



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

(11) PI 0011733-1 B1

(22) Data do Depósito: 08/06/2000

(45) Data de Concessão: 28/03/2017



* B R P I 0 0 1 1 7 3 3 B 1 *

(54) Título: VACINA DE DNA-PCV

(51) Int.Cl.: C12N 15/00; A61K 39/12; A61P 3/00

(30) Prioridade Unionista: 10/06/1999 US 60/138,352

(73) Titular(es): MERIAL

(72) Inventor(es): JEAN-CHRISTOPHE FRANCIS AUDONNET; MICHEL BUBLOT; JENNIFER MARIA PEREZ; CATHERINE ELISABETH CHARREYRE

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VACINA DE DNA-PCV"**.

A presente invenção refere-se a construtos de plasmídeo codificando e expressando imunógenos de circovírus de porco (PCV para circovírus de Porco) responsáveis pela síndrome de PMWS (Síndrome de Emaciação Multissistêmica do porco ou Síndrome de Emaciação Multissistêmicas Pós-lactação), a métodos de vacinação e a vacinas de DNA, bem como a métodos de produção e formulação dessas vacinas. Todos os documentos citados aqui, e todos os documentos citados nos documentos citados aqui, são desse modo aqui incorporados a título de referência.

PCV foi originalmente detectado como um contaminante nonicítotopatógeno em tipos de célula de rim de porco PK/15. Esse vírus foi classificado dentre os circoviridae com o vírus da anemia de galinha (CAV para vírus da Anemia de Galinha) e o vírus PBFDV (Vírus da Doença do Bico e da Pena de Psitacina). Esses são vírus não-envelope pequenos (de a partir de 15 a 24 nm), cuja característica comum é conter um genoma na forma de um DNA de filamento simples circular de 1,76 a 2,31 kilobases (Kb). Foi primeiro imaginado que este genoma codificasse um polipeptídeo de cerca de 30 kDa (Todd e outros, Arch. Virol., 1991, 117:129-135). Trabalho recente no entanto mostrou uma transição mais complexa (Meehan B.M. e outros, J. Gen. Virol., 1997, 78:221-227). Além disso, nenhuma homologia significativa na sequência de nucleotídeo ou nos determinantes antigênicos comuns é conhecida entre as três espécies de circovírus conhecidas.

O PCV derivado de células PK/15 é considerado ser patogênico. Sua sequência é conhecida de B. Meehan e outros, J. Gen. Virol., 1997 (78) 221-227. Foi apenas recentemente que alguns autores imaginaram que os tipos de PCV pudessem ser patogênicos e estas associados à Síndrome de PMWS (G.P.S. Nayar e outros, Can. Vet. J., 1997, 38:385-387 e Clark E.G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997:499-501. Nayar e outros detectaram DNA e PCV e porcos tendo a síndrome de PMWS usando técnicas de PCR.

Anticorpos monoclonais e policlonais direcionados contra circovírus encontrados em porcos tendo os sintomas da síndrome de PMWS foram

capazes de mostrar diferenças entre esses circovírus e o circovírus de porco isolado da cultura de células de PK/15 (Allan G.M. e outros, Vet. Microbiol., 1999, 66:115-123).

A síndrome de PMWS detectada no Canadá, nos Estados Unidos e na França é clinicamente caracterizada por uma perda gradual de peso e por manifestações tal como taquipnéia, dispnéia e icterícia. Do ponto de vista patológico, ela é manifestada por infiltrações linfocíticas ou granulomatosas, linfadenopatias e mais raramente, por hepatite e nefrite linfocítica ou granulomatosa. (Clarck E.G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac., 1997:499-501; La Semaine Vétérinaire No. 26, Supplement to La Semaine Vétérinaire 1996 (834); La Semaine Vétérinaire 1997 (857):54, G.P.S. Nayer e outros, Can. Vet. J., 1997, 38:385-387).

Esses circovírus obtidos de América do Norte e da Europa são proximamente relacionados, com um grau de identidade de mais de 96% da sua sequência de nucleotídeo, enquanto que o grau de identidade é menos de 80% quando as sequências de nucleotídeo desses circovírus são comparadas com aquela de circovírus de porco isolados de células PK-15. Desse modo, dois subgrupos virais foram propostos, PCV-2 para os circovírus associados à Síndrome de PMWS e PCV-1- para os circovírus isolados das células PK-15 (Meeham B.M. e outros. J. Gen. Virol., 1998, 79:2171-2179; WOA-9918214).

A requerente verificou que os construtos de plasmídeo codificando e expressando imunógenos de PCV-2 podem ser usados para imunizar porcos contra a síndrome de PMWS.

Os imunógenos de PCV-2 podem ser usados em combinação com imunógenos de PCV-1 para também imunizar esses animais contra PCV-2.

De acordo com um modo menos preferido, os imunógenos de PCV-1 podem ser usados sozinhos.

O objeto da presente invenção são construtos de plasmídeo codificando e expressando um imunógeno de PCV-1 ou PCV-2, em particular as estruturas de leitura aberta (ORFs) 1 e/ou 2 para PCV-1 e ORFs 1 e/ou 2

para PCV-2 (ORF significa Estrutura de Leitura Aberta).

É evidente que a invenção automaticamente cobre os plasmídeos codificando e expressando seqüências de nucleotídeo equivalentes, isto quer dizer que as seqüências que não mudam nem a funcionalidade
5 nem a especificidade da cepa (a saber cepa do tipo 1 e cerca do tipo 2) do gene considerado ou aqueles dos polipeptídeos codificados por esses genes. As seqüências que diferem pela degeneração do código serão incluídas, com certeza.

As seqüências de PCV-2 usadas nos exemplos são derivadas
10 de Meehan e outros, supra (Strain Imp. 1010; ORF1 nucleotides 398-1342; ORF2 nucleotides 1381-314; e correspondem respectivamente a ORF4 e ORF3 na US 09/161.092 de 25 de setembro de 1998 e a COL4 e COL13 no WO-A-9918214). Outras cepas de PCV-2 e suas seqüências foram publicadas no WO-A-9918214 e chamadas Imp1008, Imp999, Imp1011-48285 e
15 Imp1011-48121, bem como em A.L. Hamel e outros, J. Virol., junho de 1998, vol. 72, 6:5262-5267 (GenBank AF027217) e em I. Morozov e outros, J. Clinical Microb., setembro de 1998, vol. 36, 9:2535-2541, bem como GenBank AF 086834, AF086835 e AF086836, e dá acesso às seqüências ORF equivalentes.

20 A invenção também engloba as seqüências equivalentes no sentido que elas são também capazes de hibridizar para a seqüência de nucleotídeo do gene considerado sob condições de alta estrigência. Dentre as seqüências equivalentes podem ser também mencionados os fragmentos de gene que conservam a imunogeneidade da seqüência completa.

25 A homologia do genoma completa dos tipos 1 e 2 entre eles é de cerca de 75%. Para ORF1, é de cerca de 86% e para ORF2, cerca de 66%. Do contrário, homologia entre genomas e entre ORFs dentro do tipo 2 está geralmente acima de 95%.

São também seqüências equivalentes de acordo com a presente
30 invenção, para ORF1, aquelas seqüências tendo uma homologia igual ou maior do que 98%, em particular maior do que 90%, de preferência maior do que 92% ou 95% com ORF1 da cepa Imp1010, e para ORF2, essas se-

qüências tendo uma homologia igual a ou maior do que 80%, em particular, maior do que 85%, de preferência maior do que 90% ou 95% com ORF2 da cepa Imp1010.

ORF1 e ORF2 de acordo com Meehan 1998 têm o potencial de
 5 codificar proteínas com pesos moleculares previstos de 37,7 kD e 27,8 kD, respectivamente, ORF3 e ORF4 (de acordo com Meehan e outros, correspondem a ORF7 e ORF10, respectivamente, no WO-A-9918214) têm o potencial de codificar proteínas com pesos moleculares previstos de 11,9 e 6,5 kD, respectivamente. A seqüência dessas ORFs está também disponível no
 10 GenBank AF055392. Elas podem ser também incorporadas a plasmídeos e ser usadas de acordo com a invenção sozinhas ou em combinação, por exemplo, com ORF1 e/ou ORF2.

