro (ERAZP3, ERAg3ZP3, ERA2g3ZP3 e ERAZP3T; vide figura 1) foram recuperados por um sistema de genética reversa estabelecido para estudos de vacina (publicação PCT nº WO 2007/047459). O vírus ERAZP3 contém a sequência de ZP3 e uma sequência codificante da proteína G selvagem de ERA. ERAg3ZP3 e ERA2g3 contêm a sequência de ZP3 e uma ou duas cópias (respectivamente) da sequência codificante da glicoproteína mutante G333. O vírus ERAZP3T contém uma sequência codificante de ZP3 truncada e da proteína ERA G tipo selvagem. A ZP3 truncada compreende uma deleção dos nucleotídeos 79 a 1044 de ZP3 (SEQ ID NO: 7).

[00166] As quatro cepas recombinantes do vírus ERA-ZP3 de cachorro cresceram como o vírus ERA selvagem em células de rim de

hamster bebê (BHK) e em células BSR (um clone de células BHK-21), com a exceção de ERA2g3ZP3, que cresceu mais lentamente nos três primeiros ciclos de infecção em relação ao vírus ERA tipo selvagem. O teste de neutralização primária de camundongos infectados mostrou que ERAZP3T produziu títulos de anticorpo neutralizante (NA) de 714.

[00167] De modo a expressar o gene ZP3 de cachorro em sistemas procarióticos e eucarióticos para estudos imunológicos, o gene ZP3 de cachorro foi clonado no vetor pEF (para expressão em célula de mamífero; Invitrogen) e no vetor pET28 (para expressão procariótica; Novagen). Os dados primários por teste de fluorescência indireta (IFA) mostraram que a ZP3 de cachorro se expressou bem em células BSR, como demonstrado por coloração com anticorpo monoclonal de marcador His.

[00168] Os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo* com o uso de vírus recombinante com ZP3 de cachorro à base de vírus da raiva ERA estão resumidos da seguinte forma. O vírus ERAZP3 cresceu até 10^9 unidades de formação de foco (FFU)/ml em biorreatores, e se reproduziu assim como o vírus ERA parental. ZP3 de cachorro foi expressa como uma proteína não estrutural no vírion de ERAZP3 purificado. O vírus da raiva ERAZP3 cultivado até 10^9 FFU/ml em células BSR, foi purificado por ultracentrifugação em gradiente. O vírus recombinante purificado foi analisado por SDS-PAGE. Cinco bandas de proteína estrutural viral foram claramente mostradas. A proteína ZP3 foi expressa como uma proteína não estrutural no vírus da raiva ERAZP3 recombinante. Para detectar anticorpos para ZP3 nos camundongos imunizados com vírus ERAZP3, foram feitos Western blots com o uso de proteína de expressão de pcDNA/ZP3. As células BSR foram transfectadas com os plasmídios pcDNA/ZP3. Após 48 horas, as células BSR transfectadas foram coletadas e lisadas. Os sobrenadantes foram analisados por SDS-PAGE, seguido de transferência da proteína para

membranas de nitrocelulose. Um protocolo de Western-blot padrão foi aplicado para a análise. A banda de proteína específica com um peso molecular de 50 kD foi detectada, a qual corresponde ao tamanho da ZP3.

[00169] Em um modelo de camundongo, o vírus ERAZP3 induziu uma forte resposta imune contra vírus da raiva quando administrado intramuscularmente ou oralmente. Os camundongos imunizados foram protegidos contra estímulo com o vírus, enquanto os controles morreram. Anticorpos para ZP3 de cachorro foram detectados por marcação fluorescente indireta. Aproximadamente 60 camundongos foram injetados intramuscularmente com 50 µl do vírus recombinante (5×10^6 FFU por camundongo). Os camundongos foram reforçados em intervalos de 7, 14 e 28 dias. A resposta de anticorpos para o vírus da raiva foi avaliada. Os anticorpos de neutralização do vírus da raiva estavam em grande quantidade, atingindo mais de 5 IU. Os camundongos foram eutanizados e os soros foram coletados para IFA e Western blot contra proteínas ZP3. Resultados positivos foram observados em ambos os testes.

[00170] Em um modelo de hamster, o vírus ERAZP3 administrado intramuscularmente induziu uma forte resposta imune contra o vírus da raiva. Os hamsters imunizados foram protegidos quando estimulados. Anticorpos para ZP3 de cachorro foram detectados por IFA. Não foram observados eventos adversos nos modelos de camundongo ou de hamster.

Exemplo 2: Estudos imun contraceptivos piloto à base de vírus da raiva ERA com o uso de GnRH

[00171] Este exemplo descreve o desenvolvimento e o teste de vírus da raiva recombinantes contendo a sequência do hormônio de liberação da gonadotropina (GnRH) inserida em várias posições em relação à glicoproteína (G) do vírus da raiva.

[00172] O GnRH se mostrou eficaz como um peptídeo imun contraceptivo para cachorros. Entretanto, anteriormente era necessário ligar o GnRH a uma proteína veículo (ou adjuvante) para ele ser imunogênico. O aumento em escala dos produtos para se obter vacinação em massa e controle de qualidade torna o método químico sintético inaceitável para aplicações comerciais.

[00173] Através de análise de peptídeos *in vitro*, as posições adequadas para incorporação de GnRH na glicoproteína podem ser aplicadas para estudos de vacina recombinantes. Não há necessidade de adjuvante por causa das propriedades semelhantes a superantígeno das partículas do vírus da raiva. Uma vez que o vírus da raiva cresce de forma eficaz em cultura celular, o aumento em escala da produção não é limitador. Portanto, o vírus da raiva manipulado para incluir GnRH é um candidato ideal para o controle simultâneo da raiva e da população de cães.

[00174] O peptídeo de GnRH foi testado *in vitro* e observou-se que ele era imunogênico contra soro anti-GnRH de coelho. Foram escolhidos vários locais na glicoproteína do vírus da raiva para inserção da sequência de GnRH (SEQ ID NO: 47) (vide figura 2). A terminação N, o sítio antigênico IIa, e a junção entre o ectodomínio e os domínios citoplasmáticos foram identificados como sítios de inserção ideais para recuperação do vírus. Todos os vírus recombinantes foram recuperados através de um sistema de genética reversa estabelecido (publicação PCT nº WO 2007/047459). Os vírus resgatadas foram designados ERA-N-GnRH, ERA-IIa-GnRH, e ERA-C-GnRH, de acordo com o sítio de inserção de GnRH. Estes três vírus assim como o vírus ERA selvagem parental replicaram, atingindo títulos de 10^9 FFU/ml em cultura celular, com a exceção do vírus ERA-IIa-GnRH. O GnRH inserido era estável no gene da glicoproteína após a passagem do vírus. Experimentos preliminares em cachorros com o uso de administração intramuscular

demonstraram resposta imune suficiente contra raiva sem efeitos adversos detectáveis.

