



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

(21) PI 0920800-3 A2



(22) Data do Depósito: 01/10/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) **Título:** VÍRUS DA HERPES BOVINA-1, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM UM HOSPEDEIRO, E, USO DE VÍRUS DA HERPES BOVINA-1.

(51) **Int. Cl.:** A61K 39/265; A61K 39/102; C07K 14/05; C12N 15/869.

(30) **Prioridade Unionista:** 03/10/2008 US 61/195102.

(71) **Depositante(es):** NOVARTIS AG; CORNELL UNIVERSITY.

(72) **Inventor(es):** GOPINATH RAJU SEETHARAMAN; RICHARD HARLAND; LEE DAVID ALBEE II; MAYUR NAVNITBHAI PATEL; NIKOLAUS OSTERRIEDER; BENEDIKT B. KAUFER.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2009059196 de 01/10/2009

(87) **Publicação PCT:** WO 2010/039934 de 08/04/2010

(85) **Data da Fase Nacional:** 01/04/2011

(57) **Resumo:** VÍRUS DO HERPES BOVINO-I VIVO, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM UM HOSPEDEIRO, E, USO DE VÍRUS DO HERPES BOVINO-1 VIVO A descrição geralmente se refere ao tratamento ou prevenção de doença em gado. Mais particularmente, a invenção é dirigida à produção e uso de vírus do herpes bovino 1 (BFIV-I) modificado e seu uso em composições e vacinas que protegem gado de infecção por BHV-1 embora não suprimindo a resposta imunológica no hospedeiro. Em um exemplo, a invenção é dirigida ao uso de BHV-1 modificado, administrado com imunógenos adicionais, ou através de co-administração e/ou através de administração em vacinas de combinação, e o uso destas vacinas para a proteção de gado de doença. Em um exemplo, uso do BHV-1 modificado nas composições administradas facilita -uma resposta imune a ou contra os imunógenos adicionais.

UL49.5 de BHV-1 linhagem Cooper

DNA (SEQ ID NO:1)

ATGCCCGGTCGCGCTCATCGTTGCGGTTGTGCCCGCGCGCTGTTTGC
CATCGTGGCGGCGCGACCCCTGCTAGACGCGATGCGGCGCAGGG
GGCAATGGACTTTTGGAGCGCAGGCTGCTACGCGCGCGGGTGCCGCTC
TCGGAGCCACCGCAGGCGCTGTTTGTACGTGGCCCTGACCGCGG
TAATGGTGGCGGCGCTGTACGCGTACGGGCTTTGCTTTAGGCTCATG
GGCGCAGCGGCGCAATAAAAGGAGTGGCGGGCGGGGCTGA

Aminoácido (SEQ ID NO:2)

MPRSPLIVAVVAAALFAIVGRDPLLDAMRREGAMDFWSAGCYARGVPLS
EPPQALVVFYVALTAVMVAVALYAYGLCFRLMGASGPNKESRGRG

“VÍRUS DO HERPES BOVINO-1 VIVO, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM UM HOSPEDEIRO, E, USO DE VÍRUS DO HERPES BOVINO-1 VIVO”

Referência Cruzada para Pedidos Relacionados

- 5 Este pedido reivindica prioridade para pedido provisório de Patente Norte-Americana número 61/195.102, depositado em 3 de Outubro de 2008, que é incorporado neste lugar por referência.

Fundamentos

- 10 Herpesvírus bovino 1 (BHV-1), é o agente causador de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), e é um patógeno viral economicamente significativo de gado que pode causar infecção respiratória severa, conjuntivite, abortos, vulvovaginite, balanopostite, e infecção sistêmica em bezerros neonatos (Wyler et al. (1989) HERPESVIRUS DISEASES OF CATTLE, HORSES, AND PIGS 1-72 (Boston) In G. Witman (ed.) Kluwer Academic Publishers). A seqüência de nucleotídeos do genoma de BHV-1 (136 kb) é conhecida. Ela geralmente contém 67 genes únicos e 2 genes, ambos duplicados, nas repetições invertidas. Em geral, os genes de BHV-1 exibem homologia no nível de seqüências de aminoácidos com aqueles de outros alfa-herpesvírus (HSV-1, VZV, EHV-1) e são arranjados em ordem
- 15 similar. BHV-1 é um membro do gênero *Varicellovirus*, parte da subfamília Alphaherpesvirinae (família herpesviridae). A subfamília inclui herpesvírus humano 3, vírus da pseudorraiva, e herpesvírus bovinos e eqüinos.

- 20 Infecção por BHV-1 também é um componente da infecção do trato respiratório superior referida como "febre do transporte" ou complexo respiratório bovino (Tikoo et al. (1995) Adv. Virus Res. 45:191; publicação de Patente Norte-Americana no. 2004-0185056). BHV-1 não é o único agente infeccioso associado com febre do transporte, mas ele inicia a desordem imunossuprimindo gado infectado, o que geralmente resulta em infecções bacterianas secundárias e pneumonia. Susceptibilidade aumentada à infecção

secundária se correlaciona com imunidade celular mediada deprimida depois de infecção por BHV-1 (Carter et al. (1989) J. Virol. 63:1525; Griebel et al. (1990) J. Gen. Virol. 71:369; Griebel et al. (1987) Viral Immunol.1:287; Griebel et al. (1987) Viral Immunol. 1:267). BHV-1 geralmente estabelece latência vitalícia em neurônios ganglionares do sistema nervoso periférico depois de replicação inicial em epitélio de mucosa e resulta em animais sendo contagiosos além de infecção aguda. Reativação de latência geralmente resulta em excreção viral e transmissão a outros animais susceptíveis. Reativação geralmente ocorre depois de estresse natural ou induzido por corticosteróide (Rock et al. (1992) J. Virol. 66:2484; Sheffy e Davies (1972) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140:974).

Em um esforço para controlar infecções por BHV-1, vacinas convencionais de vírus morto e vírus vivo atenuado foram desenvolvidas. Vacinas comercialmente disponíveis, vacinas de vírus vivo atenuado, por exemplo, podem causar imunossupressão ou depressão imune, ou outras alterações do sistema imune do hospedeiro. Estas alterações podem ser atribuídas a proteínas codificadas por BHV-1 que suprimem ou de outra maneira alteram o sistema imune do hospedeiro infectado. Esta imunossupressão pode resultar na incapacidade destas vacinas para prevenir estabelecimento de uma infecção latente por uma linhagem virulenta de campo de BHV-1 (veja, e.g., Gerber et al. (1978) Am. J. Vet. Res. 39:753; Jericho et al. (1983) Can. J. Com. Med. 47:133; Pastoret et al. (1980) Infect. Immun. 29:483).

Uma tendência em vacinas atuais é vacinas co-administradas ou de combinação, que geralmente contêm antígenos de múltiplos agentes ou organismos. Estas vacinas podem fornecer vacinação e proteção para múltiplos agentes e/ou doenças e pode ser dada em um único momento ou administração. Em vacinas contendo BHV-1, BHV-1 pode afetar ou alterar a resposta imune do hospedeiro contra co-administrada. Em um exemplo, a

resposta imune a antígenos co-administrados com BHV-1 ou presentes em vacinas de combinação junto com BHV-1 pode ser suprimida, diminuída, ou de outra maneira alterada, em relação à resposta imune do hospedeiro àqueles antígenos quando administrados sem BHV-1. A resposta imune afetada ou
5 alterada pode reduzir a capacidade de antígenos vacinais co-administrados com BHV-1 de estimular uma resposta imune protetora contra infecção e/ou doença causada pelos agentes infecciosos a partir dos quais os antígenos co-administrados foram derivados. Vírus BHV-1 atenuados anteriores e atuais
10 geralmente não se dirigem a imunossupressão por BHV-1 e/ou respostas imunes alteradas do hospedeiro contra antígenos co-administrados.

Resumo

Foi encontrado que vírus BHV-1 com modificações, e/ou expressão alterada, de certos genes de BHV-1 podem aliviar, prevenir ou reverter alterações de respostas imunes do hospedeiro (e.g., imunossupressão)
15 atribuídas a BHV-1. Também foi encontrado que vírus BHV-1 contendo as modificações e/ou alterações podem aliviar ou prevenir as alterações em resposta imune do hospedeiro a antígenos co-administrados ou antígenos administrados em combinação (e.g., resposta imune suprimida a antígenos adicionais) se comparados com vírus BHV-1 que não têm as modificações.
20 Baseado nestes achados, as seguintes invenções são descritas.

Em um exemplo, composições e vacinas contendo um imunógeno de BHV-1 onde pelo menos um gene do BHV-1 foi modificado. Em um exemplo, a vacina com o BHV-1 modificado é administrada com um imunógeno não BHV-1 ou através de co-administração ou em uma vacina de
25 combinação. O BHV-1 pode ser uma linhagem modificada de BHV-1 vivo de vacina. Em um exemplo, os genes modificados do BHV-1 geralmente podem ser genes que codificam proteínas envolvidas na depressão da resposta imunológica do hospedeiro durante infecção por BHV-1. As composições e

vacinas também podem incluir modificação de forma que a virulência do BHV-1 tenha sido reduzida.

Exemplos de genes modificados de BHV-1 podem incluir UL49.5 de BHV-1, UL41 de BHV-1, Us4 de BHV-1, e Circ de BHV-1 modificados. Os genes podem ser modificados por mutações pontuais únicas, em alguns casos com a única mutação sendo mutações por deleção. Mutações por deleção podem ser deleções completas ou deleções parciais dos genes. As modificações podem resultar em produção de nenhuma proteína a partir daquele gene. As modificações podem resultar em produção de proteínas não nativas ou não tipo selvagem a partir daquele gene. Em um exemplo, UL49.5 de BHV-1 é modificado. Em um exemplo, UL41 de BHV-1 é modificado. Em um exemplo, Us4 de BHV-1 é modificado. Em um exemplo, Circ de BHV-1 é modificado. Modificação em genes diferentes ou adicionais é contemplada.

Vírus BHV-1 contendo modificações de genes podem conter uma modificação, duas modificações, três modificações ou quatro ou mais modificações. Estas modificações podem ser em adição a modificações que podem já existir, como em linhagens atenuadas de vacina, por exemplo. Em um exemplo, um vírus BHV-1 pode conter dois genes modificados que são UL49.5 e UL41. Em um exemplo, pelo menos um gene selecionado a partir do grupo de UL49.5 de BHV-1, UL41 de BHV-1, Us4 de BHV-1 e Circ de BHV-1 e pelo menos um gene selecionado a partir do grupo de LR-ORF 1 de BHV-1, LR-ORF 2 de BHV-1, e Us9 de BHV-1 são modificados.

Em qualquer dos exemplos descritos de composição e vacina, um gene marcador pode estar incluído. Em certas formas de realização, os genes marcadores podem ser UL49.5 de BHV-1, UL41 de BHV-1, Us4 de BHV-1, e/ou Circ de BHV-1. Certas composições e vacinas também podem incluir Us8 de BHV-1 como o gene marcador.

Vacinas descritas também podem incluir veículos farmacologicamente aceitáveis. As composições e vacinas também podem

incluir imunógenos adicionais (e.g., um imunógeno outro do que um imunógeno de BHV-1). Os imunógenos adicionais podem ser co-administrados ou podem ser administrados em uma vacina em coquetel de combinação. Outras administrações são contempladas. Os imunógenos adicionais podem ser imunógenos bacterianos, tal como imunógenos de *Vibrio*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Fusobacterium necrophorum*, clostridiais, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Mycoplasma bovis*, e/ou Leptospirose, e/ou imunógenos virais tal como imunógenos de BVD I e II, PI3 e BRSV. As composições e vacinas podem incluir adicionalmente imunógenos parasíticos tal como imunógenos de *Neospora caninum* e/ou *Trichomonas* spp..

Métodos descritos incluem prevenção ou tratamento de uma infecção por BHV-1 em um hospedeiro (geralmente um bovino) administrando com uma dose terapêutica das composições ou vacinas descritas (e.g., BHV-1 contendo gene ou genes modificado(s) e pelo menos um imunógeno adicional). Geralmente, os métodos também incluem tratamento ou prevenção de infecção e/ou doença por patógenos a partir dos quais o imunógeno adicional ou imunógenos é/são obtido(s). Em um exemplo, administração das composições ou vacinas descritas facilita respostas imunes em um hospedeiro a ou contra BHV-1 e os imunógenos adicionais. Em um exemplo, administração das composições ou vacinas descritas facilita aliviar ou prevenir imunossupressão das respostas imunes do hospedeiro atribuídas a BHV-1 que não contém os genes modificados. Em um exemplo, administração das composições descritas facilita aliviar ou prevenir imunossupressão da resposta imune do hospedeiro a ou contra os imunógenos adicionais atribuídos a BHV-1 não modificado.

Breve Descrição dos Desenhos

Nos desenhos anexos, que são incorporadas em e constituem uma parte do relatório, formas de realização de, ou relacionadas a,

composições, vacinas e métodos são ilustradas, que, junto com a descrição detalhada dada abaixo, servem para descrever os exemplos. Deve ser percebido que as formas de realização ilustradas nas ilustrações são mostradas para o propósito de ilustração e não para limitação. Deve ser percebido que alterações, modificações e desvios das formas de realização ilustradas nas ilustrações podem existir sem se afastar do espírito e escopo da invenção, conforme descrito abaixo.

Figura 1 ilustra seqüências de DNA (SEQ ID NO:1) e de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de UL49.5 de BHV-1 da linhagem Cooper.

Figura 2 ilustra seqüências de DNA (SEQ ID NO:3) e de aminoácidos (SEQ ID NO:4) de UL41 de BHV-1 da linhagem Cooper.

Figura 3 ilustra seqüências de DNA (SEQ ID NO:5) e de aminoácidos (SEQ ID NO:6) de Circ de BHV-1 da linhagem Cooper.

Figura 4 ilustra seqüências de DNA (SEQ ID NO:7) e de aminoácidos (SEQ ID NO:8) de LR-ORF 1 de BHV-1 da linhagem Cooper.

Figura 5 ilustra seqüências de DNA (SEQ ID NO:9) e de aminoácidos (SEQ ID NO:10) de LR-ORF 2 de BHV-1 da linhagem Cooper.

Figura 6 ilustra seqüências de DNA (SEQ ID NO:11) e de aminoácidos (SEQ ID NO:12) de Us4 de BHV-1 da linhagem Cooper. Como descrito no relatório, os nucleotídeos sublinhados indicam a região que foi deletada no gene Us4 da linhagem GL756 de BHV-1 para produzir o Us4 mutante usado em alguns estudos. Deleção dos nucleotídeos sublinhados resulta em ausência dos aminoácidos sublinhados quando o gene é expresso.

Figura 7 ilustra seqüências de DNA (SEQ ID NO:13) e de aminoácidos (SEQ ID NO:14) de Us9 de BHV-1 da linhagem Cooper.

Figura 8 ilustra seqüências de DNA (SEQ ID NO:15) e de aminoácidos (SEQ ID NO:16) de Us8 de BHV-1 da linhagem Cooper.

Figura 9 ilustra a seqüência de DNA (SEQ ID NO:23) de um gene UL49.5 mutante da linhagem GL756 de BHV-1. Os nucleotídeos

sublinhados indicam seqüências adicionadas à seqüência de UL49.5 de GL756 tipo selvagem. Os nucleotídeos sublinhados adicionam dois códons de parada de tradução em quadro de leitura à seqüência de codificação.

Figura 10 ilustra dados exemplares de citometria de fluxo de efeito de BHV-1 GL756 em expressão em superfície celular de moléculas de MHC classe I. Células MDBK, não infectadas (mock-infected) e infectadas com BHV-1 GL756 foram coradas com anticorpo monoclonal PT85A, específico para moléculas de MHC classe I. Células de controle negativo foram coradas com MM605, um anticorpo de controle isotípico não reativo.

Figura 11 ilustra dados exemplares de um estudo onde antígeno LkT foi administrado a bezerros sozinho (LkT) ou com BHV-1 (GL756+LkT) em dia 0 e novamente em dia 21 (LkT administrado sozinho em dia 21). Bezerros de controle foram administrados com apenas BHV-1 (GL756) em dia 0. Soros foram obtidos dos bezerros nos dias indicados e os níveis de anticorpos específicos para LkT foram determinados usando ELISA. Barras de erro indicam erro padrão da média (EPM) para as medidas. Os triângulos indicam momentos onde houve uma diferença significativa entre os níveis de anticorpos específicos para LkT em amostras de soro de animais GL756+LkT se comparados com animais LkT.

Figura 12 ilustra dados exemplares de um estudo onde antígeno LkT foi administrado a bezerros sozinho (LkT) ou com BHV-1 (GL756+LkT) em dia 0 e novamente em dia 21 (LkT administrado sozinho em dia 21). Soros foram obtidos dos bezerros nos dias indicados e os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 específicos para LkT foram determinados usando ELISA. Os dados são expressos como proporções de IgG1 versus IgG2. Barras de erro indicam EPM.

Figura 13 ilustra dados exemplares de um estudo onde antígeno LkT foi administrado a bezerros sozinho (LkT) ou com BHV-1 (GL756+LkT) em dia 0 e novamente em dia 21 (LkT administrado sozinho

em dia 21). Bezerros de controle foram administrados com apenas BHV-1 (GL756) em dia 0. Sangue periférico foi obtido dos bezerros em dia 23. Células dentro das amostras de sangue foram colocadas em contato com antígeno LkT e, subseqüentemente, níveis de IL-2 nas amostras foram determinados usando ELISA.

Figura 14 ilustra Construções de Deleção-Recombinação (DRC) de BHV-1 GL756Δ UL49.5 (A) e Us4Δ (B) exemplares usadas para gerar modificações de deleção por recombinação homóloga. Também são ilustradas seqüências de DNA exemplares de construções de recombinação UL49.5 (SEQ ID NO:17) e Us4 (SEQ ID NO:18).

Figura 15 ilustra seqüências de DNA exemplares de construções de recombinação BHV-1 UL41 (SEQ ID NO:19) e BHV-1 LR-ORF 2 (SEQ ID NO:20).

Figura 16 ilustra produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR) exemplares de amplificação de nucleotídeos de BHV-1 GL756ΔUL49.5_EGFP clones A1 e B8, e GL756 BHV-1 de base, usando iniciadores flanqueadores para o sítio de deleção/recombinação.

Figura 17 ilustra produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR) exemplares de amplificação de nucleotídeos de BHV-1 GL756ΔUs4_EGFP clones 1 e 2, e GL756 BHV-1 de base usando iniciadores flanqueadores para o sítio de deleção/recombinação.

Figura 18 ilustra um Western blot exemplar de BHV-1 GL756ΔUL49.5 clones A1, A5, B7 e B8 ou GL756 BHV-1 de base, usando anticorpo contra UL49.5. O Western blot confirma deleção do gene alvo no BHV-1 modificado.

Figura 19 ilustra um Western blot exemplar de BHV-1 GL756ΔUL49.5 clones A1, B8; GL756ΔUs4 clones 1, 2, ou GL756 BHV-1 de base usando anticorpo contra Us4. O Western blot confirma deleção do gene alvo no BHV-1 modificado.

Figura 20 ilustra as mutações dentro dos genes UL49.5 (inserção de dois códons de parada) e UL41 (deleção completa) do genoma de BHV-1 GL756. Na parte superior da ilustração são mostradas as regiões únicas (U_L e U_S) e repetidas (IR e TR) do genoma. Na parte inferior da ilustração é mostrado o gene UL49.5 dentro do fragmento J, e o gene UL41 dentro do fragmento I, do genoma.

Figura 21 ilustra as mutações dentro do gene Us4 (deleção parcial e inserção) do genoma de BHV-1 GL756. Na parte superior da ilustração são mostradas as regiões únicas (U_L e U_S) e repetidas (IR e TR) do genoma. Na parte inferior da ilustração é mostrado o gene Us4 dentro do fragmento K do genoma.

Figura 22 ilustra as mutações dentro do gene Circ (deleção completa) do genoma de BHV-1 GL756. Na parte superior da ilustração são mostradas as regiões únicas (U_L e U_S) e repetidas (IR e TR) do genoma. Na parte inferior da ilustração é mostrado o gene Circ dentro do fragmento N do genoma.

Figura 23 ilustra curvas de crescimento de vírus BHV-1 em células MDBK. Os vírus tiveram o GL756 de base. GL756 (BHV-1 WT), UL49.5 mutante de GL756 (BHV-1 Δ UL49.5), clones de dois UL41 mutantes de GL756 (BHV-1 Δ UL41:1606 e BHV-1 Δ UL41:1607), clones de dois mutantes duplos UL41/UL49.5 (BHV-1 Δ UL41/UL49.5:1614 e BHV-1 Δ UL41/UL49.5:1616), Circ mutante de GL756 (BHV-1 Δ Circ:1697) e Us4 mutantes (BHV-1 Δ Us4gG:1698) foram testados.

Figura 24 ilustra dados exemplares de citometria de fluxo de efeito de BHV-1 GL756 e BHV-1 modificado em expressão em superfície celular de moléculas de MHC classe I. Células MDBK, não infectadas (mock-infected), infectadas com BHV-1 GL756 ou GL756 Δ UL4.5 clones A1 ou B8 foram coradas com anticorpo monoclonal PT85A, um anticorpo específico

para moléculas de MHC classe I. Células de controle negativo foram coradas com MM605, um anticorpo de controle isotípico não reativo.

Figura 25 ilustra dados exemplares de citometria de fluxo do efeito de BHV-1 GL576 e GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 em expressão em superfície celular de moléculas de MHC classe I. Células MDBK não infectadas (mock-infected), infectadas com BHV-1 GL756 ou GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 foram coradas com anticorpo monoclonal PT85A, um anticorpo específico para moléculas de MHC classe I. Células de controle negativo foram coradas com MM605, um anticorpo de controle isotípico não reativo.

Figura 26 ilustra dados exemplares de citometria de fluxo do efeito de vários vírus BHV-1 mutantes em expressão em superfície celular de moléculas de MHC classe I. Os dados são expressos como expressão percentual comparada com células não infectadas (mock-infected) (100%). Células MDBK foram infectadas com BHV-1 GL576, GL756 Δ UL49.5, GL756 Δ UL41 ou GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 e foram coradas com um anticorpo reativo com moléculas de MHC classe I.

Figura 27 ilustra dados exemplares de Western blotting do efeito de vários vírus BHV-1 mutantes em expressão de moléculas de MHC classe I (topo). Os blots foram escaneados e quantificados, e os dados são expressos como expressão percentual comparada com células não infectadas (mock-infected) (100%, fundo). Células MDBK foram infectadas com BHV-1 GL576, GL756 Δ UL49.5, GL756 Δ UL41, GL756 Δ UL49.5- Δ UL41, GL756 Δ Circ ou GL756 Δ Us4.

Figura 28 ilustra dados exemplares de citometria de fluxo do efeito de BHV-1 e vários vírus BHV-1 mutantes em expressão em superfície celular de moléculas de MHC classe II. Os dados são expressos como expressão percentual comparada com células não infectadas (mock-infected) tratadas com IFN- γ (100%). Células MDBK foram infectadas com BHV-1

GL576 (WT clone 1584), GL756 Δ UL49.5 (clone 1610), GL756 Δ UL41 (clone 1606), GL756 Δ UL41 (clone 1607), GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 (clone 1614), GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 (clone 1616), GL756 Δ Circ (clone 1697) ou GL756 Δ Us4 (clone 1698), incubadas a 4°C por 30 mins, então a 37°C por 1 hora seguido por tratamento com IFN- γ . Em 72 horas após infecção, as células foram coradas com anticorpo monoclonal CAT82A, específico para MHC classe II. Células de controle negativo não foram coradas.

Figura 29 ilustra dados exemplares de citometria de fluxo do efeito de vários vírus BHV-1 mutantes em expressão em superfície celular de moléculas de MHC classe II. Os dados são expressos como restauração percentual de expressão de MHC classe II (i.e., níveis de MHC classe II em células infectadas com GL576 recebeu valor de 0; restauração de MHC classe II aos níveis presentes em células não infectadas (mock-infected) receberia valor de 100). Células MDBK tratadas com IFN- γ foram infectadas com BHV-1 GL576 (WT clone 1584), GL756 Δ UL49.5 (clone 1610), GL756 Δ UL41 (clone 1606), GL756 Δ UL41 (clone 1607), GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 (clone 1614), GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 (clone 1616), GL756 Δ Circ (clone 1697) ou GL756 Δ Us4 (clone 1698) e foram coradas com um anticorpo reativo com moléculas de MHC classe II.

Figura 30 ilustra dados exemplares de um estudo onde antígeno LkT foi administrado a bezerros sozinho (LkT), com BHV-1 GL756 (GL756+LkT), com GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 ou GL756 Δ Us4 em dia 0 e novamente em dia 21 (LkT administrado sozinho em dia 21). Soros foram obtidos dos bezerros nos dias indicados e os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 específicos para LkT foram determinados usando ELISA. Os dados são expressos como proporções de IgG1 versus IgG2. Barras de erro indicam EPM.

Figura 31 ilustra dados exemplares de um estudo onde antígeno LkT foi administrado a bezerros com BHV-1 GL756 (LkT+GL756),

GL756ΔUL49.5-ΔUL41 ou GL756ΔUs4 em dia 0 e novamente em dia 21 (LkT administrado sozinho em dia 21). Sangue periférico foi obtido dos bezerros em dia 23. Células dentro das amostras de sangue foram colocadas em contato com antígeno LkT e, subsequentemente, níveis de IL-2 nas amostras foram determinados usando ELISA.

Descrição detalhada

Vírus BHV-1 são conhecidos por causar imunossupressão de hospedeiros infectados. Quando BHV-1 é administrado a um hospedeiro como uma vacina, ele também pode suprimir ou deprimir a resposta imune a um imunógeno que pode ser administrado com o BHV-1. Este pedido descreve vírus BHV-1 que imunossuprimem hospedeiros infectados em um menor grau do que vírus BHV-1 tipo selvagem normais. Os vírus BHV-1 descritos aqui também podem aliviar a supressão ou depressão da resposta imune a um imunógeno que é administrado com BHV-1. Em alguns casos, não há nenhuma supressão da resposta imune a um imunógeno administrado com os vírus BHV-1 inventivos comparada com uma resposta imune produzida quando aquele imunógeno é administrado sozinho (sem BHV-1). Em alguns casos, há uma acentuação da resposta imune a um imunógeno administrado com os vírus BHV-1 inventivos comparada com uma resposta imune produzida quando aquele imunógeno é administrado sozinho. Também são descritas composições contendo os vírus BHV-1 inventivos e imunógenos adicionais. Também são descritos métodos de usando os vírus BHV-1 inventivos, através de co-administração a um hospedeiro ou através de administração em uma vacina de combinação, para produzir uma resposta imune em um hospedeiro a BHV-1 e um imunógeno adicional.

