



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: PT 100810 B

(51) Classificação Internacional: (Ed. 7)

C12N015/00 A C12N015/38 B

A61K039/265 B C12P021/08 B

A61K039/395 B C12Q001/70 B

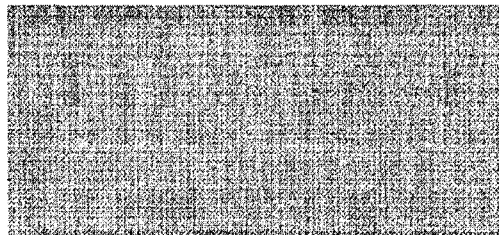
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1992.08.25	(73) Titular(es): STICHTING CENTRAL DIERGENEESKUNDIK INSTITUUT EDELHERTWEG 15 8219 PH LELYSTAD NL
(30) Prioridade:	
(43) Data de publicação do pedido: 1994.02.28	(72) Inventor(es): FRANCISCUS ANTHONIUS MARIA RIJSEWIJK JOHANNES THEODORUS VAN OIRSCHOT ROGER KAMIL MAES NL NL NL
(45) Data e BPI da concessão: 02-Jan 2001.02.14	(74) Mandatário(s): JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) Epígrafe: MUTANTES DE DELECCÃO DO VIRUS DE HERPES BOVINO TIPO 1, VACINAS À BASE DESSES MUTANTES E EQUIPAMENTOS DE DIAGNÓSTICO PARA A DETECÇÃO DE VIRUS DO HERPES BOVINO TIPO 1

(57) Resumo:

VÍRUS DE HERPES; VACINAS; HERPES BOVINO; HERPES BOVINO TIPO 1;
GLICOPROTEÍNA GE; DIAGNÓSTICO



DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 100.810

REQUERENTE: STICHTING CENTRAAL DIERGENNESKUNDIG INSTITUUT,
holandesa, industrial, com sede em
Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Holanda

EPÍGRAFE: "MUTANTES DE DELECÇÃO DO VÍRUS DE HERPES
BOVINO TIPO 1, VACINAS À BASE DESSES MUTANTES
E EQUIPAMENTOS DE DIAGNÓSTICO PARA A
DETECÇÃO DE VÍRUS DO HERPES BOVINO TIPO 1"

INVENTORES: FRANCISCUS ANTHONIUS MARIA RIJSEWIJK,
JOHANNES THEODORUS VAN OIRSCHOT, residentes
na Holanda e ROGER KAMIEL MAES, residente nos
Estados Unidos da América do Norte

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

100-810



"MUTANTES DE DELECÇÃO DO VÍRUS DE HERPES BOVINO TIPO 1, VACINAS À
BASE DESSES MUTANTES E EQUIPAMENTOS DE DIAGNÓSTICO PARA A
DETECÇÃO DE VÍRUS DO HERPES BOVINO TIPO 1"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um mutante de deleção do vírus de herpes bovino tipo 1 que apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gE. O mutante pode ainda apresentar uma deleção no gene da quinase de timidina e/ou no gene da glicoproteína gI, ou apresentar uma inserção de um gene heterólogo; a um ácido nucleico recombinante que inclui o gene gE ou uma parte deste; à glicoproteína gE, peptídeos à base desta e complexos formados pelas glicoproteínas gE e gI, e anticorpos contra estes; a vacinas e equipamentos ("kits") de diagnóstico que incluem qualquer um destes materiais.

ÂMBITO DO INVENTO

Este invento diz respeito aos campos da vacinação e do diagnóstico relativamente a doenças que são provocadas por agentes patogénicos e envolve a utilização, tanto dos métodos clássicos usados para chegar a uma vacina viva atenuada ou a uma vacina inactivada, como os modernos métodos com base na tecnologia de recombinação de DNA.

Mais especificamente, o invento diz respeito a vacinas vivas atenuadas e a vacinas inactivadas para protecção de animais, especialmente de gado bovino, relativamente ao vírus de herpes bovino tipo 1 ("bovine herpesvirus type 1" ou BHV-1), sendo essas vacinas concebidas de modo tal que não só são seguras e eficazes como criam também a possibilidade de distinguir, numa população vacinada, os animais infectados daqueles que não estão infectados.

Os "kits" de diagnóstico que podem ser utilizados num teste do tipo atrás referido para distinguir, numa população vacinada, os animais infectados daqueles que não estão infectados, constituem também um aspecto do presente invento.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O BHV-1, incluindo o vírus da rinotraqueíte bovina infecciosa ("infectious bovine rhinotracheitis virus" ou IBRV) e o vírus da vulvovaginite pustular infecciosa ("infectious pustular vulvovaginitis virus" ou IPVV), desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças respiratórias e de afecções relacionadas com a fertilidade no gado bovino. Após infecção aguda, o BHV-1 permanece frequentemente no hospedeiro sob forma latente. Um vírus presente sob forma latente pode ser reactivado

sob a influência de, entre outros factores, stress, que pode ser, ou não, acompanhado por fenómenos clínicos - e posteriormente excretado. Consequentemente, o gado infectado deve ser encarado como constituindo durante toda a vida uma fonte potencial de disseminação de BHV-1. Calcula-se que a infecção por meio de BHV-1 ocorre de modo endémico em 75% das criações de gado holandesas. Especialmente o gado mais velho revela-se serologicamente positivo.

Existem diversas vacinas inactivadas ("mortas") e uma série de vacinas atenuadas ("vivas") para inoculação contra infecções provocadas por BHV-1. As vacinas inactivadas são preparadas matando o vírus BHV-1, por exemplo mediante tratamento térmico, irradiação ou tratamento com etanol ou formalina. Todavia, estas vacinas conferem frequentemente uma protecção insuficiente. As vacinas atenuadas são preparadas através de um grande número de passagens em células homólogas (de bovino) ou em células heterólogas tais como células de porco ou cão, sendo por vezes os vírus tratados também por métodos físicos ou químicos nessa ocasião. Desse modo se desenvolvem mutações/delecções desconhecidas no genoma do vírus que reduzem, frequentemente, as propriedades de produção de doença do vírus. As vacinas vivas atenuadas conferem uma melhor protecção do que as vacinas inactivadas, entre outras razões porque apresentam ao sistema imunitário do hospedeiro uma maior quantidade de antigénios virais. Uma outra vantagem importante das vacinas vivas consiste no facto de poderem ser administradas por via intranasal, isto é, no local onde ocorre a primeira multiplicação do vírus tipo selvagem ("wild type") após a infecção. E, contudo, persistem nas vacinas vivas áreas onde são possíveis melhoramentos. Algumas vacinas vivas parecem continuar a possuir propriedades abortogénicas, que se manifestam em particular após administração intramuscular. Além disso, todas as vacinas vivas permanecem provavelmente num

estado de latência nas vacas vacinadas. Para mais, existe a possibilidade de ocorrer um fenómeno de reversão e um regresso ao estado de virulência no caso de a vacina diferir apenas ligeiramente do vírus tipo selvagem. Mas um dos principais problemas consiste no facto de as vacinas de BHV-1 não evitarem as infecções provocadas por vírus tipo selvagem. O que significa que o gado vacinado pode também disseminar BHV-1 tipo selvagem.

Para um programa de controlo de BHV-1 adequado, é necessário dispor de uma vacina eficaz e segura que se distinga do vírus tipo selvagem, uma vez que a aplicação de uma vacina eficaz pode reduzir consideravelmente a circulação de BHV-1 e um teste que consiga distinguir entre uma vacina e um vírus tipo selvagem torna possível a detecção (e posterior remoção) do gado infectado numa população vacinada.

Entretanto, têm sido desenvolvidas vacinas de BHV-1 que parecem ser mais seguras do que as vacinas convencionais e que se distinguem do vírus tipo selvagem. Foi isolado um mutante de deleção de cinase de timidina que é menos abortogénico, se torna latente com menor frequência e não pode ser reactivado. Além disso, e usando técnicas de recombinação de DNA, foi criada uma vacina de BHV-1 que apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gIII, o que permite distinguir esta vacina de BHV-1 tipo selvagem utilizando técnicas serológicas. Todavia, persistem algumas objecções relativamente a estas vacinas. Por um lado, o gene de quinase de timidina está implicado na replicação viral e um menor grau de replicação pode provocar um menor grau de protecção. Por outro lado, a glicoproteína gIII é importante para a produção de anticorpos protectores, o que torna uma vacina com deleção de gIII menos eficaz. Um problema prático consiste no facto de a administração intranasal, que geralmente proporciona a melhor protecção, de vacinas recombinantes não ser permitida

nalguns países. Consequentemente, existe a necessidade de uma vacina que seja não só segura como eficaz e que, contudo, possa ser distinguida de BHV-1 tipo selvagem, sendo ainda desejável que pelo menos uma dessas vacinas se baseie num vírus atenuado seguindo uma via tradicional em vez de se basear num vírus construído por técnicas de recombinação de DNA.

Por intermédio de passagens em culturas de células, obteve-se agora uma estirpe de BHV-1 que não possui o gene da glicoproteína gE. Os primeiros resultados das nossas pesquisa indicam que esse gene é bastante útil para se estabelecer uma distinção serológica relativamente a BHV-1 tipo selvagem e que está envolvido na expressão da virulência. Por conseguinte, a sua deleção contribui para a segurança e pode tornar supérflua a utilização de deleções de quinase de timidina. A glicoproteína gE parece ser menos importante na indução de protecção do que a glicoproteína gIII. Uma estirpe de BHV-1 atenuada de modo convencional que possa ser distinguida serologicamente de vírus tipo selvagem é única. A localização e sequência de DNA do gene gE aqui descritas pela primeira vez não eram previamente conhecidas, tal como não eram conhecidos oligonucleótidos, polipéptidos e olipéptidos que possam ser dele derivados. Um teste permitindo estabelecer uma distinção serológica com base no gene gE é igualmente único.

Uma vantagem importante deste mutante de deleção de gE "convencional" (a designação "convencional" diz respeito à utilização de um método convencional para isolar um vírus atenuado) consiste no facto de que será possível administrá-lo por via intranasal em países onde tal é proibido, no que diz respeito a vacinas recombinantes. Contudo, e tendo em conta os diferentes pontos de vista existentes relativamente à questão da segurança, foram também construídas, para além desta vacina de deleção de

gE convencional, versões recombinantes bem definidas. Estas vacinas recombinantes apresentam também uma deleção de gE - podendo apresentar ou não apresentar também uma deleção no gene de quinase de timidina - e podem ser usadas também como vectores para expressão de genes heterólogos. Todas estas vacinas recombinantes podem ser distinguidas do vírus tipo selvagem por intermédio do mesmo teste gE-específico. A utilização de um teste padronizado para um conjunto de diferentes vacinas pode constituir uma grande vantagem no combate ao BHV-1, enquanto esforço internacional. Uma tal abordagem do problema não tinha sido previamente descrita no campo das vacinas de BHV-1.

A análise serológica da reacção anti-BHV 1 em gado revelou que uma fracção importante dos anticorpos anti-gE é dirigida contra um complexo formado pela glicoproteína gE e por outro glicoproteína de BHV-1: a glicoproteína gI. Os testes serológicos que demonstram (também) a presença desses anticorpos específicos relativamente ao complexo podem, por conseguinte, revelar-se mais sensíveis do que os testes que conseguem detectar apenas anticorpos anti-gE. O gado vacinado com um único mutante de deleção de gE pode produzir anticorpos anti-gI que podem interferir com a detecção de anticorpos anti-gI/gE. Consequentemente, este invento inclui também uma vacina com uma deleção dupla de gI/gE.

SUMÁRIO DO INVENTO

Em primeiro lugar, este invento proporciona um mutante de deleção de BHV-1 que apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gE. A expressão "uma deleção no" pretende abranger uma deleção da totalidade do gene.

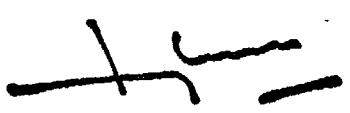
Uma forma de realização preferida deste invento é constituída por um mutante de deleção de BHV-1 que apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gE que foi provocada por um processo de atenuação, tal como o mutante de deleção Difivac-1 que adiante se descreve.

Outras formas de realização preferidas do invento consistem num mutante de deleção de BHV-1 que inclui uma deleção no gene da glicoproteína gE que foi construída por meio de técnicas de recombinação de DNA, tal como os mutantes de deleção 1B7 ou 1B8 que adiante se descrevem.

Uma outra forma de realização preferida deste invento consiste num mutante de deleção dupla de BHV-1 que inclui uma deleção no gene da glicoproteína gE e uma deleção no gene da glicoproteína gI, tal como o mutante de deleção dupla de gI/ggE Difivac-IE que adiante se descreve.