As outras ORFs 1-3 e 5, 6, 8-9, 11-12 descritas na US
 09/161.092 de 25 de setembro de 1998 (COLs 103 e 5, 6, 8-9, 11-12 no WO-
 15 A-9918214), podem ser usadas sob as condições descritas aqui, em combinação ou de outro modo com cada uma ou com as ORFs 1 e conforme aqui definido.

Isto também compreende o uso de seqüências equivalentes na
 tendência dada acima, em particular aquelas ORFs que vêm de vários tipos
 20 de PCV-2 citados aqui. Quanto à homologia, uma pessoa pode dizer com exatidão que são equivalentes àquelas seqüências que vêm de um tipo de PCV tendo uma ORF2 e/ou uma ORF1 que tem uma homologia conforme acima definido com a ORF da cepa 1010. Para ORFs de acordo com Meehan, pode ser também dito que a homologia tem que ser, por exemplo,
 25 igual ou maior do que 80%, em particular, maior do que 85%, de preferência maior do que 90% ou 95%, com ORF3 do tipo 1010. Para a ORF de acordo com Meehan, 1998, ela pode ser igual ou maior do que 86%, em particular maior do que 90%, de preferência maior do que 95% com ORF4 da cepa Imp1010.

30 A partir da seqüência de nucleotídeo genômica, por exemplo, aquelas descritas no WO-A-18214, é rotina na técnica determinar as ORFs usando um software padrão, tal como MacVector®. Também, alinhamento

dos genomas com aquele do tipo 1010 e comparação com as ORFs da cepa 1010 permite que uma pessoa versada na técnica determine imediatamente as ORFs no genoma para outra cepa (por exemplo, aquelas descritas no WO-A-99.18214). Usar um software ou fazer alinhamento não é experimenta-
5 tação indevida e dá acesso direto a ORFs equivalentes.

A palavra plasmídeo é aqui pretendida englobar qualquer unidade de transcrição de DNA na forma de uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência de PCV a ser expressa e os elementos necessários para a sua expressão *in vivo*. A forma de plasmídeo circular, superespiralada ou outra, é preferida. A forma linear está também incluída no escopo da invenção.
10

O objeto da presente invenção são mais particularmente os plasmídeos chamados pJP 109 (contendo o gene de ORF2 do PCV-2, Figura 1), pJP 111 (contendo o gene de ORF1 do PCV-2, Figura 1), pJP 120
15 (contendo o gene da ORF2 do PCV-1, Figura 3) e pJP 121 (contendo o gene de ORF1 do PCV-1, Figura 4).

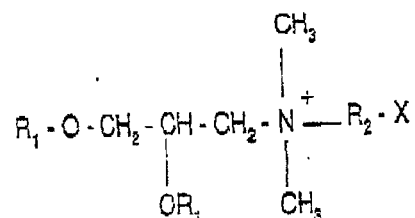
Cada plasmídeo compreende um promotor capaz de assegurar, nas células hospedeiro, a expressão do gene inserido sob seu controle. Ele é em geral um promotor eucariótico forte e em particular um promotor inicial
20 de citomegalovírus CMV-IE, de origem humana ou de murino, ou opcionalmente, de outra origem tal como rato ou porquinho-da-índia. Mais comumente, o promotor é ou de origem viral ou de origem celular. Como um promotor viral que não CMV-IE, pode ser mencionado o promotor inicial ou final do vírus SV40 ou o promotor LTR do vírus Rous Sarcoma. Ele pode ser
25 também um promotor do vírus a partir do qual o gene é derivado, por exemplo, o promotor específico para o gene. Como promotor celular, pode ser mencionado o promotor de um gene e citoesqueleto, tal como, por exemplo, o promotor de desmina, ou alternativamente, o promotor de actina. Quando vários genes estão presentes no mesmo plasmídeo, eles podem ser providos
30 na mesma unidade de transcrição ou em duas unidades diferentes.

Os plasmídeos podem também compreender outros elementos de regulação de transcrição, tal como, por exemplo, sequências de estabi-

lização do tipo íntron, de preferência íntron II do gene β -globina de coelho (van Ooyer e outros, Science, 1979, 206:337-344), seqüência de sinal da proteína codificada pelo gene ativado de plasminogen de tecido (tPA; Montgomery e outros, Cell. Mol. Biol., 1997, 43:285-292) e o sinal de poliadenila-
 5 ção (poliA), em particular do gene do hormônio do crescimento bovino (bGH) (US-A-5.122.458) ou do gene β -globina de coelho.

O objeto da presente invenção são também preparações imunogênicas e vacinas de DNA compreendendo pelo menos um plasmídeo de acordo com a invenção, codificando e expressando um dos imunógenos
 10 PCV-1 ou PCV-2, de preferência uma das ORFs acima mencionadas em adição a um veículo ou diluente veterinariamente aceitável, com opcionalmente, em adição, um adjuvante veterinariamente aceitável.

O objeto da presente invenção são mais particularmente preparações e vacinas imunogênicas contendo pelo menos um plasmídeo codifi-
 15 cando e expressando um dos imunógenos de PCV-1 e PCV-2, composições formuladas com uma adjuvante, em particular um lipídeo catiônico contendo um sal de amônio quaternário da fórmula



em que R_1 é um radical alifático linear saturado ou insaturado tendo de a partir de 12 a 18 átomos de carbono, R_2 é um outro radical alifático compre-
 20 endendo de a partir de 2 a 3 átomos de carbono e X é um grupo hidroxila ou amino.

De preferência, ele é DMRIE (N-(2-hidroxiethyl)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradecilóxi)-1-propanolamônio, WO-A-9634109) e de preferência aco-
 25 plado a um lipídeo neutro, por exemplo, de preferência DOPE (dioleilfosfatidiletanoamina), para formar DMRIE-DOPE. De preferência, a mistura de plasmídeo com este adjuvante é feita imediatamente antes do uso e de preferência, antes da sua administração ao animal, a mistura desse modo produzida é deixada formar para um complexo, por exemplo, durante um perío-

do variando de a partir de 10 a 60 minutos, em particular da ordem de 30 minutos.

Quando DOPE está presente, a razão molar de DMRIE:DOPE varia de preferência de a partir de 95:5 a 5:95, mais particularmente 1:1.

- 5 A razão em peso de plasmídeo:DMRIE ou DMRIE-adjuvante DOPE pode variar em particular de a partir de 50:1 a 1:10, em particular de a partir de 10:1 a 1:5, de preferência de a partir de 1:1 a 1:2.

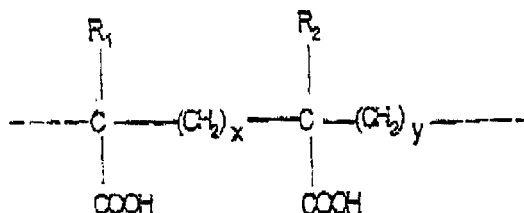
De acordo com um outro modo vantajoso da invenção, é possível usar, como adjuvante, um composto adjuvante selecionado de polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e os copolímeros de anidrido maléico e de derivados alquenila. Os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico reticulados em particular com éteres de polialquenila de açúcares ou de poliálcoois são preferidos. Esses compostos são conhecidos pelo termo carbômero (Pharmaeuropa. Vol. 8, Nº. 2, junho de 1996). Pessoas versadas na técnica podem também se referir à USA-2.909.462 (incorporada aqui a título de referência) que descreve polímeros acrílicos reticulados com um composto poliidroxilado tendo pelo menos 3 grupos hidroxila, de preferência não mais do que 8, os átomos de hidrogênio de pelo menos três hidroxilas sendo substituídos com radicais alifáticos insaturados tendo pelo menos 2 átomos de carbono. Os radicais preferidos são aqueles contendo 2 a 4 átomos de carbono, por exemplo, vinilas, alilas e outros grupos etilenicamente insaturados. Os radicais insaturados podem por si só conter outros substituintes, tal como metila. Os produtos vendidos sob o nome Carbopol® (GF Goodrich, Ohio, USA), são particularmente apropriados. Eles são reticulados com uma alil sacarose ou com alilpentaeritritol. Dentre eles, podem ser mencionados o Carbopol® 974P, 934P e 971P.