A prática da presente invenção irá empregar, a menos que de outra maneira indicado, virologia convencional, microbiologia, biologia molecular e técnicas de DNA recombinante dentro do verso da arte. Estas técnicas são completamente explicadas na literatura.

Todas as patentes, pedidos de patentes e publicações citados neste lugar, quer acima ou abaixo, são por aqui incorporadas por referência em sua totalidade. A terminologia seguinte será usada em conformidade com as definições apresentadas abaixo para descrever a presente invenção.

5

Definições

“Composição de vacina” e “vacina” se referem a um agente usado para estimular uma resposta imunológica em um animal de forma que dano atual é aliviado, ou proteção contra dano futuro é fornecida. Uma “vacina co-administrada” é uma vacina dada ou administrada
10 aproximadamente ao mesmo tempo, mas em uma dose separada. Como usado neste lugar, aproximadamente ao mesmo tempo pode ser qualquer tempo entre administração da primeira dose e cinco dias após administração da primeira dose. Uma “combinação” ou “vacina de coquetel” é uma vacina que estimula uma resposta imunológica a mais do que um patógeno que é
15 fabricada com múltiplos imunógenos e administrada em uma dose única.

Uma “molécula de DNA dupla fita” se refere à forma polimérica de desoxirribonucleotídeos (adenina, guanina, timina ou citosina) em sua hélice dupla fita normal. Este termo se refere apenas à estrutura primária e secundária da molécula, e não se limita a quaisquer formas
20 terciárias particulares. Assim, este termo inclui DNA dupla fita encontrado, entre outros, em moléculas de DNA linear (e.g., fragmentos de restrição), vírus, plasmídeos, e cromossomos. Ao discutir a estrutura de moléculas de DNA dupla fita particulares, seqüências podem ser descritas neste lugar de acordo com a convenção normal de dar apenas a seqüência na direção 5’ a 3’
25 ao longo da fita não transcrita de DNA (i.e., a fita tendo a seqüência homóloga ao mRNA).

Uma “seqüência de codificação” de DNA é uma seqüência de DNA que é transcrita e traduzida em um polipeptídeo quando colocada sob o controle de seqüências reguladoras apropriadas. Os limites da seqüência de

codificação são determinados por um códon de início no término 5' (amino) e um códon de término de tradução no término 3' (carboxi). Uma sequência de codificação pode incluir, mas não é limitada a, seqüências procarióticas, cDNA de mRNA eucariótico, seqüências de DNA genômico de DNA eucariótico (e.g., de mamífero), e seqüências de DNA sintético. Um sinal de poliadenilação e seqüência de término de transcrição normalmente estarão localizados 3' à seqüência de codificação. Um polinucleotídeo é dito “codificar” um polipeptídeo se, em seu estado nativo ou quando manipulado por métodos bem conhecidos para aqueles versados na arte, ele pode ser transcrito e/ou traduzido para produzir o mRNA para o polipeptídeo e/ou um fragmento deste. A fita antisense é o complemento de um tal ácido nucléico, e a seqüência de codificação pode ser deduzida a partir deste ponto.

“Seqüências reguladoras” de DNA se refere coletivamente a seqüências de promotores, sítios de ligação ao ribossomo, sinais de poliadenilação, seqüências de término de transcrição, domínios regulatórios à montante, acentuadores, e os semelhantes, que coletivamente sustentam a transcrição e tradução de uma seqüência de codificação em uma célula hospedeira.

“Ácido nucléico recombinante” é um ácido nucléico que não é naturalmente ocorrente, ou que é feito pela combinação artificial de dois segmentos de seqüência de outra maneira separados. Esta combinação artificial freqüentemente é realizada ou por meio de síntese química, ou pela manipulação artificial de segmentos isolados de ácidos nucléicos, e.g., por técnicas de engenharia genética. Isto pode ser feito para substituir um códon por um códon redundante codificando o mesmo aminoácido ou um conservativo, enquanto tipicamente introduzindo ou removendo um sítio de reconhecimento de seqüência. Alternativamente, isto é realizado para unir segmentos de ácidos nucléicos de funções desejadas para gerar uma combinação desejada de funções. Um polipeptídeo produzido como um

produto de expressão de uma sequência genética isolada e manipulada é um “polipeptídeo isolado”, como usado neste lugar, mesmo se expresso em um tipo de célula homóloga. Formas ou moléculas feitas sinteticamente expressas por células heterólogas são inerentemente moléculas isoladas.

5 “Polipeptídeos recombinantes” se referem a polipeptídeos produzidos por técnicas de DNA recombinante ou ácido nucléico recombinante; i.e., produzidos a partir de células transformadas por uma construção de DNA exógeno codificando o polipeptídeo desejado.

10 Uma “sequência de promotor” ou “promotor” é uma região reguladora de DNA capaz de ligar RNA polimerase em uma célula e iniciar transcrição de uma sequência de codificação à jusante (direção 3'). Para propósitos de definir a presente invenção, a sequência de promotor é ligada no término 3' pelo códon de início de tradução (ATG) de uma sequência de codificação e se prolonga à montante (direção 5') para incluir o número
15 mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar e regular transcrição apropriadamente em níveis detectáveis acima de histórico. Dentro da sequência de promotor será encontrado um sítio de início de transcrição assim como domínios de ligação de proteínas responsáveis pela ligação de RNA polimerase. Promotores eucarióticos freqüentemente, mas não sempre, irão
20 conter caixas "TATA" boxes e caixas "CAT". Promotores procarióticos podem conter sequências Shine-Dalgarno em adição às sequências consenso - 10 e -35.

25 “Operacionalmente ligado” se refere a uma justaposição de componentes caracterizado pelo fato de que os componentes assim descritos estão em uma relação permitindo que eles funcionem em sua maneira almejada. Por exemplo, um promotor é operacionalmente ligado com uma sequência de codificação se o promotor afeta a transcrição ou expressão da sequência de codificação.

Duas seqüências de DNA ou polipeptídeos são “substancialmente homólogas” quando pelo menos cerca de 85%, a menos que especificamente determinado de outra maneira, (preferivelmente pelo menos cerca de 90%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%) dos nucleotídeos ou aminoácidos coincidem ao longo de um comprimento definido da molécula. Seqüências de DNA que são substancialmente homólogas podem ser identificadas em um experimento de hibridização Southern, por exemplo, em condições estringentes, conforme definido para aquele sistema particular. Definir condições apropriadas de hibridização está dentro do verso da arte.

O termo “funcionalmente equivalente” pretende que a seqüência de aminoácidos da proteína codificada seja uma que irá produzir uma resposta biológica equivalente à resposta biológica do imunógeno ou proteína especificado, geralmente uma proteína nativa. Em alguns casos, esta resposta biológica será uma resposta imunológica. Em alguns casos, esta resposta biológica se refere à capacidade de uma proteína codificada de suprimir uma resposta imunológica em um hospedeiro. “Não funcionalmente equivalente” se refere a uma resposta biológica que não é equivalente à resposta biológica mediada pela proteína nativa. Adicionalmente, uma seqüência de genes é funcionalmente equivalente a outra seqüência de genes se ela codifica um polipeptídeo idêntico ou um polipeptídeo que por si só é funcionalmente equivalente.

O termo “polipeptídeo” é usado em seu sentido mais amplo, i.e., qualquer polímero de aminoácidos (dipeptídeo ou maior) ligados através de ligações peptídicas. Assim, o termo “polipeptídeo” inclui proteínas, oligopeptídeos, fragmentos de proteínas, análogos, muteínas, proteínas de fusão e os semelhantes. Uma “glicoproteína” é um polipeptídeo glicosilado.

Proteínas ou polipeptídeos “nativos” se referem a proteínas ou polipeptídeos com seqüências idênticas àquelas de proteínas BHV-1 tipo

selvagem e fragmentos destas. Um gene “nativo” é um gene tendo uma sequência de nucleotídeos idêntica a um gene ou fragmento deste encontrado em BHV-1 tipo selvagem.

5 "Modificação" de um gene como usado neste lugar significa
mutação, substituição ou deleção de uma sequência de nucleotídeos
codificando um gene ou um fragmento deste para uma proteína BHV-1, que
resulta em uma proteína de BHV-1 não funcionalmente equivalente se
comparada com proteína de BHV-1 ancestral. Um gene que foi
completamente deletado ou foi parcialmente deletado também passou por
10 modificação. Um gene que foi completamente deletado geralmente não
codifica uma proteína. Um gene que foi parcialmente deletado pode codificar
uma proteína modificada. Modificação de um gene também pode incluir uma
inserção de uma ou mais seqüências em um gene. Modificação de um gene
pode incluir combinações de tipos individuais de modificações ou mutações.
15 Em um exemplo, parte de um gene pode ser deletada e uma seqüência
adicional pode ser inserida na localização da deleção original ou em outra
localização dentro do gene.

Seqüências de proteínas também podem ser modificadas.
Proteínas modificadas podem ser codificadas por genes modificados. Uma
20 proteína modificada geralmente tem uma seqüência de aminoácidos diferente
do que a proteína não modificada ou nativa. Em alguns casos, uma proteína
modificada não terá a mesma função que a proteína nativa. Neste caso a
proteína modificada também pode ser uma proteína não funcionalmente
equivalente, se comparada com BHV-1 ancestral. A proteína modificada pode
25 ter mutações, substituições ou deleções de aminoácidos se comparada com
BHV-1 ancestral. Em certas formas de realização, um gene ou proteína será
modificado se ele resulta em uma proteína que não é funcionalmente
equivalente a um gene ou proteína tipo selvagem. Técnicas para modificar
genes e proteína, tal como construções de deleção gênica e cromossomos

artificiais bacterianos (BACs) são bem conhecidas dentro da arte e não pretendidas para serem limitantes. Qualquer método para modificar os genes ou seqüências de proteínas da presente invenção pode ser usado. Por exemplo, qualquer técnica de modificação que resulta em uma proteína não

5 funcionalmente equivalente pode ser usada. Uma modificação gênica também pode incluir alterações, não à seqüência de codificação de um gene, mas a uma seqüência regulatória que afeta o nível de expressão do gene. Em um exemplo, uma modificação deste tipo pode resultar em regulação descendente de expressão de um gene.

10 Dentro do contexto desta invenção, os tipos de modificações que podem ser feitas em um gene específico podem depender, em parte, da função da proteína codificada. Em um exemplo, a proteína codificada por um gene de BHV-1 particular pode ser conhecida por suprimir resposta imunológica de um hospedeiro a um antígeno administrado com BHV-1.

15 Portanto, pode ser desejado deletar o gene de forma que nenhuma proteína seja expressa a partir do gene (e.g., deleção gênica completa). Entretanto, pode ser que ausente a proteína codificada pelo gene de BHV-1 particular, o BHV-1 seja muito virulento para ser usado como uma linhagem de vacina. Uma maneira, mas não a única maneira, que isto pode ocorrer é se a proteína

20 codificada pelo gene de BHV-1 particular é um imunógeno forte que, em parte, estimula uma forte resposta imunológica no hospedeiro. Ausência desta proteína do vírus pode resultar em uma incapacidade do hospedeiro de montar uma resposta imunológica suficiente para manter o vírus infectante sob controle. Doença ou outros efeitos colaterais deletérios podem ocorrer no

25 hospedeiro. Uma solução potencial para este problema pode ser modificar o gene de BHV-1 particular de forma que a proteína codificada ainda é imunogênica, mas é incapaz de suprimir resposta imunológica de um hospedeiro. Desta maneira, o hospedeiro ainda pode ser capaz de montar uma resposta imunológica suficiente para manter o vírus BHV-1 infectante sob

controle, mas a função da proteína para suprimir uma resposta imunológica do hospedeiro é desativada. Podem existir outros cenários onde nem todo tipo de modificação em um gene de BHV-1 particular conhecida por suprimir o sistema imune do hospedeiro pode ser usada. Alguém de verso na arte terá conhecimento de métodos para identificar e solucionar este e problemas similares.

Como usado neste lugar, uma “proteína relacionada a MHC” é qualquer proteína diretamente envolvida na via de processamento de antígenos e apresentação através de uma molécula de MHC classe I ou MHC classe II. Estas proteínas são bem conhecidas para aqueles versados na arte. Assim, uma proteína relacionada a MHC pode ser não apenas uma molécula de MHC mas também, embora não limitado a, proteínas ativas no transporte de antígenos para apresentação de MHC classe I tal como proteínas transportadoras associadas ao processamento de antígenos (TAP) de um animal hospedeiro.

Um “gene marcador” se refere a um gene que pode ser usado para diferenciar animais infectados de animais vacinados. Como usado neste lugar, genes marcadores diferem de genes tipo selvagem de uma maneira que pode ser medida usando um teste diagnóstico. Uma vacina marcadora é uma vacina contendo pelo menos um gene marcador. Em uma forma de realização da presente invenção, os genes marcadores serão ou BHV-1 UL49.5, BHV-1 UL41, BHV-1 Us4, ou BHV-1 Circ. Em outras formas de realização, o gene marcador pode ser BHV-1 Us8. Genes marcadores em vacinas podem ser usados para uma vacina “DIVA” (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) como é conhecido na arte. Em um exemplo, um teste diagnóstico pode ser projetado e usado para diferenciar entre uma vacina de BHV-1 administrada (vacina DIVA) e um BHV-1 que naturalmente infectou o hospedeiro.

"Análogo mutante" de uma proteína ou gene de BHV-1 como usado neste lugar significa uma proteína tendo uma seqüência de aminoácidos ou um gene tendo uma seqüência de nucleotídeos qualquer que difere da seqüência de proteína ou gene de BHV-1 tipo selvagem em uma ou mais modificações.

Um "hospedeiro" se refere a um animal capaz de naturalmente adquirir infecção por BHV-1. Assim, um hospedeiro é um para o qual pode ser desejável imunizar contra infecção por BHV-1, quer ou não o hospedeiro já esteja infectado ou latentemente infectado por BHV-1. Geralmente o hospedeiro é um ungulado. Um hospedeiro ungulado pode ser bovino, o que inclui gado de qualquer raça e qualquer idade. Um hospedeiro bovino abrange bezerros assim como gado adulto, e é pretendido para incluir bois, touros, novilhos, vacas e bezerros. Bovino ou gado também podem incluir animais bovinos prenhes e lactantes. Aplicações veterinárias são claramente contempladas pela presente invenção. Em algumas formas de realização, as composições e vacinas da presente invenção não serão dadas a um hospedeiro que esteja prenhe, lactante, ou com cerca de três meses de idade. Em certas formas de realização, as composições e vacinas da presente invenção serão dadas a hospedeiros que estão com ou cerca de um mês de idade. Em formas de realização ainda adicionais, as composições e vacinas da presente invenção serão dadas a animais prenhes. Nestas formas de realização, as composições e vacinas podem ser dadas para prevenir infecção fetal. Em outras formas de realização, a composição e vacinas não serão dadas a um hospedeiro dentro de aproximadamente 30 dias de procriação.

Um "antígeno" se refere a uma molécula contendo um ou mais epítomos que irão estimular o sistema imune de um hospedeiro a fazer uma resposta secretória, humoral e/ou celular antígeno-específica. O termo é usado permutavelmente com "imunógeno". O antígeno específico pode ser uma proteína, um polissacarídeo, um lipopolissacarídeo, um lipopeptídeo ou outras

moléculas; ou ele pode ser uma combinação de qualquer destes. Outras combinações são possíveis. Particularmente, o antígeno específico pode incluir uma proteína ou fragmento de proteína natural, ou uma proteína ou fragmento de proteína ou peptídeo sintético; ele pode incluir glicoproteína, glicopeptídeo, lipoproteína, lipopeptídeo, nucleoproteína, nucleopeptídeo; ele pode incluir um conjugado peptídeo-peptídeo; ou ele pode incluir um produto de expressão de ácido nucléico recombinante. Exemplos não limitantes de antígenos incluem, sem limitação, aqueles que são capazes de produzir uma resposta imune contra herpesvírus bovino viral, vírus respiratório bovino, vírus da diarreia viral bovina, coronavírus bovino, e linhagens bacterianas comumente associada com "febre do transporte".

O termo "quantidade efetiva de um imunógeno" define uma quantidade de imunógeno capaz de produzir uma resposta imune humoral, secretória, e/ou celular mediada demonstrável. A quantidade apropriada de imunógeno a ser usada é dependente do imunógeno específico e é bem conhecida na arte.

O termo "epítopo" se refere ao sítio em um imunógeno ou hapteno ao qual uma molécula específica de anticorpo se liga ou é reconhecida por células T. O termo também é usado permutavelmente com "determinante antigênico" ou "sítio de determinante antigênico."

Uma "resposta imunológica" é o desenvolvimento no indivíduo de uma resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo. Normalmente, uma tal resposta inclui, mas não é limitada a, um ou mais dos seguintes efeitos; a produção de anticorpos, células B, células T auxiliares, células T supressoras, e/ou células T citotóxicas e/ou células $\gamma\delta$ T, dirigidas especificamente a um antígeno ou antígenos incluídos na composição ou vacina de interesse. Há muitos componentes que podem resultar nas respostas imunes conforme definido por anticorpos, células B, células T e os semelhantes, como descrito na frase anterior. Mensuração destes componentes

pode ser usada para interferir se ou não uma resposta humoral, celular, combinação de humoral e celular, ou outra existe ou é alterada. Por exemplo, uma resposta imune humoral ou celular, que pode assumir a forma de anticorpos específicos ou células T citotóxicas antígeno-específicas, respectivamente, pode ser afetada uma variedade de componentes. Um componente pode ser a capacidade de um epítipo específico de ser “apresentado” a células T no contexto de moléculas de MHC classe I e/ou MHC classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs) ou outras células. Portanto, a presença ou níveis de moléculas de MHC classe I e/ou MHC classe II podem indicar a capacidade de um organismo de montar um tipo específico de resposta imune. Também, alterações nos níveis de moléculas de MHC classe I e/ou MHC classe II ao longo do tempo ou em diferentes situações podem permitir inferência em se um tipo específico de resposta imune existe ou pode existir.

Outro componente de uma resposta imunológica é a capacidade de um antígeno, que já foi apresentado ao sistema imune de um organismo e estimulou uma resposta imune primária, para estimular uma resposta imune secundária ou para “relembrar” a resposta imune primária. Quando um antígeno é usado para relembrar uma resposta imune, várias citocinas podem ser secretadas por células imunes envolvidas no processo. Em uma instância, mensuração de alterações em interleucina-2 (IL-2) pode ser usada para inferir se e em qual grau um imunógeno relembrou uma resposta imune primária. Memória de uma resposta imune pode ser proporcional à quantidade de IL-2.

Em relação a uma resposta imune humoral, uma característica de se esta resposta imune existe e pode ser protetora contra um patógeno, por exemplo, pode ser os níveis de anticorpos no soro que são específicos para um antígeno do patógeno. Em adição a níveis de anticorpos, os isotipos específicos de anticorpos ou combinação de isotipos ou, para um dado isotipo

de anticorpo, o subtipo ou subclasse específico, ou combinação ou proporção de subtipos ou subclasses específicos podem ser informativos. Em um exemplo, soro pode conter diferentes subtipos do isotipo IgG. O subtipo IgG1 pode ser um anticorpo que é neutralizante para um antígeno específico (e, portanto, concebido como protetor). O subtipo IgG2 pode ser um anticorpo que não é neutralizante para um antígeno específico (e, portanto, não protetor ou menos protetor do que o subtipo IgG1). Neste exemplo, portanto, uma maior proporção de IgG1/IgG2 (para IgG específico para um dado antígeno) pode indicar o potencial para uma melhor resposta imunológica a um dado antígeno do que uma proporção menor de IgG1/IgG2.

Uma resposta imunológica, ou componentes de uma resposta imunológica, normalmente são medidos com imunoensaios. Um aumento em resposta imunológica pode ser medido contra a resposta imunológica seguindo infecção com BHV-1 tipo selvagem ou infecção com vacinas de BHV-1 comercialmente disponíveis. Depressão de uma resposta imunológica pode ser medida se comparada com infecção com vacinas de BHV-1 comercialmente disponíveis ou células não infectadas. Em algumas formas de realização, depressão de resposta imunológica será determinada avaliando expressão em superfície de célula de MHC classe I. Em outras formas de realização, depressão de resposta imunológica será determinada avaliando expressão citoplasmática de célula de MHC classe I, com ou sem expressão em superfície de célula. Em outras formas de realização, depressão de resposta imunológica será determinada avaliando expressão de MHC classe II. Em formas de realização adicionais, depressão de resposta imunológica será determinada avaliando citocinas e outros indicadores de resposta imune, tal como medindo imunossupressão de resposta de um hospedeiro a imunógenos co-administrados como um indicador. Métodos usados para medir resposta imunológica, e componentes de respostas imunológicas, são bem conhecidos na arte e não pretendidos para serem limitantes.

Os termos "polipeptídeo imunogênico" e "seqüência de aminoácidos imunogênica" se referem a um polipeptídeo ou seqüência de aminoácidos, respectivamente, que produzem anticorpos que neutralizam infectividade viral, e/ou mediam citotoxicidade celular dependente de complemento de anticorpo ou anticorpo ou imunidade celular mediada para fornecer proteção de um hospedeiro imunizado. Um "polipeptídeo imunogênico" como usado neste lugar inclui a seqüência de comprimento completo (ou comprimento quase completo) da proteína inserida ou um fragmento imunogênico desta. Por "fragmento imunogênico" é pretendido um fragmento de um polipeptídeo o que inclui um ou mais epítomos e assim produz anticorpos que neutralizam infectividade viral, e/ou mediam citotoxicidade celular dependente de complemento de anticorpo ou anticorpo ou imunidade celular mediada para fornecer proteção de um hospedeiro imunizado. Estes fragmentos normalmente serão de pelo menos cerca de 5 aminoácidos de comprimento, e em certas formas de realização pelo menos cerca de 10 a 15 aminoácidos de comprimento. Não existe nenhum limite superior crítico para o comprimento do fragmento, que pode compreender quase o comprimento completo da seqüência de proteína, ou mesmo uma proteína de fusão compreendendo fragmentos de dois ou mais antígenos de subunidades.

Os termos "tratamento" e "tratado" como usado neste lugar se referem à administração a um indivíduo de uma composição que ou previne infecção ou reinfecção (profilaxia), ou reduz ou elimina os sintomas de BHV-1 (terapia) ou outras doenças associadas com imunógenos adicionais. Como usado neste lugar, tratamento também ocorre se o ciclo latência-reativação de BHV-1 é reduzido ou prevenido como medido por excreção viral seguindo reativação se comparado com reativação seguindo infecção de BHV-1 tipo selvagem. Por exemplo, um animal hospedeiro foi tratado se a quantidade de BHV-1 excretado em fezes ou durante infecção primária ou durante latência é

reduzida ou eliminada. Um animal hospedeiro também foi tratado se o tempo de infecção latente é reduzido. Sucesso deste tratamento pode ser medido por uma redução de excreção ocular ou excreção reduzida de vírus infeccioso na amígdala ou TG.

5 “Ciclo latência-reativação” se refere ao processo de estabelecimento de latência, manutenção de latência, e reativação de BHV-1. Estabelecimento de latência inclui infecção aguda. Manutenção de latência é uma fase que dura pela vida do hospedeiro e pode ser operacionalmente definida como um período quando vírus infeccioso não é detectado por
10 procedimentos padrão de isolamento de vírus. “Reativação” e “reativação de latência” se referem ao processo de reativação viral seguindo administração exógena de corticosteróides ou níveis elevados de corticosteróides naturais como uma consequência de estresse. Imunossupressão também pode estimular expressão gênica viral a causar reativação. Mediante reativação,
15 expressão gênica viral abundante pode ser detectada em neurônios sensoriais, e vírus BHV-1 infeccioso pode ser isolado de gânglios trigeminais, esfregaços oftálmicos, e/ou esfregaços nasais. Durante reativação, vírus é translocado de volta ao sítio inicial de infecção, a partir do qual ele pode se espalhar a outros hospedeiros susceptíveis. A capacidade de reativar a partir de latência resulta
20 em doença recorrente e transmissão de vírus.

Um vírus foi “atenuado” quando a linhagem do vírus tem patogenicidade e/ou virulência reduzida de forma que ele irá iniciar uma resposta imunológica sem produzir a doença específica. Como usado neste lugar, uma vacina viva modificada (MLV) é uma vacina contendo vírus vivo
25 que foi atenuado. Em algumas formas de realização, as vacinas da invenção serão adicionalmente atenuadas. Um vírus adicionalmente atenuado exemplar é um que tem uma redução ou eliminação da febre, linfopenia, queda na produção de leite, queda no consumo alimentar, aborto em bezerras grávidas e viremia fatal em bezerros de menos do que 3 dias de idade se comparado com

vacinação com uma vacina convencional de vírus vivo atenuado. Em certas formas de realização, vírus BHV-1 será adicionalmente atenuado.

Um “veículo farmacêuticamente aceitável” é formulado para ser compatível com sua via de administração pretendida e é permutável neste
5 lugar com o termo “carreador veterinariamente aceitável” ou “veículo veterinariamente aceitável”. Exemplos de vias de administração incluem parenteral, e.g., intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (e.g., inalação), transdérmica (tópica), transmucosal, retal, e outras administrações. Soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, intradérmica, ou subcutânea
10 podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como álcool benzílico ou metilparabenos; antioxidantes tal como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tal como ácido
15 etilenodiaminotetracético; tampões tal como acetatos, citratos ou fosfatos; e agentes para o ajuste de tonicidade tal como cloreto de sódio ou dextrose. pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tal como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Uma preparação parenteral pode ser embutida em ampôlas, seringas descartáveis ou frascos de múltiplas doses feitos de vidro ou plástico.

20 Uma “modificação por deleção” ou “mutante de deleção” inclui seqüências de genes com deleção de pelo menos um nucleotídeo, geralmente no quadro de leitura aberta de uma proteína. Como alguém de verso na arte irá entender, em certos casos, uma mutação por deleção pode incluir uma mutação pontual. Em certas formas de realização, um mutante de
25 deleção tem expressão protéica nocauteada ou eliminada da proteína codificada pela seqüência de nucleotídeos modificada. Em outras formas de realização, um mutante de deleção resulta em uma proteína, que embora expressa, não é funcionalmente equivalente à proteína tipo selvagem. Em algumas formas de realização, mutantes de deleção estarão perdendo a

seqüência de genes inteira. Estes mutantes de deleção podem ser chamados de deleções completas. Em outras formas de realização, os mutantes de deleção estarão perdendo menos do que 1%, 1%-5%, 5%-10%, ou mais da seqüência gênica. Estes mutantes de deleção podem ser chamados de deleções parciais.