Além disso, com a finalidade de obter o máximo de segurança, prefere-se de acordo com o invento um mutante de deleção de BHV-1 que apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gE e uma deleção no gene de quinase de timidina. Este invento abrange também um mutante de deleção de BHV-1 que apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gE, no gene da glicoproteína gI e no gene de quinase de timidina.

O invento proporciona uma vacina para vacinação de animais, em particular mamíferos, mais especificamente gado bovino, com o objectivo de os proteger de BHV-1, que inclui um mutante de deleção tal como foi atrás definido e um veículo ou adjuvante adequados. Essa composição pode ser uma vacina viva ou inactivada.



O invento tem outra das suas formas de realização num mutante de BHV-1 que apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gE e contém um gene heterólogo introduzido por meio de técnicas de recombinação de DNA. Este diz respeito, de preferência, a um mutante de BHV-1 que contém um gene heterólogo introduzido por meio de técnicas de recombinação de DNA no local do gene da glicoproteína gE, gene heterólogo esse que está sob o controlo das sequências reguladoras do gene gE e está facultativamente ligado à parte do gene gE que codifica um péptido sinal. O referido gene heterólogo pode também estar sob o controlo de um promotor diferente de BHV-1, ou sob o controlo de um promotor heterólogo. Quando o mutante de BHV-1 apresenta outras deleções para além da deleção no gene da glicoproteína gE, tal como uma deleção no gene de quinase de timidina e/ou uma deleção no gene da glicoproteína gI, o referido gene heterólogo pode também ser inserido no local desta(s) deleção(ões) adicional(ais). As inserções múltiplas são outras possibilidade, quer em conjunto no local de uma deleção, quer distribuídas pelos locais de diversas deleções.

O gene heterólogo introduzido codifica, de preferência, uma proteína ou péptido ou proteína imunogénicos de outro agente patogénico, ou uma citocina que promove a reacção imunitária. Constituem exemplos de citocinas adequadas a interleucina 2, o interferon-alfa e o interferon-gama.

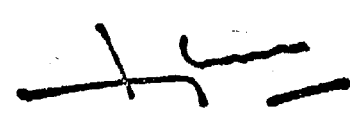
O invento proporciona também uma vacina (viva ou inactivada) para a vacinação de animais, em particular mamíferos, mais especificamente gado bovino, a fim de os proteger de um agente patogénio (diferente), que inclui um mutante de BHV-1 apresentando um gene heterólogo que codifica um péptido ou proteína imunogénicos desse outro agente patogénico, e um veículo ou adjuvante adequados. É claro que a protecção pode dizer

respeito a mais de um agente patogénico, isto é, a uma vacina multivalente em que o mutante apresenta uma diversidade de genes heterólogos.

O invento diz ainda respeito a uma composição que inclui um ácido nucleico recombinante que inclui o gene da glicoproteína gE de BHV-1, uma parte deste gene da glicoproteína gE ou uma sequência de nucleótidos derivada deste gene da glicoproteína gE. Esta composição pode incluir um vector de clonagem ou expressão apresentando uma inserção de um ácido nucleico recombinante que inclui o gene da glicoproteína gE de BHV-1, uma parte deste gene da glicoproteína gE ou uma sequência de nucleótidos derivada deste gene da glicoproteína gE.

Este invento inclui também uma composição que inclui a glicoproteína gE de BHV-1, uma parte desta glicoproteína gE, um péptido derivado desta glicoproteína gE, ou um complexo das glicoproteínas gE e gI, e uma composição que inclui um anticorpo que é específico relativamente à glicoproteína gE de BHV-1, a uma parte desta glicoproteína gE, a um péptido derivado desta glicoproteína gE ou a um complexo das glicoproteínas gE e gI. A expressão "anticorpo" deve ser entendida como dizendo respeito tanto a uma preparação de anticorpo policlonal como a um anticorpo monoclonal preferido para a maioria das aplicações. As expressões "uma parte da glicoproteína gE" e "um péptido derivado da glicoproteína gE" devem ser entendidas como referindo-se a sequências de aminoácidos específicas de gE que, de um modo geral, terão um comprimento de pelo menos 8 aminoácidos.

Este invento diz ainda respeito a um "kit" de diagnóstico para detecção de ácido nucleico de BHV-1 numa amostra, em particular numa amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo, células existentes no sangue, leite, fluidos do corpo tais



como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, esperma, em particular sêmen, saliva, expectoração ou tecidos, em particular tecidos do sistema nervoso, proveniente de um animal, em particular de um mamífero, mais especificamente de um bovino, que inclui uma sonda ou "primer" de ácido nucleico com uma sequência de nucleótidos derivada do gene da glicoproteína gE de BHV-1, e um meio de detecção adequado para um teste de detecção de ácidos nucleicos.

Além disso, o invento diz respeito a um "kit" de diagnóstico para detecção de anticorpos específicos relativamente a BHV-1, numa amostra, em particular numa amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo, saliva, expectoração, fluidos do corpo tais como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, leite, ou tecidos, proveniente de um animal, em particular de um mamífero, mais especificamente de um bovino, que inclui glicoproteína gE de BHV-1, uma parte desta glicoproteína gE, um péptido derivado desta glicoproteína gE, ou um complexo das glicoproteínas gE e gI, e um meio de detecção adequado para um teste de detecção de anticorpos. Um tal "kit" de diagnóstico pode incluir adicionalmente um ou mais anticorpos específicos relativamente à glicoproteína gE de BHV-1 ou específicos relativamente a um complexo das glicoproteínas gE e gI de BHV-1.

Este invento diz também respeito a um "kit" de diagnóstico para detecção de proteínas de BHV-1 numa amostra, em particular numa amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo, células existentes no sangue, leite, fluidos do corpo tais como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, esperma, em particular sêmen, saliva, expectoração ou tecidos, em particular tecidos do sistema nervoso, proveniente de um animal, em particular de um mamífero, mais especificamente de um bovino, que inclui um ou mais anticorpos específicos relativamente à

glicoproteína gE de BHV-1 ou que são específicos relativamente ao complexo das glicoproteínas gE e gI de BHV-1, e um meio de detecção adequado para um teste de detecção de proteínas.

O invento proporciona ainda um método de determinação de infecção por BHV-1 num animal, em particular num mamífero, mais especificamente num bovino, que inclui o exame de uma amostra proveniente do animal, em particular de uma amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo, células existentes no sangue, esperma, em particular sémen, saliva, expectoração, fluidos do corpo tais como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, leite, ou tecidos, em particular tecidos do sistema nervoso, para detecção da presença de ácido nucleico que inclua o gene da glicoproteína gE de BHV-1, ou da presença da glicoproteína gE de BHV-1 ou de um complexo das glicoproteínas gE e gI de BHV-1, ou da presença de anticorpos que são específicos relativamente à glicoproteína gE de BHV-1 ou específicos relativamente a um complexo das glicoproteínas gE e gI de BHV-1. A amostra a examinar pode provir de um animal que não tenha sido previamente vacinado com uma vacina de acordo com o invento ou de um animal que foi previamente vacinado com uma vacina de acordo com o invento.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DO INVENTO

O invento diz respeito a um conjunto de vacinas de BHV-1, tanto vivas como inactivadas, que têm em comum o facto de não apresentarem o gene da glicoproteína gE, na sua totalidade ou parcialmente. Este conjunto inclui tanto um mutante de deleção de gE natural como mutantes de deleção de gE construídos que podem, ou não, apresentar também uma deleção do gene de quinase de timidina e/ou do gene da glicoproteína gI, e mutantes de deleção de gE construídos que são usados como vectores para

genes heterólogos. Este invento diz ainda respeito a sequências de nucleótidos que codificam o gene da glicoproteína gE de BHV-1, a oligonucleótidos derivados dessas sequências, à própria glicoproteína gE, a péptidos dela derivados e a anticorpos (monoclonais e policlonais) que dirigidos contra a glicoproteína gE e a péptidos deles derivados. O invento diz também respeito a complexos das glicoproteínas gE e gI de BHV-1 e a anticorpos dirigidos contra esses complexos.

Estes materiais de acordo com o invento podem ser usados para:

- 1) vacinar gado contra as doenças provocadas por BHV-1, de tal modo que seja possível distinguir entre os animais infectados por BHV-1 e os animais vacinados; a vacina convencional e a vacina construída podem ser usadas lado a lado;
- 2) vacinar gado contra doenças provocadas por BHV-1 e doenças provocadas por outros agentes patogénicos, podendo sequências provenientes destes que codificam antigénios protectores ser incorporadas nos mutantes de deleção de BHV-1;
- 3) testar sangue, soro sanguíneo, leite ou outros fluidos do corpo provenientes de gado a fim de determinar serologicamente ou recorrendo a técnicas de detecção de ácidos nucleicos (por ex. PCR) se os animais foram infectados por um BHV-1 tipo selvagem ou se foram vacinados com um mutante de deleção de gE.

Síntese de oligopéptidos, polipéptidos e glicoproteínas derivados da sequência codificadora do gene da glicoproteína gE e do gene da glicoproteína gI de BHV-1



Os resultados da análise da sequência de DNA, descrita nos exemplos, do gene da glicoproteína gE (Fig. 3A) e dos fragmentos de DNA isolado que codificam este gene tornam possível, recorrendo a procedimentos convencionais em biologia molecular, não só sintetizar péptidos da proteína gE (oligo ou polipéptidos) como exprimir a proteína gE na sua totalidade ou numa porção considerável por intermédio da via procariótica (em bactérias) ou da via eucariótica (por exemplo, em células murinas). Por intermédio destas vias é possível obter antigénio específico relativamente a gE que pode, por exemplo, servir para produzir anticorpos monoclonais ("monoclonal antibodies" ou Mabs) específicos relativamente a gE. Além disso, os antigénios específicos relativamente a gE (e os Mabs específicos relativamente a gE) podem ser usados em testes serológicos para permitir o estabelecimento de uma distinção entre animais vacinados com uma vacina de deleção de gE de BHV-1 e animais infectados com vírus BHV-1 tipo selvagem.

Os resultados da análise parcial da sequência de DNA do gene da glicoproteína gI - descritos nos exemplos - e dos fragmentos de DNA isolado que codificam este gene, em conjunto com as células eucarióticas que exprimem a glicoproteína gE, permitem a expressão do complexo gI/gE em células eucarióticas (ver Figuras 13 e 14). Este complexo de glicoproteínas pode ser usado para produzir anticorpos monoclonais específicos relativamente a gI/gE. O complexo gI/gE pode também ser usado como antigénio em testes serológicos para permitir diferenciar entre gado vacinado com um mutante de deleção única de gE de BHV-1 ou com um mutante de deleção dupla de gI/gE de BHV-1 e gado infectado com vírus BHV-1 tipo selvagem.

Péptidos específicos de gE

Com base numa sequência que codifica uma proteína conhecida, e por intermédio de um sintetizador automático, é possível preparar polipéptidos com não menos de 40-50 aminoácidos. Agora que foi revelada a sequência codificadora de proteína da glicoproteína gE da estirpe Lam de BHV-1 (Fig. 3A), é possível sintetizar polipéptidos desta glicoproteína gE de BHV-1. Com esses polipéptidos, e de acordo com métodos convencionais, é possível imunizar animais experimentais tais como murganhos ou coelhos a fim de produzirem anticorpos específicos relativamente a gE. Além disso, usando estes péptidos específicos de gE, é possível especificar de modo mais completo os locais onde os anticorpos anti-gE reagem com a proteína gE (os epítomos), utilizando, por exemplo o método PEPSCAN (Geysen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998-4002). Os oligopéptidos específicos de gE podem também ser usados em testes serológicos que demonstram anticorpos anti-gE.

Expressão procariótica de gE

Para a síntese da proteína gE em bactérias (isto é, para a expressão procariótica de gE), os fragmentos de DNA que codificam a glicoproteína gE ou partes desta têm de ser clonados em vectores de expressão procariótica. Os vectores de expressão procariótica são moléculas circulares de DNA que permanecem no interior de uma bactéria como moléculas que se replicam separadamente (plasmídeos). Estes vectores de expressão apresentam um ou mais genes marcadores ("marker genes") que codificam uma resistência a um antibiótico, permitindo desse modo a selecção das bactérias que contêm o vector de expressão. Além disso, os vectores de expressão incluem uma região promotora (frequentemente controlável) atrás da qual podem ser ligados fragmentos de DNA



que são depois expressos sob a influência do promotor. Em muitos vectores de expressão procariótica correntes, a proteína desejada é expressa fundida com uma proteína denominada proteína veículo ("carrier protein"). Com essa finalidade, está localizada no vector, atrás do promotor, a sequência que codifica a proteína veículo, podendo o fragmento de DNA ser ligado imediatamente adjacente a ela. As proteínas resultantes de fusão são, com frequência, mais estáveis e mais fáceis de reconhecer e/ou de isolar. O estado de equilíbrio que uma proteína resultante de fusão específica pode atingir numa determinada estirpe bacteriana difere de fusão para fusão e de estirpe para estirpe. É vulgar experimentar diversas combinações.