[00175] Para aumentar a imunogenicidade do peptídeo de GnRH, duas cópias do gene GnRH alinhadas *in tandem* foram clonadas nos sítios N (ERA-N-2GnRH) e IIa (ERA-GnRH-p3). No vírus ERA-N-GnRH, a sequência de GnRH (SEQ ID NO: 47) foi inserida imediatamente após a sequência de sinal de 19 aminoácidos da glicoproteína do vírus da raiva. As sequências de nucleotídeo e aminoácido de ERA-N-GnRH são descritas aqui como SEQ ID NOs: 49 e 50, respectivamente. Para criar ERA-N-2GnRH, duas cópias de GnRH *in tandem* foram inseridas imediatamente após a sequência de sinal de 19 aminoácidos da glicoproteína do vírus da raiva (SEQ ID NOs: 51 e 52). Para gerar ERA-GnRH-p3, a sequência de GnRH foi inserida após o resíduo de aminoácido 221 (sítio antigênico IIa) na glicoproteína do vírus da raiva (SEQ ID NOs: 53 e 54). Todos os três vírus foram recuperados corretamente por genética reversa, e o gene GnRH foi expresso de maneira estável em todos os construtos por Northern-blot. Além disso, todos os construtos assim como o vírus da raiva parental cresceram com a exceção de ERA-GnRH-p3, que cresceu mais lentamente. O vírus ERA-N-GnRH foi testado em cachorros após injeção intramuscular sem eventos adversos. Estes resultados demonstram que a terminação N, logo após a sequência de sinal na glicoproteína do vírus da raiva, é um local ideal para inserção de GnRH.

[00176] Para determinar se os vírus da raiva recombinantes que compreendem GnRH são capazes de gerar imunidade protetora contra infecção pelo vírus da raiva, foram realizados estudos com estímulo com vírus da raiva selvagem. Os camundongos foram injetados i.m. com 5×10^5 FFU de ERA-N-GnRH, ERA-3-GnRH (N-G3-GnRH-P-M-L) ou ERA-G3-2GnRH (N-G3/2GnRH-P-M-L) e foram subsequentemente estimulados com uma dose letal do vírus da raiva (figura 3). Todos os

animais vacinados sobreviveram ao estímulo com vírus da raiva. Em contrapartida, nenhum dos camundongos de controle (camundongos puros não vacinados) sobreviveu ao estímulo com vírus da raiva. Estes resultados demonstram que vacinas imun contraceptivas à base de vírus da raiva recombinante são eficazes na geração de uma resposta imune protetora contra o vírus da raiva em animais.

Exemplo 3: Vacinas combinadas para vírus da raiva e imun contracepção

[00177] Este exemplo descreve a construção e a caracterização de vírus da raiva ERA recombinantes que codificam GnRH.

Materiais e Métodos

Síntese e conjugação do peptídeo de GnRH para hemocianina do molusco keyhole limpet (KLH)

[00178] O decapeptídeo de GnRH (peptídeo 1780, GnRH; SEQ ID NO: 55), e duas cópias de GnRH em tandem (peptídeo 1781, 2GnRH; SEQ ID NO: 56) foram sintetizados quimicamente e purificados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Após a verificação, os peptídeos 1780 e 1781 foram conjugados a KLH. A KLH foi adquirida junto a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e a eficiência da conjugação foi analisada através de SDS-PAGE. O Marcador de Proteína SeeBlue® e Marcador 12 foram adquiridos junto a Invitrogen (Carlsbad, CA). O marcador de peso de proteína Precision Plus foi obtido junto a Bio-Rad (Hercules, CA). As proteínas foram separadas em géis de SDS-PAGE a 4-12%.

Reposicionamento do gene G na frente do gene P no genoma de RV ERA e patogenicidade do vírus rearranjado

[00179] O genoma de RV ERA rearranjado com o gene G reposicionado na frente do gene P foi construído de modo similar ao método de genética reversa descrito anteriormente (Wu e Rupprecht, *Virus Res.* 131: 95-99, 2008; Wu *et al.*, *Virus Res.* 129: 91-103, 2007).

O resíduo de aminoácido na posição 333 (SEQ ID NO: 5) de G de RV foi trocado de arginina (AGA) para ácido glutâmico (GAG) através de mutagênese (Wu *et al.*, *J Virol.* 76: 4153-61, 2002). O vírus manipulado foi designado ERAg3p. As características de crescimento do vírus mutado foram determinadas em cultura celular. As células BSR (um clone da linhagem celular BHK) foram cultivadas em meio mínimo essencial de Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal bovino (Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA). As células BSR infectadas com RV ERAg3p foram incubadas a 34°C, em uma incubadora a 5% CO₂. O biorreator CELLLine®1000 era da INTEGRA Bioscience AG (Suíça). A estabilidade da mutação na posição definida e o genoma RV rearranjado foram verificados através de reação em cadeia de polimerase (PCR) com transcrição reversa (RT) por mais de 100 passagens contínuas de infecção em células BSR. RV ERA ou ERAg3p foi injetado por via intracerebral (i.c) em dez camundongos ICR fêmeas com três semanas de idade (Charles River Laboratory). Dez camundongos saudáveis da mesma espécie e idade serviram como controles não infectados com injeção de tampão PBS (0,01M, pH 7,4) através da mesma via. A virulência de RV ERAg3p foi comparada com a da espécie de vírus ERA parental. Os animais foram verificados e registrados diariamente quanto aos sinais de doença. Os animais doentes foram eutanizados por intoxicação com CO₂, seguido de deslocamento cervical. O cérebro do camundongo foi removido para diagnóstico de RV.

Inserção da sequência codificante de GnRH em vários locais do gene G no vírus RV ERAg3p

[00180] A sequência codificante de GnRH (ou 2GnRH) foi inserida em 6 locais diferentes do gene G em RV ERAg3p. O gene G com a mutação definida em RV ERAg3p foi designado G*. As sequências dos iniciadores usados para inserção de GnRH ou 2GnRH em G* são

mostradas na Tabela 2. A mutagênese foi feita conforme descrito anteriormente (Wu and Rupprecht, *Virus Res.* 131: 95-99, 2008). Os 12 construtos finais do gene G* foram verificados por sequenciamento com o uso do equipamento ABI 3730 DNA Analyzer.

Tabela 2. Iniciadores para inserção de GnRH ou 2GnRH em G*

Inserto	Iniciador	Sequência	SEQ. ID N°:
GnRH	GNRH15 (direto)	CCAACCTGTCAGGGTTCTCCGAACACTGGAGCTACGGTTTGAGACCCGGGTACATGGAACTTAAAGTTG	58
GnRH	GNRH13 (reverso)	GGAGAACCCTGACAGGTTGGTGCATCCTTCGTCCTCCAC	59
2GnRH	2GNRHN5 (direto)	GGTTTTCCATTGTGTTTTGGGGAACACTGGAGCTACGGTTTGAGACCCGGGGAACACTGGAGCTACGGTTTGAGACCCGGGAAATTCCTATTTACACG	60
2GnRH	2GNRHN3 (reverso)	CCCAAAACACAATGGAAAAACCAGAAGGGGTACAAACAGG	61

Recuperação e caracterização dos vírus ERAg3p transportando GnRH

[00181] Os 12 construtos com GnRH (ou 2GnRH) fundido em estrutura ao gene G* foram aplicados para recuperação de vírus de acordo com um protocolo relatado anteriormente (Wu and Rupprecht, *Virus Res.* 131: 95-99, 2008; Wu *et al.*, *Virus Res.* 129: 91-103, 2007). Se o vírus não pudesse ser resgatado no primeiro ciclo de transfecção, dois testes adicionais eram repetidos. Um resultado negativo por teste fluorescente direto (DFA) foi interpretado como uma indicação de um sítio não ótimo no gene G para inserção de GnRH. Os vírus resgatados foram cultivados adicionalmente nas células BSR até altos títulos com o uso de incubação em biorreator para caracterização.