- 5 Em certas formas de realização, a deleção será uma deleção pontual conforme definido por deleção de um único nucleotídeo. Uma modificação por deleção ou mutante de deleção também podem incluir mais do que uma deleção de um único nucleotídeo.

Um “gene repórter” pode ser qualquer seqüência a expressão da qual pode ser detectada ou medida, outra do que a seqüência de codificação a qual o promotor naturalmente é operacionalmente ligado. Tipicamente, o gene repórter é heterólogo à célula na qual atividade de promotor é medida. Exemplos de genes repórteres incluem, sem limitação, genes que codificam proteína verde fluorescente (ou qualquer outro marcador fluorescente), cloranfenicol acetil transferase (cat), β -glucuronidase (gus), β -Galactosidase (lacZ), luciferase, e os semelhantes. Expressão de gene repórter pode ser medida por qualquer dos diversos métodos convencionais, e o método ótimo irá depender de fatores tais como a natureza e função do gene repórter. Em geral, ensaios adequados de expressão de gene repórter incluem métodos tal como (i) ensaiar a função de um produto do gene repórter (e.g., medir uma reação enzimática catalisada por um produto do gene repórter); (ii) medir o nível de proteína expressa a partir do gene repórter (e.g., por SDS-PAGE ou em um imunoensaio usando anticorpos (e.g., anticorpos policlonais ou monoclonais) que se ligam especificamente ao produto do gene repórter); e (iii) medir o nível de mRNA transcrito a partir do gene repórter. Estão incluídos dentro da invenção ensaios que permitem triagem em larga escala de compostos de teste. Em um exemplo, expressão de GFP ou EGFP pode ser detectada por visualização de fluorescência verde em luz branca.

Vírus BHV-1 modificados

Em termos gerais, em muitas formas de realização, a presente invenção envolve a modificação de genes de BHV-1 de vírus BHV-1 vivos modificados de vacina de forma a prevenir ou diminuir a imunossupressão do hospedeiro vista em infecção com vírus BHV-1 tipo selvagem ou de vacina.

- 5 Em um exemplo, as modificações de BHV-1 resultam em um vírus que é menos capaz ou incapaz de diminuir ou suprimir uma resposta imunológica específica para ou contra um imunógeno que é administrado com BHV-1. Em um exemplo, as modificações de BHV-1 resultam em vírus que, quando administrado com um imunógeno não BHV-1 adicional, resulta em uma
- 10 resposta imunológica contra o imunógeno adicional que é mais robusta do que a resposta imunológica que resulta quando o imunógeno adicional é administrado sozinho (sem BHV-1).

- Geralmente, o BHV-1 usado na invenção é um vírus vivo. Este vírus pode ser ou não atenuado. Em certas formas de realização, vírus BHV-1
- 15 modificado morto pode ser usado. Esta invenção também fornece um método de aliviar imunossupressão de resposta do hospedeiro a imunógenos adicionais ou co-administrados e/ou em uma vacina de combinação. A invenção também fornece um método de tratar um animal hospedeiro com as vacinas inventivas.

- 20 A invenção inclui composições e vacinas compreendendo genes de BHV-1 modificados caracterizados pelo fato de que os genes são modificados a fim de tratar depressão de resposta imunológica do hospedeiro durante infecção por herpesvírus bovino e/ou para aliviar imunossupressão de resposta do hospedeiro a um imunógeno adicional ou co-administrado e/ou
- 25 em uma vacina de combinação. Na maioria das formas de realização, vacinas para tratar tanto subtipos BHV-1.1 como BHV-1.2 estão abrangidas pela invenção. Métodos de usar as vacinas da presente invenção também são previstos. Muitos, mas certamente não todos, genes BHV-1 ativos em suprimir o sistema imune têm homólogos celulares, permitindo que eles sejam

facilmente reconhecidos. Em certas formas de realização, a modificação será em genes que desempenham um papel em processamento e apresentação de imunógeno MHC. MHC classe I são moléculas apresentadoras de antígenos encontradas em todas as células nucleadas de vertebrados, ao passo que MHC classe II são moléculas apresentadoras de antígenos encontradas essencialmente em macrófagos e linfócitos B. Modificações podem ocorrer em genes envolvidos tanto com funções de MHC classe I como MHC classe II.

Em muitas formas de realização, genes de BHV-1 modificados serão genes que codificam proteínas que causam regulação descendente das proteínas relacionadas a MHC do hospedeiro e/ou evadem resposta imune do hospedeiro ao vírus por evasão do sistema imune do hospedeiro. Exemplos destes tipos de genes incluem BHV-1 UL49.5 [SEQ ID NO.:1], BHV-1 UL41 [SEQ ID NO.:3], e BHV-1 Circ [SEQ ID NO.:5].

Em ainda outras formas de realização, os genes modificados codificam proteínas que suprimem função imune através de regulação de complemento, ação em crescimento celular e/ou interferência em expressão de interferon. Acredita-se que Us4 de BHV-1 [SEQ ID NO.:11] seja imunomodulador através de sua função como uma proteína de ligação à quimiocina.

O gene UL49.5 de BHV-1 codifica uma proteína homóloga à glicoproteína altamente conservada N (gN), encontrada em todos os herpesvírus conhecidos. gN desempenha um papel em regulação descendente de MHC classe I na superfície celular, permitindo assim que BHV-1 evada apresentação de antígenos e ativação do sistema imune do hospedeiro. Lipinska et al. (2006) J. Virol. 80:5822, por aqui incorporado por referência, descreve o gene UL49.5 de BHV-1 em detalhe.

O gene UL41 de BHV-1 codifica uma proteína homóloga a proteína do tegumento que desliga hospedeiro ou “virion host shutoff” (vhs).

A proteína do tegumento que desliga hospedeiro parece desempenhar um papel em imunossupressão regulando de forma descendente a expressão de mRNA de MHC Classe I. Gopinath et al. (2002) *Viral Immun.* 15: 595, descreve modificação de UL41 de BHV-1.

- 5 O gene Circ de BHV-1 codifica uma proteína homóloga a proteína miristilada do tegumento. Proteína miristilada do tegumento de BHV-1 parece regular de forma descendente expressão de MHC Classe II. Schwyzer et al. (2002) *Vet. Microbiol.* 86:165, descreve Circ.

- 10 O gene Us4 de BHV-1 codifica uma proteína homóloga a glicoproteína(g)G, uma proteína de ligação à quimiocina. Bryant et al. (2003) *EMBO J.* 22:833, descreve Us4.

O gene Us9 de BHV-1 codifica uma proteína provavelmente envolvida em transporte anterógrado de gânglios trigeminais a sítios nasais durante reativação de latência.

- 15 Os genes LR-ORF 1 e 2 de BHV-1 ou ORF's relacionados à latência estão implicados em desenvolvimento de infecção latente e persistência viral em gânglios trigeminais.

- 20 O gene Us8 de BHV-1 codifica uma proteína homóloga a glicoproteína(g)E, uma proteína que segundo se acredita inibe resposta imune mediada por IgG.

Modificações de todos os genes nomeados acima são contempladas pela invenção descrita.

- 25 Em uma forma de realização, um vírus BHV-1 modificado pode ter uma modificação em um único gene. Em outras formas de realização, um vírus BHV-1 modificado pode ter modificações em dois, três, quatro, ou mesmo mais genes separados. Em muitas formas de realização, modificação de genes ativos em apoptose estará em conjunção com modificação de genes ativos em processamento de MHC e nestas outras formas de realização, embora não limitante, a modificação pode estar em genes que suprimem

resposta imunológica através de ou indução ou supressão de apoptose ou morte celular programada. Como um exemplo não limitante, modificação pode ocorrer em UL49.5 e em LR-ORF 1 [SEQ ID NO.: 7]. Em ainda outras formas de realização, modificação pode ocorrer em UL49.5, Us4, e em LR-ORF 1 ou simplesmente em UL49.5 e Us4. Em ainda outra forma de realização, modificação pode ocorrer em UL49.5 e UL41. É entendido que estas formas de realização são exemplares apenas e diferentes combinações de genes imunossupressores são contempladas pela invenção. Em certas formas de realização, composições serão escolhidas baseado na capacidade de genes modificados de atuar sinergisticamente para estimular resposta imune.

Em certas formas de realização, composições e vacinas irão incluir pelo menos um UL49.5 de BHV-1, Us4 de BHV-1, UL41 de BHV-1, e/ou Circ de BHV-1 modificado. Estes genes modificados geralmente são reconhecidos por aliviar imunossupressão. Em algumas formas de realização, todos os quatro genes serão modificados. Em outras formas de realização, um, dois ou três genes serão modificados. Os genes podem ser modificados em qualquer combinação. Como um exemplo não limitante, em composições ou vacinas onde dois dos genes foram modificados, estes genes podem ser UL49.5 de BHV-1 e UL41 de BHV-1, UL49.5 e Us4, UL41 e Us4, assim como Circ de BHV-1 e UL49.5 de BHV-1. Em formas de realização que incluem modificações em genes ativos em aliviar imunossupressão, modificações em LR-ORF 1 e 2 de BHV-1 [SEQ ID NO.: 9] e Us9 de BHV-1 [SEQ ID NO.: 13] também podem ocorrer. Inversamente, podem existir composições e vacinas onde modificações ocorreram apenas em LR-ORF 1 e 2 BHV-1 e/ou Us9 de BHV-1. É entendido que modificação pode ocorrer tanto em LR-ORF 1 e 2 de BHV-1 como Us9 de BHV-1. Acredita-se que LR-ORF 1 e 2 de BHV-1 e Us 9 de BHV-1 sejam ativos na prevenção/redução de latência e a excreção de BHV-1. Em ainda outras formas de realização, genes marcadores podem ser modificados ou em conjunção com as modificações

dos genes ativos em imunossupressão e/ou dos genes ativos na prevenção/redução de latência e a excreção de BHV-1 ou em conjunção com modificação tanto em genes de imunossupressão como de latência. O gene marcador pode ser Us8 de BHV-1 [SEQ ID NO.: 15]. Em uma única forma de
5 realização, a vacina pode consistir de três modificações em genes envolvidos em imunossupressão, duas modificações em genes envolvidos em latência, e um gene marcador. As únicas limitações nas combinações de genes modificados são que os imunógenos resultantes devem ser compatíveis tanto no animal como na preparação de vacina.

10 Métodos para a preparação e avaliação de genes e proteínas modificados dentro da presente invenção são bem conhecidos na arte. Exemplos não limitantes de técnicas de modificação incluem modificação de seqüências de DNA de forma que haja (1) substituição de um ou mais aminoácidos por outro, por exemplo, substituição por um resíduo isostérico
15 tendo uma função diferente, e.g., substituir Asn por Asp; um resíduo tendo uma função idêntica, mas uma estrutura primária, secundária ou terciária diferente, e.g., Asp por Glu; quebradores de hélices tal como Pro; substituição de aminoácidos glicosilados por aminoácidos não glicosilados e os semelhantes ou vice versa; substituindo Cys por outro resíduo para deletar
20 formação de pontes dissulfeto; e (2) adição ou deleção de um ou mais aminoácidos para produzir diferenças isostéricas, funcionais ou estruturais nas proteínas. Alterações na estrutura primária incluem alterações de hidrofobicidade ou hidrofiliicidade, alterações na estrutura secundária incluem alterações de enovelamento local e alterações na estrutura terciária incluem
25 alterações na estrutura 3-D de uma proteína. Em muitas formas de realização, estas alterações na estrutura irão resultar em proteínas nocauteadas ou proteínas incapazes de funcionar equivalentemente à proteína tipo selvagem.

Em algumas formas de realização, os genes irão resultar em imunossupressão de vias não relacionadas a MHC e.g. Us4, UL41. Nestas

outras formas de realização, embora não limitante, a modificação pode estar em genes que suprimem a resposta imunológica através de ou indução ou supressão de apoptose ou morte celular programada. Por exemplo, quando apoptose ocorre em subconjuntos de leucócitos, incluindo células CD4+, o sistema imune do hospedeiro é suprimido. Genes ativos nesta ativação de apoptose incluem bICP0 (Geiser et al. (2008) *Microb. Pathog.* 44: 459). Em algumas formas de realização, modificações estarão em genes que codificam bICP0 (Jones et al. (2006) *Vet. Microb.* 113: 199). Em ainda outras formas de realização, modificações podem estar nos genes relacionados à latência tal como LR-ORF 1 e 2 de BHV-1 e Us49 de BHV-1. Outras vias não relacionadas a MHC podem incluir modificação de genes tal como LR-ORF 1 de BHV-1 e Us9 de BHV-1.

Todas as formas de realização da presente invenção são previstos como possíveis em diferentes BHV-1 ancestrais. Por exemplo, o BHV-1 ancestral pode ser a linhagem Cooper (tipo selvagem) ou inversamente pode ser uma linhagem tal como BHV-1 GL756, encontrada em vacinas comercialmente disponíveis. GL756 é um exemplo de um vírus BHV-1 vivo modificado convencionalmente derivado. Outros vírus BHV-1 vivos modificados convencionalmente derivados são contemplados. Estas linhagens exemplares não são pretendidas para serem limitantes e as formas de realização podem usar como base qualquer linhagem de BHV-1 capaz de infectar um hospedeiro. Nas vacinas da invenção, o BHV-1 de base comumente será um vírus vivo atenuado ou modificado. Em certas formas de realização, o BHV-1 de base será vírus morto.

Em certas formas de realização, a depressão de resposta imunológica do hospedeiro será medida contra resposta imunológica vista seguindo infecção com BHV-1 tipo selvagem ou infecção com um imunógeno adicional. Em formas de realização alternativas, a depressão de resposta imunológica do hospedeiro será medida contra infecção com BHV-1 GL756

ou infecção com BHV-1 linhagem Cooper. Uma variedade de métodos de mensuração de resposta imunológica do hospedeiro, tal como ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISAs) ou mensuração de expressão de MHC, são previstos e bem conhecidos por aqueles na arte.

5 Em certas formas de realização, as composições da invenção são colocadas em um vetor adequado para produzir o BHV-1 contendo genes modificados *in vivo*. Este vetor pode ser construído em uma composição de vacina pela adição de um veículo farmacêuticamente aceitável e, opcionalmente, um adjuvante. Tais formulações estão bem dentro do verso da
10 arte. Vetores adequados podem incluir construções de cromossomos artificiais contendo os genes modificados. Um exemplo de um cromossomo artificial é um cromossomo artificial bacteriano (BAC), e.g., pBeloBAC11 ou pBAC108L; veja, e.g., Shizuya et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8794; Wang et al. (1997) Biotechniques 23:992. Os componentes das
15 construções de cromossomos artificiais podem ser reunidos usando métodos padrão. Por exemplo, os genes de BHV-1 modificados podem ser inseridos em um cromossomo artificial por co-transfecção de células com (i) uma construção contendo o cromossomo artificial, flanqueada por seqüências homólogas a regiões do genoma de BHV-1, e (ii) os genes de BHV-1, de
20 forma que recombinação ocorre nas células, resultando em produção de um vírus recombinante incluindo o cromossomo artificial. BHV-1 recombinante pode ser isolado de células nas quais uma construção de cromossomo artificial e BHV-1 foram co-transfectadas, levando à produção de um vírus recombinante por recombinação homóloga, e o BHV-1 isolado pode ser
25 manipulado para produzir os genes modificados de BHV-1, conforme desejado. Métodos de clonagem direta, empregando sítios únicos no genoma de BHV-1 e o cromossomo artificial, também podem ser usados para reunir os componentes do cromossomo artificial. Para exemplos de cromossomos artificiais com genes exógenos inseridos, veja Publicação de Patente Norte-

Americana 2004-0171569, neste lugar incorporada por referência. Nas formas de realização de vacinas da invenção, o vírus BHV-1 recombinante, produzido mediante introdução da construção de cromossomo artificial em uma célula, não mata a célula. Instâncias específicas de incorporação de genes de BHV-1 modificados específicos em um vírus viável são descritas no exemplos 5 e 6 desta invenção.

Formulações

As composições imunogênicas e vacinas empregadas neste lugar como contempladas pela presente invenção podem incluir um ou mais carreadores veterinários aceitáveis. Tais carreadores veterinariamente aceitáveis incluem qualquer solvente, meio de dispersão, agente de revestimento, adjuvante, estabilizante, diluente, agente antibacteriano, agente antifúngico, agente isotônico, agente de adsorção, agente de retardo e os semelhantes. Como usado neste lugar, carreadores veterinariamente aceitáveis e veículos farmacêuticamente aceitáveis são usados permutavelmente.

Diluentes podem incluir água, soro fisiológico, dextrose, etanol, glicerol, e os semelhantes. Agentes isotônicos podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol, e lactose, entre outros. Estabilizantes incluem albumina, entre outros.

Um veículo farmacêuticamente aceitável, adequado para injeção parenteral, normalmente é não tóxico e não terapêutico. Exemplos de tais veículos são água, soro fisiológico, solução de Ringer, solução de dextrose, e solução de Hank. Veículos não aquosos, tal como óleos fixos, óleo de gergelim, oleato de etila, ou triglicerídeos também podem ser usados. Veículos parenterais também podem assumir a forma de suspensões contendo agentes melhoradores de viscosidade, tal como carboximetilcelulose sódica, sorbitol, ou dextrana. O veículo também pode conter quantidades mínimas de aditivos, tal como substâncias que aumentam isotonicidade e estabilidade química, tal como tampões e conservantes. Exemplos de tampões incluem

tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão tris, enquanto que exemplos de conservantes incluem timerosal, m- ou o-cresol, formalina e álcool benzílico. Formulações padrão serão ou líquidos injetáveis ou sólidos que podem ser absorvidos em um líquido adequado como uma suspensão ou solução para
5 injeção. Assim, em uma formulação não líquida, o veículo pode compreender dextrose, albumina de soro humano, conservantes, etc., ao qual água estéril ou soro fisiológico podem ser adicionados antes de administração.

Qualquer material ou mistura de materiais solúvel em água farmacêuticamente aceitável pode ser utilizado na invenção. O material
10 solúvel em água farmacêuticamente aceitável pode compreender um ou mais monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos ou carboidratos. Exemplos incluem dextrose, manitol, frutose, polifrutosano, polidextrose, dextrina, glicose, açúcar invertido, lactitol, lactose, isomalte, maltitol, maltose, maltodextrina, sorbitol, xilitol, sacarose, sucralose, manose, galactose, xilose,
15 arabinose, frutose, glucosamina, galactosamina, ramnose, 6-O-metil-D-galactose, 2-O-acetol-beta-D-xilose, 2-acetamido-2-dioxi-beta-D-galactose-4-sulfato, N-acetilglicosamina, iduronato, manuronato, galacturonato de metila, galactose, arabinose, alfa-D-manopirranose e biopolímeros formados por ligação covalente entre uma ou mais unidades de monossacarídeo ou
20 dissacarídeo. Exemplos de carboidratos incluem alginato, amilose, celulose, carragena, pectina. Para conveniência, monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos e carboidratos podem ser coletivamente referidos como "açúcares". Outros materiais farmacêuticamente aceitáveis que são bem conhecidos na arte também podem ser utilizados.

25 Vários adjuvantes, um campo bem conhecido na arte, também podem ser empregados nas formulações de vacinas da presente invenção. Adjuvantes podem incluir, mas não são limitados a: géis minerais, e.g., hidróxido de alumínio; substâncias tensoativas tal como lisolecitina; glicosídeos, e.g., derivados de saponina tal como Quil A ou GPI-0100; polióis

pluronic; poliânions; polímeros em bloco não iônicos, e.g., Pluronic® F-127 (B.A.S.F., Estados Unidos da América); peptídeos; óleos minerais, e.g. Montanide ISA-50, carbopol, Amphigen®, Amphigen® Mark II (Hydronics, Estados Unidos da América), Alhydrogel® (BSA2; Accurate Scientific, Westbury, NY), emulsões oleosas, e.g. uma emulsão de óleo mineral tal como BayolF/Arlacel A e água, ou uma emulsão de óleo vegetal, água e um emulsificante tal como lecitina; alume; citocinas bovinas; colesterol; e combinações de adjuvantes. Emulsões oleosas adicionais incluem uma emulsão de água em óleo, e uma emulsão de água em óleo em água. Outros adjuvantes ou agentes com propriedades de imunoestimulação ou imunomodulação ou apresentação de antígenos, e produtos comerciais Impran™ (Boehringer Ingelheim Vetmedica, St. Joseph, MO), Emunade® (Schering-Plough Animal Health, Summit, NJ), MetaStim® (Fort Dodge Animal Health, Overland Park, KS) e/ou Emulsigen® (MVP Laboratories, Inc., Omaha, NE) também podem ser usados. Emulsigen D também pode ser usado. Na maioria das formas de realização, o tipo de adjuvante não é limitante contanto que ele não interfira em Beef Quality Assurance™. Quantidades e concentração de adjuvantes e aditivos úteis no contexto da presente invenção podem ser prontamente determinadas pelo artesão versado.

Adjuvantes podem ser usados de diferentes maneiras dependendo de como a vacina inventiva é administrada. Por exemplo, quando o BHV-1 inventivo e um imunógeno não BHV-1 adicional são co-administrados (e.g., BHV-1 administrado em uma localização e o antígeno adicional administrado a outra localização do hospedeiro), o adjuvante pode ser administrado com o imunógeno adicional, mas não com o BHV-1. Em outros exemplos, adjuvante pode ser administrado com o BHV-1, mas não com o imunógeno adicional. Tanto o BHV-1 como imunógeno adicional podem ser administrados com adjuvante ou sem adjuvante (e.g., no caso onde BHV-1 e imunógenos não BHV-1 são administrados em um coquetel de

combinação). Em alguns exemplos, BHV-1 pode ser administrado com um adjuvante e imunógenos adicionais podem ser administrados com um adjuvante diferente.

Em algumas formas de realização, as vacinas da presente invenção serão fornecidas em forma líquida. Em outras formas de realização, as vacinas serão fornecidas como um pó seco. Em formas de realização onde a vacina é fornecida como um pó seco, o usuário final da vacina pode reconstituir a vacina usando um diluente apropriado. Diluentes são bem conhecidos na arte e podem incluir, mas não são limitados a, substâncias tal como água estéril. Em alguns casos, a vacina é preferivelmente usada dentro de um certo período de tempo, tal como 24 horas, uma vez que ela tenha sido reconstituída.

Administração e imunógenos adicionais

Geralmente, as vacinas de BHV-1 modificado serão administradas com pelo menos um imunógeno adicional, ou através de co-administração e/ou através de administração de uma vacina de combinação. Como usado neste lugar, um “imunógeno adicional” é um imunógeno outro do que um imunógeno BHV-1. Além disso, em certas formas de realização, um imunógeno adicional pode não compreender um gene exógeno inserido em um vetor de BHV-1. Um imunógeno adicional pode estar em uma vacina co-administrada ou em uma vacina de combinação/coquetel, i.e. uma vacina com pelo menos dois tipos de imunógenos. Estes imunógenos adicionais podem ser um único imunógeno de um ou mais patógenos particulares (bactérias, micoplasma, vírus, parasitas, etc.) ou podem incluir uma combinação de mais do que um imunógeno de um ou mais patógenos particulares. As vacinas co-administradas e/ou de combinação podem ser preparações de células inteiras ou parciais e/ou preparações vivas modificadas e tais comumente são conhecidas por alguém de verso na arte. Elas também podem incluir outras moléculas imunomoduladoras. Exemplos não limitantes

de patógenos e moléculas imunomoduladoras a partir dos quais imunógenos adicionais podem ser selecionados incluem, mas não são limitados a: vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV); I, II e III; Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV); Vírus da Parainfluenza 3 (PI3); *Mannheimia haemolytica*; *Histophilus somni* (previamente *Haemophilus somnus*) (*H. somni*); Rotavírus (BRV); Coronavírus (BCV); *Mycoplasma bovis*; *Leptospirosis*; *Neospora caninum*; *Trichomonas* spp.; *Vibrio*; antígenos clostridiais; *Pasteurella multocida*; *Fusobacterium necrophorum*; *E.coli* O157:H7; *Salmonella enterica* e citocinas imunomoduladoras tal como, por exemplo, interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), e interferons.

Conforme determinado acima, em certas formas de realização, imunógenos contra BVD estarão incluídos em vacinas co-administradas e/ou de combinação. BVDV Tipos 1, 2 e 3 foram implicados em uma variedade de síndromes clínicas. Estudos estabeleceram que o vírus causa doença respiratória primária severa; que infectou persistentemente gado são uma grande fonte de infecção para bezerros susceptíveis; e que BVD infecta reservatórios de células brancas, causando déficits profundos e abrangentes no sistema imune. Além disso, aborto ou mumificação podem ocorrer quando gado prenhe se torna infectado especialmente durante o primeiro trimestre. Doença das mucosas, outra manifestação fatal freqüente de diarréia viral bovina (BVD), resulta de infecção fetal precoce com um biotipo de BVD não citopático, desenvolvimento de imunotolerância ao vírus, nascimento de um bezerro infectado persistentemente, e subsequente superinfecção com um biotipo de BVD citopático. BVD Tipo 2, foi previamente reconhecido principalmente como um isolado de BVD hemorrágico principalmente em rebanhos leiteiros.

Em certas formas de realização, imunógenos adicionais contra *Mycoplasma bovis* estarão incluídos em uma vacina co-administrada e/ou de combinação para prevenir a doença clínica e perdas associadas com infecções causadas por *Mycoplasma bovis* em gado de corte e leiteiro. Estas doenças incluem mastite contagiosa, pneumonia respiratória, infecções articulares (condições artríticas), ceratoconjuntivite, e infecções do ouvido médio.

Pasteurella multocida, uma causa bacteriana de pneumonia em gado, é outra bactéria a partir da qual imunógenos adicionais podem estar incluídos em vacinas co-administradas e de combinação.

Imunógenos de *Mannheimia haemolytica* podem incluir leucotoxina (LkT) ou antígenos associados a Proteína de Membrana Externa (OMP), ou outros antígenos.