Expressão eucariótica do gene da glicoproteína gE

Embora a expressão procariótica de proteínas apresente certas vantagens, as proteínas não apresentam as modificações, como glicosilação e outras análogas, que ocorrem nas células eucarióticas. Consequentemente, as proteínas expressas eucarioticamente constituem, com frequência, antigénios mais adequados. Para a expressão heteróloga de proteínas em células eucarióticas, tais como células murinas, utilizam-se vectores de expressão eucariótica. Estes vectores são plasmídeos que não só se podem multiplicar não apenas em bactérias E. coli mas também subsistem de modo estável em células eucarióticas. Para além de um marcador de selecção procariótica, apresentam também um marcador de selecção eucariótica. Tal como sucede com os vectores de expressão procariótica, os vectores de expressão eucariótica apresentam uma região promotora atrás da qual podem ser ligados os genes desejados. Todavia, as sequências promotoras nos vectores eucarióticos são específicas para células eucarióticas. Além disso, a fusão com proteínas veículo só raramente é utilizada em vectores eucarióticos. Estes vectores são introduzidos nas

células eucarióticas por um método de transfecção convencional (F.L. Graham e A.J. van der Eb, 1973, Virology 52, 456-467). Para além dos vectores plasmídeo eucarióticos existem também vectores virais, em que o gene heterólogo é introduzido no genoma de um vírus (por ex. retrovírus, vírus de herpes e vírus vaccínia). As células eucarióticas podem depois ser infectadas com vírus recombinantes.

De um modo geral, não é possível prever qual o tipo de vector e de célula que são mais adequados para um gene específico. Na maioria dos casos são experimentadas diversas combinações.

Expressão eucariótica tanto da glicoproteína gE como da glicoproteína gI

A estrutura final de uma proteína depende da sua sequência primária de aminoácidos, do modo como se dobra sobre si mesma, das modificações pós-translacionais, etc. Um factor importante que contribui para a estrutura de uma proteína consiste na sua interacção com uma ou mais outras proteínas. Descobrimos que também a glicoproteína gE de BHV-1 forma um complexo com pelo menos uma outra glicoproteína: a glicoproteína gI de BHV-1. O primeiro indício da existência de um tal complexo veio dos nossos resultados com os Mabs anti-gE candidatos: 1, 51, 67, 75 e 78 (ver Quadro 2). Estes Mabs não reagiram com Difivac-1, nem com Lam gE⁻, sendo também incapazes de reconhecer células 3T3 que exprimiam a glicoproteína gE. Todavia, estes Mabs reagem com células 3T3 que exprimiam gE após infecção com Difivac-1, revelando que eram necessários factores complementares para conferir à glicoproteína gE a conformação antigénica adequada para estes Mabs. Nalgumas das nossas experiências de rádio-imunoprecipitação com Mab 81 verificámos a co-precipitação de uma proteína com um peso molecular aparente de 63 kD. Tendo em conta que a

glicoproteína gE do vírus de herpes simplex forma um complexo com uma proteína de peso molecular comparável (glicoproteína gI de HSV1), concluímos que a glicoproteína gE de BHV-1 forma um complexo com o homólogo de BHV-1 da glicoproteína gI. Para podermos estudar este complexo gE/gI de BHV-1 e para produzir antigénio de gE com a estrutura antigénica adequada exprimimos ambas as glicoproteínas numa única célula eucariótica. Para tal, aplicámos os mesmos procedimentos descritos para a expressão eucariótica da glicoproteína gE isoladamente. O único pré-requisito adicional consiste na utilização de vectores de expressão com marcadores de selecção eucarióticos diferentes.

Testes serológicos

Os métodos serológicos utilizados para estabelecer uma distinção entre gado vacinado com Difivac-1 e gado infectado com BHV-1 tipo selvagem com base em anticorpos anti-gE baseiam-se, de preferência, na utilização de anticorpos monoclonais dirigidos contra gE. Estes podem ser utilizados dos seguintes modos:

a) De acordo com o princípio descrito por Van Oirschot et al. (Journal of Virological Methods 22, 191-206, 1988). Neste procedimento ELISA para a detecção de anticorpos gI contra o vírus da doença de Aujeszky, a demonstração dos anticorpos é feita por intermédio do seu efeito bloqueador da reacção de dois Mabs apresentando dois epítomos diferentes em gI. O teste é levado a cabo tal como a seguir se descreve. Placas de micotitulação são revestidas com Mab 1, permanecendo de um dia para o outro a 37°C, após o que são guardadas, por ex. a 4°C ou a -20°C. O soro a analisar é pré-incubado com antigénio em placas de microtitulação diferentes não revestidas, por ex. durante 2 h a 37°C. As placas revestidas com Mab 1 são lavadas, por ex. 5 vezes, após o que se adiciona Mab 2 ligado a peroxidase de rábano

("horseradish peroxidase" ou HRPO) a essas placas. Depois as misturas soro-antigênio pré-incubadas são transferidas para as placas em que estão os dois Mabs, a que se segue incubação, por ex. durante 1 h a 37°C. As placas são lavadas e adiciona-se substrato a cada cavidade. Após por ex. 2 h à temperatura ambiente, as placas são analisadas espectrofotometricamente. São incluídos em cada placa quatro soros de controle negativos e quatro diluições em série de um soro positivo. O soro que apresenta um valor de densidade óptica ("optical density" ou OD) inferior a 50% do valor OD médio dos quatro soros de controle negativos que foram examinados na mesma placa é considerado positivo.

b) De acordo com o princípio de "Indirect Double Antibody Sandwich" ou IDAS. Aqui, as placas de microtitulação são revestidas com um Mab ou um soro policlonal dirigido contra a proteína gE. A incubação com uma preparação de antigênio de gE resulta na ligação de gE ao revestimento. Os anticorpos especificamente dirigidos contra gE no soro bovino a ser examinado subsequentemente ligam-se a gE. Este anticorpos ligados são reconhecidos por um conjugado de imunoglobulina anti-bovina. Os anticorpos neste conjugado ligam-se por meio de ligações covalentes à enzima peroxidase. Finalmente, o conjugado ligado é visualizado por adição de um substrato cromogénico. A especificidade da reacção é verificada utilizando o mesmo procedimento com uma preparação de controle gE-negativa no lugar da preparação de antigênio de gE. Em cada placa de microtitulação incluem-se soros de controle positivos e negativos. O teste é válido se o soro positivo apresentar um resultado positivo a um determinado valor de diluição. Um soro é positivo se apresentar um valor OD superior em 0,2 ao do soro de controle negativo convencional.

c) De acordo com o princípio IDAS, tal como foi descrito em b), mas após incubação do soro a examinar utiliza-se um conjugado Mab anti-gE/HRPO em vez do conjugado de imunoglobulina anti-bovina. Podem ser usados um soro de péptido anti-gE ou um soro policlonal anti-gE em vez do Mab anti-gE. As placas são lavadas e a cada cavidade adiciona-se um substrato cromogénico. Após, por ex. 2 h à temperatura ambiente, as placas são analisadas espectrofotometricamente. Incluem-se em cada placa quatro soros de controlo negativos e quatro diluições em série de um soro positivo. O soro que apresenta um valor OD inferior em 50% ao valor OD médio dos quatro soros de controlo negativos examinados na mesma placa é considerado positivo.

d) De acordo com o princípio de um procedimento ELISA de bloqueamento, em que um antigénio de vírus que pode apresentar-se ou não purificado é utilizado para revestir a placa de microtitulação de um dia para o outro. Nestas placas, o soro a examinar é incubado durante, por ex., uma hora ou durante mais tempo a 37°C. Após um procedimento de lavagem, adiciona-se às placas um Mab anti-gE, a que se segue incubação durante, por ex., 1 h a 37°C. Podem ser utilizados um soro de péptido anti-gE ou um soro policlonal anti-gE em vez do Mab anti-gE. As placas são lavadas e a cada cavidade adiciona-se um substrato cromogénico. Após, por ex., 2 h à temperatura, as placas são analisadas espectrofotometricamente. Incluem-se em cada placa quatro soros de controlo negativos e quatro diluições em série de um soro positivo. O soro que apresenta um valor OD inferior em 50% ao valor OD médio dos quatro soros de controlo negativos que foram examinados na mesma placa é considerado positivo.

Em todos os procedimentos atrás descritos pode ser usado antigénio de vírus cultivado de modo convencional que contenha gE, mas o mesmo sucede com antigénio de gE cuja

expressão tem lugar por meio de procariontes ou eucariontes. Em alternativa, poderiam ser usados nos testes de diagnóstico atrás referidos oligopéptidos com base na sequência de gE de BHV-1, em vez de antigénio convencional. Além disso, esses oligopéptidos poderiam ser usados para o desenvolvimento de um designado "cow-side test", de acordo com o princípio descrito num artigo de Kemp et al., Science 241, 1352-1354, 1988. Um tal teste basear-se-ia então numa ligação da sequência antigénica do oligopéptido a anticorpos dirigidos contra gE, presentes em animais infectados. Para um tal teste, o oligopéptido teria de ser ligado a um Mab dirigido contra eritrócitos de bovino.

Análise de ácidos nucleicos usando a técnica PCR

Os oligonucleótidos (sondas e "primers") podem, por exemplo, ser usados numa reacção em cadeia de polimerase a fim de se estabelecer uma distinção entre animais vacinados e infectados. A reacção em cadeia de polimerase ("polymerase chain reaction" ou PCR) é uma técnica por intermédio da qual os ácidos nucleicos de um agente patogénico podem ser multiplicados biliões de vezes num curto espaço de tempo (De polymerase kettingreactie, P.F. Hilderink, J.A. Wagenaar, J.W.B. van der Giessen e B.A.M. van der Zeijst, 1990, Tijdschrift voor Diergeneeskunde deel 115, 1111-1117). Os oligonucleótidos de gE podem ser escolhidos de tal modo que num genoma positivo de gE se forme um produto diferente daquele se forma num genoma negativo. A vantagem disto consiste no facto de um animal que tenha sido vacinado com uma vacina com deleção de gE também originar um sinal positivo num teste PCR. Todavia, esta abordagem depende da presença de ácidos nucleicos do vírus numa amostra, por exemplo sangue, proveniente do animal que se pretende testar.

Após uma infecção aguda por BHV-1, existe uma grande probabilidade de poder ser feita no sangue a demonstração de ácidos nucleicos específicos de BHV-1, mas ainda não se estabeleceu se os ácidos nucleicos de BHV-1 podem também ser demonstrados no sangue durante o período de latência.

A utilização de BHV-1 como vector

Para a expressão de genes heterólogos no genoma de BHV-1, é necessário dispor de informações exactas acerca da área onde se pretende inserir o gene heterólogo. Não devem ser perturbadas quaisquer sequências fundamentais, e as sequências de regulação devem permanecer disponíveis para a expressão do gene heterólogo. Em princípio, o gene da glicoproteína gE constitui um local adequado para a expressão de genes heterólogos. O gene gE não é essencial, não existindo por conseguinte qualquer objecção à substituição do gene gE por um gene heterólogo. Em consequência disso, o gene heterólogo pode ser posicionado de tal modo que se encontre sob a influência das sequências de regulação do gene gE. Todavia, não é necessário utilizar as sequências de regulação do gene gE. A expressão de genes heterólogos pode ser controlada, alternativamente, por outras sequências de regulação, por ex. mais fortes, de genes diferentes. É também possível ligar o gene heterólogo ao péptido sinal (exportado) do gene gE, de tal modo que a secreção do produto do gene heterólogo possa ser influenciada. É óbvio que um conhecimento pormenorizado do gene gE e da proteína gE confere a possibilidade de utilização de BHV-1 como vector de um modo muito controlado. Os vectores desenvolvidos podem, além disso, ser distinguidos serologicamente do tipo selvagem. A construção de mutantes de BHV-1 que expressem genes heterólogos pode ser levada a cabo de modo análogo àquele que foi utilizado para a construção de mutantes com deleção de gE, tal como se descreve nos exemplos. Todavia, os fragmentos de

delecção devem depois ser substituídos por um fragmento apresentando um gene heterólogo no local da delecção.