Expressão de GnRH nos vírus RV ERAg3p

[00182] O RNA total das células BSR infectadas com vírus ERAg3p transportando GnRH foi extraído com o uso do reagente TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA). Uma sonda para GnRH de oligonucleotídeo antissenso marcada com digoxigenina (Dig) foi sintetizada de acordo com métodos padrão. O kit de detecção de ácido nucleico marcado com Dig foi adquirido junto a Roche (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Penzberg, Alemanha). O protocolo para o Northern

blotting foi descrito anteriormente (Wu e Rupprecht, *Virus Res.* 131: 95-99, 2008; Wu *et al.*, *Virus Res.* 129: 91-103, 2007; Wu *et al.*, *J Virol.* 76: 4153-61, 2002). O marcador de peso molecular de RNA 1 foi obtido junto a Roche (Roche, Indianápolis, IN). O procedimento para purificação de RV a partir dos sobrenadantes da cultura celular infectada foi modificado a partir de descrições anteriores (Thomas *et al.*, *Virology* 25: 271-275, 1965; Sokol *et al.*, *J Virol.* 2: 836-849, 1968). Resumidamente, cerca de 200 ml de sobrenadante viral da cultura celular foram filtrados (diâmetro de poro de 0,22 µm) para remover possíveis restos de células. Os vírions foram peletizados através de ultracentrifugação a 22.500 x g durante 1 hora (Beckman, SW 28). O pélete foi ressuspenso de um dia para o outro a 4 °C em 2 ml de tampão Tris a 0,5mM (pH 7,2), e foi aplicado a gradientes de sacarose para centrifugação a 24.000 x g durante 1 hora (Beckman, SW 41). A banda do vírus no gradiente foi coletada para análise por SDS-PAGE. O padrão de peso molecular de proteína pré-corado foi adquirido junto a GIBCO (Carlsbad, CA).

Segurança e potência contra raiva com o uso de vírus RV ERAg3p transportando GnRH em um modelo de camundongo

[00183] Camundongos ICR fêmeas com três semanas de idade (Charles River Laboratory) foram divididos em quatro grupos de 10 animais cada. O grupo 1 foi inoculado com RV ERA-N-2GnRH, o grupo 2 com ERA-N-GnRH, o grupo 3 com ERA-IIa-GnRH, e o grupo 4 (como o controle) com tampão PBS (0,01M, pH 7,4). Por camundongo, 50 µl de cada vírus ($6,0 \times 10^6$ FFU) ou tampão PBS (0,01M, pH 7,4, os controles) foram injetados intramuscularmente (i.m) no músculo gastrocnêmio na pata esquerda. Três semanas após a inoculação, os animais que sobreviveram foram estimulados i.m pela mesma via na pata direita com uma dose letal de 50 µl de cerca de 2,5 a 10,0 MICLD₅₀ de RV de cachorro/coiote de rua (MD5951). A segurança e a potência

dos vírus para os animais foram analisadas dois meses após o estímulo.

Reação de soro de camundongo imunizado com o uso dos vírus RV ERAg3p transportando GnRH contra conjugados de GnRH-KLH e 2GnRH-KLH

[00184] Dez camundongos ICR fêmeas com 3 semanas de idade (Charles River Laboratory) foram imunizados i.m no músculo gastrocnêmio da pata esquerda com 50 µl ($6,0 \times 10^6$ FFU) de ERA-N-2GnRH, ERA-N-GnRH ou ERA-IIa-GnRH. Três semanas após a vacinação, o soro foi coletado por via retro-orbital após sedação dos animais. O soro foi mantido a -20°C para análise posterior. Os conjugados de GnRH-KLH e 2GnRH-KLH foram separados em géis de SDS-PAGE a 4-12%, e foram transferidos para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para Western blotting contra o soro do camundongo imunizado. Resumidamente, após a eletroforese em gel, GnRH-KLH e 2GnRH-KLH foram transferidos para a membrana de PVDF para bloqueio em tampão de caseína 1x (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) à temperatura ambiente durante 30 minutos. O soro de camundongo imunizado (diluição 1:200 em reagente de caseína 1X) foi incubado com a membrana à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após três lavagens (3 minutos cada) em tampão Tris caseína 1X, IgG anticamundongo biotinilada (H+L) (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) a 1:1000 foi adicionada para outra incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. O kit de coloração foi o sistema ABC da Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA).

Reação de soro de coelho imunizado com GonaCon[®] contra os vírus RV ERAg3p transportando GnRH

[00185] Soro de coelho imunizado com GonaCon[®] foi obtido junto a National Wildlife Research Center, USDA. O teste fluorescente indireto (IFA) para detecção de peptídeo de GnRH nos vírus RV-ERA3p

recombinantes foi executado da seguinte forma. Em uma placa de seis poços (Becton Dickinson Labware, NJ), as células BSR infectadas com vírus ERA-N-2GnRH, ERA-N-GnRH ou ERA-IIa-GnRH (37°C durante 48 h) foram fixadas em 4% de formalina PBS (Protocol Formalin®, Fisher Scientific Company LLC, Kalamazoo, Inc) à temperatura ambiente durante 30 minutos. O soro de coelho imunizado com GonaCon® a uma diluição de 1:200 em PBS (0,01M, pH 7,4) foi adicionado às células BSR fixadas e as placas foram incubadas a 37°C durante 30 minutos. Após três lavagens no mesmo PBS (3 minutos cada), anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado a FITC (H+L) a uma diluição de 1:200 (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) foi adicionado, e as placas foram incubadas a 37°C durante 30 minutos. Os resultados da marcação foram registrados sob microscopia de UV. Para o Western blot com o uso do soro de coelho imunizado com GonaCon® contra os vírus RV ERA transportando GnRH purificados, o mesmo protocolo descrito acima foi seguido.

Resultados

Síntese e conjugação de peptídeo de GnRH a KLH

[00186] O peptídeo de GnRH (em negrito): NH₂-**CEHWSYGLRPG**-COOH (SEQ ID NO: 55), e o peptídeo 2GnRH (em negrito): NH₂-**CEHWSYGLRPGEHWSYGLRPG**-COOH (SEQ ID NO: 56) foram sintetizados com uma cisteína adicional (C, em itálico na sequência) na terminação amino. A pureza dos peptídeos 1780 e 1781 foi verificada com o uso de análises de espectrometria de massa Micro HPLC e MALDI. A KLH foi, então, conjugada através do resíduo C amino terminal adicional aos peptídeos 1780 e 1781. A eficiência da conjugação foi analisada através de SDS-PAGE (figura 4).

Características de crescimento e patogenicidade do vírus RV ERAg3p rearranjado

[00187] O genoma de ERA rearranjado com o gene G reposicionado

na frente do gene P foi construído de modo similar ao método descrito anteriormente de Wu *et al.* (*Virus Res.* 129: 91-103, 2007). A mutagênese do gene G no resíduo de aminoácido 333 de AGA para GAG foi descrita em outro local (Wu e Rupprecht, *Virus Res.* 131: 95-99, 2008). O vírus ERAg3p recuperado assim como o vírus ERA parental cresceram, atingindo $4,2 \times 10^9$ FFU/ml nas células BSR infectadas na incubação no biorreator (figura 2B). A inoculação intracraniana de ERAg3p em camundongos com 3 semanas de idade não causou nenhum sinal de raiva, ou outros efeitos colaterais adversos. Entretanto, o vírus ERA parental matou todos os camundongos inoculados pela mesma via (figura 2C). Portanto, o vírus ERAg3p atenuado foi usado como uma cadeia principal para inserção subsequente da sequência codificante de GnRH nos estudos imun contraceptivos.