Imunógenos bacterianos adicionais contra Leptospirose também são previstos em vacinas co-administradas e de combinação. Leptospirose, causada por bactérias do gênero *Leptospira*, é uma infecção zoonótica economicamente importante de animais de fazenda. *Leptospira borgpetersenii* sorovar hardjo (*L. hardjo*) e *L. interrogans* sorovar pomona (*L. pomona*) são os dois sorovares mais comumente associados com leptospirose bovina ao redor do mundo. Em muitos casos, imunógenos adicionais destes dois sorovares estarão incluídos na vacina co-administrada e/ou de combinação. Imunógenos adicionais de Leptospirose incluem aqueles de *Leptospira cannicola*, *Leptospira grippotyphosa*, e *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Infecção leptospiral de gado pode resultar em febre aguda, agalactia, aborto, ou nascimento de bezerros infectados prematuros e fracos, e pode contribuir para falhas reprodutivas e baixas taxas de concepção.

Outros imunógenos exógenos de patógenos bacterianos que podem ser usados em formas de realização da presente invenção vêm de *Vibrio* spp. e espécies clostridiais. Exemplos de imunógenos clostridiais incluem aqueles de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium*

novyi, *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens* Tipos C e D, e *Clostridium haemolyticum*.

Em formas de realização ainda adicionais, imunógenos adicionais contra *Neospora caninum* estarão incluídos em vacinas co-administradas e/ou de combinação. *Neospora caninum* é um protozoário formador de cisto que causa aborto em gado. Em gado, aborto devido a infecção com *N. caninum* normalmente ocorre no meio para o final da gestação, embora nem todos os fetos infectados sejam abortados. Muitos bezerros infectados congenitamente nascem saudáveis e infectados persistentemente, embora alguns bezerros infectados fiquem adoentados no nascimento e morram no período neonatal com lesões similares àquelas de bezerros abortados.

Trichomonas é ainda outro parasita para o qual imunógenos adicionais podem estar incluídos em vacinas co-administradas e/ou de combinação.

Em certas formas de realização, vacinas contra BHV-1 co-administradas e/ou de combinação podem incluir imunógenos adicionais escolhidos a partir de qualquer combinação de ou de cada um dos grupos de citocinas bacterianas, virais, parasíticas, e imunomoduladoras acima. Em outras formas de realização, a vacina co-administrada e/ou de combinação pode incluir apenas um imunógeno adicional de um dos grupos acima. Em ainda outras formas de realização, é entendido que vacinas co-administradas e/ou de combinação podem incluir qualquer número de combinações múltiplas de imunógenos adicionais tirados dos grupos acima. Como um exemplo, uma vacina de combinação pode consistir de imunógenos de BHV-1 modificado, BVDV Tipo I e Tipo II, PI3, e BRSV. Em uma forma de realização, será usada uma vacina de combinação contendo antígenos de BHV-1 modificado, BVD I & II, L. Pomona, Lepto hardjo-bovis, *Vibrio*, e *Trichomonas*. Esta vacina pode ser particularmente útil em vacas de corte de

mais do que um ano de idade. Esta vacina exemplar pode ser usada em fêmeas prenhes para a prevenção de infecção fetal devido a BVD I & II, a prevenção de aborto por BHV-1, prevenção de morte embrionária precoce devido a *Vibrio* e *L. hardjo bovis*, e prevenção de infecção por *Trichomonas*.

- 5 Em outra forma de realização, uma vacina de combinação contendo antígenos contra BHV-1 modificado, BVD I & II, *L. Pomona*, *Lepto hardjo-bovis*, *Vibrio*, e *Neospora* é prevista. Esta vacina pode ser particularmente adequada para vacas leiteiras de mais do que um ano de idade. Em ainda outra forma de realização, adequada para bezerros de um a seis meses de idade, a vacina de
- 10 combinação pode conter antígenos de BHV-1 modificado, BVD I & II, BRSV, *M. haemolytica*, *H. somnus*, *Mycoplasma bovis*, *L. pomona*, e *Lepto hardjo-bovis*. Em algumas formas de realização, bezerros mais jovens do que um mês de idade, mas mais velhos do que um dia de idade serão vacinados. Para bezerros entre as idades de seis a doze meses, uma vacina de combinação
- 15 exemplar pode conter antígenos contra BHV-1 modificado, BVD I & II, *M. haemolytica*, *H. somnus*, *Mycoplasma bovis*, *L. pomona*, e *Lepto hardjo-bovis*.

- Vacinas co-administradas exemplares incluem aquelas com imunógenos adicionais para um ou mais dos antígenos clostridiais,
- 20 *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Fusobacterium necrophorum*, *E.coli* O157:H7 e *Salmonella enterica*. Em certas formas de realização, a vacina co-administrada será uma contra apenas bacterina clostridial. Em outras formas de realização, a vacina co-administrada será contra apenas bacterina de *Histophilus somni*, bacterina de
- 25 *Fusobacterium necrophorum*, ou bacterina de *Salmonella dublin-typhimurium*.

Conforme é entendido por alguém de verso na arte, as únicas delimitações em vacinas co-administradas e/ou de combinação são que os componentes individuais possam ser co-administrados ou administrados como

uma vacina de combinação para atingir o resultado desejado de combater imunossupressão causada por BHV-1. Em cada uma das vacinas contempladas pela presente invenção, também é entendido que qualquer dos componentes veterinários aceitáveis, incluindo, mas não limitado a, adjuvantes, diluentes, solventes, etc., descritos neste lugar, também podem ser incorporados na vacina co-administrada e/ou de combinação.

É entendido que em certas formas de realização, mesmo que vacinas co-administradas e/ou de combinação possam não produzir a mesma imunogenicidade que vacinas individuais, a vacina co-administrada ou de combinação ainda pode ser preferida. Em muitas instâncias, é vantajoso administrar uma vacina de combinação ao invés de administrar diversas vacinas diferentes, pois vacinas de combinação comumente reduz custos, tanto em termos de trabalho como materiais. Além disso, vacinas de combinação ocupam menos espaço, tornando-as mais fáceis para transporte e armazenamento.

Muitos protocolos para administrar as composições de vacina da presente invenção a animais hospedeiros estão dentro do verso da arte, incluindo oral, intranasal, tópica, transdérmica, e parenteral. Em certas formas de realização, a via de administração é intranasalmente ou parenteralmente, particularmente intramuscularmente. Em certas formas de realização, as formulações serão particularmente adaptadas para injeção intramuscular, pois injeção intravenosa pode não ser prática para aplicação em larga escala a animais domésticos. Contudo, outras vias de administração, tal como subcutaneamente ou intradermicamente são previstas, pois pode ser desfavorável administrar intramuscularmente em hospedeiros designados para composição de alimentos. Alternativamente, as vacinas podem ser dadas oralmente e as subunidades formuladas com um veículo oral farmacêuticamente aceitável. Nestas formas de realização, as vacinas da presente invenção podem ser administradas oralmente para produzir

imunidade de mucosa, assim como intramuscularmente para imunidade sistêmica.

Para instilação intranasal, animais hospedeiros podem ser inoculados com aproximadamente 10^2 a 10^8 TCID₅₀ das respectivas
5 linhagens modificadas de vacinas vivas. Para vacinação IM, a vacina pode ser injetada no flanco (massa do músculo caudal) ou no pescoço (músculo braquiocefálico) usando 10^2 a 10^8 TCID₅₀ do vírus. Para administração subcutânea, animais hospedeiros podem ser inoculados com aproximadamente 10^2 a 10^8 TCID₅₀ das respectivas linhagens modificadas de
10 vacinas vivas. Em muitas formas de realização, vacinas irão incluir pelo menos $102,5$ TCID₅₀ de vírus por dose. Em certas formas de realização, a vacinação pode conter um volume de dose de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 5 ml. As vias de vacinação fornecidas acima são exemplares apenas, e quaisquer meios adequados conhecidos na arte podem
15 ser usados na prática da presente invenção.

A concentração do(s) antígeno(s) na composição de vacina é selecionada de forma que uma dose efetiva seja apresentada no hospedeiro para produzir imunidade mediada por células ou anticorpos aos epítopos neutralizantes de polipeptídeos. Dentro de amplos limites, não se acredita que
20 a dosagem seja crítica.

Embora opcional, em certas formas de realização, uma segunda imunização de reforço será administrada ao animal hospedeiro diversas semanas a diversos meses depois da imunização inicial. Em formas de realização específicas, tal reforço pode ser administrado tão tarde quanto
25 um ano depois da imunização inicial. Para garantir altos níveis constantes de proteção contra doença, pode ser de grande auxílio re-administrar uma imunização de reforço aos animais hospedeiros em uma base periódica.

Esta base periódica pode variar de mensalmente, a cada seis meses, a anualmente, a múltiplos anos. Em certas formas de realização, as

composições não serão usadas em animais prenhes ou lactantes. Em certas outras formas de realização, as composições não serão usadas em indivíduos que estão dentro de menos do que uma semana, uma semana, duas semanas, três semanas, ou quatro semanas de procriação. Em ainda outras formas de
5 realização, a vacina não será usada em animais condenados ao abate dentro de 28 dias ou menos.

Sem pretensão de ser limitante, animais de corte podem ser comumente vacinados em marcação (ou pré-arrumação para pastagem de verão), momento de desmama, em momento de liberação para uma instalação
10 de recria (pastagem de trigo de inverno), e na chegada em um curral de engorda. Para vacas, desmama de outono ou monitoramento de gestação também são momentos comuns para vacinação. Para gado leiteiro, um momento comum para vacinação é o momento de secagem.

As presentes composições e vacinas modificadas podem ser
15 usadas como marcadores. Análise de amostras do animal hospedeiro pode ser usada para determinar se o animal hospedeiro está protegido pela vacina da invenção e não foi exposto a uma linhagem tipo selvagem de BHV-1. Em certas formas de realização, a invenção inclui um método para determinar a ausência ou presença e/ou concentração de anticorpos dirigidos contra genes
20 de BHV-1 e genes de BHV-1 modificados em uma amostra empregando um imunoensaio, o imunoensaio caracterizado por usar imunógenos de BHV-1 modificado reativos com anticorpos para BHV-1 como um reagente no imunoensaio, através do qual é formado um complexo dos anticorpos para BHV-1 e o imunógeno de BHV-1 modificado, e determinar a ausência ou
25 presença e/ou concentração de um tal complexo para determinar se anticorpos dirigidos contra tal BHV-1 modificado estão presentes em uma amostra e, se presentes, fornecer um meio de determinar sua concentração. Por exemplo, os imunógenos modificados podem ser usados como reagentes substratos em imunoensaios para identificar anticorpos para estas proteínas BHV-1 em uma

amostra, e.g., sangue, de um animal hospedeiro como um meio de determinar se o animal hospedeiro está infectado com BHV-1 e para determinar a concentração dos anticorpos na amostra. Imunógenos de BHV-1 podem ser misturados com ou ligados a uma matriz (suporte) adequada ou carreador, tal como uma partícula de látex, placa de microtitulação de plástico ou um material similar. Eles também podem ser conjugados com uma enzima, corante, radioisótopo ou material similar, dependendo de qual método imunológico é usado. Imunoensaios empregando imunógenos modificados de BHV-1 dentro da presente invenção incluem, mas não são limitados a, radioimunoensaio, imunoensaio de competição, imunoprecipitação, ensaio imunoenzimático indireto, ensaio de imunofluorescência e os semelhantes. Em muitas formas de realização, detecção preferivelmente é conveniente, rápida, sensível e específica.

São descritos abaixo exemplos da presente invenção que são fornecidos apenas para propósitos ilustrativos. Os exemplos não são pretendidos para limitar o escopo da presente invenção de qualquer maneira, uma vez que numerosas formas de realização dentro do escopo das reivindicações estarão perceptíveis para aqueles de habitual verso na arte à luz da presente descrição. Aqueles de habitual verso na arte presumivelmente são familiares com (ou têm pronto acesso a) as referências citadas neste pedido, e as descrições destas são incorporadas por referência neste lugar.

Exemplos

Os exemplos seguintes têm o propósito de ilustrar uma forma de realização e não devem ser interpretados como uma limitação.

Exemplo 1. Infecção por BHV-1 causou regulação descendente de moléculas de MHC classe I em células infectadas

Para avaliar o efeito de infecção por BHV-1 em expressão de MHC classe I na superfície de células infectadas, células de rim bovino MDBK (Madin-Darby bovine kidney) foram infectadas com linhagem GL756

de BHV-1 em uma multiplicidade de infecção (moi) de 10, ou não infectadas (mock infected). Em 16-24 horas após infecção, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal PT85A (VMRD, Inc.; Pullman, Washington, Estados Unidos da América), específico para moléculas de MHC classe I.

5 Células de controle negativo foram coradas com um anticorpo controle isotípico não reativo (MM605; Dr. Subramaniam Srikumaran; Washington State University). Os anticorpos primários foram ou marcados com Zenon® Mouse IgG Labeling Kits (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América) ou

10 anticorpos secundários marcados fluorescentemente foram usados. As células foram então examinadas para imunofluorescência de superfície por citometria de fluxo.

Na **Figura 10**, os dados mostram que células infectadas com BHV-1 expressaram moléculas de MHC classe I na superfície celular, mas os

15 níveis de expressão foram diminuídos ou regulados de forma descendente se comparados com células não infectadas (mock infected). Portanto, BHV-1 tipo selvagem diminuiu expressão de moléculas de MHC classe I na superfície de células infectadas.

Exemplo 2. Administração de BHV-1 causou uma resposta imune suprimida a um imunógeno co-administrado adicional em bezerros

20

Para avaliar o efeito de BHV-1 na resposta imune a um imunógeno não BHV-1 co-administrado a bezerros, o seguinte estudo foi realizado. Bezerros soro-negativos para BHV-1 (cruzamento Hereford-Angus ou Holandês-Leiteiro), de 3-6 meses de idade, foram usados. Os bezerros

25 também tiveram quantidades mínimas de títulos de LkT conforme medido por ELISA. Bezerros foram subcutaneamente administrados no pescoço ou com LkT recombinante de *Mannheimia haemolytica* apenas (100 µg em 2 ml contendo adjuvante Emulsigen D), BHV-1 apenas (aproximadamente 10^{5.5} linhagem GL756 de BHV-1 em 2 ml) ou LkT e BHV-1 (BHV-1 e LkT co-

administrados no pescoço aproximadamente 5 cm distante) em dia 0. LkT foi administrada novamente em dia 21 aos grupos de bezerros de LkT apenas e BHV-1 mais LkT. Sangue foi extraído e soros coletados antes de administração (dia 0) e em dias 4, 10, 14, 21, 28 e 35. Anticorpos séricos reativos com LkT foram medidos para cada momento usando ELISA. Níveis de anticorpos nos vários momentos foram normalizados para os níveis para dia 4, que receberam valores de 1.

Os resultados em Figura 11 mostraram que níveis de anticorpos específicos para LkT nos grupos de LkT apenas e BHV-1 mais LkT geralmente aumentaram durante o percurso de tempo do estudo e com pico em 28-35 dias. Em todos os momentos, os níveis de anticorpos específicos para LkT presentes nos soros de bezerros administrados com LkT apenas foram maiores do que os níveis de anticorpos específicos para LkT presentes nos soros dos bezerros administrados com BHV-1 mais LkT. Diferenças significativas entre os grupos de LkT apenas e BHV-1 mais LkT foram vistas em dias 10, 14, 21 e 28. Estes dados indicaram que o BHV-1 co-administrado suprimiu a resposta imune a um imunógeno co-administrado nos bezerros se comparado com bezerros que foram administrados com o imunógeno apenas.

Exemplo 3. Administração de BHV-1 causou uma proporção suprimida de subtipos IgG1 para IgG2 para IgG específica para um imunógeno co-administrado em bezerros

Para avaliar o efeito de BHV-1 em subtipos de IgG para IgG reativa com um imunógeno não BHV-1 co-administrado com BHV-1, as amostras de soro dos grupos administrados LkT apenas e BHV-1 mais LkT no estudo descrito no exemplo 2 foram usadas. Estas amostras de soro foram testadas para subtipos IgG1 e IgG2 específicos para LkT usando placas de ELISA cobertas com LkT e anticorpos específicos de subtipo IgG.

Os resultados em Figura 12 mostraram que a proporção de IgG1/IgG2 específica para LkT para soros de bezerros administrados com LkT e BHV-1 foi reduzida comparado com bezerros administrados com LkT apenas. Estes dados indicaram que BHV-1 pode alterar (diminuir) a proporção de subtipos IgG1/IgG2 para um imunógeno administrado junto com BHV-1.

Exemplo 4. Administração de BHV-1 causou uma resposta de memória a antígeno suprimida para um imunógeno co-administrado em bezerros

Para examinar o efeito de BHV-1 em memória ao antígeno para um imunógeno não BHV-1 co-administrado com BHV-1 (conforme medido por produção de IL-2), sangue foi extraído dos bezerros usados no estudo descrito no exemplo 2 em dia 23. O sangue foi diluído e antígeno LkT foi adicionado às amostras. Níveis de IL-2 foram subsequentelemente medidos nas amostras usando ELISA.

Os resultados em Figura 13 mostraram que produção de IL-2 em resposta a antígeno de memória foi suprimida em amostras de bezerros administrados com BHV-1 mais LkT, se comparado com bezerros administrados com LkT apenas. Estes dados indicaram que BHV-1 pode suprimir uma resposta de memória a um imunógeno administrado com BHV-1.

Exemplo 5. Construção de mutantes de deleção de BHV-1 usando construções de deleção-recombinação em células de mamíferos

Mutantes de deleção de BHV-1 GL756 para UL49.5, clones A1, A5, B7 e B8, foram gerados usando construções de deleção-recombinação (DRC) conforme mostrado em **Figura 14A** e em SEQ ID NO: 17 em **Figura 14**. Proteína verde fluorescente melhorada (EGFP) foi inserida nas construções para possibilitar isolamento de vírus recombinantes. DRC foram transfectadas em células MDBK e as células foram subsequentelemente infectadas com BHV-1 GL756. Sobrenadante de cultura de células infectadas

foi diluído e emplacado em novas células MDBK. Placas virais exibindo fluorescência verde foram isoladas, purificadas em placa e identidade confirmada por uma triagem recombinante por reação em cadeia da polimerase (PCR). A triagem por PCR usou iniciadores flanqueando o sítio de deleção/recombinação. Tamanho esperado de produto de PCR foi de 2072 pares de bases (bp) para os mutantes e 657 bp para o vírus tipo selvagem/parental. **Figura 16** mostra o padrão esperado para os mutantes A1 e B8.

Lisados de cultura de células infectadas foram usados para triar BHV-1 GL756 Δ UL49.5 A1 e B8 por SDS- Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e Western blot para confirmar deleção do gene visado. Tamanho esperado do produto protéico do gene UL49.5 é de aproximadamente 15 kDa em vírus ancestral. **Figura 18** mostra que os clones A1, A5, B7 e B8 não expressaram o produto protéico do gene UL 49.5. Células não infectadas (mock infected) foram usadas como o controle.

Mutantes de deleção de BHV-1 GL756 para Us4, clones 1 e 2, foram gerados usando construções de deleção-recombinação (DRC) conforme mostrado em **Figura 14B** e em SEQ ID NO: 18 em **Figura 14**. EGFP foi inserida nas construções para possibilitar isolamento de vírus recombinantes. DRC foram transfectadas em células MDBK e as células foram subsequëntemente infectadas com BHV-1 GL756. Sobrenadante de cultura de células infectadas foi diluído e emplacado em novas células MDBK. Placas virais exibindo fluorescência verde foram isoladas, purificadas em placa e identidade confirmada por triagem por PCR. A triagem por PCR usou iniciadores flanqueando o sítio de deleção/recombinação. Tamanho esperado de produto de PCR foi 2072 bp para os mutantes e 1757 bp para o vírus tipo selvagem/parental. **Figura 17** mostra o padrão esperado para os mutantes 1 e 2.

Lisados de cultura de células infectadas foram usados para triar BHV-1 GL75ΔUs4- 1 e 2 por SDS-PAGE e Western blot para confirmar deleção do gene visado. Tamanho esperado do produto protéico do gene Us4 é de aproximadamente 40 kDa em vírus ancestral. **Figura 19** mostra que os clones 1 e 2 não expressaram o produto protéico do gene Us4. Células não infectadas (mock infected) foram usadas como o controle.

Exemplo 6. Construção de mutantes de deleção de BHV-1 usando construções de cromossomos artificiais bacterianos em células de mamíferos

Um procedimento usando construções de cromossomos artificiais bacterianos (BAC) foi usado para gerar mutantes de BHV-1 usados em alguns estudos. O procedimento foi descrito em Tischer et al. (2006) BioTechniques 20:191. Em geral, o procedimento usa plasmídeos de transferência recombinantes que contêm a mutação desejada para ser colocada em BHV-1 que é flanqueada por seqüências de BHV-1 tipo selvagem. Os plasmídeos de transferência recombinantes continham o gene codificando proteína verde fluorescente (GFP) e também uma origem de replicação bacteriana. Os plasmídeos de transferência recombinantes foram transfectados em células MDBK e subsequente infectados com BHV-1 GL756. Sobrenadante de cultura de células infectadas foi diluído e emplacado em novas células MDBK. Placas virais exibindo fluorescência verde foram isoladas, purificadas em placa e o DNA viral foi eletroporado em células de *E. coli*. DNA dos clones transformados de *E. coli* foi triado por digestões de restrição e Southern blotting para obter os mutantes desejados de BHV-1. Seqüências indesejadas de GFP e origem de replicação bacteriana foram então removidas dos clones mutantes de BHV-1 usando mutagenese “en passant”, como descrito na referência Tischer et al.. Este método usa inserção catalisada por Red para criar uma seqüência que é excisada, junto com as seqüências de GFP e origem bacteriana, em uma subsequente etapa catalisada por Red. Os

clones de BHV-1 resultantes foram transfectadas em células MDBK e estoques de vírus mutantes infecciosos foram obtidos.

Cinco diferentes vírus BHV-1 mutantes ou modificados foram produzidos usando os procedimentos acima. Todos os vírus BHV-1 mutantes foram feitos na linhagem ancestral GL756. Um vírus BHV-1 mutante continha uma modificação no gene UL49.5. A sequência de DNA do UL49.5 mutante é mostrada como SEQ ID NO: 23 em **Figura 9**. Os nucleotídeos sublinhados na sequência de DNA ilustrada em **Figura 9** indicam nucleotídeos que foram inseridos na sequência de UL49.5 de GL756 tipo selvagem. Os nucleotídeos sublinhados adicionam dois códons de parada de tradução em quadro com a sequência de codificação. As proteínas traduzidas a partir deste gene são truncadas.

Outro vírus BHV-1 mutante continha uma deleção completa da sequência de codificação de UL41. Um terceiro vírus BHV-1 mutante continha ambas as mutações já descritas de UL49.5 e UL41. Portanto, este BHV-1 particular continha modificações em dois genes, UL49.5 e UL41. **Figura 20** ilustra as localizações das regiões de genes UL49.5 e UL41 dentro do genoma de BHV-1, assim como as modificações descritas acima.

Um quarto vírus BHV-1 mutante continha uma deleção parcial da sequência de codificação de Us4, mas também uma inserção de uma nova sequência na localização da deleção. As sequências de DNA (SEQ ID NO: 11) e de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) do gene Us4 da linhagem Cooper de BHV-1 são ilustradas em **Figura 6** e são as mesmas que do gene Us4 da linhagem GL756. Os nucleotídeos sublinhados ilustrados na sequência de DNA de **Figura 6** são os nucleotídeos que foram deletados no Us4 mutante de BHV-1. Deleção destes nucleotídeos resultou em deleção dos aminoácidos sublinhados na sequência de aminoácidos de **Figura 6**. A deleção foi uma deleção em quadro de leitura. Portanto, a sequência de aminoácidos

codificada por nucleotídeos após a deleção é a mesma que aquela codificada por nucleotídeos da sequência de Us4 tipo selvagem.

Em adição a estas deleções, o gene Us4 mutante também tinha uma inserção de 24 nucleotídeos (GGATCTGGTAGTGGCTCCGGGAGC; SEQ ID NO: 21) na região onde a deleção descrita acima foi localizada. Estes 24 nucleotídeos codificaram a sequência de aminoácidos Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser (SEQ ID NO: 22). Pelo fato de a inserção ter sido uma deleção em quadro de leitura, a proteína codificada pelo gene Us4 modificado continha os aminoácidos Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser no lugar dos aminoácidos sublinhados mostrados em SEQ ID NO: 12 ilustrada em **Figura 6**. **Figura 21** ilustra a localização da região de gene Us4 dentro do genoma de BHV-1, assim como a modificação.

Um quinto vírus BHV-1 mutante continha uma deleção completa da sequência de codificação de Circ. **Figura 22** ilustra a localização da região de gene Circ dentro do genoma de BHV-1, assim como a modificação.

Exemplo 7. Crescimento de vírus BHV-1 contendo modificações

Para examinar o efeito de modificações dentro de genes de interesse em propriedades de crescimento do vírus BHV-1, células MDBK foram infectadas com os vírus descritos no exemplo 6, e título de vírus foi determinado em vários momentos posteriormente. Vírus examinados incluíram BHV-1 com nenhuma das modificações descritas (GL756; BHV-1 WT), com a modificação em UL49.5 (BHV-1 Δ UL49.5), dois diferentes clones de BHV-1 com a modificação em UL41 (BHV-1 Δ UL41:1606 e BHV-1 Δ UL41:1607), dois diferentes clones de BHV-1 com as modificações tanto em UL49.5 como UL41 (BHV-1 Δ UL41/UL49.5:1614 e BHV-1 Δ UL41/UL49.5:1616), com a modificação em Circ (BHV-1 Δ Circ:1697), e com a modificação em Us4 (BHV-1 Δ Us4gG:1698).

Os resultados em Figura 23 mostram que todos os vírus BHV-1 testados com modificações tiveram cinética de crescimento similar ao BHV-1 sem nenhuma modificação. Estes dados indicaram que modificações nos genes testados não afetaram as propriedades de crescimento do vírus.

5 Exemplo 8. Restauração de expressão de MHC classe I em células infectadas por infecção com vírus BHV-1 contendo modificações

Para avaliar o efeito de vírus BHV-1 contendo modificações em expressão de MHC classe I na superfície de células infectadas, células MDBK foram infectadas com os vírus BHV-1 modificados descritos no exemplo 5 (dados para estes experimentos mostrados em Figura 24) ou os vírus BHV-1 modificados descritos no exemplo 6 (dados para estes experimentos mostrados em Figuras 25-31). Para os experimentos onde expressão de MHC classe I foi avaliada, como descrito neste exemplo, células MDBK foram infectadas pelos vírus em um moi de 10, ou não foram infectadas (mock infected). Em 16-24 horas após infecção, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal PT85A (VMRD, Inc.; Pullman, Washington, Estados Unidos da América), que é específico para moléculas de MHC classe I. Células de controle negativo foram coradas com um anticorpo de controle isotípico não reativo (MM605; Dr. Subramaniam Srikumaran; Washington State University). Os anticorpos primários foram ou marcados com Zenon® Mouse IgG Labeling Kits (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América) ou anticorpos secundários marcados fluorescentemente foram usados. As células foram então analisadas para fluorescência de superfície por citometria de fluxo.