10
15
20
25

Dentre os copolímeros de anidrido maléico e de um derivado de alquila, os EMAs® (Monsanto) são preferidos, os quais são copolímeros de anidrido maléico e etileno, lineares, ou ramificados, por exemplo, reticulados com éter de divinila. Referência pode ser feita a J. Fields e outros, Nature 186:778-780, 4 de junho de 1960 (incorporado aqui a título de referência). A partir do ponto de vista da sua estrutura, os polímeros de ácido acrílico ou

30

metacrílico e os EMAs® consistem de preferência em unidades básicas da fórmula que segue:



em que:

-R₁ e R₂, que são iguais ou diferentes, representam H ou CH₃

5 -x = 0 ou 1, de preferência x=1

-y = 1 ou 2; com x + y = 2

Para os EMAs®, x = 0 e y = 2. Para os carbômeros, x = y = 1.

A dissolução desses polímeros em água leva a uma solução ácida que será neutralizada, de preferência para pH fisiológico, para dar a
10 solução adjuvante à qual a vacina real será incorporada. Os grupos carboxila do polímero estão então particularmente na forma COO⁻.

Para este tipo de adjuvante, é preferível preparar uma solução do adjuvante, em particular do carbômero, em água destilada, de preferência na presença de cloreto de sódio, a solução obtida estando em pH ácido.
15 Esta solução de estoque é diluída através da adição a ela da quantidade necessária (a fim de se obter a concentração final desejada, ou uma parte substancial dela), de água carregada com NaCl, de preferência solução salina fisiológica (NaCl 9 g/l), em uma ou mais porções com neutralização concomitante ou subsequente (pH 7,3 a 7,4), de preferência com NaOH. Esta
20 solução em pH fisiológico será usada como é para misturar com o plasmídeo, em particular armazenada na forma liofilizada, líquida ou congelada.

A concentração de polímero na composição de vacina final será de 0,01% a 2% p/v, mais particularmente 0,06 a 1% p/v, de preferência 0,1 a 0,6% p/v.

25 Em uma modalidade específica, a preparação imunogênica ou de vacina compreende um plasmídeo ou uma mistura de plasmídeos codificando e expressando ORF1 e ORF2 de PCV-2.

A invenção também provê a combinação da vacinação contra o

circovírus de porco bom uma vacinação contra outros patógenos de porco, em particular aqueles que podem estar associados à síndrome do PMWS. A título de exemplo, uma pessoa pode citar: vírus da doença Aujeszky, vírus da gripe do porco, PRRS, parvovírus suíno, vírus do cólera hog, *Actinobacillus* pleuropneumonia.

O objeto da presente invenção são desse modo misturas de plasmídeos contendo pelo menos um plasmídeo de acordo com a invenção e pelo menos um outro plasmídeo codificando e expressando um imunógeno de porco, selecionado, por exemplo, do grupo consistindo em glicoproteínas gB e gD do vírus da doença de Aujeszky (vírus da pseudo-raiva ou PRV), a hemaglutinina e a nucleoproteína do vírus da gripe do suíno H1N1, a hemaglutinina e a nucleoproteína do vírus da gripe do suíno H3N2, os genes de ORF5 e ORF3 do vírus PRRS das cepas Lelystada e Americanas, a proteína VP2 do parvovírus suíno, as proteínas E1 e E2 do vírus do cólera hog (HCV) e genes apxI, apxII e apxIII deletados do *Actinobacillus pleuropneumoniae* (vide quanto aos plasmídeos, por exemplo, o WO-A-9803658).

Essas misturas de plasmídeos são tomadas em um veículo ou diluente veterinariamente adequado, com opcionalmente, em adição, um adjuvante veterinariamente adequado conforme acima descrito, desse modo formando preparações imunogênicas ou vacinas de DNA multivalentes. Essas preparações ou vacinas multivalentes podem em particular ser vantajosamente formuladas com um lipídeo catiônico conforme acima descrito, em particular DMRIE, e de preferência acopladas a um lipídeo neutro, DOPE, para formar o DMRIE-DOPE.

As preparações ou vacinas de DNA monovalentes ou multivalentes de acordo com a invenção formuladas ou de outro modo com um adjuvante conforme acima descrito, podem ser também vantajosamente suplementadas com uma citocina, de preferência de origem suína, em particular GM-CSF de porco. Esta adição de GM-CSF de porco (granulócito-macrófago – fator de estimulação de colônia; Clark S.C. e outros, Science 1987, 230:1229; Grant S.M. e outros, Drugs, 1992, 53:516) pode ser realizada em particular através da incorporação à preparação ou à vacina ou da

proteína GM-CSF de porco ou um plasmídeo codificando e expressando o gene GM-CSF de porco (Inumaru S. e Takamatsu H. Immunol. Cell. Biol., 1995, 73:474-476). De preferência, o gene GM-CSF de porco é inserido em um plasmídeo diferente daqueles que codificam os imunógenos de PCV ou outros imunógenos de porco.

Em particular, o plasmídeo que codifica e expressa o GM-CSF de porco pode ser o plasmídeo pJP58 (Figura 5).

As preparações imunogênicas e as vacinas de DNA monovalentes e multivalentes de acordo com a invenção podem ser também combinadas com pelo menos uma vacina convencional (vida atenuada, inativada ou subunidade) ou vacina recombinante (vetor viral) direcionado contra pelo menos um patógeno de porco que seja diferente ou idêntico. A invenção provê em particular a combinação com vacinas convencionais contendo adjuvante (vida atenuada, inativada ou subunidade). Para as vacinas inativadas ou de subunidade, podem ser mencionados aqueles contendo em particular gel de alumina sozinho ou misturado com saponina como adjuvante, ou aqueles formulados na forma de uma emulsão óleo-em-água.

O objeto da presente invenção é também um método de imunização que torna possível induzir uma resposta imune em porcos com relação a circovírus de acordo com a invenção. Seu objeto é em particular um método de vacinação que seja eficaz em porcos. Esses métodos de imunização e vacinação compreendem a administração de uma das preparações ou de uma das vacinas de DNA monovalentes e multivalentes conforme acima descrito. Esses métodos de imunização e vacinação compreendem a administração de uma ou mais doses sucessivas dessas preparações ou vacinas de DNA. As preparações e vacinas de DNA podem ser administradas, no contexto deste método de imunização ou de vacinação, através de várias vias de administração propostas na técnica anterior para vacinação de polinucleotídeo, em particular as vias intramuscular e intradermal, e por meio de técnicas de administração conhecidas, em particular injeções com uma seringa tendo uma agulha, através de jato líquido (Furth e outros, Analytical Bioch., 1992, 205: 365-368) ou através de projeção de partículas de ouro

revestidas com DNA (Tang e outros, Nature, 1992, 356:152-154).

Este método não apenas permite a administração a porcos adultos, mas também a mais novos e fêmeas grávidas; no último caso, isto torna possível, em particular, conferir imunidade passiva aos recém-nascidos (anticorpos maternos). De preferência, porcos fêmea são inoculadas antes da procriação; e/ou antes de servir, e/ou durante a gestação. Vantajosamente, pelo menos uma inoculação é feita antes do acasalamento e ela é de preferência seguida por uma inoculação a ser realizada durante a gestação, por exemplo, pelo meio da gestação (em cerca de 6-8 semanas de gestão) e/ou no final da gestação (cerca de 11-13 semanas de gestação). Desse modo, um regime vantajoso é uma inoculação antes do acasalamento e uma inoculação de aumento durante a gestação. Em seguida, pode haver reinoculação antes de cada acasalamento e/ou durante a gestação, pelo meio da gestação e/ou no final da gestação. De preferência, reinoculações são durante a gestação.

Leitões, tal como leitões de fêmeas vacinadas (por exemplo, inoculados conforme aqui anteriormente discutido), são inoculados dentro das primeiras semanas de vida, por exemplo, inoculação em uma e/ou duas e/ou três e/ou quatro e/ou cinco semanas de vida. De preferência, leitões são primeiro inoculados dentro da primeira semana de vida ou dentro da terceira semana de vida (por exemplo, na hora do desmame). Vantajosamente, tais leitões são então impulsionados para crescer de duas a quatro semanas mais tarde.

A quantidade de DNA usado nas vacinas de acordo com a presente invenção está entre cerca de 10 µg e cerca de 2000 µg, e de preferência entre cerca de 50 µg e cerca de 1000 µg. Pessoas versadas na técnica terão competência necessária para definir com precisão a dose eficaz de DNA a ser usada para cada protocolo de imunização ou vacinação.

Os volumes de dose podem estar entre 0,5 e 5 ml, de preferência entre 2 e 3 ml.