EXEMPLOS

1) Isolamento e identificação de um mutante com delecção de gE natural

a) Isolamento de um mutante natural

Isolou-se DNA genómico de uma série de vacinas atenuadas de modo convencional de acordo com métodos conhecidos, que se analisou utilizando enzimas de restrição. Em particular, procurámos desvios no genoma que fossem adequados permitindo distinguir o vírus BHV-1 tipo selvagem.

A atenção foi dirigida em particular para a região U_S do genoma de BHV-1, uma vez que estão provavelmente localizados nessa região - por analogia com o vírus de herpes simplex - uma série de genes que codificam glicoproteínas não essenciais [Identification of a herpes simplex virus 1 glycoprotein gene with a gene cluster dispensable for growth in cell culture, R. Longnecker, S. Chatterjee, R.J. Whitley e B. Roizman (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4303-4307].

Um lote de uma vacina de BHV-1 proveniente da Universidade de Zagreb, Jugoslávia (Lugovic et al., Veterinarski Arhiv 55, 241-245, 1985), após um grande número de passagens em células embrionárias de rim de bovino e células embrionárias de traqueia de bovino (Ebtr) revelou apresentar uma região U_S apresentando desvio para além de uma região U_S normal. Esta vacina parecia, além disso, dar origem à formação de plaquetas pequenas e grandes em células Etbr. A partir desta população mista isolou-se um

vírus com uma região U_S apresentando desvio, por intermédio de três passos de diluição com limitação, escolhendo-se de cada vez plaquetas pequenas. O vírus isolado por este método foi examinado adicionalmente e designado Difivac-1, tendo sido depositado no Institut Pasteur, Paris, França, a 27 de Maio de 1992, com o número de depósito I-1213.

b) Identificação da deleção no gene gE em Difivac-1

Para uma análise adicional deste desvio na região U_S , o DNA genômico de Difivac-1 foi isolado de acordo com métodos convencionais e submetidos a uma análise pela técnica "Southern blot" (Fig. 1A). A hibridação deste "blot" com um fragmento K de HindIII tipo selvagem marcado com ^{32}P confirmou que o fragmento, localizado na zona central da região U_S , era cerca de 1,0 kilobase (kb) mais curto em Difivac-1. Além disso, foi possível por intermédio desta análise obter a posição aproximada da parte que faltava (Fig. 1B). Para uma análise adicional desta deleção, a região U_S da estirpe Lam de BHV-1 tipo selvagem foi isolada e clonada em vectores procarióticos. Com essa finalidade, e de acordo com métodos convencionais, isolou-se DNA genômico da estirpe Lam (Fig. 2A) que foi clonado nos vectores pUC18, pACYC e pBR322 (Fig. 2B). Compôs-se um mapa físico da área em volta da suposta posição da deleção (Fig. 2C). Partindo deste mapa físico, construíram-se subclones adequados para a determinação da sequências de nucleótidos dessa área nos vectores pKUN19 e pUC18 (Fig. 2D). Usando esses subclones, determinou-se a sequência de nucleótidos das duas cadeias em toda a área (indicada na Fig. 2C), recorrendo ao método Sanger. Esta sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:1) foi analisada usando o programa PC/Gene. Partindo da tradução conceptual, verificou-se que os nucleótidos (nt) 168 a nt 1893 pareciam codificar um quadro de leitura aberto ("open reading frame") de 575 aminoácidos (Fig. 3A). Uma análise

ulterior revelou que esta sequência de aminoácidos apresenta as características de uma glicoproteína transmembrana, tal como se mostra na Fig. 3B. Na realidade, os primeiros 26 aminoácidos (aa) são reconhecidos como constituindo um sinal de exportação eucariótico típico ("export signal") e a área entre aa 423 e aa 450 é reconhecida como constituindo uma região transmembrana. Além disso, existem nesta sequência três locais potenciais de glicosilação N-ligada. Esta sequência prevista de aminoácidos apresenta claras semelhanças com o gene da glicoproteína gE do vírus de herpes simplex (HSV); ver Figs. 4A e 4B. Estas e outras semelhanças justificam a conclusão de que o gene encontrado constitui o homólogo de gE de BHV-1. Por esse motivo, o gene é designado gE. A fim de determinar até que ponto este gene gE de BHV-1 falta em Difivac-1, o fragmento p318 foi isolado. O fragmento p318 começa no local AluI 55 nt antes do quadro de leitura aberto de gE de BHV-1 postulado e termina 133 nt depois dele. O DNA genómico de Difivac-1 foi analisado com este fragmento p318 usando a técnica de hibridação de "Southern blot". Este procedimento revelou que o Difivac-1 não continha quaisquer sequências detectáveis de p318 (Fig. 5). Esta experiência confirmou que o Difivac-1 apresenta uma deleção e demonstrou claramente que essa deleção abrange a totalidade do gene gE.

Para determinar a dimensão e a posição da região que sofreu deleção, clonaram-se em vectores procarióticos sequências genómicas abrangendo a região U_S de Difivac-1. Ver Figura 11C. O fragmento EcoRI de 14,5 kb foi clonado no vector pACYC e designado p775. O fragmento HindIII de 7,4 kb foi clonado independentemente no vector pUC18 e designado p728. A partir do clone p728 isolaram-se dois subclones: o fragmento PstI de 1,4 kb no clone p737 e o fragmento AluI-PstI de 350 bp no clone p754. A análise com enzimas de restrição e a análise por intermédio da técnica de "Southern blot" destes clones (resultados não

apresentados) demonstram que a deleção de gE em Difivac-1 tem um comprimento de 2,7 kb, começando imediatamente a 5' do gene gE e terminando na fronteira da região U_S . Estes 2,7 kb foram substituídos por uma duplicação de um segmento de 1 kb, localizado na região U_S que se opõe ao gene gE, como extensão/aberração da região de repetição. Ver Figura 11B. Para confirmar os resultados desta análise e determinar o ponto exacto de recombinação, a sequência de nucleótidos da maior parte do fragmento inserido ("insert") do clone p754 foi determinada e comparada com sequências tipo selvagem. Ver Figura 12. Esta análise mostrou que o ponto de recombinação se situa 77 bp a montante do codão "start" do gene gE.

c) Avaliação da segurança e eficácia de Difivac-1

O Difivac-1 foi testado em vitelos de sete semanas apresentando seronegatividade específica relativamente a BHV-1 e livres de agentes patogénicos. Sete vitelos foram vacinados por via intranasal com 10^5 TCID₅₀ em 2 ml, de que se pulverizou 1 ml em cada narina. A oito vitelos de sete semanas apresentando seronegatividade específica relativamente a BHV-1 e livres de agentes patogénicos, mantidos numa unidade de isolamento separada, foram administrados 2 ml de meio de cultura por via intranasal, tendo servido de animais de controlo não vacinados. Cinco semanas após a vacinação, os vitelos vacinados e de controlo foram submetidos a um desafio por via intranasal com 10^7 TCID₅₀ da estirpe Iowa, uma estirpe de BHV-1 extremamente virulenta. Seis semanas após o desafio, todos os vitelos foram tratados por via intramuscular com dexametasona durante 5 dias, a fim de serem reactivados vírus latentes putativos. A evolução dos sintomas clínicos, temperaturas rectais e crescimento dos seus corpos foi seguida. Procedeu-se ao isolamento dos vírus a partir de

recolhas de material nasal e os títulos dos anticorpos neutralizantes foram determinados em soro.

Após a vacinação, o comportamento, apetite, temperatura rectal e taxa de crescimento dos vitelos permaneceram normais, mas os animais vacinados apresentavam descargas nasais de soro e alguma hipersalivação. Não foram observadas lesões na mucosa nasal. Verificou-se a excreção de Difivac-1 em recolhas de material nasal após a vacinação (Fig. 17). Todos os vitelos vacinados produziram anticorpos neutralizantes relativamente a BHV-1.

Após o desafio, todos os vitelos não vacinados apresentavam sinais de apatia, perda de apetite, descargas oculares e nasais, gengivas do maxilar inferior mais vermelhas, lesões graves das mucosas nasais até 14 dias após o desafio e uma interrupção do crescimento de 4 dias. Os vitelos vacinados apresentavam pequenas lesões das mucosas nasais que rapidamente saravam e não apresentavam qualquer interrupção do processo de crescimento. Nas Figs. 18, 19 e 20 apresentam-se os valores clínicos, as temperaturas rectais e o desenvolvimento do processo de crescimento diários após o desafio. Após o desafio, todos os vitelos libertavam vírus pelo focinho, embora a quantidade da excreção e o período durante o qual ela ocorria fosse marcadamente mais reduzidos nos vitelos vacinados (Fig. 21). Nos vitelos vacinados teve lugar uma reacção de anticorpos secundária e os vitelos não vacinados produziram todos anticorpos após o desafio.

Após a reactivação, o vírus do desafio foi isolado a partir de um vitelo vacinado e de 5 vitelos não vacinados. Não foi possível reactivar Difivac-1.

Os resultados atrás referidos demonstram que Difivac-1 praticamente não induzia quaisquer sintomas de doença em vitelos jovens e não podia ser reactivado. O Difivac-1 reduzia acentuadamente a gravidade da doença e a quantidade de excreção de vírus após o desafio.

Em conclusão, o Difivac-1 constitui uma vacina segura e eficaz para utilização em gado bovino contra infecções provocadas por BHV-1.

2) Construção de mutantes de deleção de gE de BHV-1 recombinantes

A fim de se poder dispor de vacinas de BHV-1 diferenciáveis que, de um ponto de vista molecular, estivessem mais bem definidas do que Difivac-1 e que, caso se desejasse, apresentassem uma deleção, por exemplo, no gene da quinase de timidina, para além de uma deleção no gene gE, construíram-se, para além de Difivac-1, mutantes de deleção de gE recombinantes. Partindo da posição determinada do gene da glicoproteína gE e utilizando os fragmentos de DNA clonados que flanqueiam o gene gE, foi possível construir um fragmento de deleção de gE. Utilizando uma técnica convencional (F.L. Graham e A.J. van der Eb, 1973, Virology 52, 456-467), foi possível recombinar este fragmento de deleção no genoma de uma estirpe de BHV-1 tipo selvagem, de que resultou um mutante de deleção de gE.

a) A construção do fragmento de deleção de gE

Para a construção do fragmento de deleção de gE, teve-se como objectivo a obtenção de um fragmento a que, por um lado, faltasse a totalidade da sequência gE e que, por outro, apresentasse uma sequência flanqueadora com extensão suficiente

para permitir recombinação com o genoma tipo selvagem. Do lado 5' (a montante), foi escolhido o fragmento PstI-AsuII de 1,2 kb que termina 18 nt antes do codão "start" do gene gE. Para o fragmento 3' (a jusante) foi escolhido o fragmento EcoNI-DraI de 1,2 kb, que começa 2 nt antes do codão "stop" do gene gE (fig. 6).

Para a construção do fragmento de deleção de gE, o fragmento PstI-SmaI de 1,4 kb proveniente do fragmento HindIII K de 8,4 kb da estirpe Lam de BHV-1, localizado no lado 5' do gene gE, foi subclonado no local SmaI e PstI do plasmídeo pUC18. Este clone foi designado p515. O fragmento EcoNI-SmaI localizado no lado 3' de gE e proveniente do clone HindIII-EcoRI de 4,1 kb foi clonado no único local AsuII de p515. Deste modo se completou a construção do fragmento de deleção de gE, tendo o clone assim construído sido designado p519. Embora, em princípio, a totalidade do fragmento inserido ("insert") PstI-SmaI de p519 pudesse ser usada como fragmento de deleção de gE, tal não era aconselhável. De facto, o fragmento PstI-SmaI prolonga-se por cerca de 100-150 pares de bases (bp) para o interior da sequência de repetição ("repeat sequence") que flanqueia a região U_S . Este fragmento de 100-150 bp pode, em princípio, recombinar-se com a sequência de repetição do outro lado da área U_S onde o gene gE não está localizado, dando origem desse modo a produtos de recombinação não desejados. Por esse motivo, foi escolhido o fragmento PstI-DraI para a experiência de recombinação, pelo que 100 bp da sequência de repetição são removidos.

b) Recombinação do fragmento de deleção de gE com o genoma de BHV-1 tipo selvagem

Com o objectivo de levar a cabo a recombinação entre o

fragmento de deleção de gE construído e o genoma de BHV-1 tipo selvagem, cotransfectaram-se quantidades da ordem dos microgramas das duas moléculas de DNA para células embrionárias de traqueia de bovino (Ebtr) de acordo com a técnica convencional de F.L. Graham e A.J. van der Eb (1973, Virologia 52, 456-467). Os mecanismos de recombinação celular proporcionam a recombinação de uma pequena percentagem das moléculas de DNA (2-4%) que foram incorporadas pelas células. Para efeitos de selecção dos mutantes de deleção de gE recombinados, a mistura de vírus que se forma após a transfecção é disseminada numa cultura fresca de células de Ebtr. Na maioria dos casos, as diferentes populações de vírus que desse modo se desenvolvem (plaquetas) têm origem num vírus. Para o isolamento dos mutantes de deleção de gE da estirpe Lam de BHV-1, isolaram-se 230 dessas plaquetas que foram examinadas de acordo com métodos imunológicos convencionais, recorrendo a anticorpos monoclonais específicos relativamente a BHV-1 (Mabs) que não reagem com células infectadas por Difivac-1. Estes Mabs são dirigidos contra a glicoproteína gE. Cinco das 230 plaquetas não reagiram com esses Mabs. Procedeu-se a uma análise adicional do DNA dessas 5 plaquetas.

c) Análise do DNA dos mutantes de deleção de gE da estirpe Lam de BHV-1 construídos

Preparações de DNA de 3 (1B7, 1B8 e 2H10) dos 5 mutantes de deleção de gE candidatos atrás referidos foram analisados adicionalmente utilizando a técnica convencional de análise "Southern blot" (Sambrook et al. 1989). Digestões duplas destas preparações de DNA com PstI e DraI, seguidas por electroforese sobre gel e hibridação pela técnica "Southern blot" com o fragmento de deleção PstI-DraI de 2,3 kb funcionando como sonda revelaram que o gene gE do genoma das populações de vírus 1B7 e 1B8 tinha sido removido exactamente do modo desejado; ver Figs.