Em Figura 24, os dados mostraram que células infectadas com BHV-1ΔUL49.5 A1 ou B8 (como descrito no exemplo 5) tiveram expressão de MHC classe I parcialmente revertida ou restaurada na superfície celular se comparadas com células infectadas com BHV-1 não contendo modificação no

gene UL49.5 (BHV-1 GL756). Em **Figura 25**, os dados mostraram que células infectadas com BHV-1GL756 Δ UL41- Δ UL49.5, contendo modificações tanto em UL49.5 e UL41 (como descrito no exemplo 6) tiveram expressão de MHC classe I completamente revertida ou restaurada na superfície celular se comparadas com células infectadas com BHV-1 não contendo as modificações (BHV-1 GL756). Estes dados indicaram que os vírus BHV-1 contendo estas modificações não causaram regulação descendente de expressão de molécula de MHC classe I, ou pelo menos não causaram regulação descendente de MHC classe I no grau em que vírus BHV-1 não modificados causaram regulação descendente de expressão de MHC classe I.

Em **Figura 26**, os dados mostraram que células infectadas com BHV-1 GL756 Δ UL49.5, contendo modificação em UL49.5 (como descrito no exemplo 6), e com BHV-1 GL756 Δ UL41, contendo modificação em UL41 (como descrito no exemplo 6), tiveram expressão de MHC classe I parcialmente revertida ou restaurada na superfície de células infectadas se comparadas com células infectadas com BHV-1 GL756 que não continha modificações. Os dados também mostraram que células infectadas com BHV-1 GL756 Δ UL49.5- Δ UL41, contendo modificações em UL49.5 e UL41, expressão de MHC classe I completamente revertida ou restaurada na superfície celular de células infectadas se comparadas com células infectadas com BHV-1 GL756 que não continha as modificações.

Em adição a análise de citometria de fluxo de expressão em superfície de célula de MHC classe I, lisados foram preparados a partir de células infectadas como descrito acima e foram analisados por SDS-PAGE e Western blotting usando anticorpo reativo com moléculas de MHC classe I. **Figura 27** (topo) mostra esta análise para células infectadas com vírus BHV-1 não contendo modificação (GL756), vírus BHV-1 contendo modificação em UL49.5 (GL756 Δ UL49.5), dois clones de vírus BHV-1 contendo

modificação em UL41 (GL756 Δ UL41), dois clones de vírus BHV-1 contendo modificações tanto em UL49.5 como UL41 (GL756 Δ UL49.5- Δ UL41), vírus BHV-1 contendo modificação em Circ (GL756 Δ Circ), e vírus BHV-1 contendo modificação em Us4 (GL756 Δ Us4). Estes são os vírus BHV-1 mutantes descritos no exemplo 6. **Figura 27** (fundo) mostra quantificação densitométrica dos Western blots.

Os dados em **Figura 27** mostraram que, para vírus BHV-1 contendo uma modificação em um único gene, BHV-1 com UL41 modificado teve o maior efeito em restauração (menor efeito em supressão) de expressão de MHC classe I se comparado com BHV-1 não contendo uma modificação. Os dados também mostraram que BHV-1 contendo modificações tanto em UL49.5 como UL41 restaurou completamente (não teve nenhum efeito em) expressão de MHC classe I se comparado com BHV-1 não contendo uma modificação. Os dados mostraram que o BHV-1 modificado, GL756 Δ UL49.5- Δ UL41, pode ter até expressão de MHC classe I acentuada se comparado com células não infectadas (mock infected).

Exemplo 9. Regulação descendente de BHV-1 de moléculas de MHC classe II em células infectadas e restauração de expressão de classe II por vírus BHV-1 contendo modificações

Para avaliar o efeito de vírus BHV-1 e vírus BHV-1 contendo modificações em expressão de moléculas de MHC classe II na superfície de células infectadas, células MDBK foram infectadas com os vírus BHV-1 modificados descritos no exemplo 6. Células foram infectadas com os vírus em um moi de 0,1, ou não foram infectadas (mock infected), incubadas a 4°C por 30 mins, então a 37°C por 1 hora seguido por tratamento com IFN- γ . Em 72 horas após infecção, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal CAT82A, específico para moléculas de MHC classe II (VMRD). O anticorpo CAT82A foi ou marcado com Zenon® Mouse IgG Labeling Kits (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados

Unidos da América) ou anticorpos secundários marcados fluorescentemente foram usados. Células de controle negativo não foram coradas. As células foram então analisadas para fluorescência por citometria de fluxo.

Os dados em Figura 28 mostraram expressão relativa de MHC classe II em células infectadas com vírus se comparadas com células não infectadas (mock infected) (células não infectadas (mock infected) indicadas como 100% de expressão). Os dados em Figura 29 mostraram restauração percentual de expressão de MHC classe II em células pelos vírus contendo modificações se comparadas com células infectadas com vírus não contendo genes modificados (níveis de MHC classe II em células infectadas com BHV-1 GL756 receberam valor de 0; células não infectadas (mock infected) tiveram valor de 100). Os dados mostraram que BHV-1 não modificado causa supressão de expressão de molécula de MHC classe II na superfície de células infectadas. Os dados mostraram que vírus BHV-1 com modificação em UL49.4, e vírus BHV-1 com modificação em UL41, restauraram parcialmente expressão de MHC classe II (não suprimiram tão significativamente) se comparados com BHV-1 não modificado ou tipo selvagem. Os dados mostraram que vírus BHV-1 com modificações tanto em UL49.5 como UL41 suprimiram expressão de MHC classe II em células infectadas menos do que vírus contendo as modificações simples (maior restauração de MHC classe II se comparado com BHV-1 contendo modificações em genes únicos).

Exemplo 10. Restauração e acentuação de proporção de subtipos IgG1/IgG2 em bezerros para IgG específica para um imunógeno co-administrado por vírus BHV-1 contendo modificações

Os dados apresentados no exemplo 3 e Figura 12 indicaram que BHV-1 diminuiu a proporção de subtipos IgG1/IgG2 para IgG produzida em resposta a um imunógeno que é administrado com BHV-1, se comparada com a proporção de IgG1/IgG2 para IgG produzida em resposta a um imunógeno que foi administrado sozinho. Para avaliar o efeito de vírus BHV-

1 contendo modificações na proporção de IgG1/IgG2 para IgG reativa a um
 imunógeno administrado com o vírus, bezerros BHV-1 soro-negativos
 (cruzamento Hereford-Angus ou Holandês-Leiteiro), de 3-6 meses de idade,
 foram usados. Os bezerros também tiveram quantidades mínimas de títulos de
 5 LkT conforme medido por ELISA. Bezerros foram subcutaneamente
 administrados no pescoço ou com LkT recombinante de *Mannheimia*
haemolytica apenas (100 µg em 2 ml contendo adjuvante Emulsigen D), LkT
 e BHV-1 GL756 (aproximadamente $10^{5.5}$ linhagem GL756 de BHV-1 em 2
 ml), LkT e BHV-1 contendo modificações tanto em UL49.5 como UL41
 10 (GL756 Δ UL49.5- Δ UL41 como descrito no exemplo 6), ou LkT e BHV-1
 contendo uma modificação em Us4 (GL756 Δ Us4 como descrito no exemplo
 6). BHV-1, ou BHV-1 modificado, e LkT foram co-administrados
 aproximadamente 5 cm distante em dia 0. LkT foi novamente administrada
 aos bezerros sozinha (sem vírus) em dia 21. Sangue foi extraído e soros
 15 coletados em dias 14, 21, 28 e 35. Anticorpos séricos IgG1 e IgG2 reativos
 com LkT foram medidos para cada momento usando placas de ELISA
 cobertas com LkT e anticorpos específicos de subtipo IgG.

Os resultados em Figura 30 mostraram que administração de
 BHV-1 tipo selvagem (GL756) junto com LkT diminuiu a proporção de
 20 IgG1/IgG2 específica para LkT se comparada com a proporção de IgG1/IgG2
 específica para LkT obtida depois de administração de LkT apenas (veja
 momentos de dia 28 e 35). Estes resultados são os mesmos que aqueles
 discutidos no exemplo 3 e ilustrados em **Figura 12**. Os dados em Figura 30
 também mostraram que esta supressão de IgG1/IgG2 não foi observada
 25 quando LkT foi administrada com vírus BHV-1 que tinham modificações
 tanto em UL49.5 como UL41, ou vírus BHV-1 que tinham modificações em
 Us4. Os dados mostraram que, em contraste com a supressão da proporção de
 IgG1/IgG2 específica para LkT vista depois de administração de LkT com
 BHV-1 tipo selvagem (se comparada com LkT apenas), a proporção de

IgG1/IgG2 específica para LkT vista depois de administração de LkT com qualquer dos dois vírus BHV-1 modificados foi acentuada (maior do que a IgG1/IgG2 vista depois de administração de LkT apenas). Estes dados indicaram que os vírus BHV-1 modificados podem reverter a supressão da proporção IgG1/IgG2 para anticorpos específicos para um imunógeno co-administrado com BHV-1 tipo selvagem. Estes dados também indicaram que os vírus BHV-1 modificados podem até acentuar a proporção IgG1/IgG2 para anticorpos específicos para um imunógeno co-administrado, se comparada com a proporção IgG1/IgG2 para os anticorpos produzidos depois de administração do imunógeno apenas (sem BHV-1 tipo selvagem).

Exemplo 11. Restauração de resposta de memória ao antígeno para um imunógeno co-administrado em bezerros por vírus BHV-1 contendo modificações

Os dados apresentados no exemplo 4 e **Figura 14** indicaram que BHV-1 pode suprimir uma resposta de memória a um imunógeno co-administrado com BHV-1 tipo selvagem, se comparada com a resposta de memória ao imunógeno administrado sozinho. Para avaliar o efeito de vírus BHV-1 contendo modificações na resposta de memória a um imunógeno administrado com o vírus, conforme medido por produção de IL-2, sangue foi extraído dos bezerros usados no estudo descrito no exemplo 10 em dia 23. O sangue foi diluído e antígeno LkT foi adicionado às amostras. Níveis de IL-2 foram subsequentelemente medidos nas amostras usando ELISA.

Os resultados ilustrados em **Figura 31** mostraram que memória ao antígeno, conforme medido por produção de IL-2 a partir de células no sangue, foi aumentada quando LkT foi administrada a bezerros com vírus BHV-1 contendo modificações tanto em UL49.5 como UL41 (GL756ΔUL49.5-UL41 como descrito no exemplo 6) se comparado com LkT administrada a bezerros com BHV-1 que não continham as modificações (GL756). Os dados mostraram que memória ao antígeno foi adicionalmente

aumentada quando LkT foi administrada a bezerros com BHV-1 contendo uma modificação em Us4 (GL756ΔUs4 como descrito no exemplo 6).

Embora composições, métodos exemplares, e assim por diante tenham sido ilustrados por descrição, não é a intenção dos requerentes restringir ou de qualquer forma limitar o escopo do pedido. Naturalmente, não é possível descrever cada combinação concebível de componentes ou metodologias para propósitos de descrever as composições, métodos, e assim por diante descritos neste lugar. Vantagens e modificações adicionais irão aparecer prontamente para aqueles versados na arte. Portanto, a invenção não é limitada aos detalhes e exemplos específicos mostrados e descritos. Assim, este pedido tem a intenção de abarcar alterações, modificações, e variações que caem dentro do escopo do pedido. Além disso, a descrição precedente não é pretendida para limitar o escopo da invenção. De preferência, o escopo da invenção deve ser determinado pelas reivindicações anexas e seus equivalentes. Na medida em que o termo “ou” é empregado na descrição detalhada ou reivindicações (e.g., A ou B) é pretendido para significar “A ou B ou ambos”. Quando os requerentes pretendem indicar “apenas A ou B mas não ambos” então o termo “apenas A ou B mas não ambos” será empregado. Assim, uso do termo “ou” neste lugar é o inclusivo, e não o exclusivo.

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus do herpes bovino-1 vivo caracterizado pelo fato de que tem modificações do UL49.5 e pelo menos um gene adicional codificando proteína que pode suprimir o sistema imune de um hospedeiro infectado, onde células infectadas com o BHV-1 que tem as modificações tendo pelo menos parcialmente restaurada expressão classe I MHC como comparada a células infectadas com um BHV-1 que não tem as modificações.

2. BHV-1 vivo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um gene adicional é UL41 ou Us4.

3. BHV-1 vivo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que células infectadas com BHV-1 que tem as modificações tendo parcialmente restaurada expressão classe II MHC como comparada a células infectadas com um BHV-1 que não tem as modificações.

4. BHV-1 vivo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um gene adicional é UL41.

5. BHV-1 vivo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o conhecimento do BHV-1 inclui linhagem Cooper ou linhagem GL756.

6. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um BHV-1 vivo que tem modificações de UL49.5 e pelo menos um gene adicional codificando proteína que pode afetar uma resposta imunológica de hospedeiro a um imunógeno; e

b) um imunigene adicional,

em que administração a seguir da composição a um hospedeiro, uma razão de IgG1/IgG2 para IgG específico para o imunógeno adicional no hospedeiro é maior que a razão de IgG1/IgG2 para IgG específico para imunógeno adicional em um hospedeiro administrado uma composição de BHV-1 vivo que não tem as modificações e o imunógeno adicional.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o pelo menos um gene adicional é UL41 ou Us4.

8. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a administração seguinte da composição do BHV-1 vivo que
5 tem as modificações e o imunógeno adicional ao hospedeiro, amostras de célula obtidas do sangue do hospedeiro e contactado com o imunógeno adicional tem maiores níveis de interleucina-2 (IL-2) como comparado a níveis de IL-2 de amostras de células obtidas do sangue do hospedeiro administrado a composição de BHV-1 vivo que não tem as modificações e o
10 imunógeno adicional, e contactar com o imunógeno adicional.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o pelo menos um gene adicional é UL41.

10. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o imunógeno adicional inclui uma bactéria,
15 viral ou imunógeno parasítico.

11. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o imunógeno adicional inclui imunógeno do Vírus Da diarreia viral Bovina (BVDV) I, BVDV II, BVDV III, Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV), Vírus Parainfluenza 3 (PI3), Rotavírus
20 (BRV), Cornavírus (BCV), Mannheimia haemolytica, Histophilus somni, Mycoplasma bovis, espécies de Leptospira, espécies de Vibrio, espécies de Clostridia, Pasturella multocida, Fusobacterium necrophorum, E. coli O157:H7, Salmonella entérica, Neospora caninum ou espécies de Trichomonas.

25 12. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o imunógeno adicional inclui LkT do Mannheimia haemolytica.

13. Método para produzir uma resposta imunológica em um hospedeiro, caracterizado por compreender administrar ao hospedeiro:

a) um imunógeno outro do que um antígeno do BHV-1 (imunógeno que não é de BHV-1); e

b) um BHV-1 vivo que tem modificações de UL49.5 e pelo menos um gene adicional codificando proteína que pode afetar uma resposta imunológica de hospedeiro a um imunógeno,

em que a seguinte administração da composição da composição do hospedeiro, a razão de IgG1 para IgG2 no hospedeiro para IgG específico para o imunógeno não-BHV-1 é maior que a razão de IgG1 para IgG2 para IgG específico para o imunógeno de não-BHV-1 em um hospedeiro administrado uma composição de imunógeno de não-BHV-1 e BHV-1 vivo que não tem as modificações.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o imunógeno de não-BHV-1 e o BHV-1 vivo são co-administrados ou administrados ao hospedeiro em uma combinação de vacina.

15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que pelo menos um gene adicional é UL41 ou Us4.

16. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a seguinte administração da composição de não-imunógenos BHV-1 e BHV-1 vivo que tem as modificações para o hospedeiro, amostras de célula obtidas do sangue do hospedeiro e contactado com o imunógeno de não-BHV-1 tendo níveis mais altos de interleucina-2 (IL-2) de amostras de células obtidas do sangue do hospedeiro administrado a composição do imunógeno de não-BHV-1 e BHV-1 vivo que não tem as modificações, e contactados com o não-imunógeno BHV-1.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que pelo menos um gene adicional é UL41.

18. BHV-1 vivo caracterizado pelo fato de que tem modificações de UL49.5 e um de UL41 ou Us4, para uso elicitando uma resposta imunológica para BHV-1 e imunógeno de não-BHV-1 em um

hospedeiro ungulado.

19. BHV-1 vivo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que as modificações de um de UL41 ou Us4 é uma modificação de UL41.

5 20. Uso de um vírus do herpes bovino 1 (BHV-1) vivo que tem modificações de UL49.5 e UL41 ou Us4, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de uma composição de vacina para elicitar uma resposta imunológica para BHV-1 e um não-imunógeno BHV-1, pela co-administração do Imunógeno de BHV-1 e não-BHV-1 ou pela administração
10 de um coquetel de combinação de Imunógeno de BHV-1 e não-BHV-1 a um hospedeiro ungulado.

21. BHV-1 vivo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a modificação de um de UL41 ou Us4 é uma modificação de UL41.

UL49.5 de BHV-1 linhagem Cooper

DNA (SEQ ID NO:1)

ATGCCGCGGTCGCGCTCATCGTTGCGGTTGTGGCCGCCGCGCTGTTTGC
CATCGTGGCGCGCGGACCCCTGCTAGACGCGATGCGGCGCGAGGG
GGCAATGGACTTTTGGAGCGCAGGCTGCTACGCGCGCGGGTGCCGCTC
TCGGAGCCACCGCAGGCCCTGGTTGTTTACGTGGCCCTGACCGCGG
TAATGGTCGCCGTGGCCCTGTACGCGTACGGGCTTTGCTTTAGGCTCATG
GGCGCCAGCGGCCCAATAAAAGGAGTCGCGGGGCGGGGCTGA

Aminoácido (SEQ ID NO:2)

MPRSPLIVAVVAALFAIVRGRDPLLDAMRREGAMDFWSAGCYARGVPLS
EPPQALVVFYVALTAVMVAVALYAYGLCFRLMGASGPNKKESRGRG

Figura 1

UL41 de BHV-1 linhagem Cooper**DNA (SEQ ID NO:3)**

ATGGGGCTCTTCAAGCTACTGCGTTACGCCGTACGGCAATCGGCTGGTAAAGCACGACGCCATCACCAAGCCGCCGGCGTGATGACCCCGATCGCGGTCGACCTGTGGAACGTGATGTATAAGCTCCTGTGGAGCGCTTCTGCGGCACGCGCCCCGGCGTAGGAGACGCCGCCGACCGCGCGCTGCTTCTCTCGCTGCTGCGGATGCTGCTCAAGCGCTCCTACTACCCGATCTTTGTAGCGGACCGCGGCATCCACGGGACCGCGCGGCCACGCGGGGTGCCAAGGCCATTGTGGCGCAGACGATGCGCGCGTCTCGGCGGCTCGGGCCGCCCTCGGGCGGCTCGTCAGCGACGATTATACCTCGGAGGACGAGGTGCTGGGCGCGTACGAGTACCCCGTCCCGCACGCGGACGCGGCAGCCGACGACGAGGAGGCAACGGCGGAAGGAATTTGCCGGCGCGGCTCGGCGGGGCCCGCGGGGCCAACGCGGCCCAAGCTGGCACATCGCGTGTGCGTGAGCCTCATCCGCTTTTTGGGCTACGCGTACGTCGACGCCGCTGAGATGGAGGCAGACGACGTCCTGCGCAACCTCTCTCCACACAACACCGTGGCGCACATCTACACGACGGACACGGACATGATCCTATGGGCTGTGACCTGATTTTGGACGCGGCGCGCTTGTTC

Figura 2-1

CCCCGACGCTACGCTGCCCGCAGCGTGCTGGCGTCTGCTGGGGCTCACGTA
CGGCCAGTTCCTCGCGACGTTCTGTGCGCTGCCACACCGACTTGCACCCAG
CCGCCAATGCTGCGCTCGGTGCAGCAGGTGGTGGCGGGGGCTGCGGGCGCG
CTGCCGAGGCCGAGCCCGGACTACCGAGACGGAGTCTGGCTCCGAGCG
CGAGCCGGAGTCCGAGCTCGGTCTCCGGGCGCTGGGCGCGCGGCCGG
TTGCCGCCCGGTCGACGACCCGCTGAATACTACGACGCCGGCGACCCG
TGGAAGCGCACAGCGTGCGCATGAAGTATACATCTCGGTACCCCTCCGAT
TGCGCAGACGTGCGCGCAGCGCGCTGCGGCTGCTGCCGGCTGCCAGACG
CGCGCGCGTGCTGGAGCGCAAAATTGTAAAGCACGTGGTGGACACG
ATCGCGCCCGAAATGCGCGGGCGCTGGGCCGTGCTGAAGCGCGTGCCCA
TCGCACAGGACGCCCCGACCCCTCGGCTCGTGTACGACACCATCGTGAG
CGCCGTAGGCAGCGCGCGGAGGCCGACACGCTGATGGGGCTCTTCTGG
AAGCACATCCCCACTCCACCCCCATTTGCCAAAGGTGCTGGCAGACTACT
GGGACGAGGCCCCCGGGGGCGGGTCTGCGGACGGACAACCCGCCAAT
AA

Figura 2-2

Aminoácido (SEQ ID NO:4)

MGLEKLLRYAYGNRLVKHDAITPPGVMTPIAVDLWNVMYTLLERFCGDA
 PGGVGDAATAARCFLSLRLMLLKRSYYPIFVADRGHIGDRRA TRGAKAIVA
 QTMRAVGGSGRLGRLVSDDYTSEDEVLGAYEYVPVPHADAAADDEEATA
 KEFAGRASAGAAARANAPKLAHRVCVSLIRFLGYAYVDAAEEMEADDVCAN
 LEHTNTVAHIYTTDTMILMGCDLILDAAPLFPPTLRCRDVLASLGLTYGQF
 LATFVRCHTDLHQPPMLRSVQQVVRGLRRAAEAPATTETESGSEPESEL
 GRPGAGPRRRLLPPAVDDPLKTTTPATVEAHSVRMKYTSRYPPIAQTCADAL
 RLLPASQTRGGVLERKFVKHVVDTIAPRMRGRWA VLKRVPIAQDAPDPRL
 VYDTIVSAVGSAAEADTLMGLFWKHIPTPPFFAKVLADYWDEAPAGPGSRR
 TTRQ

Figura 2-3

Circ de BHV-1 linhagem Cooper

DNA (SEQ ID NO:5)

ATGGGTGCCCGCCTCCGGCCTGCTGCCGGCCGCCCCAGCCACG
CTGTTCTACTAGATGCGCTCTCCGGGGCACGATTGACCTGCGCGGC
GACGAGGCCGTCTTTGTGTCCTGCCCGACGACGCGCCCGTGTACCAAC
ACATGCGCCGCGCCGACGCGCCACACTACACCCGTGCACTTCGTTGG
CCGCGCCTATGCCATCTTGCCCTGCCGCAAGTTTATGCTGTATCTGATGC
GCGGTGCTGCCGTTTACGGCTACGAGCCACCACTGGCCTGCACCGCCT
CGCCGATTCACTGCACGACTTTCTTACTACTGCCGGACTACAGCAGCGAG
ACCTACACTGCCCTCGATGTCACGGTGCTTGACGCGCAGATGACCCGGT
GACGTTCAACCACCCCGAGATCCTCATCGAGCTCGAGCGGACCCGGCC
TTCCCAACCGCGCCCTCGGCCCGCGCGCGCTCCACGCTGCGCGCGG
CGTCTATGCGCGCGCCGACGCACTTCTGCCCCCAACAGCTGCTAGCA
GAGGGCTCCATTCTGGACCTCTGCTCGCCAGAGCAAGCGGCGGCCGG
GCTGTTGCTGCTCCCCGCTGTGACTCTGGAGACGCGCGTGCCCCCTGC
GACGCTGGCGAGACCGCCCGTGACTGTACTGCCCAGATGC

Figura 3-1

CGCGCGCGCTCCCAGCCCCGGCGCCTTATCTCGCTATAGCTCCGTGCGC
TCGGTGTCTTTTAG

Figure 3-2

Aminoácido (SEQ ID NO:6)

MGARASAPAAAGPPPAHA VLLDALSGGTIDLPGGDEA V FVSCPTTRPVYHH
MRRGRTAHTTPVHFVGRAYAILPCRKFML YLMRGGA VYGYEPTTGLHRLA
DSLHDFLTTAGLQQRDHLCLDVTVLDAQMDPVTTTPEILIELEADPAFPPPP
SARARRSTLRRASMRRP ARTFCPHQLLAEGSILDLCSPEQAAAPGCSLLPAC
DSGDAACPCDAGETARDCTADAARAPSPGALSRYSSVRSVFF

Figura 3-3

LR-ORF1 de BHV-1 linhagem Cooper

DNA (SEQ ID NO: 7)

ATGGCGCTCGCTGGCCTTCTCTCCGGCCGGGTTGCCATTGCGGCCGACC
TCGGCCCGGGCGGCTCCGGCCAGGGCCGAGCGCCGCCGCCCGCGGGGTC
GGCGCAGGGGCGCGGCCGGGAGACGGGTCGGGGCTCGGGTGGAA
ATAGCCGCGGGTGCTGGTAGCCGCCGGGTACAGCGGGGCTCGGGCG
CGAGCTCCGAGCGACGGAAGGTGCCCGCGCGGCAGTTACTGCCGCCG
CCGCGCCGGGTCCCAATTTCGCACCCGCCGAGCCGCCCGGGGCC
GCCGCGGGGCGGGTCGGCGGGCGGGCGGGCGGTTCCCGTCAGGTC
TATCACTGTGAGATGGGCGGGGGCTGGGGCCGGGCGCGGGCCGGG
TCGGGCGCGGTCTAACTCTGTCTTCTTCTCCGGCGGGCTGCACACGG
GAGGCCAGCCTCCCGAGCAGCCTGGCCCGCGCTCCCTCGTCCCTCCT
CACTGCCGCCGCCAGCCCGCGGTCTCTCCCGCCGACTCCCAAGCCCC
CTCCCTCCCTCTTCTGCGGCTCGGGCTGCATGCGCGCGCTTGCGCGCG
GGGGCTGCCCGCGCGCCCGCAATCGGGGTCTCGTCTCCCGCCGC
GGTCCGAGAGCTGGGGGCGCGGAAACTGCCGCCGCGCGCAAGGG
CGGCGGCTAGCGACCGAGCGCGCGGCTGCACCGCGGGT