Um método preferido de imunização ou de vacinação consiste na administração das vacinas de DNA, de acordo com a invenção através da

via intramuscular.

A invenção será agora descrita em mais detalhe com ao auxílio de modalidades exemplares não-limitantes, tomada com referência ao desenho, em que:

- 5 Figura 1: plasmídeo pJP109
- Figura 2: plasmídeo pJP111
- Figura 3: plasmídeo pJP120
- Figura 4: plasmídeo pJP121
- Figura 5: plasmídeo pJP058
- 10 Listagem de seqüência SEQ ID
- SEQ ID NO. 1: oligonucleotídeo JP779
- SEQ ID NO. 2: oligonucleotídeo JP780
- SEQ ID NO. 3: oligonucleotídeo JP781
- SEQ ID NO. 4: oligonucleotídeo JP782
- 15 SEQ ID NO. 5: oligonucleotídeo JP783
- SEQ ID NO. 6: oligonucleotídeo JP784
- SEQ ID NO. 7: oligonucleotídeo JP785
- SEQ ID NO. 8: oligonucleotídeo JP786
- SEQ ID NO. 9: oligonucleotídeo RG972
- 20 SEQ ID NO. 10: oligonucleotídeo RG973

EXEMPLOS

As cepas de PCV-2 úteis para clonagem de ORFs são por exemplo cepas depositadas no ECACC e tendo os números de acesso V97100219 (Imp1008), V97100218 (Imp1010) e V97100217 (Imp999) (que
25 são depositados em 2 de outubro de 1997), V98011608 (Imp1011-48285) e V98011609 (Imp1011-48121) (que foram depositados em 16 de janeiro de 1998).

Esses exemplos são construídos usando a cepa Imp1010. Uma pessoa versada na técnica é capaz de adaptar o processo a outras cepas de
30 PCV-2.

Exemplo 1. Construção do plasmídeo pJP109

O plasmídeo pGEM7Z-Imp1010 Stoon-EcoRI N^o. 14 contendo o

genoma do vírus PCV-1 na forma de um fragmento de EcoRI (B. Meehan e outros, J. Gen. Virol. 1998, 79 2171-2179) foi digerido com EcoRI a fim de isolar, após a eletroforese de gel de agarose, o fragmento de EcoRI-EcoRI de 1768 pares de base (pb). Este fragmento era autoligado.

5 O gene ORF2 da cepa do vírus PCV-2 1010-Stoon (B. Meehan e outros, J. Gen. Virol. 1998, 79. 2171-2179; acesso de seqüência ao GenBank No. AF055392) foi simplificado, usando o molde consistindo no fragmento de EcoRI-EcoRI autoligado, através de técnica de redução de cadeia de polimerase (CR) com os oligonucleotídeos que seguem: JP779
10 (SEQ ID NO.1) (35 mero):

5'CATCATCATGTCGACATGACGTATCCAAGGAGGCG3

e JP780 (SEQ ID NO.2) (36 mero):

5'TACTACTACAGATCTTTAGGGTTTAAGTGGGGGGTTC3

a fim de gerar um fragmento de PCR de 730 pb. Este fragmento foi digerido
15 com Sall e BglII a fim de isolar, após eletroforese de gel de agarose, o fragmento de restrição de Sall-BglII de 715 pb. Este fragmento foi então ligado com o plasmídeo pVR1012 (Hartikka J. e outros, Human Gene Therapy. 1996. 7. 1205-1217), digerido de antemão com Sall e BglI, para dar o plasmídeo pJP109 (5567 pb) (Figura 1).

20 Exemplo 2: Construção do plasmídeo pJP111

Uma reação de cadeia de polimerase foi realizada com o plasmídeo pGem7Z-Imp1010-Stoon (vide Exemplo 1) (B. Meehan e outros, J. Gen. Virol. 1998, 79. 2171-2179) e os oligonucleotídeos que seguem:

JP781 (SEQ ID NO.3) (35 mero):

25 5'CATCATCATGTCGACATGCCCAGCAAGAAGAATGG3'

e JP782 (SEQ ID NO.4) (36 mero):

5'TACTACTACAGATCTTCAGTAATTTATTTTCATATGG3'

a fim de gerar um fragmento de PCR de 970 pb contendo o gene ORF1 do vírus PCV-2. Este fragmento foi digerido com Sall e BglI a fim de isolar, após
30 eletroforese de gel de agarose, o fragmento de restrição Sall-BglII de 955 pb. Este fragmento foi então ligado com o plasmídeo pVR1012 (Exemplo 1) para dar o plasmídeo pJP111 (5810 pb) (Figura 2).

Exemplo 3: Construção do plasmídeo pJP120 (ORF2 de PCV-1)

Uma reação de cadeia de polimerase foi realizada com o plasmídeo pPCV (B. Meehan e outros, J. Gen. Virol. 1997. 78. 221-227) e os oligonucleotídeos que seguem;

5 JP783 (SEQ ID NO. 5) (35 mero):

5'CATCATCATGTCGACATGACGTGGCCAAGGAGGCG3'

e JP784 (SEQ ID NO.6) (40 mero):

5'TACTACTACAGATCTTTATTTATTTAGAGGGTCTTTTAGG3'

a fim de gerar um fragmento de PCR de 730 pb contendo o gene ORF2 do
10 vírus PCV-1 (cepa PK-15, No. de acesso da seqüência no GenBank U49186). Este fragmento foi digerido com Sall e BglII a fim de isolar, após eletroforese de gel de agarose, o fragmento de restrição de SALL-BglII de 715 pb. Este fragmento foi então ligado com o plasmídeo pVR1012 (Exemplo 1) para dar o plasmídeo pJP120 (5565 pb); (Figura 3).

15 Exemplo 4: Construção do plasmídeo pJP121 (ORF1 de PCV-1)

O PVC1 de plasmídeo contendo o genoma do vírus PCV1 na forma de um fragmento de PstI (B. Meehan e outros, J. Gen. Virol., 1997, 78, 221-227) foi digerido com PstI a fim de isolar, após eletroforese de gel de agarose, o fragmento PstI-pstI de 1759 pares de base (pb). Este fragmento
20 era autoligado.

O gene ORF1 da cepa do vírus PCV-1 PK-15 (B. Meehan e outros, J. Gen. Virol., 1997, 78, 221-227; N° de acesso da seqüência no GenBank U49186) foi amplificado, usando o molde consistindo no fragmento PstI-PstI autoligado, através de técnica de reação de cadeia de polimerase
25 (PCR) com os oligonucleotídeos que seguem:

JP785 (SEQ ID NO.7) (35 mero);

5'CATCATCATGTCGACATGCCAAGCAAGAAAAGCGG3'

e JP786 (SEQ ID NO.8) (36 mero);

5'TACTACTACAGATCTTCAGTAATTTATTTTATATGG3'

30 a fim de gerar um fragmento de PCR de 965 pb contendo o gene ORF1 do vírus PCV-1 (cepa PK-15). Este fragmento foi digerido com o Sall e BglII a fim de isolar, após eletroforese de gel de agarose, o fragmento de restrição

Sall-BglII de 946 pares de base. Este fragmento foi então ligado a um plasmídeo pVR1012 (Exemplo 1) para dar o plasmídeo pJP121 (5804 pb) (Figura 4).

Exemplo 5: Construção do plasmídeo pJP058 (expressando GM-CSF de porco)

Sangue de porco foi coletado em um tubo contendo EDTA tomando o sangue da veia jugular. As células mononucleadas foram colhidas através de centrifugação em um gradiente Ficoll e então cultivadas *in vitro* em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL) e estimuladas através da adição de concanavalina A (Sigma) em uma concentração final de cerca de 5 µg/ml no meio de cultura. Após 72 horas de estimulação, os linfoblastos foram colhidos e então RNA total dessas células foi extraído com o kit de extração "Micro-Scals Total RNA Separator Kit". (Clontech) seguindo as recomendações do fabricante. Uma reação de transcrição reversa, realizada com o auxílio

do kit "1st –Strand cDNA Synthesis Kit" (Perkin Elmer), seguido por uma reação de cadeia de polimerase, foi realizada no RNA total extraído desses linfoblastos de porco com os oligonucleotídeos que seguem:

RGS72 (33 mero): (SEQ ID NO.9)
5'TATGCGGCCGCCACCATGTGGCTGCAGAACCTG3"

e RG973 (34 mero): (SEQ ID NO. 10)

5'TATGCGGCCGCTACGTATCACTTCTGGGCTGGTT3'

a fim de gerar um fragmento de PCR de cerca de 450 pares de base (pb). Este fragmento foi digerido com NotI a fim de isolar, após eletroforese de gel de agarose, o fragmento NotI-NotI de 450 pb. Este fragmento foi então ligado com o plasmídeo pVR1012 (Exemplo 1), de preferência digerido com NotI e desfosforilado para dar o plasmídeo pJP058 (5405 pb) (Figura 5). A sequência do gene pGM-CSF clonado no plasmídeo pJP058 foi checada e verificada ser idêntica àquela disponível nos dados do GenBank (Nº. de acesso D21074).