7A e 7B. A população 2H10 apresentava um fragmento PstI-DraI que se desviava dessa situação. Híbridações pela técnica de "Southern blot" com uma sonda específica relativamente a gE revelaram não existirem quaisquer sequências gE localizadas em qualquer uma das três preparações de DNA (resultados não apresentados). As populações de vírus BHV-1 1B7 e 1B8 foram consideradas populações de mutantes de deleção de gE recombinantes. A população de vírus BHV-1 1B7 foi testada relativamente às suas possíveis propriedades como vacina.

d) Construção de mutantes de deleção dupla quinase de timidina/gE

Uma vez que os mutantes de deleção recombinantes de BHV-1 com uma deleção em apenas um gene podem não apresentar uma virulência suficientemente reduzida, proporcionaram-se também deleções no gene da quinase de timidina ("thymidine kinase" ou TK) das estirpes Lam e Harberink de BHV-1. Estes mutantes foram construídos de modo análogo àquele que foi utilizado para os mutantes de deleção de gE atrás referidos (resultados não apresentados). Estes mutantes de deleção de TK foram usados para construir mutantes de deleção dupla TK/gE.

e) Construção de mutantes de deleção dupla glicoproteína gI/glicoproteína gE

Uma vez que o gado vacinado com um mutante de deleção única gE pode produzir anticorpos anti-gI que podem interferir com a detecção de anticorpos anti-gI/gE (situação adiante analisada), inventámos também uma vacina com uma deleção dupla gI/gE. Um tal mutante de deleção dupla gI/gE pode ser construído usando os mesmos procedimentos que foram utilizados para a construção do mutante de deleção única gE. A análise parcial da sequência de

nucleótidos da extremidade a montante do fragmento PstI de 1,8 kb - que cobre a extremidade 5' do gene gE - revelou um quadro de leitura aberto apresentando uma homologia significativa relativamente a homólogos de gI encontrados noutros vírus de herpes. Ver Figuras 13 e 14. Utilizando o fragmento SmaI-PstI de 350 bp que inclui a extremidade 5' putativa do gene gI e o fragmento EcoNI-SmaI, situado a jusante do gene gE, é possível construir um fragmento de deleção de gE/gI. Este fragmento pode ser recombinado com o genoma selvagem tipo selvagem a fim de proporcionar um mutante de deleção de gI/gE de BHV-1. Ver Figura 16. Os 80-90 aminoácidos que, em teoria, podem ainda ser produzidos, serão incapazes de promover o aparecimento de anticorpos que possam, de algum modo, interferir com a detecção de anticorpos anti-gI/gE. Uma análise mais completa da sequência de nucleótidos do gene gI permitirá construir uma deleção de gI que abranja a totalidade da região que codifica gI. Este mutante de deleção dupla gI/gE foi baptizado Difivac-IE.

f) Avaliação da segurança e eficácia dos mutantes Lam gE⁻ e Lam gE⁻,TK⁻

As propriedades como vacinas das estirpes mutantes de BHV-1 Lam gE⁻ e Lam gE⁻,TK⁻ foram testadas em vitelos com sete semanas, seronegativos relativamente a BHV-1 e livres de agentes patogénicos específicos. Cada uma das estirpes mutantes foi administrada a 6 vitelos por meio de pulverização intranasal. A cada vitelo foi administrada uma dose total de 10^5 TCID₅₀ em 2 ml de meio de cultura, de que se pulverizou 1 ml em cada narina. Seis outros vitelos foram pulverizados por via intranasal com meio de cultura sem vírus, e serviram de animais de controlo não vacinados. Cinco semanas após a vacinação, todos os vitelos, tanto aqueles que tinham sido vacinados como os controlos, foram submetidos a um desafio por via intranasal com 10^7 TCID₅₀ da

estirpe Iowa, uma estirpe extremamente virulenta de BHV-1. Após a vacinação e após o desafio, a evolução dos sintomas clínicos, temperaturas rectais e pesos corporais foi seguida. Foi recolhido material nasal a fim de se determinar o número de dias de libertação de vírus por via nasal.

Após a vacinação, o comportamento, apetite, temperatura rectal e taxa de crescimento dos vitelos permaneceu normal. Em todos os vitelos vacinados foram observadas descarga nasal de soro e pequenas lesões da mucosa nasal. Foi possível isolar vírus a partir dos focinhos dos vitelos vacinados durante cerca de 7 dias (Quadro 1).

Após o desafio, todos os vitelos não vacinados revelaram apatia, falta de apetite, descargas oculares e nasais, gengivas do maxilar inferior avermelhadas, lesões graves das mucosas nasais e crescimento reduzido. Os vitelos vacinados com Lam gE⁻,TK⁻ desenvolveram todos alguma descarga nasal e revelaram ligeiras lesões das mucosas nasais. Nem todos os vitelos vacinados com Lam gE⁻ desenvolveram descargas nasais ou lesões das mucosas nasais. Nos vitelos vacinados não se observaram apatia, falta de apetite ou outros sintomas clínicos da doença. As temperaturas rectais, o crescimento e os valores clínicos após o desafio são apresentados nas Figs. 22, 23 e 24. Os vitelos não vacinados libertaram vírus pelo focinho durante o dobro do tempo dos vitelos vacinados (Quadro 1).

Os resultados atrás referidos demonstram que as estirpes mutantes de BHV-1 Lam gE⁻ e Lam gE⁻,TK⁻ praticamente não induzem quaisquer sintomas clínicos da doença em vitelos jovens. Ambas as estirpes mutantes evitaram a doença após o desafio e reduziram o período de libertação nasal do vírus em 50%.

As estirpes mutantes de BHV-1 Lam gE⁻ e Lam gE⁻,TK⁻ são seguras e eficazes, podendo ser usadas na vacinação de gado bovino contra infecções provocadas por BHV-1.

3) Expressão procariótica de gE

Para a expressão procariótica do gene da glicoproteína gE de BHV-1 têm sido utilizados, até agora, vectores de expressão pGEX (D.B. Smith e K.S. Johnson, Gene 67 (1988) 31-40). Os vectores pGEX codificam a proteína veículo S-transferase de glutathione ("glutathione S-transferase" ou GTS) de *Schistosoma japonicum* que está sob a influência do promotor tac que pode ser induzido a exprimir-se por meio de Isopropiltiogalactosídeo ("Isopropylthiogalactoside" ou IPTG). Constitui um exemplo de uma proteína de fusão GST-gE o produto do material construído pGEX-2T600s3 (Fig. 8A). Neste material construído recorrendo a técnicas de biologia molecular convencionais (Sambrook et al., 1989), um fragmento SmaI de 600 bp que codifica uma região N-terminal de 200 aminoácidos da proteína gE foi ligado atrás do gene de GST. Este material construído foi concebido em triplicado, sendo ligado ao GST de cada vez um quadro de leitura diferente do fragmento de 600 bp. Os três materiais construídos foram introduzidos na estirpe DH5 α de *Escherichia coli*, induzidos com IPTG e as proteínas que se formaram foram transferidas para nitrocelulose após electroforése sobre gel de poliacrilamida por meio da técnica de "Western blotting". A detecção imunológica com anticorpos anti-GST revelou que apenas o quadro de leitura adequado (o N $^{\circ}$ 3) que codifica a área da proteína gE origina a expressão de uma proteína de fusão proeminente com a dimensão prevista de 27k (GST) + 20k (gE) = 47k. Três dos Mabs isolados por nós que não reagem com Difivac-1 reconhecem a proteína de fusão de 47 kD GST-gE numa análise pela técnica "Western blot"; ver figura 8B.

4) Expressão eucariótica do gene da glicoproteína gE

Para a expressão eucariótica do gene da glicoproteína gE foi escolhido, anteriormente e entre outros, o vector pRVHis. O vector pEVHis apresenta, como marcador eucariótico ("eukaryotic marker"), o gene HisD que codifica a desidrogenase de histidinol [EC 1.1.1.23] (C. Hartmann e R. Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8047-8051) que leva a células a sobreviverem à concentração tóxica de histidinol 2,5 mM. Este vector inclui, ainda, a região promotora do gene precoce imediato ("immediate early gene") do citomegalovírus humano ("human cytomegalovirus" ou HCMV), com locais de enzimas de restrição únicos situados atrás dele. Para a construção de um vector de expressão pEVHis/gE foi utilizado um fragmento que incluía a totalidade da região codificadora do gene da glicoproteína gE. Esta tem início no local AluI 55 bp antes do quadro de leitura aberto de gE que foi postulado e termina 133 bp atrás dele. Esta região foi clonada atrás do promotor de HCMV do vector pEVHis, tendo desse modo sido obtido o material construído ("construct") pEVHis/gE (Fig. 9). O pEVHis/gE foi amplificado em células de E. coli DH5 α e purificado por meio de um gradiente de cloreto de cério (Sambrook et al., 1989). Este DNA purificado foi transfectado para células Balb/C-3T3 de acordo com o método de Graham e Van der Eb. As células transformadas foram seleccionadas com histidinol, o que permitiu o isolamento de vinte colónias resistentes ao histidinol. Estas colónias foram examinadas com Mab 81 por meio de um ensaio do tipo "Immuno Peroxidase Monolayer Assay" (IPMA). Quatro colónias revelaram exprimir a proteína gE. Destas quatro colónias, foi utilizado o clone 9 de 3T3 gE para isolar um subclone apresentando uma elevada expressão de gE. O clone isolado por este método (denominado 3T3gE 9.5) foi utilizado para a caracterização de anticorpos monoclonais anti-gE candidatos.

5) Expressão eucariótica da glicoproteína gE de BHV-1 e da glicoproteína gI de BHV-1 na mesma célula

A fim de exprimirmos a glicoproteína gI de BHV-1 na mesma célula da glicoproteína gE de BHV-1 determinamos em primeiro lugar a posição putativa do gene gI de BHV-1. Uma vez que o gene da glicoproteína gI do vírus herpes simplex se situa imediatamente a montante do gene da glicoproteína gE, inferiu-se que o gene gI de BHV-1 se situaria numa posição correspondente. Para testar esta hipótese, determinou-se a sequência de uma região de 283 nucleótidos, localizada cerca de 1 kb a montante do início do gene gE de BHV-1. A tradução conceptual desta região revelou que o segundo quadro de leitura codifica uma sequência de 94 aminoácidos que é homóloga da glicoproteína gI do vírus herpes simplex (figuras 13 e 14). Uma vez que o segmento homólogo se situa a cerca de 80 aminoácidos do codão "start", calcula-se que o "start" putativo do quadro de leitura aberto do gene gI de BHV-1 se situe cerca de 250 nt a montante da região cuja sequência foi determinada. Daqui inferiu-se que o fragmento SmaI de 1,7 kb que se inicia 400 nt a montante da região cuja sequência foi determinada e que termina no interior do gene gE deveria conter a totalidade da região codificadora do gene gI de BHV-1. Este fragmento SmaI de 1,7 kb foi clonado no vector eucariótico MSV-neo (Ver figura 15). Este vector inclui o promotor forte do Vírus de Sarcoma Murino ("Murine Sarcoma Virus" ou MSV) e o gene selector neo que codifica a resistência ao antibiótico "G-418 sulphate Geneticin". O material construído resultante MSVneo GI foi amplificado em células E. coli DH5 α e foi transfectado para células 3T3gE 9.5 utilizando o método de Graham e Van der Eb. As células transfectadas foram seleccionadas com 400 μ g de Geneticin/ml de meio de cultura e as colónias resistentes foram isoladas e testadas com Mabs anti-gE candidatos que não reagem com células 3T3gE 9.5. A partir daqui seleccionámos o clone

3T3gE/gI R20 que reagia com, por ex., Mab 66, tão bem como o BHV-1 tipo selvagem.