Figura 4-1

GTTTGTGACCTCTAGTGCTGACATACTGTCTTTCCGCAAGGCCGCCGAGC
CCGGCCGCGCCAGACGCCCCCGCGTGCCTCGACTCAACCTCCGCG
TCCGTC'TCCGGCTCCGTTTCCGTGTCGTCATGGCGGTCAAGTCCGGAGGT
GCTGAGCCCCGACGACGACTCTTCTGACTCCGACCAAGAGTCGTCTCC
GAGCCCTCCGAGTCCGAGTCCGAGGTGTCGAGAAACACCCACCCACGGC
CGCCAGGAGGCGCAGACTGCTGA

Figura 4-2

Aminoácido (SEQ ID NO: 8)
MALAGLLSRPGLPLRPTSARAAPARAGAPARRGSAAGARPAGDGVGARVEI
AAAVLVAAA VTAGLGAE LRATEGAAAAA VTAAAGVPICAPAEAGPGA
AAGAGSAGRAGAFVRSITVEMGAGAGAGAGAGVARSNSVLLRRRACT
RGGPASPSLARSRPSSLPA PQPAVSPAATPKPAPLPSSLGSGLHARACAA
GAARGAAGNRGSRLLPPRLREL GGAETAAARPQGRRASDRGAGCTAGVCRP
LVLT YCLSA GRRAARAAPDAPRVRLDSTSASVSGSVSVSSMA VRSEVLSPDD
DSSDSDQESSESESESESRNTTTPRPPGGA

Figura 4-3

LR-ORF2 de BHV-1 linhagem Cooper

DNA (SEQ ID NO: 9)

ATGCGCGACCTGGGCCATAAAGCCCCGCGCATGCGCAGCAGTTACTTT
CGGTTTGGGATGACAGCGGCGACTGCGGGCTCGAAAGTTAAGTATGCAG
GCTGGGGTTCGCAATACACGGCGGTGCGGTGTGGTGGCTGCGGGTCCG
CGAGTGGGTGGGCGGGAGCCGGCCGCGGCGATTATTGCCGCCAGGCG
CTGCCGCCGCTGCAGCGGCCGAGCAGCCGGCCAGGCTCGGGCCCTGGC
GACCGCCTGGCTGCGGCGCCAGGGCCGCGTGTGCGGCGGGGGTCCC
CAGGAGGCTTCTCGCACCCAGGCGGCCACTTCCATTTCGGTGCGCCGCC
TCTTCTGCGCGAGCTCTCGGGCCGGGTCCAGGTCGCCCGCGCCATG
GCGCTCGCTGGCCTTCTCTCCCGCGGGGTGCGCATTCGCGCCGACCTC
GGCCCGGGGCTCCGGCCAGGGCCCGGAGCGCCGCCGCCGGGGTCCG
GCGGCAGGGGCGCGCGCGGAGACGGGGTCTGGGGCTCGGGTGGAA
ATA

Figura 5-1

Aminoácido (SEQ ID NO: 10)

MRDLGHKSPAHARA VTFGLGMTAATAARKLSMQAGGRKYTA VRCGGGLR
VAEWVGGEPA AAIIAARRCRRCSGRAARPGSGPGRDLAAAPGCCGGGSP
GGFLAPRRPLPFRCAASSAPSSRGRGPAPWRS LAFSPGRGCHCGRPRPG
RLRPGPERRPAGGRRQGRGRRETGSGLGWK

Figura 5-2

Us4 de BHV-1 linhagem Cooper

DNA (SEQ ID NO: 11)

ATGCCCTGCCGCCGACCGGCACCTTGGCCGCCGTCGCCCTAATCCTGCTC
TGCGGGGCCGCCGTTTGGGGCGCCCGCGCCGACGACCTCTGTTCGCC
GACGTGCCCGCACTGGCATGGCGCCCTCCCGCCCGCTGGGGCCCGTCCTG
AACCTAGCGGCTCGGATTTGACCTCGCGGGTTTCGGTGC GCGGTGGAC
GCTTCGCGGGCTGCGCCCTGGCCCTCTTGACATGGCGGAGACGGTGGTG
CCCGCGGACCGCGAGCCGCCGACGTCGTCGACGTCGGCTGGGCTTACCA
AGACGGGACTGCATGGTGCCCTCTGGCATAATCGCCAGTACTTTAACTGCAC
GGGGGGCGCGCTGCCCGGCCAAACGTCCTGCGCCGGGCTCTCTGAGACCC
GCATCCGCGGTGGCTTTGGAAACCTCCGACTACGCGCTCTACGGGACGTCGC
TAGTACTGCGCCCCGGCCTGTACGACCGCGGACCTACATCTACTTCCTTG
GATACGGCCCAGACGACATCTACGTGGGCAGCGTCACGCTCATGGTGGGC
GCCGACATCCACAAATACCCCTGCGGGCTGGACCGAGGGCTCGGTGTGGC
CCTGCACCACAAGAGCGGACCGGCCCGACCTCTGACAGAGGACGACGCCA
CCGGCGACTGGGCTGCGGCTGCTTCCCCGCCCTTGTGA

Figura 6-1

GGTTGACGCGGTGTGGGGCAACGTAAAGCGCCGCAGAGCTGGGCCCTGGCC
GACCCGATCGACTACGCCGACGAAGGGGTGAGGTGAAAGTGCTCGAG
GACGAAGCCGGGAGCGCCAGCGGAACCTGCCGCAGGACGACCCCGAC
CCCGACCTCGCAGATTGCCGGACCGTCGGGCTCTTTAGCGAAAGCGACA
TGTTCCGGACCGCCAGCGGGCCCGAATCGCTGCTGATCGGCGCCGTTGC
CAAGGACGTCTGACGGTGCCCTCAATCTGCCGCCCGCGCTCTTAC
GAGGCCCTGCGAAACGCATCGCTGGAGTGCAACTCCCGCCCGCGGAGAG
CCGGCGACGCAGCGGTGGTGTGATGTCTCTCCAGGAGCCCGCTCGCCT
CGAGCGCCGCCCGATGCCCGCGCCACCGATCCGGAGTTTGGGCTCTTT
GGCCTGCCCGATGACCCCGCCGTGCCGGCGCGGCATTCTCATCGGCCCTCG
CGATCGCTCTGCTGCTGCTGTTTTCGCTGGTGATCGTGCTCGTCTGC
GCCTGCCGGCTCGCCCGCGCAGCCAAAGGCTGCCGACGCGCCCGGCCG
CCACGTTCCGCAAGAGCAACCCCGCGTACGAGCCGATGCTCAGCGTCTG
A

Figura 6-2

Aminoácido (SEQ ID NO: 12)

MPAARTGTLAAVALILLCGAAVLGRPAPDDLCLCFADVRRTGMAPSRPLGPVL
NLAASDLTSRVSVRAVDASRGCALALLDMAETVVPGGPRAADVVDVGWA
YQDGD CMVPLA YRQYFNCTGGALPGQNV CAGLSETRIRGGFGTSDYAL YG
TSL VLRPGL YDRGTYYFLGYGPDDIYVGSV TLMV GADIIHKYPCGLDRGLG
VALHHKSGPARPLTEDDATGDWACGCFPALVEVDA VWGNVSA AELGLAD
PIDYADEGGEVEVLEDEAGSASGNLPQDDPDPDL ADCRTVGLFSESDMFRT
ASGPESLLIGA VAKDVL TVPLNLPPGRSYEALRNA SLECNSRPRETGDA AAVV
VMSLOEPARLERRPDARA TDPEFGLFGLPDDPA VRRGILIGLAIALL VLLFSL
VIVLVCACRLARA AKAARRARAATFAKSNPA YEPMLSV

Figura 6-3

Us9 de BHV-1 linhagem Cooper

DNA (SEQ ID NO: 13)

ATGGAGAGTCCACGCAGCGTCGTCAACGAAAACTATCGAGGCGCTGATGA
GGCCGATGCAGCGCCCCCTTCAACGCCGCCGGAAGGCTCCATCGTGTCCA
TCCCCATCCTCGAGCTCACCATCGAGGACGCCGCCAGCGCAGCAAGCA
ACCGGCACCGGCGCAGCCGCAACCCGCTGGGCGCACTCCAGACGCCGAACGC
AGCACCCGGCGGCTACGTGCCAGTTCCCGCGCGGATGTGGACTGCTATT
ATAGCGAAAGCGACAGCGAGACGGCAGGCGAGTTTGTGATACGCATGGG
GCGGCAGCAGCGCGCGGCA TCGGCGGCGGCGCTGCATGATAGCAGCG
GCCCTGACTTGCA TTGGCC TCGGGGCC TGCGCGGCGGCGCAGCGGCAGG
CGCCGTCC TGGCGTTGGAGGTAGTGCCCCCGGCCCTGA

Figura 7-1

Aminoácido

(SEQ ID NO: 14)

MESPRSVVNNENYRGADEADAAPPSPPEGIVSIPILELTIEDAPASAEATGTA
AAAPAGRTPDANAAPGGYVPVPAADVDCYYSESDSETAGEFLIRMGRQQR
RRHRRRCMIAAALTCIGLGACAAAAGAVLAEVVRP

Figura 7-2

Us9 de BHV-1 linhagem Cooper

DNA (SEQ ID NO: 15)

ATGCAACCCACCGCGCCCGCGGGGCTTGCTGCCGCTGCTGCTGC
CGCAGTTATTGCTTTTCGGGCTGATGGCCGAGGCCAAGCCCGGACCGA
AACCCCGGGCTCGGCTTCGGTCGACACGGTCTTCACGGCGCGCTGGC
GGCCCGTCTTTCTCCAGGGCCCGCGGCGCGCCGACGTGCGCGCCG
TTCGCGGCTGGAGCGTCTTCGCGGGCGCTGCTCGCCGCCGTGCCGGA
GCCCGTCTGCCCTCGACGACCGCGAGTGCTTCAACCGACGTGCCCTGGAC
GGGGCTGCCCTGCGAACCGCCCGCGTGGCCCGCTGGCCATCGCGGAGC
TCGCCGAGCGGCCCGACTCAACGGGCGACAAAGAGTTTGTCTCGCCGA
CCCGCACGTCTCGGCGCAGCTGGGTCGCAACGCGACCGGGTGCTGATC
GGGGCCGACGCCGAGGAGGACGGCGGCGGTGTACTTCCTGTACGACCGGC
TCATCGGCGACGCCGCGGACGAGAGACGACAGTTGGCGCTGACGCTGC
AGGTCGCGACGGCCGGCGCGCAGGGCGCCGCGCGGACGAGGAGAGGG
AACCAGCGACCGGGCCCAACCCCGGCCCGCCGCCCAACCGCA

Figura 8-1

CGACGACACGCGGCCCCCGGGCGGCACGGCGCGCTTCCGCGTGCT
GCCGTACCACTCCACGTATACACCCGGGCGATTCCCTTCTGTCTATCGG
TGCGTCTGCAGTCTGAGTTTTCGACGAGGCTCCCTTCTCGGGCCAGCATC
GACTGGTACTTCCTGCGGACGGCCGGCGACTGCGGCTCATCCGCATAT
ACGAGACGTGCATCTTCCACCCCGAGGCACCGGCTGCCGTGACCCCGC
CGACGCGCAGTGCAAGCTTCGCGTCGCCGTACCGCTCCGAGACC GTGTAC
AGCCGGCTGTACGAGCAGTGCCGCCCGGACCCCTGCCGGTCTGCTGGCCGC
ACGAGTGCGAGGGCGCGGTACCGCGGCCCGCTTGCGCACCTGCGTCC
CGCCAATAACAGCGTAGACCTGGTCTTTGACGACGCGCCGGCTGCCGCC
TCCGGGCTTTACGTCTTTGTGCTGCAGTACACGGCCACGTGGAAAGCTTG
GGACTACAGCCTAGTCGTTACTTCGGACCGTTTGGTGCGCGCGGTCACC
GACCACACGCGCCCCGAGGCCCGCAGCCGCCGACGCTCCCGAGCCAGGC
CCACCGCTCACCAAGCAGCCGGCGGCGGCCACCGGGCCCGGCCCT
GGCTTGTGCTGGTGGGCGCGCTTGGA CTGCGGGAC

Figura 8-2

TGGTGGGCATCGCAGCCCTCGCCGTTTCGGGTGTGCGCGCGCGCAAG
 CCAGAGCGCACCTACGACATCCTCAACCCCTTCGGGCCCGTATACACC
 AGCTTGCCGACCAACGAGCCGCTCGACGTGGTGGTGCCAGTTAGCGACG
 ACGAATTTTCCCTCGACGAAGACTCTTTTGCGGATGACGACAGCGACGA
 TGACGGGCCCGCTAGCAACCCCTGCGGATGCTACGACCTCGCCGGC
 GCCCAGAGCCAACTAGCGGGTTTGCGCGAGCCCCCGCCAACGGCACGC
 GCTCGAGTCGCTCTGGGTTCAAAGTTTGGTTTAGGGACCCGCTTGAAGA
 CGATGCCCGCCAGCGCGGACCCCGCCGACCAAGATTACACCGTGTA
 GCAGCGGACTCAAGTCCATCCTCCGCTAG

Figura 8-3

Aminoácido (SEQ ID NO: 16)
 MQPTAPPRRRLLPLLQQLLFGGLMAEAKPATETPGSASVDTVFTARAGAP
 VFLPGPAARPDVRAVRGWSVLAGACSPVPEPCLDDRECFTDVALDAAC
 LRTARVAPLAIAELAERPDSTGDKFVLADPHVSAQLGRNATGVLIAAAAE
 EDGGVYFLYDRLIGDAGDEETQLALTQVATAGAAQGAARDEEREPA TGPTP
 GPPPHRTTTRAPRRRHGARFRVLPYHSHVYTPGDSFLLSVRLQSEFFDEAPFS
 ASIDWYFLRTAGDCALIRIYETCIFIHPEAPACLHPADAQCFSFASPYRSETVYS
 RLYEQCRPDPAGRWPHECEGAA YAAPVAHLRPANNNSVDL VFDDAPAAASG
 LYVFLQYNGHVEAWDYSLVVTSDRLVRA VTDHTRPEAAAADAPEPGPPL
 TSEPAGAPTGPAPWL VVLVGALGLAGLVGIAALA VRVCARRASQKR TYDIL
 NPFGPVYTSLPTNEPLDVVPVSDDEFSLDEDSFADDDSDDDGPA SNPPADA
 YDLAGAPEPTSGFARAPAN GTRSSRSRGFKVWFRDPLEDDAAPARTPAAPDY
 TVVAARLKSILR

Figura 8-4

UL49.5 mutante de BHV-1 linhagem GL756

DNA (SEQ ID NO:23)

ATGCCGCGGTCGCCGCTCATCGTTGCGGTTGTGGCCGCCGCGCTGTTTGC
CATCGTGCGCGCGCGCACCCCTAGTAAGCTTTTGCTAGACGCGATGCGG
CGCGAGGGGCAATGGACTTTTGGAGCGCAGGCTGCTACGCGCGCGGG
GTGCCGCTCTCGGAGCCACCGCAGGCCCTGGTTGTTTACGTGGCCCT
GACCGCGGTAATGGTCGCCCGTGCGCCCTGTACGCGTACGGGCTTTGCTTT
AGGCTCATGGGCGCCAGCGGGCCCAATAAAAGGAGTCGCGGGGGCGG
GGCTGA

Figura 9

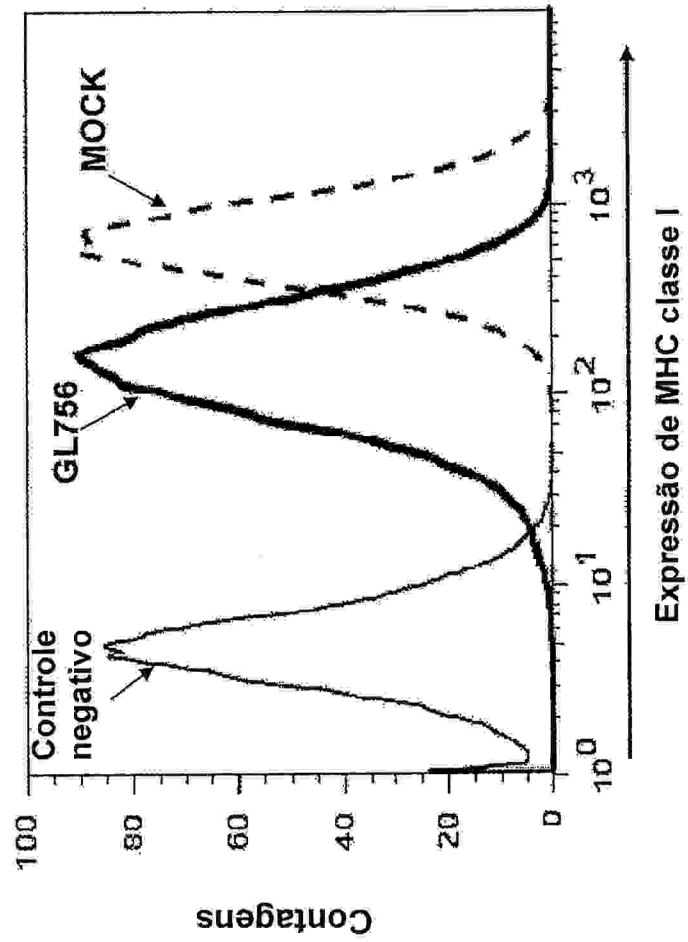
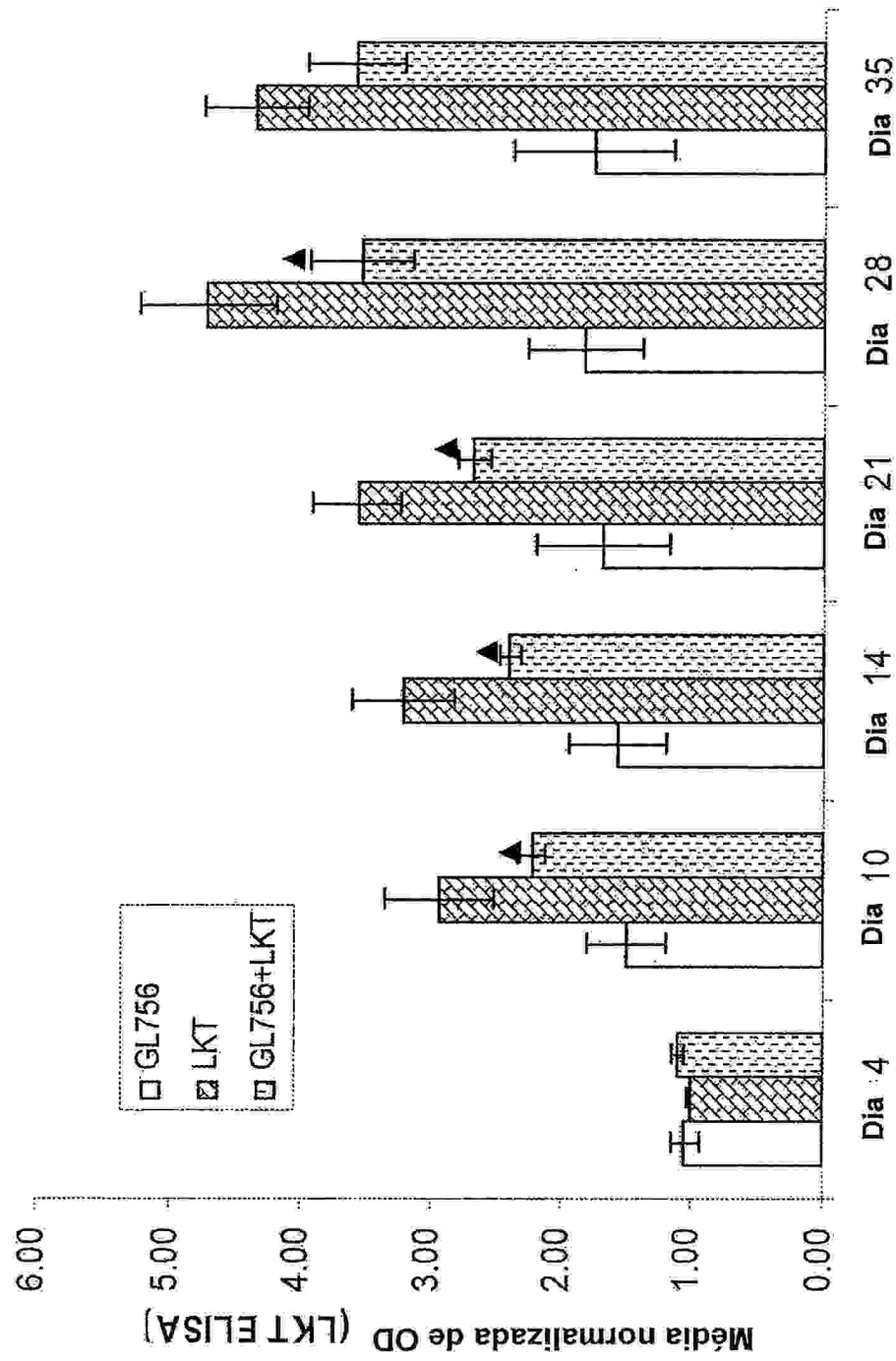
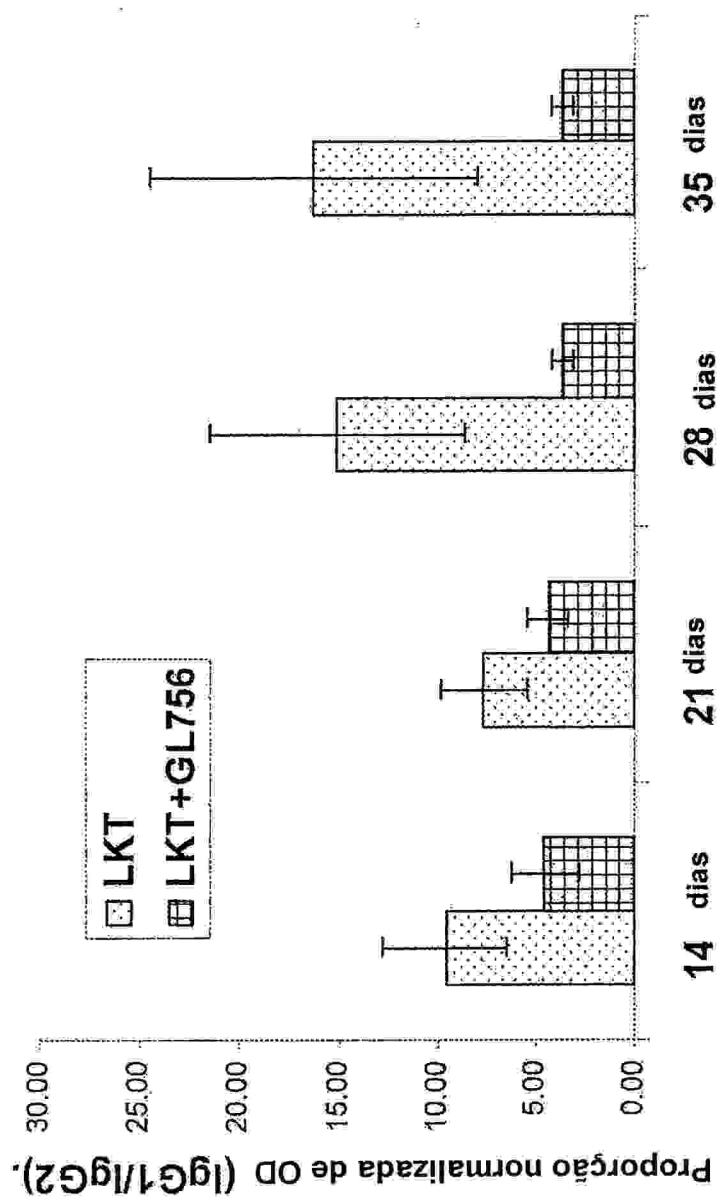


Figura 10



Após vacinação

Figura 11



Dias após vacinação

Figura 12

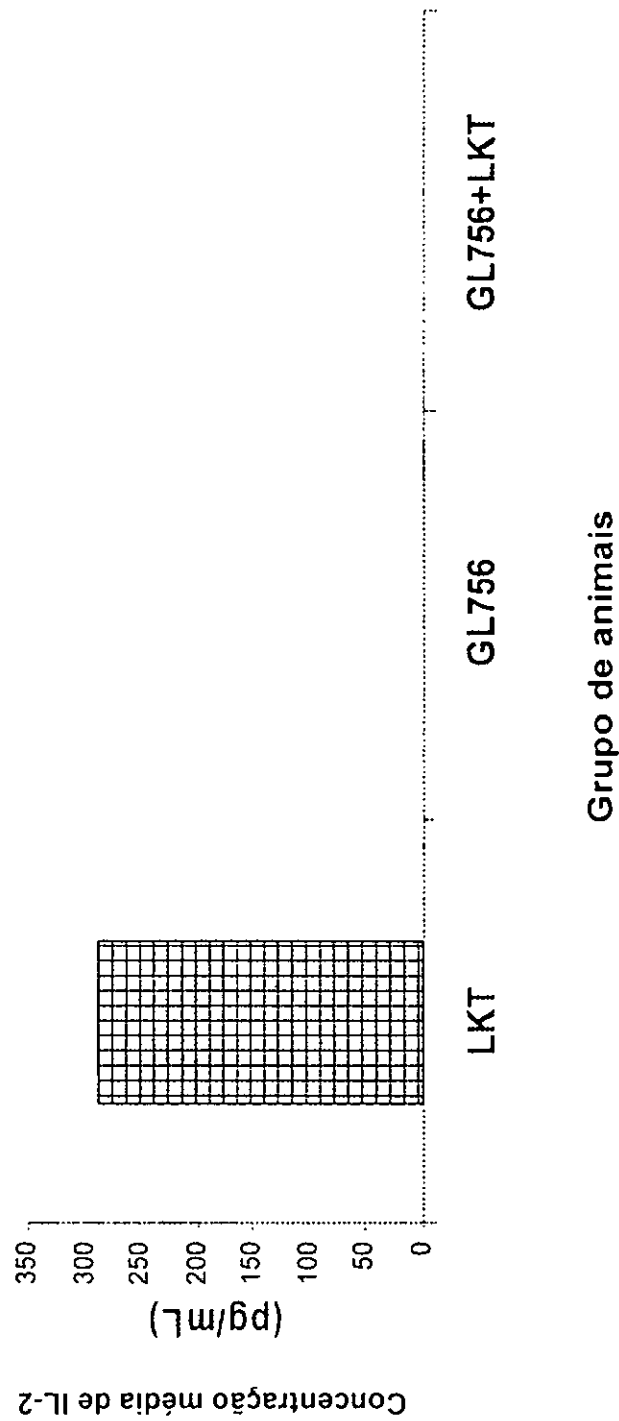
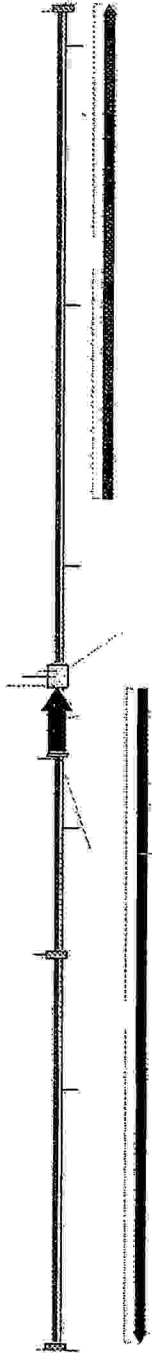