Exemplo 6: Produção dos plasmídeos purificados para a vacinação de porcos

Bactérias *Escherichia coli* K12 (cepas DH10B ou SCS1) foram

transformadas com os plasmídeos pJP109, pJP111, pJP058, pJP120 e pJP121 dos Exemplos 1 a 5 supra. Os cinco clones transformados obtidos respectivamente com esses cinco plasmídeos foram então postos em cultura separadamente, com agitação a +37°C, em meio Luria-Broth (LB). As culturas de bactéria foram coletadas no final da fase exponencial e os plasmídeos foram extraídos de acordo com a técnica de lise alcalina. Os plasmídeos extraídos foram então purificados em um gradiente de cloreto de cério de acordo com a técnica descrita por Sambrook e outros (Molecular Biology: A Laboratory Manual, 2ª edição, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Após extração final do brometo de etídeo e precipitação na presença de etanol absoluto, os plasmídeos purificados foram ressuspensos em tampão TE (1 mM de Tris/EDTA, pH 8,0) a fim de se obter soluções de matéria-prima contendo 2 mg de plasmídeo por ml. Essas soluções de matéria-prima são armazenadas a -20°C antes do uso.

Exemplo 7: Controle da expressão de ORF1 e 2 do vírus PCV-2

A fim de controlar os produtos de expressão dos genes ORF2 de PCV-2 e ORF1 de PCV-2, clonados respectivamente nos plasmídeos pJP109 e pJP111, esses plasmídeos foram transfectados em células de CHO-K1 (Ovário de Hamster Chinês) (ATCC No. CCL-61) com o kit de transfecção Lipofectamina Plus® (Gibco-BRL, Nº de catálogo 10964-013), seguindo as recomendações do fabricante para uso. 48 horas após transfecção, as células transfectadas são lavadas e fixadas com uma solução de acetona glacial a 95% por 3 minutos em temperatura ambiente. Cinco anticorpos monoclonais específicos para as proteínas de ORF1 de PCV-2 (F199 1D3GA) e F210 7G5GD) e proteínas de ORF2 (F190 4c&CF, P190 2B1BC e P190 3A8BC) foram usados como primeiros anticorpos. Um conjugado IgG anticumudongo, rotulado com Cy3, foi usado para revelar a rotulagem específica. Uma fluorescência específica de PCV-2 foi observada com os 3 monoclonais de ORF2 de PCV-2 nas células transfectadas com o plasmídeo pJP109, mas não naqueles transfectados com o plasmídeo pJP111. Em contraste, uma fluorescência específica de PCV-2 foi observada com os dois monoclonais de ORF1 de PCV-2 nas células transfectadas com o plasmídeo

pJP111, mas não naqueles transfectados com o plasmídeo pJP109. Nenhuma fluorescência foi detectada com os monoclonais PCV-2 nas células CHO transfectadas com o plasmídeo pVR1012 sozinho ou em células CHO não-transfectadas. O mesmo resultado de expressão foi obtido com um soro policlonal específico para o vírus PCV-2. Neste caso, um conjugado de IgG antiporco rotulado com fluoresceína foi usado para detectar a fluorescência específica. Nenhuma fluorescência foi detectada com este soro policlonal nas células CHO transfectadas com o plasmídeo pVR1012 sozinho ou nas células CHO não-transfectadas.

10 Exemplo 8: Vacinação de porcos com DNA exposto

8.1. Leitões de um dia de vida

Grupos de leitões obtidos através de cesariana em D0 do protocolo, são postos na unidade de isolamento. Esses leitões são vacinados na idade de 2 dias através de via intramuscular com várias soluções de vacina de plasmídeo. As soluções de vacina são preparadas através de diluição das soluções de estoque na solução salina fisiológica (NaCl a 0,9%).

Os leitões são vacinados:

ou com plasmídeo pJP109 sozinho

ou com as misturas dos plasmídeos pJP109 e pJP111

20 ou com a mistura dos plasmídeos pJP109 e pJP058

ou com a mistura dos plasmídeos pJP109, pJP111 e pJP058.

As soluções de vacina compreendem 500 µg de cada plasmídeo.

Volume: as soluções de vacina são injetadas por via intramuscular no volume total de 2 ml. Na prática, dada a idade dos leitões na vacinação (1-2 dias), 1 injeção de 1 ml é dada em cada lado do pescoço (= 2x1 ml).

Duas injeções de vacina são realizadas em intervalos de duas semanas, isto que dizer nos dias D2 e D14 do protocolo.

30 Um desafio é realizado no D21 do protocolo através de administração intranasal de uma suspensão viral de uma cepa de PCV-2 virulenta. Os leitões são então monitorados por 3 semanas quanto à aparência os si-

nais clínicos específicos da síndrome de enfraquecimento multissistêmico pós-desmame em leitões. Os sinais que são monitorados são:

Temperatura retal: medição diária para os primeiros 14 dias, então duas medições durante a terceira semana que segue o desafio.

5 Peso: medida de peso dos leitões um pouco antes do desafio então uma vez por semana durante as 3 semanas que seguem o desafio.

Coleta das amostras sanguíneas para testar a viremia e os anticorpos: amostras de sangue tomadas em D2, D14, D21, D28, D35 e D42.

Autopsia: no D42, os porcos sobreviventes são humanamente
10 mortos e sofrem autopsia para procurar por lesões anatomicopatológicas e fazer preparações histológicas do fígado, dos nós linfáticos, do baço, dos rins e do timo para procurar por lesões nesses tecidos.

8.2. Leitões de 5-7 semanas de vida

Leitões de 5 a 7 semanas de vida, não tendo mais anticorpos
15 maternais específicos para o vírus PCV-2 são vacinados por via intramuscular:

ou com o plasmídeo pJP109 sozinho,

ou com a mistura dos plasmídeos pJP109 e pJP111

ou com a mistura dos plasmídeos pJP109 e pJP058

20 ou com a mistura dos plasmídeos pJP109, pJP111 e pJP058

as doses das vacinas são as mesmas que aquelas indicadas no Exemplo 8.1 (500 µg por plasmídeo). As soluções de vacina são injetadas por via intramuscular em um volume de 2 ml (uma administração simples de 2 ml, nos músculos do pescoço).

25 Duas vacinações são realizadas em intervalos de 21 dias (D0 e D21). Um desafio é feito 14 após a última vacinação (D35) através de administração intramuscular de uma suspensão viral de uma cepa de PCV-2 virulenta. Os porcos são então monitorados por 8 semanas quanto à ocorrência de sinais clínicos específicos da síndrome de enfraquecimento multis-
30 sistêmico de pós-desmame em leitões. O monitoramento clínico dos leitões após o desafio é idêntico àquele descrito no Exemplo 8.1 exceto que a duração total de observação é dessa vez de 8 semanas.

Exemplo 9: Vacinação de porcos com DNA formulado com DMRIE-DOPE

É possível usar, no lugar das soluções de DNA de plasmídeo exposto descritas no Exemplo 8, soluções de DNA de plasmídeo formuladas com DMRIE-DOPE. Uma solução de DNA (contendo um ou mais plasmídeos de acordo com o Exemplo 6) a 1 mg/ml é preparada em NaCl a 0,9%.
 5 Uma solução de DMRIE-DOPE a 0,75 mM é preparada tomando um liofilizado de DMRIE-DOPE em um volume adequado de água estéril destilada.