6) Caracterização dos Mabs anti-gE candidatos

Produziram-se Mabs relativamente a BHV-1 tipo selvagem, que se seleccionaram em relação á sua incapacidade para reagirem com células embrionárias de traqueia de bovino ("embryonic bovine trachea cells" ou Ebtr) infectadas com Difivac-1. Estes Mabs são examinados relativamente á sua reactividade em relação a

- a) o mutante de deleção Lam gE⁻;
- b) o produto de expressão procariótica atrás descrito num teste do tipo "Western blot";
- c) as células Balb/c-3T3 exprimindo gE atrás descritas;
- d) células referidas em c) e infectadas com Difivac-1, e
- e) células Balb/c-3T3 exprimindo o complexo gE/gI.

Para os testes de reactividade referidos em a, c, d e e foi utilizado um teste do tipo "Immuno Peroxidase Monolayer Assay" (IPMA). Os resultados apresentados no Quadro 2 revelam que produzimos Mabs dirigidos contra gE (nº 2, 3, 4, 52, 66, 68, 72 e 81) e Mabs (nº 1, 51, 53, 67, 75 e 78) que podem ser dirigidos contra domínios de conformação antigénicos no complexo gE/gI. Um teste IPMA competitivo para estabelecimento de um mapa ("mapping") dos domínios antigénicos reconhecidos pelos diferentes Mabs revelou a presença de pelo menos 4 domínios antigénicos na glicoproteína gE e o facto de o complexo gE/gI formar provavelmente um domínio (Quadro 2).

Detecção de anticorpos anti-gE em gado infectado com BHV-1

Para investigar se no soro de gado infectado estão presentes anticorpos anti-gE, levou-se a cabo um teste do tipo IPMA com bloqueamento indirecto ("indirect blocking IPMA") nos 16 gE-Mabs candidatos e nos 8 soros seleccionados que se seguem:

- 2 soros de bovinos vacinados com Difivac-1 e submetidos a um desafio com a estirpe virulenta Iowa, que foram recolhidos 14 dias após o desafio;
- 2 soros de bovinos infectados experimentalmente com vírus BHV-1 subtipo 1, que foram recolhidos 20 meses após a infecção. Um dos bovinos foi infectado através de contacto;
- 2 soros de bovinos infectados experimentalmente com vírus BHV-1 subtipo 2b, que foram recolhidos 20 meses após a infecção. Um dos bovinos foi infectado através de contacto;
- um soro de um vitelo livre de agente patogénico específico vacinado com uma vacina de mutante ts e submetido 3 semanas mais tarde a um desafio com o vírus BHV-1 subtipo 2b, que foi recolhido 7 semanas após o desafio;
- um soro de um vitelo gnotobiótico vacinado com uma vacina de mutante ts e submetido 3 semanas mais tarde a um desafio com vírus BHV-1 subtipo 2b, que foi recolhido 7 semanas após o desafio.

O Quadro 2 mostra que todos estes soros continham anticorpos contra os domínios antigénicos III e IV em gE, e contra o domínio antigénico I que está provavelmente localizado no complexo gE/gI. Podemos concluir que gE parece constituir um marcador serológico adequado para estabelecer a distinção entre gado infectado com BHV-1 e gado vacinado.

7) Detecção de ácidos nucleicos de BHV-1 por meio da técnica PCR utilizando "primers" específicos relativamente a gE de BHV-1

Partindo da sequência de nucleótidos do gene gE de BHV-1 que foi determinada, seleccionou-se um par de "primers" adequado para utilização num procedimento PCR, usando o programa de selecção de "primers" de Lowe et al. (T. Lowe, J. Sharefkin, S. Qi Yang e C.W. Dieffenbach, 1990, Nucleic Acids Res. 18, 1757-1761). Estes "primers" foram designados P_3 e P_4 e estão representados na Fig. 10. Os "primers" estão separados entre si por 159 nt e dão origem à amplificação de um fragmento de 200 nt. As condições para utilização da técnica PCR foram optimizadas recorrendo à utilização dos "primers" P_3 e P_4 e de DNA de BHV-1 isolado. Isto implicou, em particular, a variação da concentração de $MgCl_2$, da concentração de glicerol e das condições dos ciclos. A solução tampão óptima encontrada para utilização de P_3 e P_4 na amplificação de DNA de BHV-1 consiste em Tris pH 8,0 10 mM, KCl 50 mM, gelatina a 0,1%, $MgCl_2$ 2,6 mM e glicerol a 20%. As condições de ciclo óptimas encontradas (Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler) são, para os ciclos 1-5, de 1 min. 98°C, 30 seg. 55°C e 45 seg. 72°C, e para os ciclos 6-35, de 30 seg. 96°C, 30 seg. 55°C e 45 seg. 72°C. Após a amplificação por meio da técnica PCR, o fragmento de DNA de 200 nt obtido foi submetido a electroforese sobre um gel de agarose a 2%, "blotted" sobre nitrocelulose e, subsequentemente, submetido a uma análise pela técnica "Southern blot". A sonda marcada com ^{32}P dCTP usada para a análise por meio da técnica "Southern blot" é o fragmento TaqI de 137 bp, que está localizado entre os locais de ligação do "primer" (Fig. 10). Na sequência de uma auto-radiografia dos filtros hibridizados, foi possível observar uma banda de 200 bp. Utilizando esta via, a amplificação de apenas 10 genomas de BHV-1 (aprox. $1,5 \times 10^{-15}$ μg de DNA) proporciona ainda assim um sinal

que pode ser detectado de modo adequado (resultado não apresentado). De modo análogo, desenvolveu-se um procedimento PCR utilizando "primers" com base na sequência codificadora da glicoproteína gIII de BHV-1 (D.R. Fitzpatrick, L.A. Babiuk e T. Zamb, 1989, Virology 173, 46-57). Para que fosse possível estabelecer uma distinção entre DNA de BHV-1 tipo selvagem e uma vacina de mutante de deleção de gE, amostras de DNA foram submetidas tanto a análise PCR específica relativamente a gE como a análise PCR específica relativamente a gIII. Num teste deste tipo, verificou-se que uma preparação de DNA de Difivac-1 era positiva relativamente a gIII e negativa relativamente a gE.

Uma vez que a detecção de DNA de BHV-1 no sêmen de bovinos irá constituir uma utilização importante do procedimento PCR específico relativamente a BHV-1, tentou-se utilizar a técnica PCR específica relativamente a gE em sêmen de bovinos infectado com BHV-1. Todavia, existem componentes desconhecidos no sêmen que exercem um efeito de inibição forte sobre a reacção em cadeia de polimerase. Foi, por conseguinte, desenvolvido um protocolo para isolar o DNA de BHV-1 do sêmen de bovinos. Para isolar o DNA do sêmen de bovinos, 30 μ l de sêmen foram incubados com 1 mg/ml de proteinase K (pK) num volume total de 300 μ l de NaCl 0,15 M, Na-Sarkosyl a 0,5% e DTT 40 mM, a 60°C. Passada 1 hora, a amostra foi deixada arrefecer para o valor da temperatura ambiente, adicionaram-se 300 μ l de NaI 6 M e o conjunto foi incubado durante 5 minutos. O DNA foi isolado a partir desta mistura por meio de uma extracção convencional com clorofórmio/isoamiletanol, e precipitado com 1 volume de isopropanol. O precipitado foi lavado com NH_4Ac 2,5 M/etanol a 70% e suspenso de novo em Tris pH 7,4 10 mM, EDTA 1mM, Tween 80 a 0,5% e 0,1 mg/ml de pK para uma nova incubação durante 1 hora a 60°C. Esta preparação de DNA pode ser submetida directamente à técnica PCR.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1

Análise pela técnica de "Southern blot" das estirpes Difivac e Iowa de BHV-1

A. Imagem de um auto-radiograma resultante de uma análise pela técnica "Southern blot" do DNA genômico de Difivac-1 e Iowa. Nas pistas 1 e 3, o DNA de Difivac-1 foi aplicado após digestão com as enzimas de restrição HindIII e PstI, respectivamente. Nas pistas 2 e 4, o DNA de Iowa foi aplicado após digestão com as enzimas de restrição HindIII e PstI, respectivamente. As dimensões dos fragmentos são indicadas em kilobases (kb).

Isolou-se o DNA viral centrifugando o meio de cultura (70 ml/garrafa de rolamento ("roller bottle") de cerca de 450 cm²) com células Ebtr infectadas com vírus durante 2 horas através de uma almofada de sucrose a 25% (p/p), em Tris pH 7,4 10 mM, NaCl 150 mM e EDTA 1 mM a 20 krpm no rotor SW27 da ultracentrifugadora Beckman L5-65. A partir do grânulo de vírus assim obtido isolou-se o DNA de acordo com técnicas convencionais (J. Sambrook, E.F. Fritsch e T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor laboratory Press, Nova Iorque). Este DNA foi submetido a digestões com enzimas de restrição provenientes de Boehringer Mannheim nas soluções "SuRE/cut buffers" fornecidas pelo fabricante.

Após separação sobre um gel de agarose a 0,7% para efeitos de electroforese horizontal e "blotting" sobre um filtro de nitrocelulose (Schleicher & Schuell, Inc.), o filtro foi pré-hibridizado durante 6 horas a 42°C em formamida a 50%, 3 x SSC (1 x SSC = NaCl 0,15 M e citrato de Na 0,015 M, pH 7,4), 50

μ l de DNA de esperma de salmão desnaturado (Sigma)/ml e albumina de soro bovino a 0,02%, polivinil pirrolidona a 0,02% e ficoll a 0,02% e dodecilsulfato de Na ("sodium-dodecylsulphate" ou SDS) a 0,1%. Depois levou-se a cabo a hibridação, adicionando a essa solução o fragmento HindIII K marcado com 32 P dCTP (Amersham) (A escolha do fragmento HindIII K baseia-se em: clonagem e estabelecimento do mapa dos locais de clivagem do DNA de vírus de herpes bovino 1 (estirpe Cooper), John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOort, Alphonso R. Campbell e David A. Reed, Journal of Virology (1983) 259-264). Após 12-14 horas de hibridação, o filtro foi lavado durante 2 horas em SDS a 0,1% e 0,1 x SSC a 60°C. O fragmento Hind III K foi clonado no vector pUC18 de acordo com procedimentos convencionais de hibridação (J. Sambrook, E.F. Fritsch e T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque). Após a digestão com HindIII do clone pUC/8,4 HindIIIK o vector pUC18 foi novamente separado do fragmento HindIII K de 8,4 kb por meio de electroforese sobre gel de "Low Melting Point Agarose" (BRL, Life Technologies, Inc.) a 0,7%, e isolado da agarose por meio de procedimentos convencionais de extracção com fenol e precipitação com etanol. O fragmento HindIII K isolado foi marcado com "Random Primed DNA labeling Kit 1004.760" da Boehringer Mannheim. A auto-radiografia dos filtros hibridizados foi obtida mediante exposição durante 36 horas de um filme Kodak XAR a -70°C, utilizando um ecrã reflector.

B. Mapas físicos do fragmento HindIII K de 8,4 kb de Iowa e do fragmento HindIII de 7,4 kb de Difivac-1. Tendo em conta a co-migração dos fragmentos PstI de 6 kb e a ausência do fragmento PstI de 1,8 kb em Difivac-1, a deleção é postulada na área tracejada.

Figura 2

Subclonagem dos fragmentos de BHV-1 tipo selvagem em redor da região em falta em Difivac-1

Em A são mostrados os componentes do genoma de BHV-1: a região Única Longa ("Unique Long" ou U_L); a região Única Curta ("Unique Short" ou U_S) e as duas sequências de repetição ("repeats") (Ir e Tr). Este mapa baseia-se na análise publicada da estirpe Cooper (John F. Mayfield, Peter J. Good, Holly J. VanOort, Alphonso R. Campbell e David A. Reed, Journal of Virology (1983) 259-264).