Figura 13

A UL50-UL49.5delta-ATG mutado, FlancoATC-U149, local mutado Asel(A8816G)
casete Asel-EcoRV-AflII inserido, Flanco 5'HindIII3'Xba I



B Us3-deltaUs4-Us6 Flanco 500bp Flanco 5'HindIII3'Xba I casete Asel-EcoRV-AflII
inserido

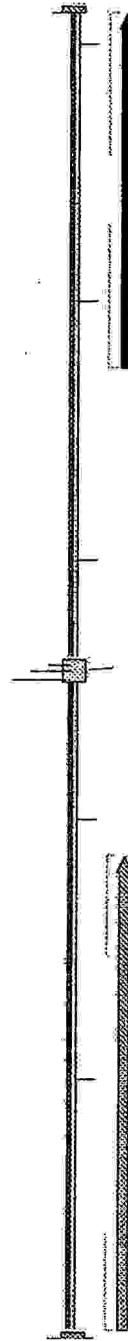


Figura 14-1

Construção de recombinação exemplar de UL49.5 (SEQ ID NO: 17)

AAGCTTAAAGAGGGCACTTCGACGCCCGCCTCTGTCCCGCGTTTGC
GTCGTCGTCGACGGCGATGAGGCGAGGCAGCGTGGTGGTTAGCCGCG
CGAGCGTCAGCCGCGAGCGCAAGCCCCGCCGGGAGCGCCGCTGCG
GACTCGGGGCCAGACGATGGCGCGCAAGATCCCCGAGTAGCCCCGA
GTCGACGATGCCGACGGCCAACGGCTGGTGGCGGGGCATGTGTGT
CACCCGAGCGCATTTGCGACATTATAATGGCATATCCGCCGGCGCG
GCCGCTTCATGTTTAAGTTAATCAGCCGGCTATAAAGGAGAGATCCC
GACGGGCTGTTTCATCTCGCTTTGCTGCTGGCGCAATTGGGCCCCAG
AGGCCAGCGAGTCGGGCTCACAGCAGCTTTCCACCGCCAGGGGC
CGCCTCCGCGTTGAGCTCTACGACGAGGATCCCGGGTCGCCGCTCAT
CGTTGCGGTTGTGGCCGCCGCGCTGTTTGCCATATTAATGATATCCTT
AAGTGATTGACCGCAACGCTGCGGAGTAAGTTGTATATAAGCTCGC
GGTCCCGCGACCGCTGCCCTTTTCGCACTCGGCCCGACCCGCTTGA
GCTGCACGCCCGCCGGCCCGCGACTCGCTTGCCATGGCCCCG

Figura 14-2

GTTCCACAGGCCCTCCGAAGACGAGGACGATTACGAGTACAGCGACCTT
TGGGTGCGAGAAACAGCCTCTATGACTACGAGTCCGGCTCGGATGACC
ACGTATACGAAGAGCTGCGCGCCGACGAGCGGACCCGAGCCGAGCG
GGCGGCGGCTAGCGTCCGTGCGTGCAGCGCTGCAGCCGTCCAGCC
CGCCGCCCGCGCCGCGATCGAGCCGCGAGCCGCGGACGACCGTAGC
TGCGCCCGCCGCGCCGCGCCGCGCTCGAGCAGCCGGCGTCCCTCG
CGCCCGCCGCGAGCTGCGCGCCGACCCGCGCTCCCGGCCAGCCACGC
GCGGGTCCCTCCGGCGCGCCGGGCA

Figura 14-3

Construção de recombinação exemplar de Us4 (SEQ ID NO: 18)

AAGCTTCTGGCATACCCGCGCGCTGTTCGACAGCCCCGCGGCCCGC
AGGGCGAGGACGCCGAGGCATCGGGCCCGCCGACGATCTTGGGCGACC
GCGACTGCGCCCGCAGCTGCTCCCGCGTGATTGCGCGCTGGCCGTGCA
CGCCGAAGAGTTTCCACCCAGCCCACTGACCGGCTGACCCGCAACTTC
AAGCGCCACGCGAGCACGCGCCGAGAGCCGCACAGCCCGTACCGCTGC
CTGGCGGTGCTCCGGCTGCCCTGCGACGCCGACCGCCTCCTACACCAGA
TGCTGACCTTTGACTTTCGCGCGCGCCCCACCGCCGCGGAGCTGCTGGA
GCACCCCGTCTTCGGTGCGGCTCAGGGGTAGCCCCGGGGTTTCCCGCA
AAACTGAGGCATATAAGGCGCGGGCACCCGGCAAGTTTGGCATCCACAC
TTCGCGCTGTGGACACGAGAGCGGAACGCGAGCGAACGCGAGCGCAAGC
GCGAGCACACGACTGCGATCATTAATGATATCCTTAAGTCGCCGGCACC
CCACGCCGCCCGACCCCGCTGTCCCGCGTTTACAATAAACAGTTATTC
TTACCAACGTTGGTGCGCCTGTGCGCGTGTCTATTGCGAGTTAAACCGAG
TGCCCCACCCAGGCAGGGCGGGGTTGGGCCGGGCCG

Figura 14-4

CAGCCCCGGCTGGGTATATATCCCCGACGGGGCGACTAGAGATACACTCG
CCCCGGCGGCTGCTGCCGAGCGGGCGAACAATGCAAGGGCCGACATTGG
CCGTGCTGGGCGGCTGCTCGCCGTTGCGGTGAGCTTGCCCTACACCCGC
GCCGCGGGTGACGGTATACGTCCGACCCGCCGGCGTACCCGATGCCCGCGA
TACAAC TACACTGAACGCTGGCACACTACCGGGCCCATACCGTCGCCCT
TCGCAGACGGCCCGCAGCAGCCCGTCGAGGTGCGCTACGCCGACGAGCG
CGGCGGCGTGCGACATGCTGGCGCTGATCGCAGACCCGCAGGTGGGGC
GCACGCTGTGGGAATCTAGA

Figura 14-5

Construção de recombinação exemplar de UL41 (SEQ ID NO: 19)

AAGCTTCTTCTCGGGCGGGACGGCCACGTACACTTGC¹TGCTCGTAGAGGC
CGCTGTGTACCAAGCATGCCCTCGCGGCTAAAGACCAAAAGCGTTTCGC
AGCGAGGCGCCAAAGGGGCTCAGCAGGGCGGAGACGTCCGCCAGCTGGC
GGCCGATAAGCGAGGCGCTCGCGATTGGGTTGCCGTTGCCGCCGTCGGAC
AGACCGGGGTGAGGCGGGCTCGCCTTCGTGCGCGCAGATGCGAGGG
GGGCTGCAGCATCGCGCGGGTGCTTCGGCGGCGCTTTCGCTCGCCTCTTA
CGCGCGGGTCGCAAAAGCGAGTCTGCGCTGCGGGCGGCTCTTTA²ACTG
GGCGGACGCCCCCGCAGCGGCAAAACACACACTCGGGCGGCTCAGCGTAT
CAAAACGGCGACACGTTTAAAGTTTCGACGCC³TATAAGCGGCGCGGCACT
AGGCCTCCCAATCGGCACCGCGCGGCTGTGCGGGCGACCC⁴TGCGCAGA
GAGAGATTAAATGATATCCTTAAAGAAACGCGCGCATACCGAGACTGGCTT
TCGTTGACATGGAACATTTT⁵TATTTCGCGGCGTGCGGGTGAGAAAGGAGGA
GGAAAGGCGGGCGCTCTTGCAAGGCAGCGGGGTGCCCTACAGGTCGTT
GATTACGGTGCCGTGTAGTTGGTGTCTGCGGGCGCTCAAGAAGT

Figura 15-1

TCGTGTGCTTCTCGGCAGTCATCAGGGCCAAAGGAAAATCGGTCCCAGG
AGGCGGGGTGCCA AACAGAGGAGGCAGCTGGATAGCAGCGAGCAGGCG
GTCCGCGCTGTACTCGACGTACGCAGAAATAGCCTCCACGTCAAAGTATA
TGACTGCCGCGCGCAACCAAAATAA ACTCGCGCTCAATTTCACCG
CTTCGCGGAACAGCTCGTAGATGCGGGCGCGCGCGCTCCCCGCC
GAGGTAGTTGTCGAAGATGCACGACGCGGCCGTGTGTCACGGCTTCG
TCGCGGCTGATGAGGTCGTTGGTTGGCACGTCA CGACTCTAGA

Figura 15-2

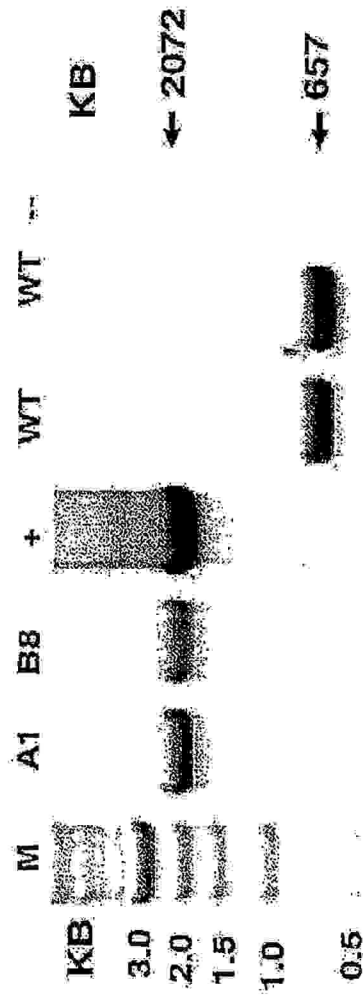
Construção de recombinação exemplar de LR-ORF2 (SEQ ID NO: 20)

AAGCTTCTCTACCTCCTCCCTCGAGGCAGCGCAACGGACCCCGCCAG
TCCATCCCACTTCGCACAATCGCCAATTTTGTCCATTAGCTAAAGTAT
CTCCGGCCATAATCGATGTGTCTGAGAGGGTAATAAAACACACCCAGAC
GCTCGGCACTTAGCTCTCGAGTGATTGCCCTGGCTGCTTGCCCCCGTTTGGGT
GGAATGAGGCCAAACAAGCATTTGGCCCCCTGTTTGGCTAGACGGGGCTTT
GTGTTTTTCCACCCCTGCCCTTGCCCCCTGGCCCGCTGGCCGGCCGGCTAA
AGTATAGGCCAGACCAAAACCCCGCAGCAGCTCTGCTCGCTGGCGAGA
CCCCAAAGCGCCAAATTGTGGCATAATTCCGGGTCTGACCGCGCTGCAC
TGCCCTTTGGCAGTAATATTATTAATGATATCCCTTAAGTCAGAGTTTAATAT
TACAGACAGACAAAGCCAGATAATTACAAAGTATTTGTTTTTATTGAT
TGCGCATGCAGAAATTCCTAGTTAGTTAGCATGCGCGAGCAGTTACTTTCGG
TTTGGGATGACAGCGGCGACTGCGGCTCGAAAGTTAAGTATGCAGGCT
GGGGGTCGCAAAATACACGGCGGTGCGGTGTGTTGGGCTGCGGTCGCGG
AGTGGGTGGCGGGGAGCCGGCCGGCGGGAATTATTC

Figura 15-3

CGCCAGGCGCTGCCGCCGCTGCAGCGGCCGAGCAGCCCGGCCAGGCTCG
GGCCCTGGCGACCGCCTGGCTGGCTGGCGGCCAGGGCCGCGCTGCTGCGGCG
GGGGTCCCCAGGAGGCTTTCTCGCACCCAGGCGGCCACTTCCATTTCG
GTGCGCCGCTCTTCTGCGCCGAGCTCTCGGGGCCGGGTCCAGGTCGC
CCGCGCCATGGCGCTCGCTGGCCTTCTCTCCGGCCGGGTGCGCATTG
CGGCCGACCTCGGCCCGGGCGGCTCCGGCCAGGGCCGGAAGCGCCGCC
CGCCGGGGTTCGGCGGCAGGGGCGCGGCCGGGTCTAGA

Figura 15-4



BHV-1 GL756ΔUL49.5_EGFP

Figure 16

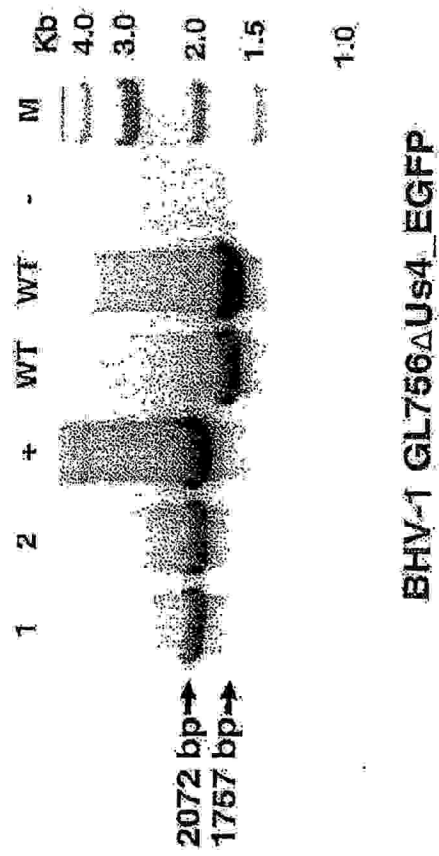
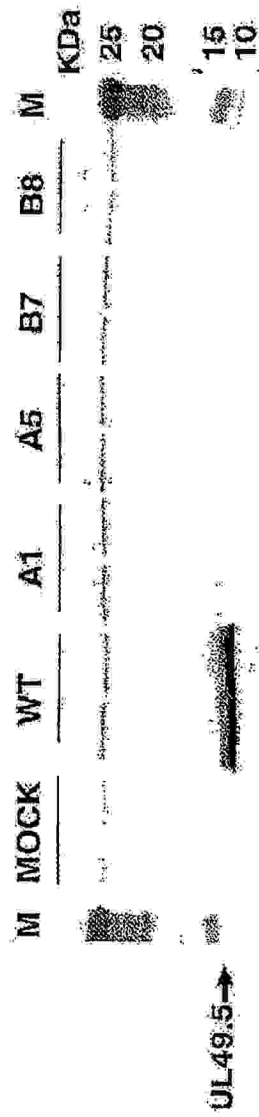