Inserção da sequência codificante de GnRH em vários locais do gene G no vírus RV ERAg3p

[00188] Seis locais do gene G* em RV ERAg3p foram selecionados para inserção da sequência codificante de GnRH com base em epitopos antigênicos identificados anteriormente: imediatamente após a sequência de sinal; sítio antigênico II; sítio antigênico IIa; sítio antigênico WB+; sítio antigênico III; e na junção entre o ectodomínio e o domínio transmembrana (vide figura 6) (Coulon *et al.*, *J. Gen. Virol.* 64: 693-696, 1983; Seif *et al.*, *J. Virol.* 53: 926-934, 1985; Prehaud *et al.*, *J. Virol.* 62: 1-7, 1988). A sequência codificante para GnRH (GAACACTGG AGCTACGGTTTGAGACCCGGG; SEQ ID NO: 47) foi introduzida nos 6 locais acima através de mutagênese. A sequência codificante de 2GnRH ligada em tandem(GAACACTGGAGCTACG GTTTGAGACCCGGGGAACACTGGAGCTACGGTTTGAGACCCGGG; SEQ ID NO: 57) também foi incorporada no gene G* gene de forma semelhante. Os 12 construtos finais do gene G* foram verificados por

sequenciamento de DNA, e foram clonados corretamente no plasmídio de extensão completa de RV ERAg3p para recuperação do vírus. As sequências de nucleotídeo e aminoácido dos quatro construtos do gene G* que foram recuperados nos vírus da raiva recombinantes (vide Tabela 3) são descritas como SEQ ID NOs: 49 e 50 (G-N-GnRH); SEQ ID NOs: 51 e 52 (G-N-2GnRH); SEQ ID NOs: 53 e 54 (G-IIa-GnRH); e SEQ ID NOs: 63 e 64 (G-C-GnRH).

Recuperação e caracterização dos vírus ERAg3p transportando GnRH

[00189] Cada um dos 12 construtos de G* (figura 6) com GnRH ou (2GnRH) fundido em fase ao gene G foi clonado corretamente na frente do gene P no genoma de RV ERAg3p. A sequência de extensão completa de cada construto foi confirmada antes da recuperação do vírus. O vírus recombinante foi recuperado com sucesso de 4 dos 12 construtos nos quais o GnRH foi inserido na terminação amino imediatamente após a sequência de sinal (o vírus recuperado foi chamado RV ERA-N-GnRH ou ERA-N-2GnRH), no sítio IIa (RV ERA-IIa-GnRH), ou na junção entre o ectodomínio e o domínio transmembrana (RV ERA-C-GnRH) da glicoproteína (vide a Tabela 3 abaixo). Os testes de transfecção do plasmídio para resgate do vírus foram repetidos em dois testes separados caso nenhum vírus fosse detectado no primeiro ciclo de recuperação. Os vírus RV ERA-N-GnRH, ERA-N-2GnRH e ERA-C-GnRH recuperados cresceram bem em cultura celular, mas o vírus ERA-IIa-GnRH não cresceu de forma eficiente, e a titulação foi cerca de 100 vezes inferior que a dos seus equivalentes (figura 7B).

Tabela 3. Recuperação dos vírus ERAg3p transportando GnRH

Construto do vírus	Construto do gene G	Vírus recuperado
ERA-N-GnRH	G-N-GnRH	Sim
ERA-N-2GnRH	G-N-2GnRH	Sim
ERA-II-GnRH	G-II-GnRH	Não
ERA-II-2GnRH	G-II-2GnRH	Não
ERA-IIa-GnRH	G-IIa-GnRH	Sim

Construto do vírus	Construto do gene G	Vírus recuperado
ERA-IIa-2GnRH	G-IIa-2GnRH	Não
ERA-WB+GnRH	G-WB+GnRH	Não
ERA-WB+2GnRH	G-WB+2GnRH	Não
ERA-III-GnRH	G-III-GnRH	Não
ERA-III-2GnRH	G-III-2GnRH	Não
ERA-C-GnRH	G-C-GnRH	Sim
ERA-C-2GnRH	G-C-2GnRH	Não testado

Expressão de GnRH nos vírus RV ERAg3p

[00190] O GnRH inserido entre o ectodomínio e o domínio transmembrana da proteína G pode não estar em uma posição ótima para exposição à superfície do vírus. Desta forma, os estudos descritos a seguir focaram em RV ERA-N-2GnRH, ERA-N-GnRH e ERA-IIa-GnRH. Através de SDS-PAGE dos vírus purificados, um padrão de 5 bandas típico foi corado por azul de Coomassie (figura 8A). As bandas da proteína G de RV ERA-N-GnRH e ERA-N-2GnRH foram cortadas do gel para análise de sequência da proteína. A terminação amino da proteína G foi verificada estando bloqueada após a fusão ao peptídeo de GnRH em três testes independentes. Entretanto, o GnRH foi detectado estando fundido ao mRNA de G com o uso de Northern-blot em ambos os vírus ERA-N-2GnRH e ERA-N-GnRH (figura 8B).

Segurança e potência contra raiva com o uso de vírus RV ERAg3p transportando GnRH em um modelo de camundongo

[00191] Não foram observados efeitos colaterais óbvios ou alterações do comportamento nos camundongos inoculados com RV ERA-N-2GnRH, ERA-N-GnRH ou ERA-IIa-GnRH. Os animais que sobreviveram foram estimulados 3 semanas após a inoculação com uma dose letal de cerca de 2,5 a 10,0 MICLD₅₀ de RV de cachorro/coiote de rua. Todos os camundongos de controle desenvolveram sinais típicos de raiva, e foram eutanizados entre 8 e 10 dias. O antígeno de RV foi detectado no cérebro por DFA. Os camundongos que sobreviveram nos grupos de RV ERAg3p transportando GnRH não desenvolveram qualquer sinal de raiva, e permaneceram saudáveis

antes do término do experimento em 2 meses (figura 9).

Reação de soro de camundongo imunizado com o uso dos vírus RV ERAg3p transportando GnRH contra conjugados de GnRH-KLH e 2GnRH-KLH

[00192] Para comparar a reatividade do soro de camundongo de imunizado com o uso de vírus RV ERA transportando GnRH com a do soro de coelhos imunizados com GonaCon[®] (de USDA) contra GnRH-KLH e 2GnRH-KLH, os conjugados de peptídeo foram separados em géis de SDS-PAGE a 4-12%. No Western blotting, tanto o soro de camundongo imunizado com RV ERA transportando GnRH quanto o soro de coelho imunizado com GonaCon[®] reconheceram os conjugados GnRH-KLH e 2GnRH-KLH (figura 10). Entretanto, cada conjugado apresentou várias bandas na sorologia, indicando um processo não unificado ou incontrolável na ligação do peptídeo.

Reação de soro de coelho imunizado com GonaCon[®] contra os vírus RV ERAg3p transportando GnRH

[00193] No IFA, foi observada fluorescência típica de membrana celular nas células BSR infectadas com ERA-N-2GnRH, ERA-N-GnRH e ERA-IIa-GnRH. O padrão de coloração foi compatível com o da proteína G de raiva nas células infectadas pelo RV. No Western blot com o uso de vírus purificado contra soro de coelho imunizado com GonaCon[®], a banda da proteína G foi corada, o que é uma indicação de fusão do peptídeo de GnRH com a glicoproteína de RV.