Em B são apresentados os fragmentos da região U_S que foram clonados em vectores procarióticos: um fragmento EcoRI de 15,2 kb em pACYC, um fragmento HindIII de 8,4 kb em pUC18 e um fragmento EcoRI-HindIII de 2,7 kb e de 4,1 kb em pBR322. O isolamento dos fragmentos de DNA viral foi levado a cabo de acordo com os procedimentos que são referidos nas legendas da Fig. 1A. A clonagem destes fragmentos nos vários vectores foi executada de acordo com procedimentos convencionais (J. Sambrook, E.F. Fritsch e T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque).

Em C apresenta-se um mapa físico da região onde se localiza a deleção postulada em Difivac-1.

Em D indicam-se alguns subclones desta região, que foram utilizados para análises adicionais. Os dois fragmentos PstI foram clonados em pKUN19 e os restantes fragmentos em pUC18.

Figura 3

A: Sequência de nucleótidos compreendendo 2027 nucleótidos da região U_5 da estirpe Lam de BHV-1 em redor da localização postulada que foi eliminada em Difivac-1, tal como se indica na Fig. 2C [do local de reconhecimento de AluI no extremo esquerdo ao local de reconhecimento de HincII no extremo direito]. A sequência de nucleótidos nos fragmentos de inserção ("inserts") dos subclones apresentados na Fig. 2D foi determinada mediante análise das duas cadeias usando o método de sequenciação didesoxi de Sanger et al. (F. Sanger, S. Nicklen e A.R. Coulson, 1977, Proc. natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Com esse fim, foi utilizado o "T7 sequence kit" da Pharmacia, de acordo com o procedimento especificado pelo fabricante. Para efeitos de marcação radioactiva, utilizou-se [35 S] dATP (Amersham). A análise da sequência das regiões ricas em GC com artefactos de compressão foi repetida com a variante 7-deaza-dGTP do "kit" da Pharmacia. Por debaixo da sequência de nucleótidos indica-se, utilizando o código de três letras, a sequência de aminoácidos (aa) do quadro de leitura aberto de 575 resíduos aa, que foi encontrada após tradução conceptual da sequência de nucleótidos. Esta tradução baseia-se no código universal e foi determinada utilizando o programa para computador PC/gene (PC/gene versão 1,03, Novembro 1987). Este quadro de leitura aberto de 575 aa inicia-se com metionina no nt 168 e termina com o codão "stop" no nucleótidos 1893.

A análise estrutural do quadro de leitura aberto de 575 resíduos aa foi também levada a cabo com o programa de computador PC/gene. Os primeiros 26 aa formam um sinal de exportação eucariótica identificado na figura pela designação "péptido sinal" ("signal peptide"). Com um valor de 6,2, a clivagem desta sequência-sinal é prevista entre aa 26 e aa 27. A sequência de

575 aa apresenta três locais possíveis de glicosilação N-ligada ("N-bound glycosylation sites" ou NXT/S) indicados por uma linha sob os resíduos aminoácidos. De acordo com o método de Rao e Argos, existe uma região transmembrana entre aa 423 e aa 450, indentificada na figura pela designação "hélice transmembrana" ("transmembrane helix"). As sequências (locais) de reconhecimento para as enzimas de restrição AsuII, SmaI, HindIII e EconNI estão sublinhadas. O peso molecular calculado deste polipéptido é de 61212.

B: Representação esquemática das características estruturais do quadro de leitura aberto de 575 aa atrás referido.

Figura 4

Comparação de aminoácidos entre a sequência de aminoácidos do gene gE de BHV-1 e a sequência de aminoácidos do gene gE do vírus herpes simplex (HSV) e de outros genes gE homólogos [gI de vírus da pseudo-raiva ("pseudo-rabies virus" ou PRV) e gpI de vírus "varicella-zoster" (VZV)]

As sequências utilizadas nesta comparação provêm das seguintes publicações; HSV: Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. D.J. McGeoch, A. Dolan, S. Donald e F.J. Rixon (1985) Journal Mol. Biol 181, 1-13. VZV: DNA sequence of the U_S component of the varicella-zoster virus genome. A.J. Davidson (1983), EMBO Journal 2, 2203-2209. PRV: Use of lambdagt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simplex virus and varicella-zoster virus glycoproteins. E.A. Petrovskis, J.G. Timmins e L.E. Post (1986) Journal of Virology 60, 185-193]. Estas sequências foram comparadas usando o programa de análise de

sequências Multalin (F. Corpet, 1988, Nucl. Acids Res. 16, 10881-10890).

Em A mostra-se um diagrama em que as quatro sequências de aminoácidos são apresentadas de modo esquemático. Aqui, as partes transmembrana (TM) previstas são mostradas umas debaixo das outras. Para além das sequências-sinal de exportação previstas (SP) e dos possíveis locais de glicosilação N-ligada (I), apresentam-se duas áreas conservadas em que a posição relativa dos resíduos cisteína permanece com frequência inalterada (CCC).

Em B apresentam-se os resultados da comparação, por meio do programa Multalin, das regiões ricas em cisteína localizadas centralmente nas quatro versões de gE. Os asteriscos indicam aminoácidos idênticos e dois pontos indicam aminoácidos análogos.

Figura 5

Desenho das fotografias obtidas numa análise "Southern blot" de Difivac-1 e Iowa

Imagem A: DNA genómico de Difivac-1 e Iowa resultante de digestões com as enzimas de restrição Bst (1,2), EcoRI (3,4) e HindIII (5,6), separado sobre um gel de agarose a 0,7%, "blotted" sobre nitrocelulose e hibridizado com um fragmento HindIII K marcado com ^{32}P da estirpe Lam de BHV-1 de acordo com os procedimentos especificados nas legendas da Fig. 1A.

Imagem B: "Blot" sobre nitrocelulose do mesmo gel que foi utilizado em A, hibridizado com a sonda p318 específica relativamente a gE de BHV-1. Esta sonda inclui a totalidade da região AluI-HincII indicada na Fig. 2C.

Figura 6

Construção do fragmento de deleção de gE de BHV-1

Em A mostra-se a posição do gene gE e os clones utilizados. Os componentes do genoma de BHV-1 são: a região Única Longa ("Unique Long" ou U_L); a região Única Curta ("Unique Short" ou U_S) e as duas sequências de repetição (IR e TR). Para se obter a região localizada do lado 5' do gene gE, o fragmento PstI-SmaI de 1,4 kb do fragmento HindIII k de 8,4 kb da estirpe Lam de BHV-1 foi subclonado no local SmaI e PstI do plasmídeo pUC18. Este clone foi designado p515 e é apresentado em B. O fragmento EcoNI-SmaI localizado no lado 3' de gE, proveniente do clone HindIII-EcoRI de 4,1 kb, foi clonado no local único AsuII de p515. Para que a ligação da parte EcoNI à parte AsuII, o clone p515 foi digerido com AsuII, e depois tratado com enzima Klenow (Boehringer Mannheim) e dCTP, a fim de proporcionar um resíduo de citosina na parte AsuII de acordo com métodos convencionais (Sambrook et al., 1989). Esta citosina adicional é identificada por um asterisco em D. Depois, o p515 foi também digerido com a enzima SmaI, após o que o fragmento EcoNI pôde ser ligado a este vector. O clone assim construído foi designado p519.

Figura 7

A. Desenho de uma fotografia obtida numa análise pela técnica "Southern blot" de preparações de DNA de 1B7, 1B8 e 2H10. O isolamento do DNA, as digestões com enzimas de restrição, o "blotting" e a hibridação foram executados de acordo com os procedimentos descritos nas legendas da Fig. 1A. Após uma dupla digestão com PstI-DraI das preparações de DNA 1B7, 1B8 e 2H10, os fragmentos foram separados sobre gel de agarose a 0,7% e

subsequentemente submetidos a "blotting" sobre um filtro de nitrocelulose. Este filtro foi hibridizado com o fragmento de deleção PstI-DraI de 2,3 kb marcado com ^{32}P dCTP, utilizado como sonda. Nas pistas 1 a 3, as amostras 1B7, 1B8 e 2H10, respectivamente, foram separadas. Na pista 4 aplicou-se DNA da estirpe Lam de BHV-1 tipo selvagem e na pista 5 o fragmento de deleção de 2,3 kb.

B. Mapa físico do fragmento EcoRI de 15,2 kb da estirpe Lam de BHV-1. O mapa mostra a posição dos locais de reconhecimento PstI, DraI e HindIII e a posição da sonda de hibridação referida em 7A.

Figura 8

Expressão procariótica de gE de BHV-1

Para a expressão procariótica de gE de BHV-1, o fragmento SmaI de 600 bp do gene gE foi fundido em três quadros de leitura à região de codificação do gene de glutathione-S-transferase de *Schistosoma japonicum* no vector pGEX-2T (D.B. Smith e K.S. Johnson, Gene 67 (1988) 31-40). As moléculas recombinantes com a orientação apropriada (syn) do fragmento SmaI foram identificadas por intermédio de uma análise com enzimas de restrição em que se utilizaram métodos convencionais. Os clones de *E. coli* DH5 α com esta estrutura construída por fusão foram designados pGEX-2T600s1, pGEX-2T-600s2 e pGEX-2T600s3.

A. Diagrama de uma das estruturas construídas pGEX-2T600s. No lado NH_2 da região que codifica o produto de fusão GST-gE está localizada a região promotora tac que pode ser induzida por Isopropiltiogalactosídeo (IPTG)

("Isopropylthiogalactoside (IPTG) inducible tac promoter region").

B. Desenho das fotografias obtidas numa análise pela técnica "Western blot" de preparações totais de proteína de células DH5 α transformadas com pGEX-2T600s. Culturas de células DH5 α mantidas de um dia para o outro e tranfectadas com as estruturas construídas pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 e pGEX-2T600s3 foram continuadas a 1/10 em meio Luria-Bertani (LB) com 50 μ g/ml de ampicilina e após 1 hora de crescimento induzidas com IPTG durante 5 horas. Estas culturas induzidas foram centrifugadas durante 5 minutos a 6000 x g e incorporadas em 1 x layermix (SDS a 2%, glicerol a 10%, mercaptoetanol a 5% e azul de bromofenol a 0,01%) [1,5 ml de cultura são incorporados em 500 μ l de layermix] e aquecidas a 95°C durante 5 minutos. Depois 50 μ l por pista foram separados num gel de poliacrilamida a 12,5% vertical de acordo com procedimentos convencionais, e subsequentemente submetidos a um processo de "semi-dry blotting" para um filtro de nitrocelulose utilizando o sistema LKB-multiphor II Nova Blot sob as condições especificadas pelo fabricante.

Nas pistas M aplicou-se proteína-marca pré-tingida ("prestained marker protein", BRL Life Technologies, Inc. 236k, 112k, 71k, 44k, 28k, 18k e 15k) e nas pistas 1, 2 e 3 as preparações totais de proteína das células DH5 α tranfectadas com os três quadros ("frames") respectivos: pGEX-2T600s1, pGEX-2T600s2 e pGEX-2T600s3.

Na imagem A, pode ver-se o resultado da análise pela técnica "Western blot" com soro anti-GST. Para o obter, o filtro foi incubado de acordo com procedimentos convencionais (E. Harlow e D. Lane, 1988, Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring harbor Laboratory, New York) em solução tampão de bloqueamento (PBS + leite em pó a 2% e Tween 20 a 0,05%) e, subsequentemente,

como soro de coelho anti-GST policlonal. Depois o filtro foi lavado e incubado com soro de imonoglobulina de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase de rábano ("horseradish peroxidase (HRPO) conjugated goat-anti-rabbit immunoglobulin serum"). Em seguida, os anticorpos de cabra ligados foram detectados imunoquimicamente com cromogénio (diaminobenzidina, cloronaftol e H_2O_2). O produto de fusão GST que é indicado por uma seta tem a dimensão calculada de aproximadamente 47 k apenas no quadro ("frame") 3.

Na imagem B, pode ver-se o resultado da análise pela técnica "Western blot" com anticorpo monoclonal Mab 4, que reconhece a proteína gE. Para tal, um filtro duplo tal como na imagem A foi bloqueado, incubado com Mab, lavado e incubado com soro de coelho anti-rato conjugado com HRPO ("HRPO conjugated rabbit-anti-mouse serum"). Depois, os anticorpos de coelho ligados foram detectados imunoquimicamente com cromogénio. A banda que é visível na pista 3 (quadro 3) tem a dimensão de 47 k e é indicada por uma seta.