A formação dos complexos de DNA de plasmídeo-lipídeo catiônico é conseguida através de diluição, em partes iguais, da solução de
 10 DMRIE-DOPE a 0,75 mM com solução de DNA a 1 mg/ml em NaCl a 0,9%. A solução de DNA é introduzida gradualmente, com o auxílio de uma seringa preparada com uma agulha de 26G, ao longo da parede do frasco contendo a solução de lipídeo catiônica de modo a evitar a formação de espuma. Agitação suave é realizada assim que as duas soluções foram misturadas. Uma
 15 composição compreendendo 0,375 mM de DMRIE-DOPE e 500 µg/ml de DNA é finalmente obtida.

É desejável que todas as soluções usadas estejam em temperatura ambiente para todas as operações descritas acima. A formação de complexo de DNA/DMRIE-DOPE é realizada em temperatura ambiente por
 20 30 minutos antes a imunização dos porcos.

Os porcos são então vacinados de acordo com as condições descritas nos Exemplos 8.1. e 8.2.

Exemplo 10: Vacinação de leitões e resultados do 1º experimento:

Grupos de 3 ou 4 leitões, derivados de cesariana no dia 0, são
 25 postos nos isoladores. Os leitões são vacinados no dia 2 ou com pJP109 sozinho ou com mistura de plasmídeos pJP109 e pJP111 e com uma solução fisiológica para o grupo de controle. Cada plasmídeo é diluído em uma solução fisiológica estéril (NaCl a 0,9%) a uma concentração final de 250 µg/µl final. Um volume de 2 ml é injetado por via intramuscular em dois pontos de 1 ml (1 ponto cada lado do pescoço). Uma segunda injeção de vacina
 30 ou placebo é administrada no dia 14. Vacinação com DNA é bem tolerada por leitões e nenhuma evidência quanto à reação adversa à vacinação não é

notada. Os leitões são provocados no dia 21 através de administração oronasal de suspensão viral de PCV-2, 1 ml em cada narina. Após desafio os leitões são pesados uma vez por semana. Temperaturas retais são registradas nos dias 17, 21, 22, 24, 27, 29, 31, 34, 37, 41, 44. Chumaços de algodão fecal do dia 44 são coletados de cada leitão quanto a derrame de PCV-2. Os vírus são detectados e quantificados através de PCR quantitativo. Necropsias do dia 45 são realizadas e as amostras de tecido são coletadas para isolamento do vírus.

. Sintomas Clínicos:

10 Não há nenhuma diferença significativa quanto aos ganhos de peso do corpo médios ou as temperaturas do corpo médias entre os grupos.

. Lesões de Necropsia:

15 A única constatação flagrante notada em porcos na terminação é linfadenopatia bronquial. As lesões são avaliadas de acordo com os critérios que seguem.

- 0 = nenhum crescimento visível dos nós linfáticos
- 1 = crescimento suave dos nós linfáticos, restritos aos nós linfáticos brônquicos
- 2 = crescimento moderado dos nós linfáticos, restrito aos nós linfáticos brônquicos
- 3 = crescimento grave dos nós linfáticos, estendido aos nós linfáticos brônquicos submandibulares pré-escapsular e inguinais.

std é uma abreviação para desvio padrão

25 N é para número de animais em cada grupo

Grupos	Avaliações de Linfadenopatia		
	Média	Padrão	N
pJP109	1,2	1,3	4
pJP109 + pJP111	2,0	1,7	3
Controles	3,0	0,0	3

N = número de leitões em cada grupo

Uma redução das lesões dos nós linfáticos é observada em 3 de 4 leitões imunizados com pJP109 e 1 de 3 leitões imunizados com mistura

de plasmídeos pJP109 e pJP111. Esta diferença não é significativa ($p > 0,05$) devido ao alto valor dos desvios padrão (std).

. Carga de vírus em tecidos de nós linfáticos:

Novo isolamento de vírus quantitativo é realizado nos homogenatos de tecido preparados a partir de nós linfáticos brônquicos e mesentéricos.

Os dados apresentados correspondem aos títulos de vírus em homogenatos de tecido após transformação em $\log_{10}$.

Títulos de PCV-2

Grupos	NL brônquico		NL Mesentérico		N
	Médio	Padrão	Médio	Padrão	
pJP109	0,9	0,8	0,9	0,8	4
pJP109 + pJP111	0,7	0,6	0,2	0,2	3
Controles	2,0	1,1	1,8	1,1	4

10 Nodos linfáticos brônquicos parecem conter o vírus mais infeccioso. Uma redução da carga viral é observada nos nós linfáticos brônquicos e mesentéricos de leitões imunizados ou com pJP109 ou mistura de pJP109 + pJP111. Esta redução é significativa ($p \leq 0,05$) para a mistura de plasmídeo.

. Excreção Viral:

15 Chumaços de algodão fecal pós-provocados são avaliados quanto a derrame de PCV-2 através de PCR com base na amplificação de ORF2 de PCV-. Cada ensaio é realizado em triplicata em 2 ml de amostra. Controles não-vacinados são negativos quanto a PCV-2 antes do desafio e positivos após o desafio confirmar a validade do ensaio de PCR.

20 Os valores são expressos como $\log_{10}$ (número de moléculas de DNA de PCV-2 em amostras de 2 μ l).

Número $\log_{10}$ de moléculas de DNA de PCV-2

Grupos	Média	Padrão	N
pJP109	3,3	0,3	4
pJP109 + pJP111	2,9	0,7	3
De controles	3,6	0,6	4

As diferenças entre os grupos não são significantes ($p > 0,05$).

2º experimento:

Leitões convencionais de 14 dias de vida (8 por grupo) são imunizados com 2 administrações de mistura de plasmídeos pJP109 e pJP111 formuladas com DMRIE DOPE no dia 0 e dia 20. Para cada administração, 2 ml são injetados através de via intramuscular no lado do pescoço atrás da orelha. A composição de vacina é de 250 µg para cada plasmídeo/ ml de solução fisiológica (NaCl a 0,9%) e 0,375 mM de DMRIE DOPE.

Para grupo de controle, leitões são injetados com a solução fisiológica.

No dia 32 os leitões são provocados através de via oronasal, introduzindo 5 ml de suspensão viral de PCV-2 a $10^{5,8}$ de TCID₅₀/ml de título com uma seringa em cada narina.

Os leitões são monitorados quanto a sintomas clínicos, prostração, vômito, dispnéia, tosse, anorexia e hipertemia (temperatura retal é registrada a cada dia durante 28 dias pós-desafio), crescimento mais lento (os leitões são pesados nos dias 32, 40, 53, 60). Os sintomas são avaliados de acordo com os critérios que seguem: Annex1 (A avaliação de um leitão é igual à soma das avaliações correspondendo a dias diferentes de observação).

Necropsia do dia 60 são realizadas e as lesões são avaliadas de acordo com os critérios que seguem: Annex2 (A avaliação de um leitão é igual à soma das avaliações correspondendo a cada órgão observado).

Amostras de tecido são coletadas, em particular nós linfáticos.

Chumaços de algodão retal são coletados nos dias 32, 39, 42, 46, 49, 53, 56, 60 para seguir a extração viral.

. Sintomas Clínicos:

Uma redução significativa dos sintomas clínicos é observada no grupo de leitões imunizados comparado com os controles. No grupo de controle 1 leitão morreu com sintomas de PMWS e nenhum no grupo vacinado.

Avaliações Clínicas

	Média	Padrão	N
Vacinados	13,5	7,1	8
Controles	29,3	15,6	8

($p < 0,01$ Kruskal-Wallis test)

Uma redução significativa da duração da hipertemia pós-desafio é observada no grupo de leitão imunizado ($p \leq 0,05$).

5 Duração (dias) de temperatura retal $\geq 40^\circ\text{C}$.

	Média	Padrão	N
Vacinados	1,9	2,0	8
De controles	8,4	3,9	8

O ganho de peso diário pós-desafio não é significativamente diferente entre os grupos vacinado e de controle.

. Lesões de Necropsia:

- 10 Uma redução significativa das lesões é observada nos leitões imunizados comparado aos de controle em particular quanto à linfadenopatia ($p \leq 0,05$).

Grupos	Média	Padrão	N
Lesões global			
Vacinados	7,6	3,3	8
Controles	13,1	7,5	8
Avaliações de linfático			
Vacinados	3,1	2,7	8
Controles	5,7	2,9	8

. Carga de vírus nos tecidos de nó linfático:

A carga de vírus em nós linfáticos mesentéricos e mediastinais é determinada através de imunoquímica.