Exemplo 4: Estudos *in vivo* de ERA-GnRH em caninos

[00194] Este exemplo descreve o teste dos construtos de vacina de ERA-GnRH (tais como os aqui apresentados) em cachorros para estabelecer a segurança e a eficácia. O vírus ERA-GnRH recombinante será testado em cachorros para avaliação dupla da eficácia para raiva e efeitos imun contraceptivos para o controle populacional. Acredita-se na hipótese de que ERA-GnRH irá gerar anticorpo neutralizante do vírus

da raiva e estabilizará a população dos cachorros imunizados dentro de 3 anos após a primeira dose. ERA-GnRH será administrado a aproximadamente 100 cachorros (50 machos e 50 fêmeas) e mais 20 cachorros servirão como controles. Os vírus da raiva recombinantes serão administrados intramuscularmente a uma dose de aproximadamente 10^7 FFU/ml, ou serão administrados oralmente a uma dose de aproximadamente 10^8 FFU/ml. Acredita-se que cerca de 70% dos animais imunizados permanecerão estéreis por um ano, e o número de ninhadas cairá em pelo menos 50%.

Exemplo 5: Vacinação de cachorros com um imun contraceptivo à base do vírus da raiva

[00195] Este exemplo descreve um estudo de vacinação imun contraceptiva baseada no vírus da raiva a ser executado em cachorros puros para o vírus da raiva. Sete grupos de cachorros adultos de rua puros para raiva totalmente reprodutivos serão incluídos neste experimento. A ausência de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva (VNAs) no soro será usada para confirmar que os animais são puros para raiva. Os grupos consistirão em 20 animais, cada um com uma proporção 1:1 de machos para fêmeas para garantir a obtenção de significado estatístico para machos e fêmeas dentro de cada grupo. A gravidez será descartada antes do início do experimento. Além disso, tumor venéreo transmissível canino deve ser descartado nos machos e nas fêmeas. Todos os animais serão deixados em quarentena (pelo menos 40 dias) e serão submetidos à desvermifugação completa obrigatória.

[00196] Dois grupos (20 animais cada) serão vacinados com 1 mL de vírus da raiva recombinante (conforme descrito aqui) no dia 0, e administrados com uma única dose de reforço no dia 21. Um grupo será vacinado intramuscularmente (i.m) e o outro grupo oralmente. Dois outros grupos (20 animais cada) serão vacinados com uma dose única

de 1 mL de vírus da raiva recombinante por via i.m ou administração oral no dia 0. Os grupos de controle (20 animais cada) receberão placebo (meio de cultura celular, o mesmo usado na propagação do vírus) intramuscularmente ou oralmente (por instilação). Um terceiro grupo, o grupo de controle da contracepção, receberá GonaCon® (uma vacina imun contraceptiva de GnRH) por injeção i.m.. Todos os grupos serão rotulados adequadamente (tal como com o uso de coleiras com cores diferentes ou com uma tatuagem indicando o número do grupo). Os grupos de teste e de controle estão resumidos abaixo.

[00197] **Grupo 1:** 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) inoculados com 1 mL de construto por via i.m., nos dias 0 e 21.

[00198] **Grupo 2:** 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) inoculados com 1 mL de construto por via oral, nos dias 0 e 21.

[00199] **Grupo 3:** 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) inoculados com 1 mL de construto uma vez, por via i.m., no dia 0.

[00200] **Grupo 4:** 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) inoculados com 1 mL de construto uma vez, por via oral, no dia 0.

[00201] **Grupo 5:** 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) inoculados com 1 mL de meio de cultura celular por via i.m..

[00202] **Grupo 6:** 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) inoculados com 1 mL de meio de cultura celular por via oral.

[00203] **Grupo 7:** Grupo de controle de contracepção com 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) inoculados com 1 mL de GonaCon® por via i.m..

Alojamento

[00204] Com a finalidade de confinamento, gaiolas ou canis grandes (por exemplo, de 5 metros × 5 metros) serão usados para confinar até 10 cachorros cada. Os machos e as fêmeas serão separados o tempo todo para evitar brigas entre os machos quando as fêmeas estiverem no cio. Além disso, os canis ou gaiolas serão suficientes para proteger

Tabela 5. Cronograma para o estudo (semanas 9 a 24 e até 6 meses)

Tempo em semanas / atividade	9	10	11	12	13	14	17
Imunização com construtos de RABV ¹ dos grupos 3 e 4	x						
Inoculação de placebo aos grupos 5 e 6	x						
Coleta de sangue para todos os grupos, separação de soro e armazenamento a -20°C	x	x	x	x	x	x	x
Reforço com construtos de RABV nos grupos 1 e 2				x			
Envio de amostras de soro para o CDC ²					x		
Detecção de RVNA ³ no CDC	x	x	x	x	x	x	x
Teste de fertilidade para ambos os gêneros	x	x	x	x	x	x	x
Cruzamento				x	x		x
Testes de gravidez							

Tempo em semanas / atividade	18	19	20	21	22	23	24
Imunização com construtos de RABV ¹ dos grupos 3 e 4							
Inoculação de placebo aos grupos 5 e 6							
Coleta de sangue para todos os grupos, separação de soro e armazenamento a -20°C	x	x	x				
Reforço com construtos de RABV nos grupos 1 e 2							
Envio de amostras de soro para o CDC ²		x				x	
Detecção de RVNA ³ no CDC							
Teste de fertilidade para ambos os gêneros	x		x				
Cruzamento	x						x
Testes de gravidez	x	x		x	x		

¹ Vírus da raiva recombinante;

² Centro para controle e prevenção de doenças;

³ Anticorpo neutralizante do vírus da raiva

[00208] Acredita-se que aproximadamente 70% dos animais imunizados permanecerão estéreis durante um ano, e o número de ninhadas cairá em pelo menos 50%. Acredita-se, ainda, que mais de 80% dos animais sobreviverão a doses letais de estímulo com vírus da raiva no final do estudo.

Exemplo 6: Avaliação de segurança *in vivo*, imunogenicidade e eficácia das vacinas imun contraceptivas de vírus da raiva recombinante em um modelo de roedores

[00209] A primeira fase deste estudo testará a eficácia das vacinas imun contraceptivas de vírus da raiva (GnRH) contra infecções por vírus da raiva em camundongos. Vinte camundongos com 4 semanas de idade serão divididos em grupos de machos (n=10) e fêmeas (n=10)

(20 camundongos para cada vacina, GonaCon[®] e combinação de vacinas e GonaConTM), e receberão um agente biológico experimental no dia 0 (50 µl através de injeção intramuscular no músculo gastrocnêmio esquerdo). Nos dias 7, 14 e 28, sangue será coletado de todos os camundongos por técnica de coleta submandibular e testado quanto a presença de anticorpos neutralizantes de vírus da raiva (VNA), anticorpos contra GnRH, e testosterona e estrogênio. Os camundongos com níveis detectáveis de anticorpos neutralizantes de vírus da raiva serão estimulados com vírus da raiva no músculo gastrocnêmio direito no dia 28 após a vacinação. Os animais serão eutanizados aos primeiros sinais clínicos de raiva. O cérebro e os órgãos reprodutores serão coletados para exame histológico.

[00210] **Grupos:** 1) vacina recombinante viva com 1 a 8 cópias de GnRH incorporadas (8 x 20 camundongos); 2) vacina recombinante inativada com GnRH incorporado (20 camundongos); 3) vacina comercial (20 camundongos); 4) GonaCon[®] (20 camundongos); 5) vacina recombinante viva com GnRH incorporado (20 camundongos) + GonaCon[®]; 6) vacina comercial + GonaCon[®] (20 camundongos); 7) vacina recombinante inativada com GnRH incorporado (20 camundongos) + GonaCon[®]; 8) grupo de controle administrado com PBS (10 camundongos).