Figure 17



BHV-1 GL756ΔUL49.5_EGFP-A1

Figura 18

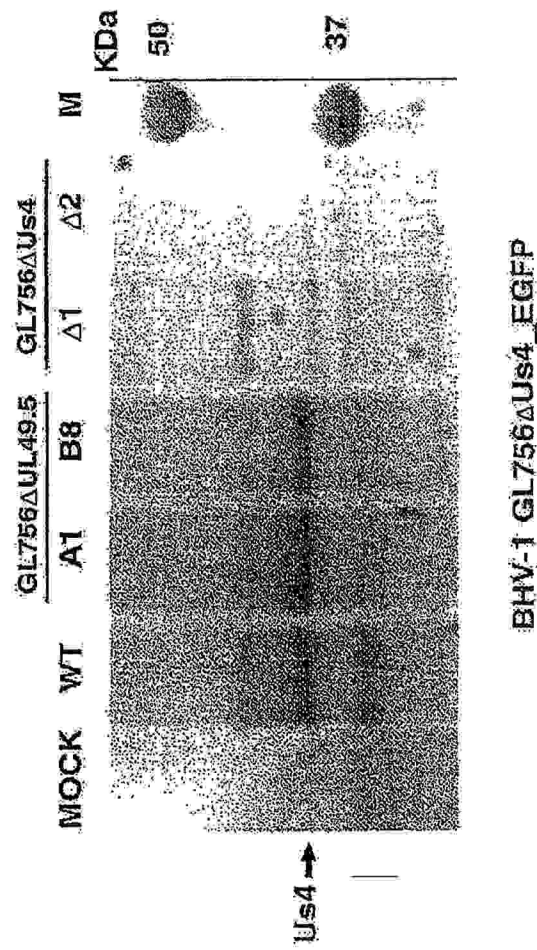


Figura 19

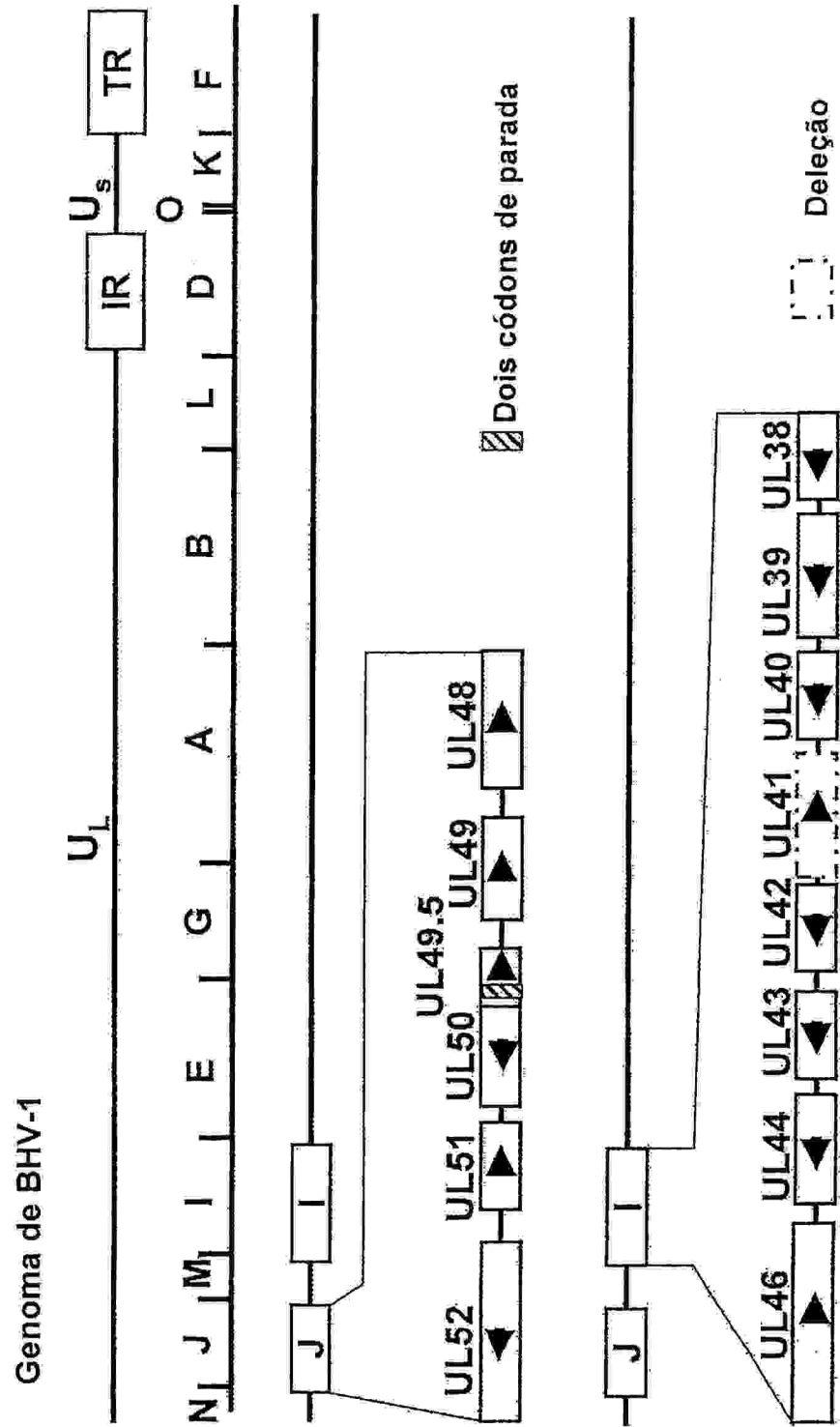


Figura 20

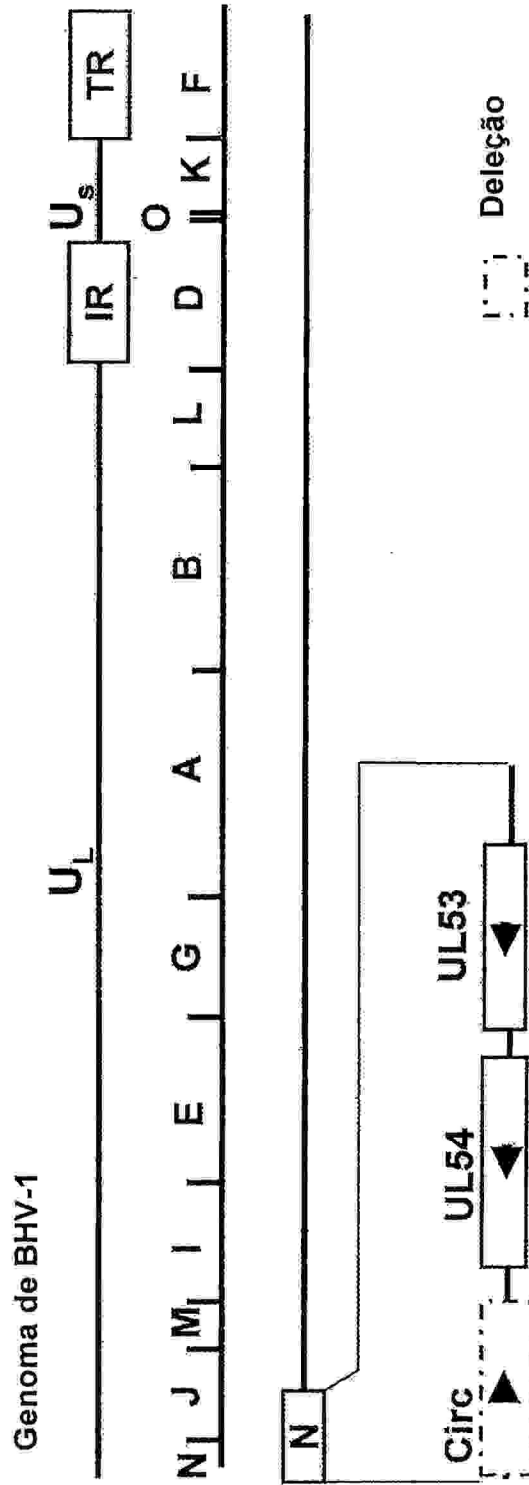


Figura 22

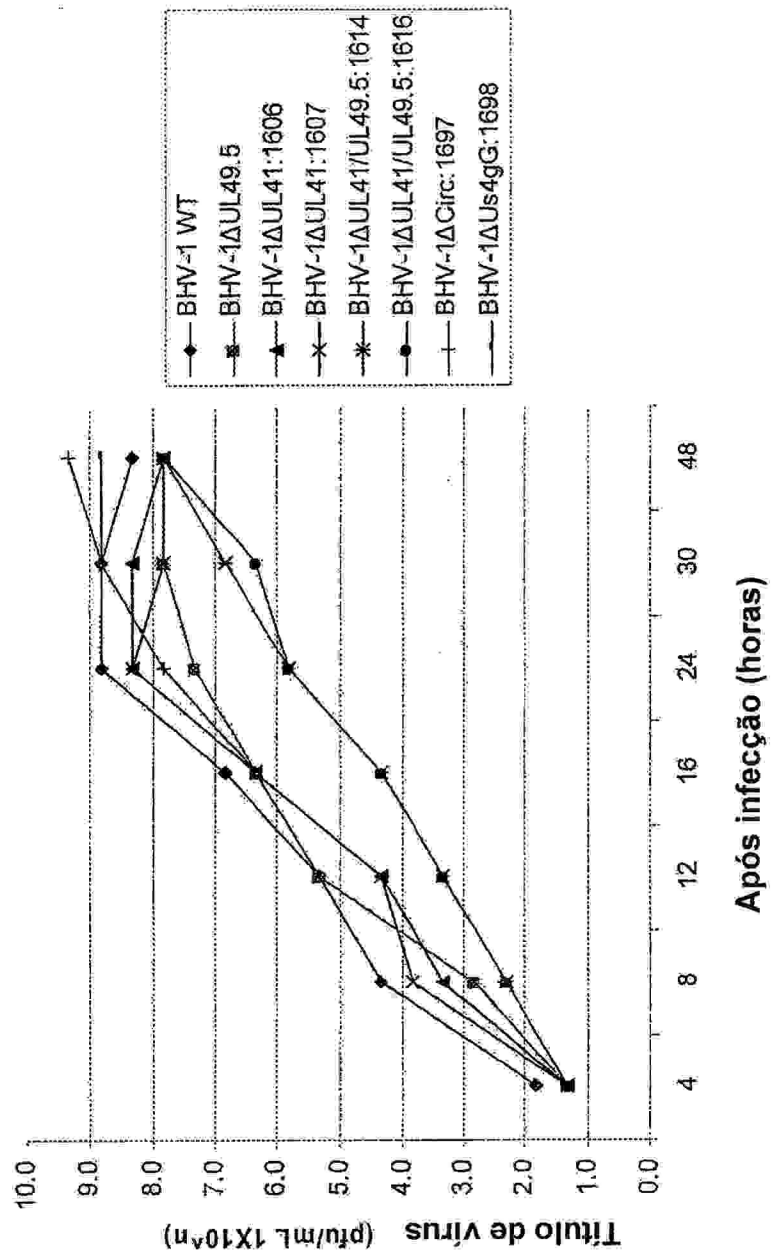


Figura 23

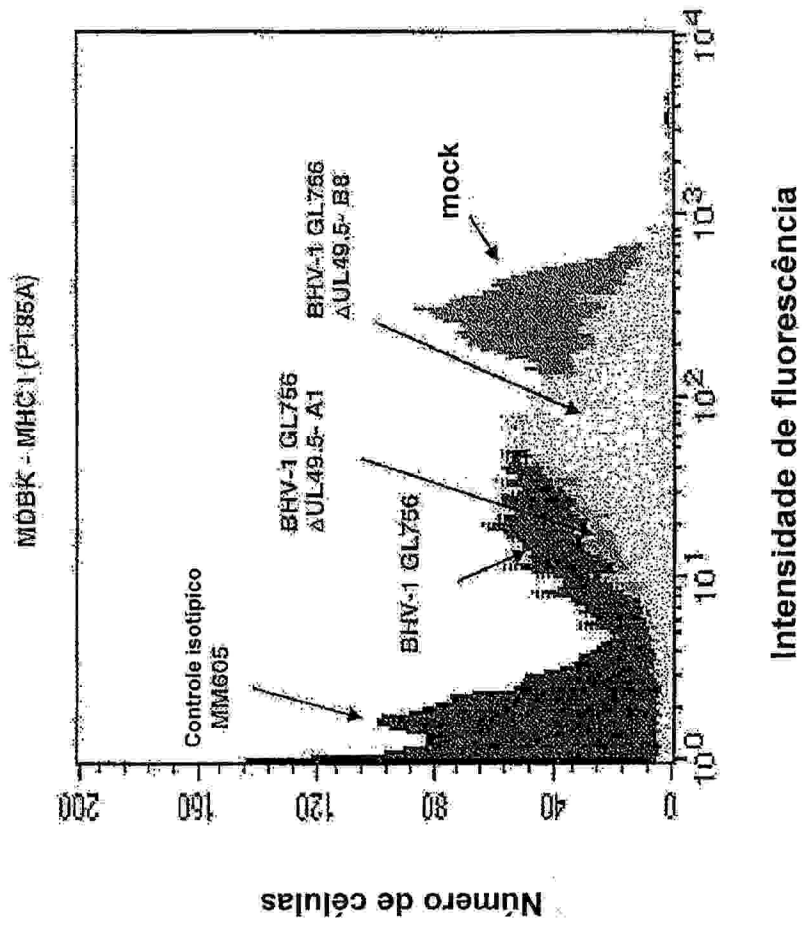


Figura 24

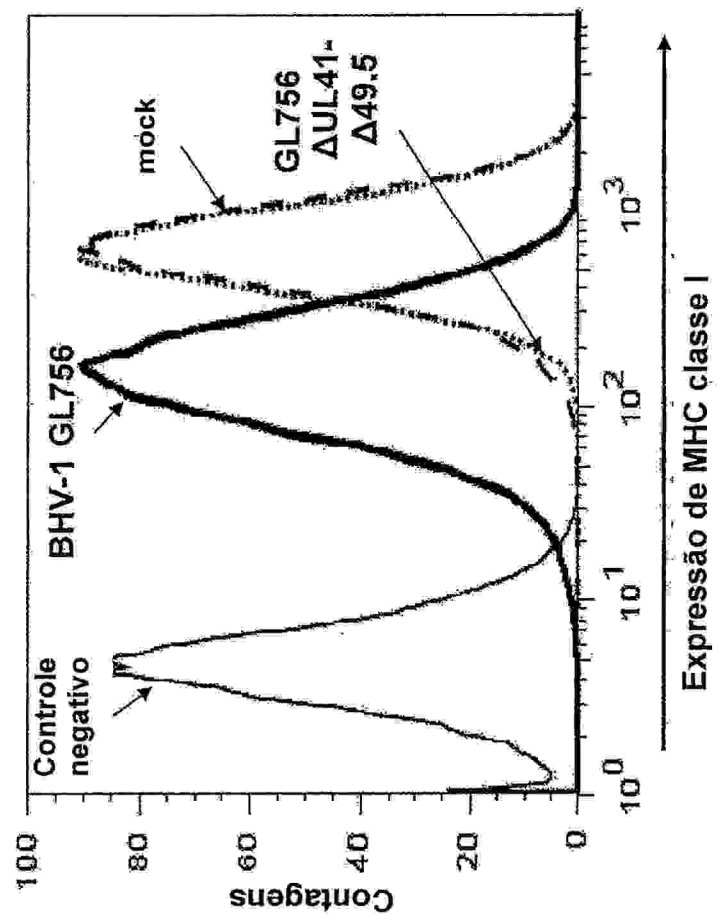


Figura 25

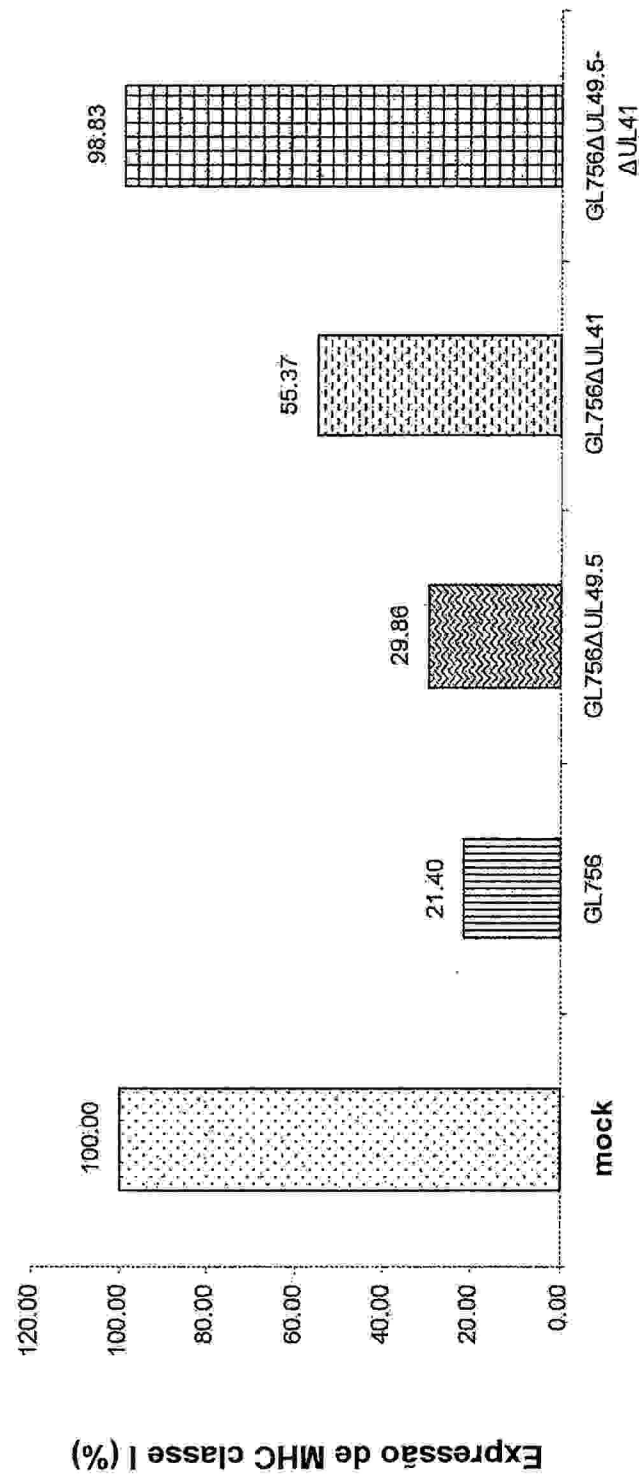


Figura 26

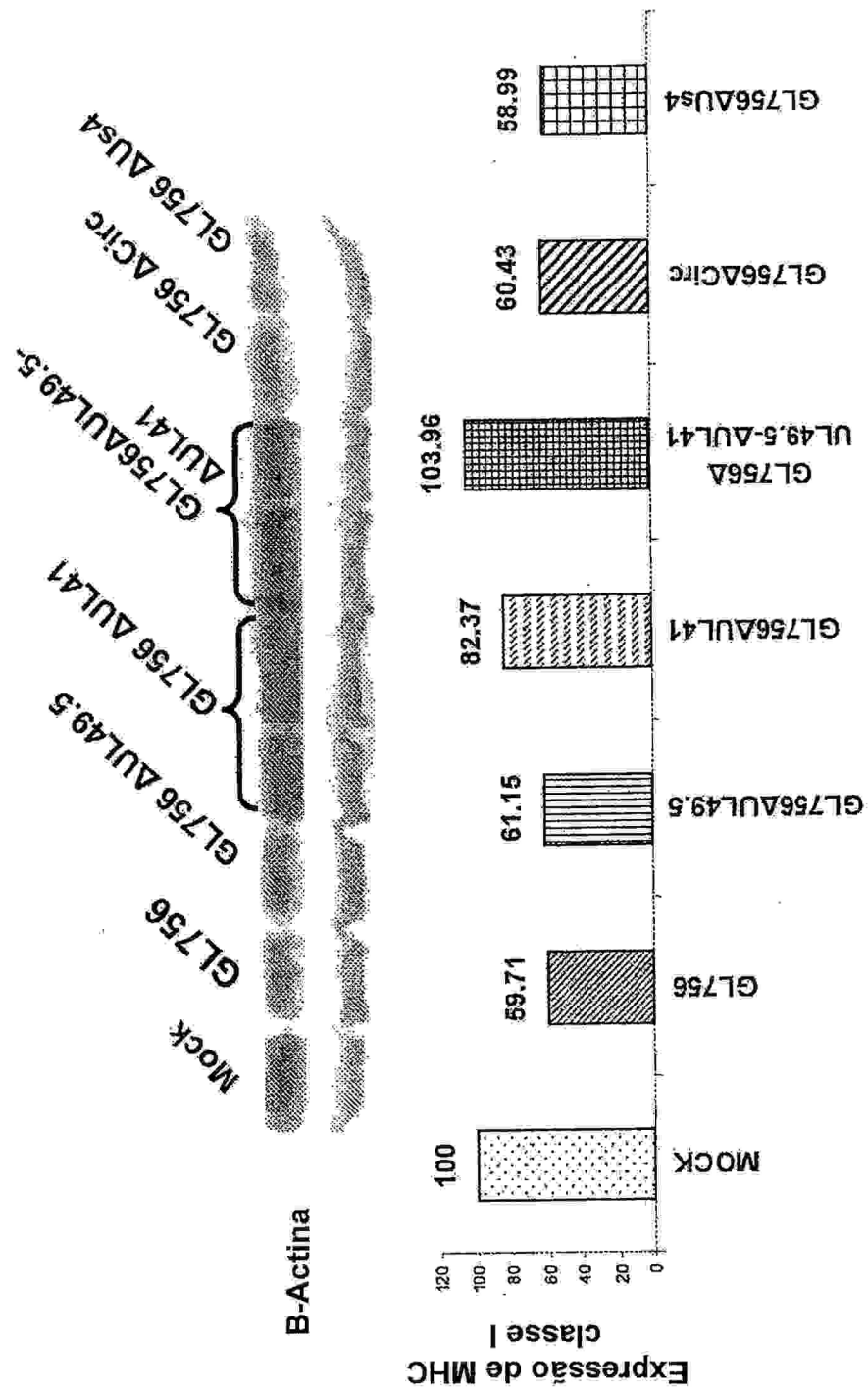


Figura 27

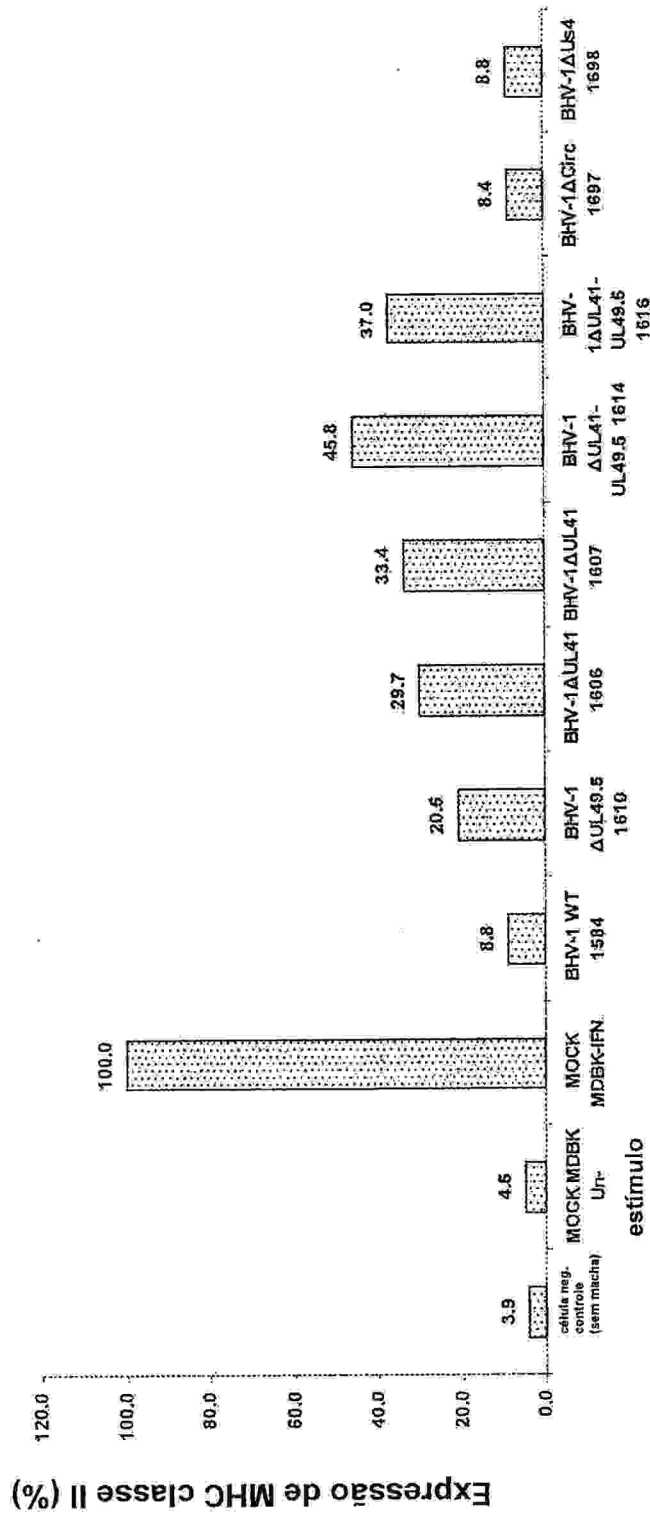


Figura 28

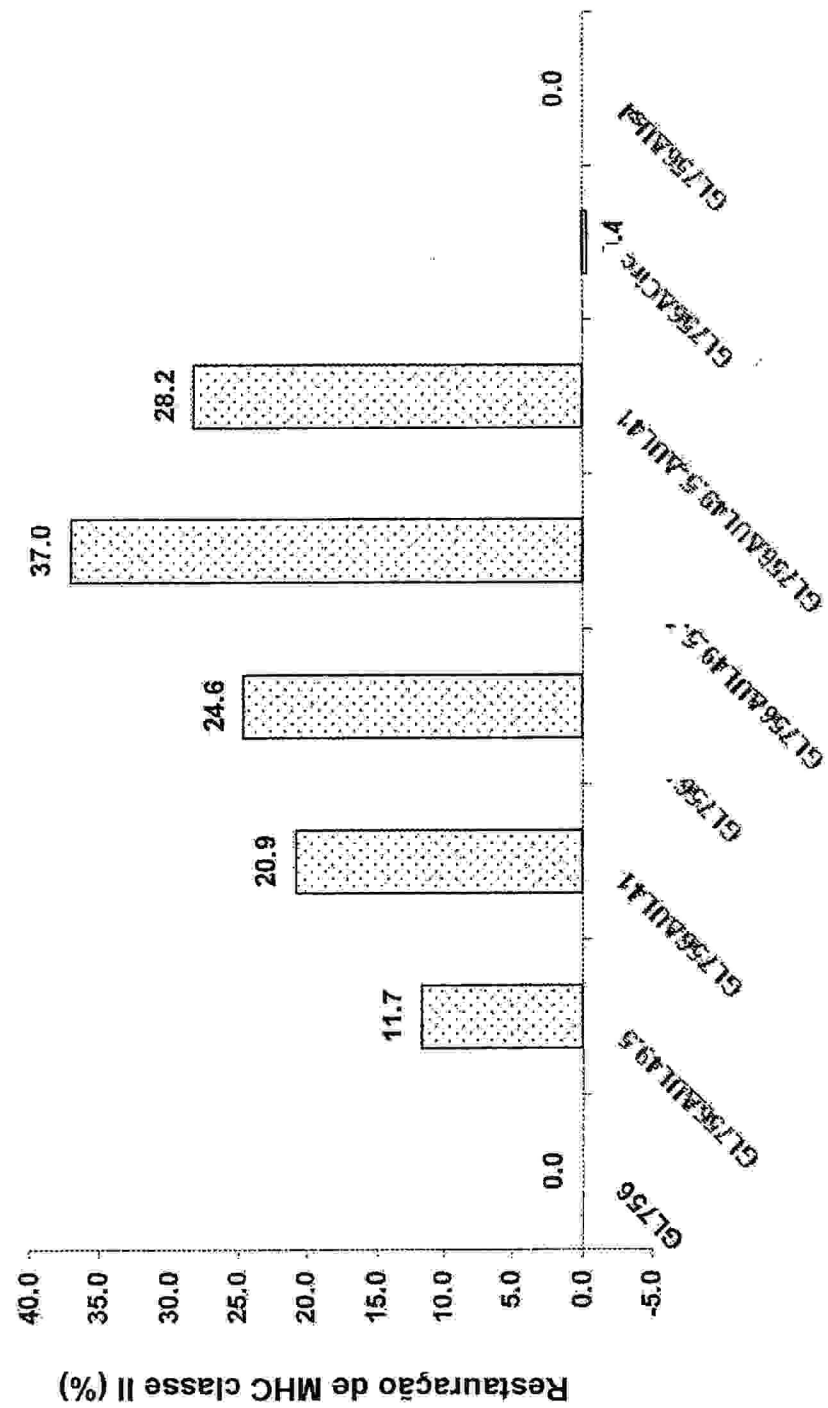


Figura 29

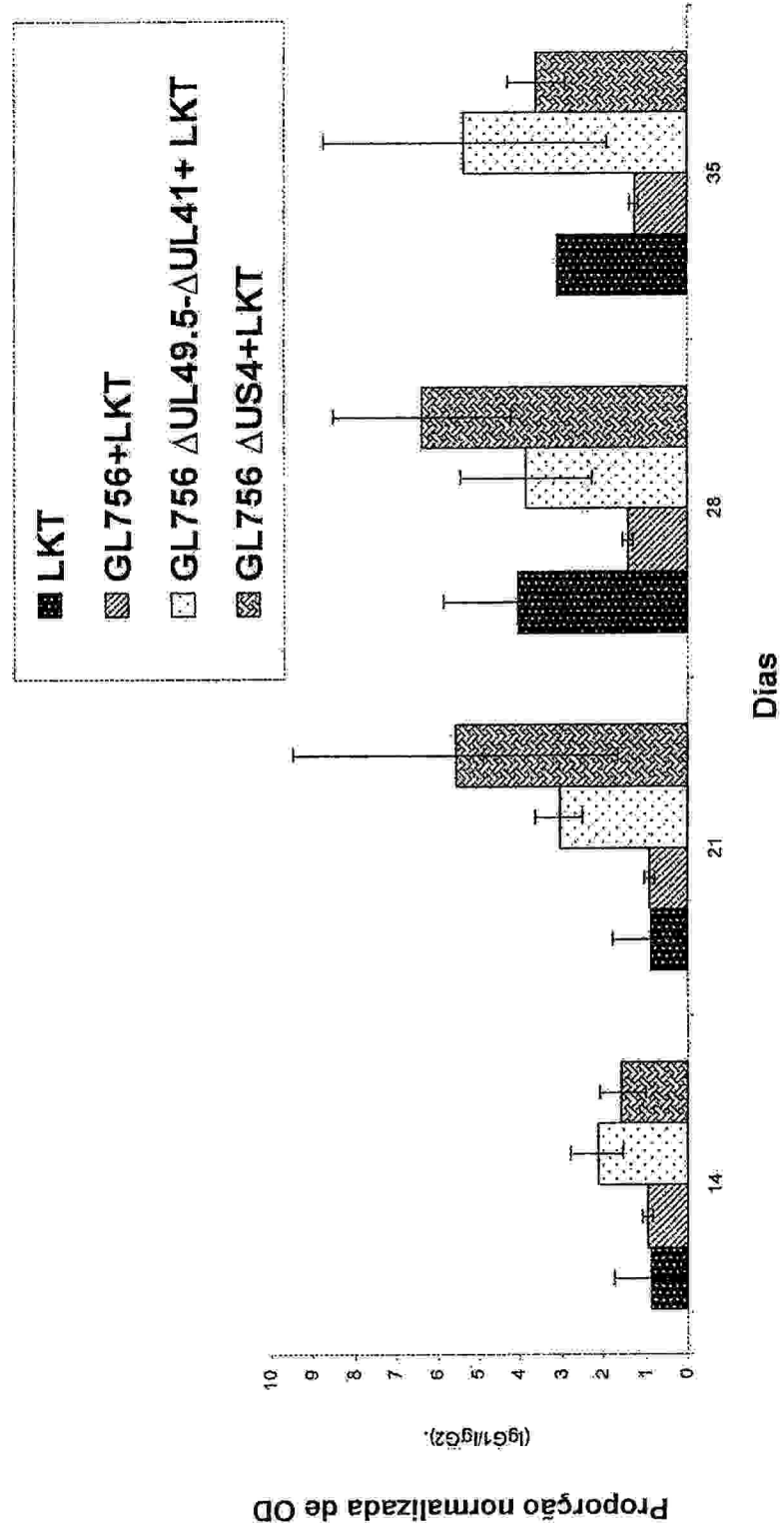


Figura 30

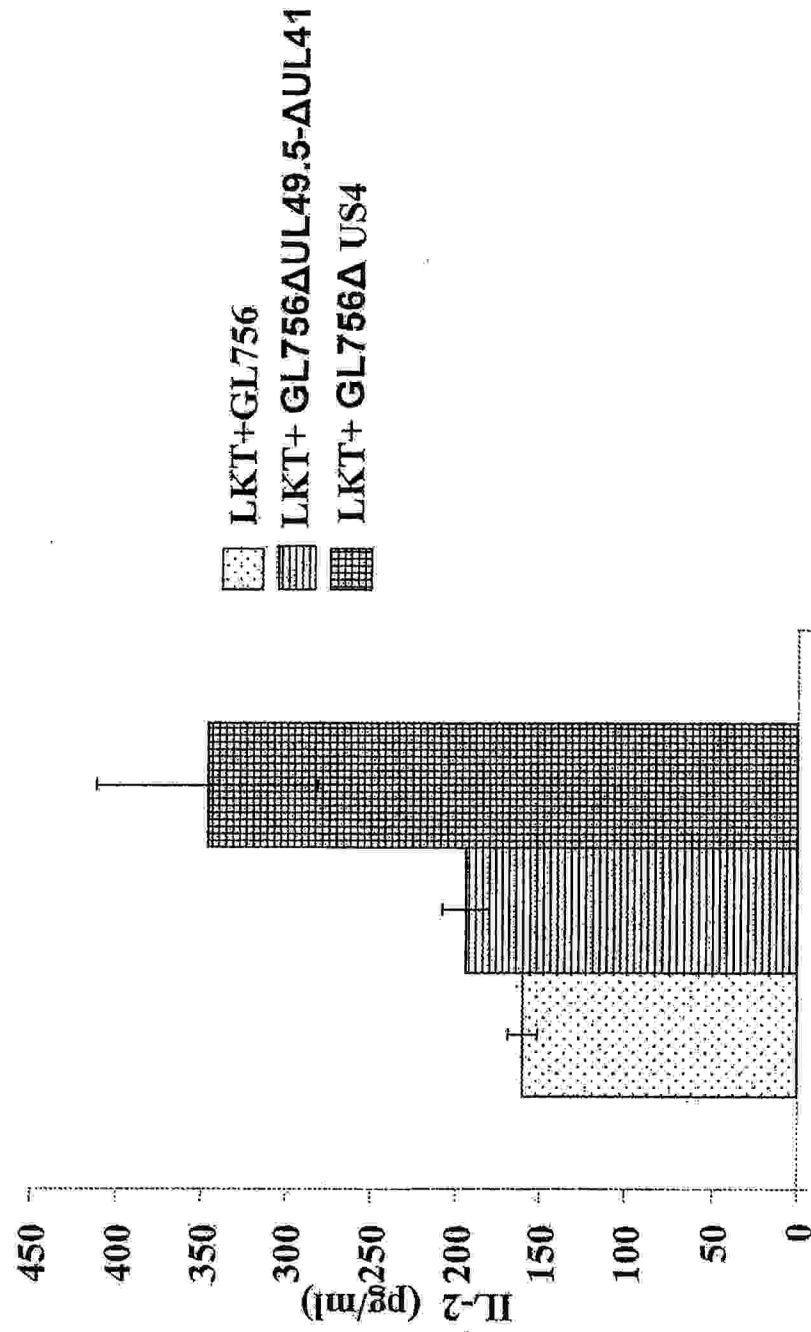


Figura 31

RESUMO

“VÍRUS DO HERPES BOVINO-1 VIVO, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM UM HOSPEDEIRO, E, USO DE VÍRUS DO HERPES BOVINO-1 VIVO”

5 A descrição geralmente se refere ao tratamento ou prevenção de doença em gado. Mais particularmente, a invenção é dirigida à produção e uso de vírus do herpes bovino 1 (BHV-1) modificado e seu uso em composições e vacinas que protegem gado de infecção por BHV-1 embora não suprimindo a resposta imunológica no hospedeiro. Em um exemplo, a
10 invenção é dirigida ao uso de BHV-1 modificado, administrado com imunógenos adicionais, ou através de co-administração e/ou através de administração em vacinas de combinação, e o uso destas vacinas para a proteção de gado de doença. Em um exemplo, uso do BHV-1 modificado nas composições administradas facilita uma resposta imune a ou contra os
15 imunógenos adicionais.

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

Código de Controle

Campo 1



EB707BDC04686BAF

Campo 2



B783F61AD5961440

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 110389e004.txt
- Data de Geração do Código: 12-08-2011
- Hora de Geração do Código: 10:11:12
- Código de Controle:
 - Campo 1: EB707BDC04686BAF
 - Campo 2: B783F61AD5961440