- 15 Os critérios que seguem são usados para as avaliações:

- . 0 = falta de fluorescência
- . 1 = alguns focos fluorescentes em algumas fatias de órgãos
- . 2 = aproximadamente 1 local por carga
- . 3 = órgão completamente fluorescente.

- 20 Uma redução significativa da carga de vírus é observada nos grupos imunizados ($p \leq 0,05$).

Grupos	NL Mesentéricos		Mediastinal LN N		
	Média	Padrão	Média	Padrão	
Vacinados	0,5	0,6	1,3	0,2	8
Controles	1,8	0,8	2,0	0,8	8

. Excreção Viral

Os chumaços de algodão fecais são avaliados através de PCR quanto a derrame de PCV-2. Os resultados são avaliados de acordo com os

5 critérios que seguem:

0 = ausência de PCV-2

1 = presença de PCV-2

No grupo imunizado, 38% de leitões versus 88% no grupo de controle excretam PCV-2 nas fezes. A duração de excreção viral é significamente reduzida no grupo de vacinação comparado com os de controle.

10

Duração média de excreção viral.

Grupos	(Dias)	Média	Padrão	N
Vacinado		1,2	2,1	8
Controles		11,4	6,3	8

Deve ser claramente entendido que a invenção definida pelas reivindicações apenas não é limitada às modalidades específicas indicadas no relatório acima, mas compreende as variantes que não se afastem nem

15 do espírito nem do escopo da presente invenção.

ANEXO 1 : Avaliação para sinais clínicos

Sinais	Avaliações
Prostração	O, não; 1 sim; 2 não podem levantar
Vômito	O, não; 1 sim
Dispneia	Moderada alta
Tosse	O, não; 1 sim
Anorexia	O, não; 1 sim
Hipertermia	O, não; $\geq 40^{\circ}\text{C}$ $\geq 41^{\circ}\text{C}$
Crescimento	O, não; 1 DWG da semana $\leq$ DWG da semana x ml e $>$ 100 gramas por dia 2 DWG da semana $<$ 100 gramas por dia
Morte	Avaliação do dia um pouco antes da morte
Para um dia de avaliação é a soma da avaliação de cada sinal	

ANEXO 2 : Avaliação para lesões macroscópicas

Pele (cor)	Normal	0
	Branca	1
	Amarela	2
Corpulência	Normal	0
	Fina	1
	Muito fina	2
	coquético	3
Muco	Normal	0
	Branco	1
	Amarelo	2
Conjuntivo subcutâneo	Normal	0
	Brilhante	1
	Amarelo	2
Gânglios (gg)	Normal	0
	Grande e/ou congestionado	1
	> 1 grande e/ou congestionado	2
	> 1 Muito grande	3
Fluidos torácico	Normal	0
	Brilhante	1
	Visível	2
Coração	Normal	0
	Lesão	1
Pulmões	Normal	0
	Lesão ≤ 4	1
	Lesão $> 4 \leq 6$	2
	Lesão > 6	3
Pleura	Normal	0
	Lesão	1
Ascite	Normal	0
	Brilhante	1
	Visível	2
Peritônio	Normal	0
	Lesão	1
Estômago	Normal	0
	Lesão	1
	úlceras	2
Intestino delgado	Normal	0
	Lesão	1
Intestino grosso	Normal	0
	Lesão	1
Placas Peyers	Normal	0
	Visível em 1 parte do intestino	1
	Visível em 2 parte do intestino	2
	Muito importante	3
Fígado	Normal	0
	Lesão	1

Rim	Normal	0
	Lesão	1
Placa	Normal	0
	lesão	1

Listagem de seqüências

	<110>	MERIAL	
	<120>	vacina de DNA-PCV	
	<130>	vacina de DNA-PCV	
5	<140>	Número do pedido de patente	
	<141>	data de depósito do pedido de patente	
	<160>	10	
	<170>	PatentIN Ver 2.1	
	<210>	1	
10	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência artificial	
	<220>		
	<223>	Descrição de Seqüência Artificial:	
15		oligonucleotídeo	
	<400>	1	
		catcatcatg tcgacatgac gtatccaagg aggcg	35
	<210>	2	
	<211>	36	
20	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência artificial	
	<220>		
	<223>	Descrição de Seqüência Artificial:	
		oligonucleotídeo	
25	<400>	2	
		tactactaca gatctttagg gtttaagtgg ggggtc	36
	<210>	3	
	<211>	35	
	<223>	DNA	
30	<213>	Seqüência artificial	

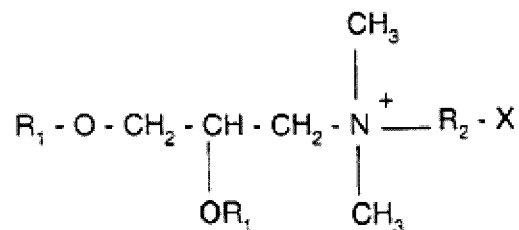
	<220>		
	<223>	Descrição de Seqüência Artificial:	
		oligonucleotídeo	
	<400>	3	
5		catcatcatg togacatgcc cagcaagaag aatgg	35
	<210>	4	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência Artificial:	
10	<220>		
	<223>	Descrição de Seqüência Artificial:	
		oligonucleotídeo	
	<400>	4	
		tactactaca gatcctcagt aatttatttc atatgg	36
15	<210>	5	
	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência artificial	
	<220>		
20	<223>	Descrição de Seqüência Artificial:	
		oligonucleotídeo	
	<400>	5	
		catcatcatg togacatgac gtggccaagg aggcg	35
	<210>	6	
25	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência artificial	
	<220>		
	<223>	Descrição de Seqüência Artificial:	
30		oligonucleotídeo	
	<400>	6	
		tactactaca gatctttatt tatttagagg gtcttttagg	40
	<210>	7	

	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência artificial	
	<220>		
5	<223>	Descrição de Seqüência Artificial: oligonucleotídeo	
	<400>	7	
		catcatcatg tcgacgcc aagaacgaaa agcgg	35
	<210>	8	
10		tactactaca gatcttcagt aatttatttt atatgg	36
	<210>	9	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência artificial	
15	<220>		
	<223>	Descrição de Seqüência Artificial: oligonucleotídeo	
	<400>	9	
		tatgcggccg ccaccatgtg gctgcagaac ctg	33
20	<210>	10	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	Seqüência artificial	
	<220>		
25	<223>	Descrição de Seqüência Artificial: oligonucleotídeo	
	<400>	10	
		tatgcggccg ctacgtatca cttccgggct gggt	34

REIVINDICAÇÕES

1. Preparação imunogênica ou vacina **caracterizada por** compreender, por um lado, um plasmídeo codificando e expressando um gene selecionado do grupo consistindo em ORF1 de PCV-2, ORF2 de PCV-2, ORF1 de PCV-1 e ORF2 de PCV-1, e, por outro lado, um elemento capaz de aumentar a resposta imune direcionada contra o produto de expressão do gene;

em que dito elemento capaz de aumento da resposta imune compreende como adjuvante um lipídeo catiônico da fórmula



em que R₁ é um radical alifático linear saturado ou insaturado tendo de a partir de 12 a 18 átomos de carbono, R₂ é um outro radical alifático compreendendo de a partir de 2 a 3 átomos de carbono, e X é um grupo hidroxila ou amino.

2. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o lipídeo catiônico é DMRIE.

3. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada pelo** fato de que o DMRIE é acoplado a um lipídeo neutro.

4. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pelo** fato de que o DMRIE é acoplado a DOPE.

5. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o elemento capaz de aumento da resposta imune compreende um carbômero como adjuvante.

6. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o elemento capaz de aumento da resposta imune compreende citocinas de porco.

7. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pelo** fato de que a citocina de porco e GM-CSF.

8. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **caracterizada pelo** fato de que ela compreende um plasmídeo codificando e expressando a citocina de porco.

9. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o elemento capaz de aumento da resposta imune compreende uma citocina

de porco e um composto selecionado do grupo compreendendo DMRIE, DMRIE/DOPE e carbômero, como adjuvante.

10. Preparação ou vacina imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada pelo** fato de que ela compreende um plasmídeo codificando e expressando um imunógeno de porco associado à síndrome PMWS.