[00211] **Resultado esperado:** No final de um período de observação de 3 meses, espera-se que pelo menos 80% dos animais imunizados sobrevivam sem sinal de raiva.

Exemplo 7: Teste de contracepção intramuscular em roedores

[00212] A vacinação será conduzida conforme descrito acima. Cada grupo conterá 10 camundongos de cada sexo. Os animais terão sangue coletado nos dias 7, 14, e 28 após a vacinação para medir VNA contra vírus da raiva e GnRH, assim como progesterona nos camundongos do sexo feminino e testosterona nos camundongos do sexo masculino.

Cada camundongo nos grupos de vacina recombinante será pareado com um camundongo de controle do sexo oposto (não vacinado, fértil) em novo alojamento no dia 30 (total de 40 camundongos por grupo). Estes 20 pares serão mantidos sob observação. As fêmeas serão avaliadas para gravidez a cada 2 dias após o pareamento.

[00213] Para medir a longevidade das respostas imunes induzidas e a correlação com a infertilidade, os pares de camundongo serão mantidos juntos por mais 6 meses (ou até que as fêmeas fiquem prenhes), se as fêmeas não engravidarem nos primeiros 18 dias. Os camundongos terão sangue coletado através da via submandibular duas vezes por semana. Os órgãos sexuais femininos serão examinados para gravidez após eutanásia.

[00214] **Resultados esperados:** No final de 3 meses, espera-se que pelo menos 80% das fêmeas não estejam grávidas e pelo menos 80% dos machos não engravidem fêmeas não imunizadas. As respostas sorológicas serão correlacionadas com as proporções de fertilidade. Dois ou mais vírus da raiva recombinantes serão selecionados para investigações como contraceptivos orais.

[00215] Se eficácia (infertilidade nos animais vacinados de ambos os sexos) for obtida pela via intramuscular, a imunogenicidade e a eficácia da vacina por administração oral serão avaliadas. O delineamento experimental será similar ao do teste de contracepção i.m.

Exemplo 8: Estudo de imunogenicidade e segurança *in vivo* em um modelo de cachorro

[00216] **Teste de eficácia (administração intramuscular):** A eficácia das vacinas imun contraceptivas recombinantes contra infecções pelo vírus da raiva e sua capacidade de induzir respostas imunes contra GnRH serão testadas em cachorros do sexo masculino e feminino. Cada grupo consistirá em 8 animais (4 machos e 4 fêmeas). Na primeira fase, várias vacinas selecionadas, provadas serem eficazes

e imunogênicas no modelo de roedores, serão administradas i.m. Sangue será coletado no dia 0 e subsequentemente uma vez ou duas vezes por semana nos dois primeiros meses e mensalmente após isto. O soro será testado quanto a presença de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva e anticorpos contra GnRH. Os níveis de GnRH, progesterona e testosterona também serão medidos. Um grupo de controle de 4 cachorros receberá uma injeção com placebo. Quatro animais em cada grupo (anteriormente vacinados com um dos construtos da vacina para raiva gerados com titulação comprovada de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva) serão inoculados com vírus da raiva no músculo gastrocnêmio direito no dia 28 após a vacinação. Os animais serão observados e eutanizados (injeção intravenosa de um derivado de ácido barbitúrico) aos primeiros sinais clínicos de raiva. O cérebro e os órgãos reprodutores serão coletados para exames histológicos. O delineamento dos grupos experimentais dependerá dos resultados dos testes destas vacinas nos modelos de roedor. Dada a vacinação anterior, espera-se a sobrevivência de todos os animais do experimento.

[00217] **Grupos (8 cachorros cada):** 1) vacina viva recombinante com GnRH incorporado; 2) vacina recombinante inativada com GnRH incorporado; 3) vacina comercial; 4) GonaCon[®]; 5) vacina para raiva + GonaCon[®]; 6) GnRH-VLP recombinante de APHIS/NWRC; e 7) grupo de controle (4 cachorros). A fase 1 do experimento com a vacina imun contraceptiva exigiria um máximo de 52 a 60 animais. Dependendo dos resultados dos experimentos de segurança, imunogenicidade, e eficácia com as vacinas administradas i.m., a administração oral das vacinas vivas atenuadas selecionadas com GnRH incorporado também será testada.

[00218] **Resultados esperados:** Ao final de um período de observação de 1 ano, espera-se que pelo menos 80% dos animais

imunizados sobrevivam sem qualquer sinal de raiva, e espera-se que pelo menos alguns grupos experimentais tenham titulações significativas de anticorpos anti-GnRH e níveis significativamente reduzidos de progesterona e testosterona.

[00219] **Teste de contracepção em cães:** A eficácia da melhor vacina experimental com GnRH incorporado, demonstrada sendo imunogênica nos testes de eficácia acima em roedores e cães, será testada quanto a capacidade de induzir infertilidade em cachorros do sexo feminino após administração intramuscular. Os grupos tratados e de controle consistirão em 10 e 5 animais, respectivamente.

[00220] **Resultados esperados:** Ao final de um período de observação de 1 ano, espera-se que pelo menos 80% dos animais imunizados permaneçam inférteis, com titulações significativas de anticorpos anti-GnRH e níveis reduzidos de progesterona e testosterona. Espera-se que pelo menos 50% dos animais de controle procriem de forma bem sucedida.

[00221] Esta descrição fornece vírus da raiva recombinantes que compreende proteínas imunocontraceptivas. A descrição fornece ainda métodos de proteger simultaneamente animais não humanos contra infecção pelo vírus da raiva e inibição da fertilidade dos animais. Será evidente que os detalhes exatos dos métodos descritos podem ser alterados ou modificados sem desconsiderar o espírito da descrição descrita. Reivindica-se todas as modificações e variações que estão incluídas no escopo e no espírito das reivindicações abaixo.

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus da raiva recombinante, caracterizado pelo fato de que o genoma do vírus da raiva recombinante compreende genes de nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e RNA polimerase dependente de RNA (L) do vírus da raiva e uma sequência de ácido nucleico heteróloga que codifica uma proteína imun contraceptiva, em que a proteína imun contraceptiva compreende hormônio de liberação de gonadotropina (GnRH).

2. Vírus da raiva recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o gene G é reposicionado entre o gene N e o gene P no genoma do vírus da raiva recombinante.

3. Vírus da raiva recombinante de acordo com qualquer a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o genoma é derivado da cepa ERA do vírus da raiva.

4. Vírus da raiva recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o gene G do vírus da raiva compreende a sequência dos nucleotídeos 3317-4888 da SEQ ID NO: 1, em que os nucleotídeos 4370-4372 são GAG.

5. Vírus da raiva recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de GnRH compreende a SEQ ID NO: 47.

6. Vírus da raiva recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende duas cópias da sequência de ácido nucleico de GnRH.

7. Vírus da raiva recombinante de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que as duas cópias são contíguas.

8. Vírus da raiva recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a sequência de

ácido nucleico de GnRH é inserida no gene da glicoproteína do vírus da raiva.9. Vírus da raiva recombinante de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de GnRH é inserida após a sequência de sinal (nucleotídeos 1 a 57 da SEQ ID NO: 49) do gene da glicoproteína.

10. Vírus da raiva recombinante de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o gene da glicoproteína compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 49 ou SEQ ID NO: 51.

11. Vírus da raiva recombinante de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de GnRH é inserida imediatamente após o sítio antigênico IIa (nucleotídeo 663 da SEQ ID NO: 53) do gene da glicoproteína.

12. Vírus da raiva recombinante de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o gene da glicoproteína compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 53.

13. Vírus da raiva recombinante de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de GnRH é inserida na junção do ectodomínio e do domínio de transmembrana (após o nucleotídeo 1374 da SEQ ID NO: 63) do gene da glicoproteína.

14. Vírus da raiva recombinante de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o gene da glicoproteína compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 63.

15. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende o vírus da raiva recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14 e um adjuvante e/ou sal farmacologicamente aceitável da mesma.

16. Uso de composição imunogênica como definida na reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que é para a fabricação de

um medicamento para imunização de um animal não humano contra infecção pelo vírus da raiva e inibição da fertilidade do animal.

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a composição imunogênica é administrada oralmente.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a composição imunogênica é administrada através de iscas de alimento.

19. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, caracterizado pelo fato de que o animal é um cachorro, gato, rato, camundongo, morcego, raposa, guaxinim, esquilo, gambá, coiote ou lobo.

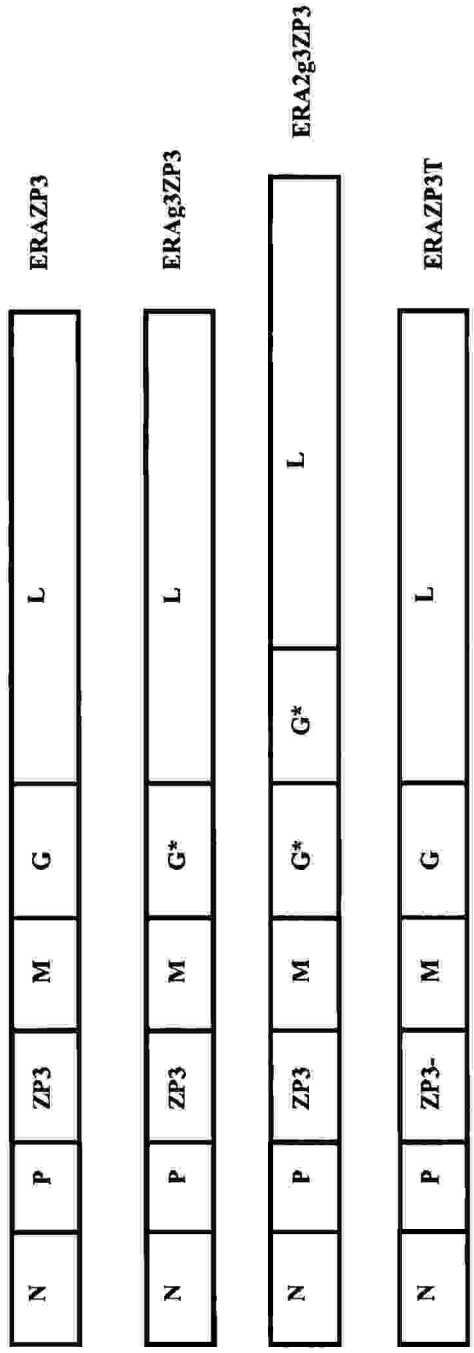


FIG. 1

Nº do vírus	Descrição
1	N-P-M-G3-DZP3-L
2	N-P-DZP3-M-G3-L
3	N-G3-P-M--DZP3-L
4	N-G3-P-M-DZP3/2GnRH-L
5	N-P-M--G3/GnRH-L
6	N-P-G3/GnRH-M-L
7	N-G3-GnRH-P-M-L
8	N-G3/2GnRH-P-M-L
9	N-G3/2GnRH-P-M-DZP3/2GnRH-L

FIG. 3B

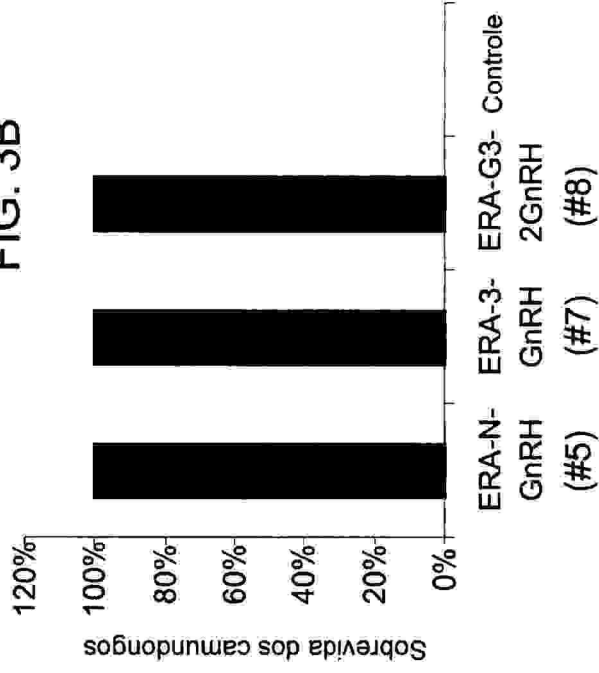


FIG. 3A

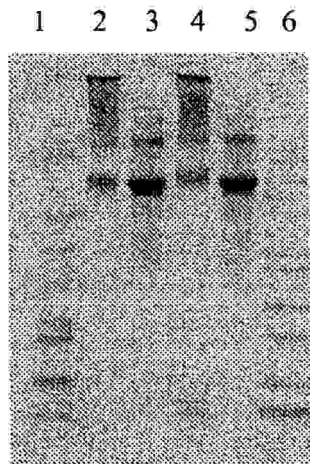


FIG. 4

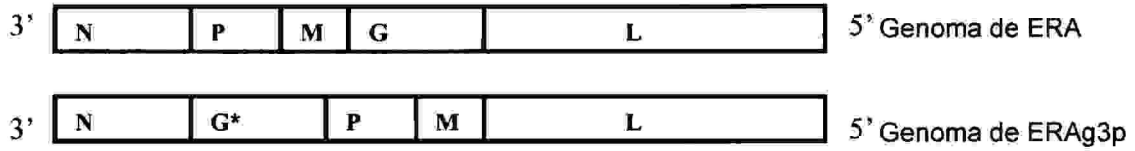


FIG. 5A

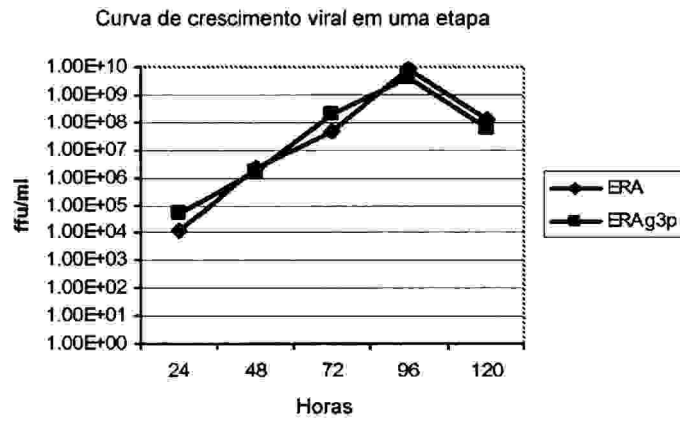


FIG. 5B

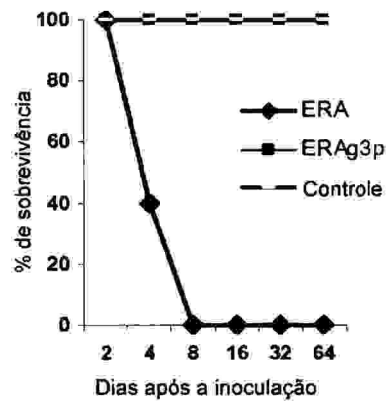


FIG. 5C

		Ecto- Epitopos antigênicos Ecto-							
		SP	II	IIa	WB+	III	TM	CT	Glicoproteína
		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
GnRH		√	×	√	×	×	√		
2 GnRH		√	×	×	×	×	N/T		