FIG 1

Plasmídeo pJP109

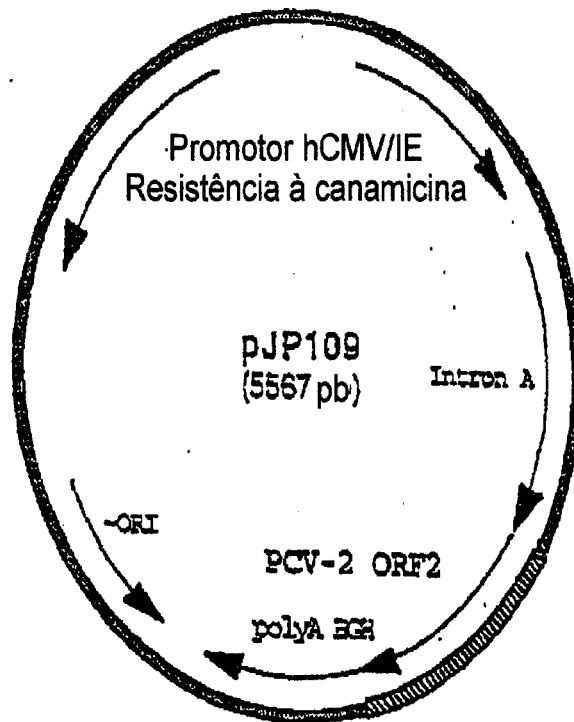


FIG 2

Plasmídeo pJP111

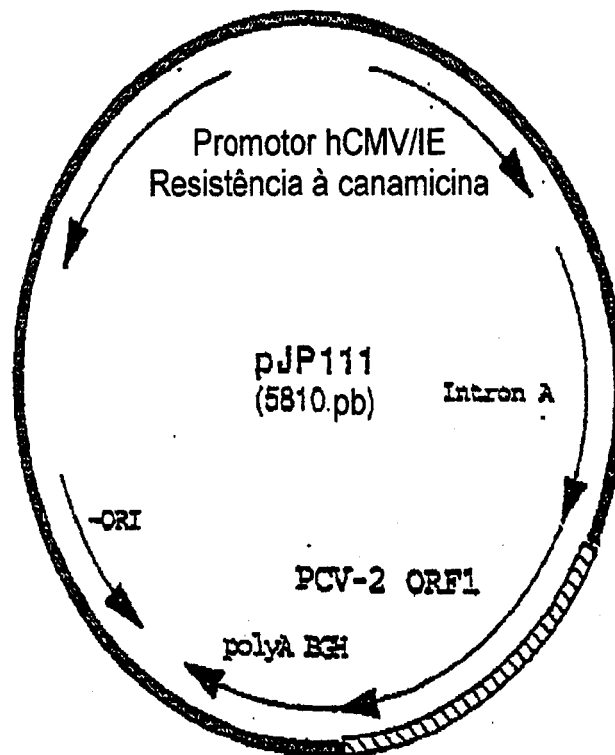


FIG 3

Plasmídeo pJP120

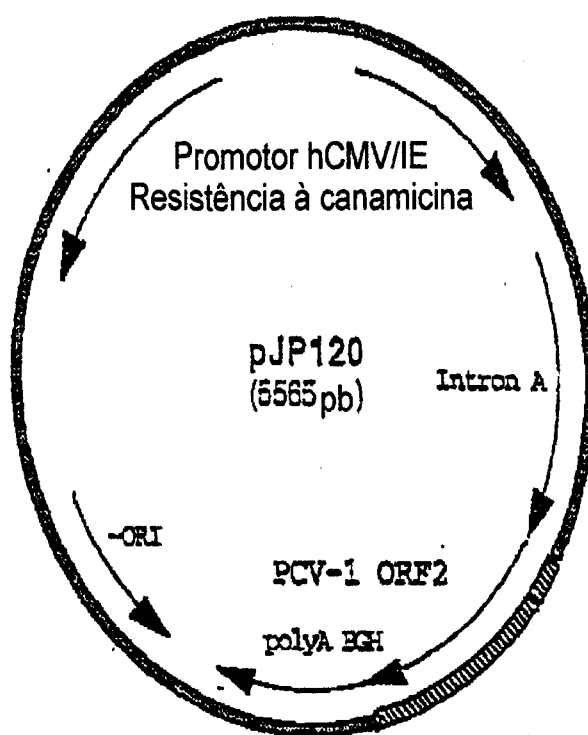


FIG 4

Plasmídeo pJP121

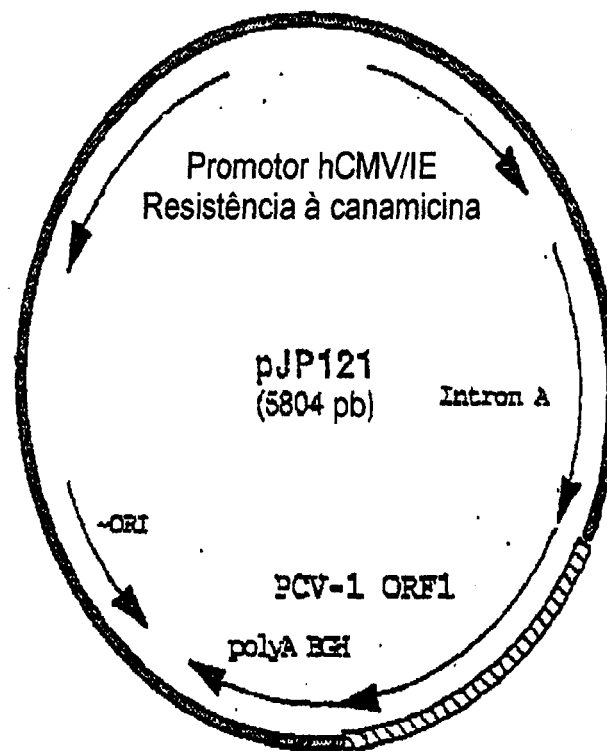
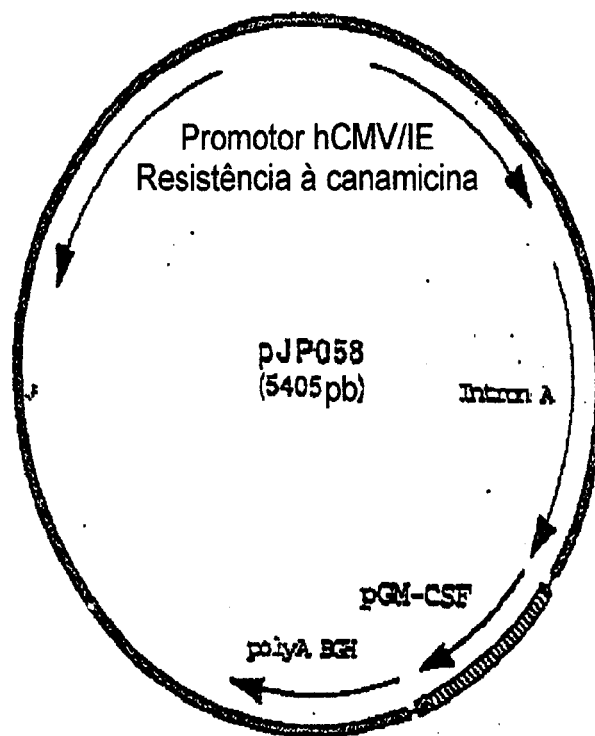


FIG 5

Plasmídeo pJP058



RESUMO

Patente de Invenção: **"VACINA DE DNA-PCV"**.

A invenção refere-se a preparações ou vacinas imunogênicas compreendendo, por um lado, um plasmídeo codificando e expressando um
5 gene de PCV, em particular selecionado do grupo consistindo em ORF1 de PCV-2, ORF2 de PCV-2, ORF1 de PCV-1, e ORF2 de PCV-1, e, por outro lado, um elemento capaz de aumentar a resposta imune direcionada contra o produto de expressão do gene, que pode ser um carbômero, uma citocina de porco, por exemplo, GM-CSF ou um lipídeo catiônico da fórmula (I), onde
10 R_1 é um radical alifático linear saturado ou insaturado tendo de a partir de 12 a 18 átomos de carbono, R_2 é um outro radical alifático compreendendo de 2 a 3 átomos de carbono e X é um grupo hidroxila ou amino. O lipídeo catiônico pode ser DMRIE, possivelmente acoplado a DOPE.