FIG. 6

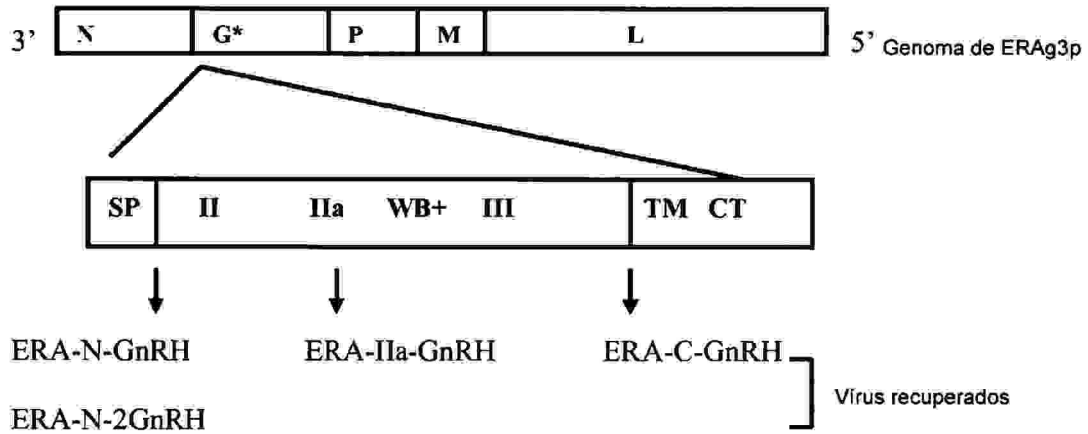


FIG. 7A

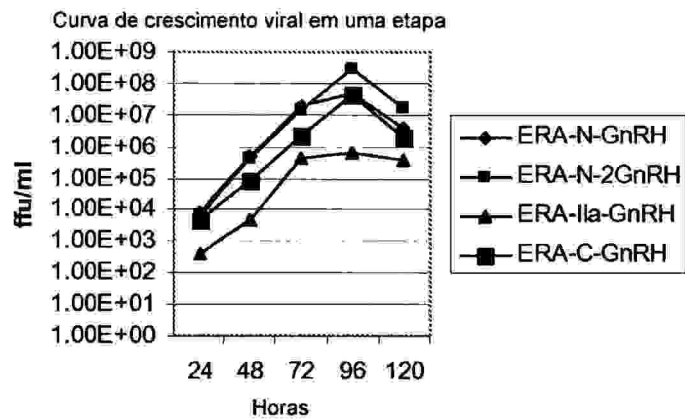


FIG. 7B

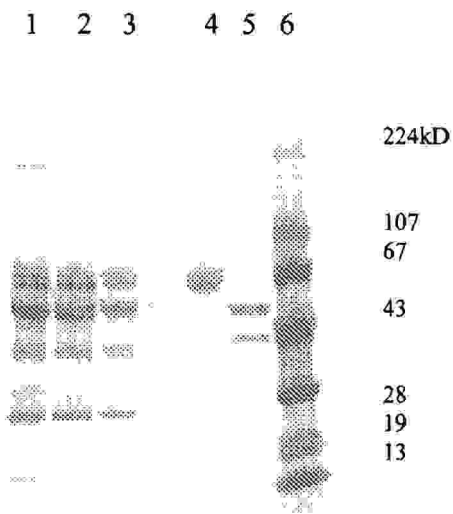


FIG. 8A

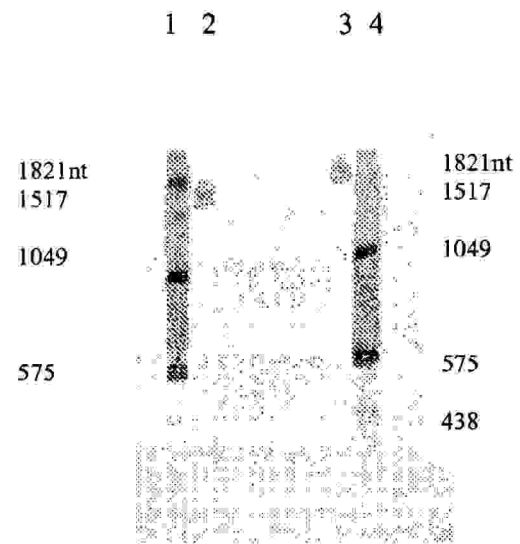


FIG. 8B

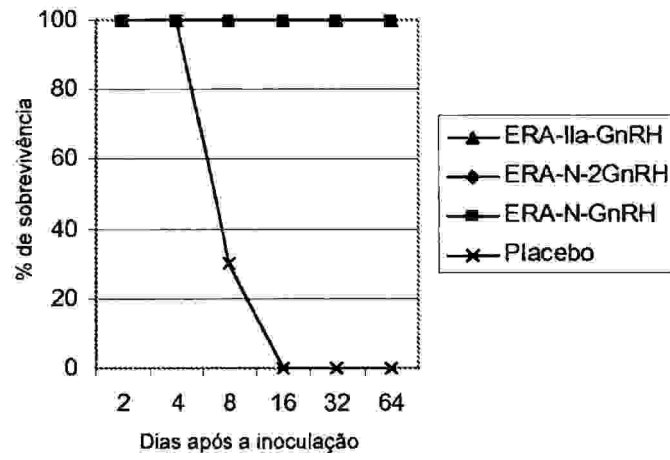


FIG. 9

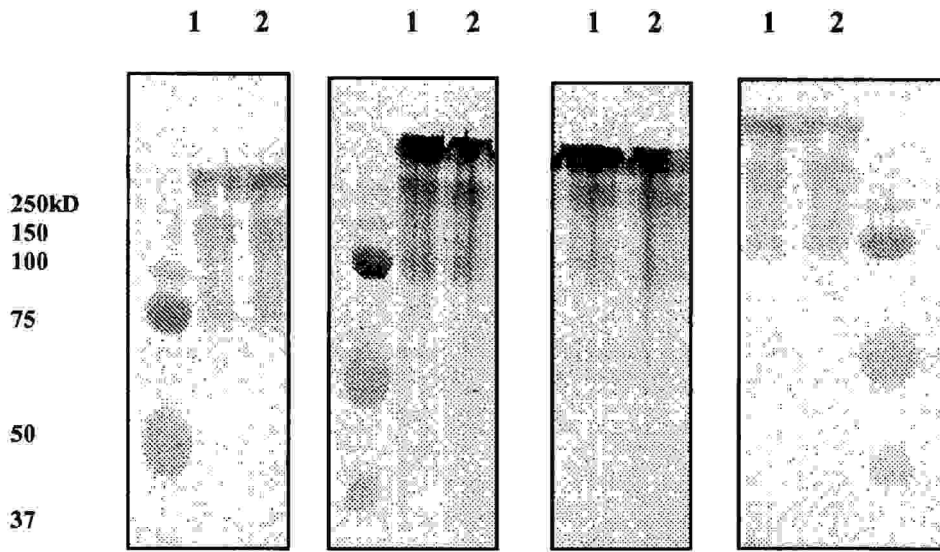


FIG. 10A

FIG. 10B

FIG. 10C

FIG. 10D