Figura 9

Construção do plasmídeo pEVHisgE para a expressão eucariótica do gene gE de BHV-1

Para a expressão eucariótica do gene gE, a totalidade da região codificadora de gE foi clonada na orientação adequada atrás da região promotora de HCMV do vector de expressão pEVHis, utilizando procedimentos convencionais (Sambrook et al., 1989). Para tal, o fragmento AluI de 394 bp que começa 55 bp antes do quadro de leitura aberta do gE foi clonado em pUC18 e designado p201. Depois, após a digestão com HincII de p201, o fragmento HincII de 1740 bp, que inclui a maior parte do gene gE, foi

clonado em p201. Daqui resultou o plasmídeo p318 que no "polylinker" de pUC18 inclui a totalidade da área codificadora de gE, desde o local AluI 55 bp antes do codão "start" de gE até ao local HincII 133 bp atrás do codão "stop" de gE. Utilizando os locais das enzimas de restrição no "polylinker" do vector, este fragmento foi separado de p318 com as enzimas BamHI e SphI. Primeiro, o p318 foi digerido com SphI e depois o local SphI foi preenchido utilizando polimerase de Klenow e dNTPs. Após a digestão com BamHI, o fragmento inserido ("insert") de 1,9 kb foi separado do vector pUC18 em Low Melting Point Agarose (Agarose de Baixo Ponto de Fusão) e ligado no vector pEVHis que tinha sido digerido com BamHI e EcoRV com essa finalidade. O plasmídeo que assim se formou foi designado pEVHis/gE.

Figura 10

Posição dos "primers" específicas relativamente a gE e sonda para o procedimento PCR de detecção de DNA de BHV-1

Na figura mostra-se a sequência de ácidos nucleicos do gene da glicoproteína gE de BHV-1, do nucleótido 1272 ao 2027 [a sequência foi extraída da da Fig. 3]. Os "primers" para o procedimento PCR específico relativamente a gE foram designados P₃ e P₄. Os locais de ligação do "primer" para P₃ e P₄ estão sublinhados. A sequência de nucleótidos de P₃ é 5'-ACG-TGG-TGG-TGC-CAG-TTA-GC-3' (SEQ ID NO:2). A sequência de nucleótidos de P₄ é (complementar à sequência de ligação do "primer" atrás referida) 5'-ACC-AAA-CTT-TGA-ACC-CAG-AGC-G-3' (SEQ ID NO:3). A sonda que foi usada para a hibridação pela técnica "Southern blot" para a detecção do DNA amplificado por meio da técnica PCR é o fragmento TaqI de 137 bp localizado entre os locais de ligação do "primer", estando indicadas as extremidades

deste fragmento. Para efeitos de comparação com a Fig. 3, indicam-se também os locais HindIII e EcoNI.

Figura 11

Estabelecimento de um mapa ("mapping") da deleção de gE de Difivac-1

A representa o mapa físico do fragmento EcoRI de 15,5 kb da estirpe Lam de BHV-1 tipo selvagem. B representa o mapa físico do fragmento EcoRI de 14,5 kb de Difivac-1. Ambos os fragmentos EcoRI cobrem a totalidade das regiões Únicas Curtas ("Unique Short") dos genomas dos vírus respectivos. A posição do gene gE e a posição putativa do gene gI são indicadas por caixas abertas. Os mapas A e B estão dispostos de tal forma que os fragmentos PstI de 6 kb no interior de cada mapa se apresentam alinhados. Em ambos os mapas, as sequências de repetição interna e terminal ("internal repeat and terminal repeat") foram indicadas por caixas tracejadas. As setas por baixo das sequências de repetição indicam a orientação dessas sequências.

Em A a parte da região U_S que falta na estirpe Difivac-1 está indicada.

C representa a posição dos fragmentos de Difivac-1 clonados que foram utilizados para estabelecimento do mapa da deleção de gE e para obtenção do mapa físico apresentado em B. As setas por baixo dos fragmentos inseridos dos clones p728, p737 e p754 indicam as regiões cujas sequências foram estabelecidas para se determinar o ponto de recombinação.

Abreviaturas:

A = AluI, E = EcoRI, P = PstI, H = HindIII, r = ponto de recombinação, IR = sequência de repetição interna ("internal repeat"), TR = sequência de repetição terminal ("terminal repeat").

Figura 12

Determinação do ponto de recombinação exacto na região U_S de Difivac-1

Para determinar as fronteiras exactas da deleção de gE encontrada na estirpe de Difivac-1, foram determinadas as sequências do clone p754 e das extremidades dos clones p728 e p737. Os fragmentos inseridos nestes clones foram indicados na Figura 11. Os procedimentos utilizados para estabelecer as sequências foram descritos nas legendas da Figura 3.

Em A apresenta-se a sequência da maior parte do fragmento AluI - PstI. Esta sequência inicia-se na região promotora do gene gE. Uma caixa TATA putativa foi sublinhada. No ponto r (= ponto de recombinação), esta região promotora funde-se com uma sequência encontrada também no local oposto da região U_S , designada: sequência de repetição invertida ("inverted repeat"). O ponto de recombinação exacto foi determinado comparando a sequência de repetição encontrada na região promotora de gE com a cópia da sequência de repetição encontrada no local oposto da região U_S . O ponto onde estas sequências divergem foi identificado em B (I) por meio de um 'r'. Fez-se uma comparação semelhante com a sequência promotora de gE encontrada em Difivac-1 e o promotor de gE encontrado na estirpe Lam tipo selvagem. O ponto em que estas sequências divergem foi identificado em B (II)

também por meio de um 'r'. Os pontos de recombinação encontrados são iguais.

Figura 13

Análise parcial da sequência do gene gI de BHV-1

A sequência de 284 nucleótidos no interior da região de codificação de gI de BHV-1 foi determinada utilizando o clone PstI de 1,8 kb da estirpe Lam de BHV-1 que penetra tanto no gene gI como no gene gE de BHV-1 (ver Figura 11). Os procedimentos utilizados para estabelecer a sequência foram descritos nas legendas da Figura 3. A sequência foi traduzida com base no código universal por meio do programa de computador PC/gene versão 1,03 (Novembro, 1987). A sequência de aminoácidos codificada pelo segundo quadro de leitura é indicada por meio do código de uma única letra sob a sequência de nucleótidos. Esta sequência de aminoácidos é homóloga da região codificadora de outros homólogos de gI de vírus de herpes (ver Figura 14).

Figura 14

Comparação de aminoácidos entre a sequência parcial de aminoácidos do gene gI de BHV-1 putativo e as partes correspondentes das regiões codificadoras do gene gI do vírus de herpes simplex ("herpes simplex virus" ou HSV1), do gene gp63 do vírus de pseudo-raiva ("pseudorabies virus" ou PRV) e do gene gpIV do vírus "varicella-zoster" (VZV).

A sequência PRV inicia-se no aminoácido 82, a sequência HSV1 inicia-se no aa 80 e a sequência VZV inicia-se no aa 76 das suas respectivas regiões codificadoras. As sequências utilizadas foram publicadas nos artigos referidos nas legendas da Figura 4.



A comparação foi levada a cabo usando o programa para computador Multalin. Os asteriscos indicam aminoácidos idênticos e os ':' indicam aminoácidos análogos.

Figura 15

Construção do plasmídeo MSVneoGI para a expressão eucariótica do gene gI de BHV-1

A posição putativa do gene gI de BHV-1 foi determinada com base na comparação de aminoácidos da sequência parcial do gene gI de BHV-1. Com base nesta determinação, inferiu-se que o fragmento SmaI de 1,7 kb deveria conter a totalidade da região codificadora do gene gE de BHV-1. A posição deste fragmento SmaI de 1,7 kb é indicada em A. às extremidades rombas ("blunt ends") deste fragmento SmaI de 1,7 kb foram ligados "linkers" BamHI, recorrendo a procedimentos convencionais. O produto resultante foi digerido com BamHI e ligado no vector de expressão eucariótica MSV-neo. O vector MSV-neo tem um local único BamHI atrás de MSV-LTR, que apresenta uma intensa actividade promotora. Este vector foi descrito em Rijsewijk et al., 1987 EMBO J. 6, 127-131.

Figura 16

Construção de um fragmento de deleção dupla gI/gE de BHV-1

A posição do gene da glicoproteína gE e a posição putativa do gene da glicoproteína gI na região U_S de BHV-1 são representadas no diagrama A. Os blocos tracejados indicam as sequências de repetição que ladeia a região U_S . B representa o mapa físico de alguns locais de enzimas de restrição essenciais relativamente à posição de ambos os genes. Para construir o fragmento de deleção gI/gE o clone p1.7-SmaI/o contendo o

fragmento SmaI de 1,7 kb que abrange o gene gI tem de ser digerido com PstI. As extremidades do local PstI do fragmento inserido SmaI-PstI de 350 bp remanescente são tornadas rombas utilizando técnicas de biologia molecular convencionais. As extremidades do fragmento EcoNI-SmaI (ver Figura 6B), isolado a partir do fragmento HindIII-EcoRI de 4,1 kb descrito na Figura 6A são também tornadas rombas e o fragmento é ligado ao local PstI modificado. Este processo é representado em diagrama em C e D. O fragmento SmaI-DraI de 1,4 kb pode ser isolado a partir do clone p8IE resultante para ser re combinado com DNA de BHV-1 tipo selvagem.

Abreviaturas:

E = EcoRI, H = HindIII, S = SmaI, P = PstI, ENI = EcoNI, D = DraI, kb = kilobase e U_S = Única Curta ("Unique Short").

Figura 17

Libertação média de vírus por via nasal em vitelos após vacinação
. = vacinados com Difivac-1, 0 = controlos não vacinados

Figura 18

Valores clínicos diários médios em vitelos após desafio com uma estirpe virulenta de BHV-1, chave tal como na Fig. 17.

Figura 19

Temperatura rectal média em vitelos após desafio com uma estirpe virulenta de BHV-1, chave tal como na Fig. 17.

Figura 20

Crescimento médio da vitelos após desafio com uma estirpe virulenta de BHV-1, chave tal como na Fig. 17.

Figura 21

Libertação média de vírus por via nasal em vitelos após desafio com uma estirpe virulenta de BHV-1, chave tal como na Fig. 17.

Figura 22

Temperatura rectal média em vitelos após desafio com uma estirpe virulenta de BHV-1

. = vacinados com Lam gE⁻, 0 = vacinados com Lam gE⁻/TK⁻, x = controlos não vacinados.

Figura 23

Crescimento médio da vitelos após desafio com uma estirpe virulenta de BHV-1, chave tal como na Fig. 22.

Figura 24

Valores clínicos diários médios em vitelos após desafio com uma estirpe virulenta de BHV-1, chave tal como na Fig. 22.

QUADRO 1

Libertação de vírus por via nasal em vitelos após vacinação com Lam gE⁻ ou Lam gE⁻/TK⁻ e após desafio com uma estirpe de BHV-1 virulenta destes vitelos vacinados e de controle

Grupo	<u>Nº médio de dias de libertação de vírus por via nasal</u>	
	Após vacinação	Após desafio
Controlo	0	10,33 ± 1,51
Lam gE ⁻	7,00 ± 0,89	4,83 ± 1,17
Lam gE ⁻ /TK ⁻	7,17 ± 1,33	5,17 ± 0,98

QUADRO 2

Caracterização de gE-Mabs

Mab	REACTIVIDADE DE gE-MABS CANDIDATOS COM							
	Difivac-1 3T3/EBTR	Lam gE ⁻	Prok.	3T3 gE	3T3 gE Difivac-1	3T3 gE/gI	Grupo Ag	Gado Ab
1	-	-	nd	-	+	?	I	+
2	-	-	-	+	+	+	II	-
3	-	-	+	+	+	+	?	-
4	-	-	+	+	+	+	?	-
42	-	-	nd	-	-	?	V?	±
51	-	-	nd	-	+	+	III	+
52	-	-	+	+	+	+	?	-
53	-	-	nd	-	+	+	III	+
59	-	-	nd	-	-	+	III	+
66	-	-	nd	+	+	+	III	+
67	-	-	nd	-	+	+	III	+
68	-	-	-	+	+	+	IV	+
72	-	-	-	+	+	+	V	±
75	-	-	nd	-	+	?	I	+
78	-	-	nd	-	+	?	nd	-
81	-	-	-	+	+	+	II?	-

- + : Todos os 8 soros testados apresentam um valor de percentagem de bloqueamento > 50% num análise IPMA de bloqueamento indirecto ("indirect blocking IPMA").
- ± : Os soros apresentam um valor de percentagem de bloqueamento de ± 50%.
- : Os soros apresentam um valor de percentagem de bloqueamento < 50%.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO:1

COMPRIMENTO: 2027 nucleótidos, 575 aminoácidos

TIPO: nucleótido e aminoácido

TIPO DE CADEIA: única

```

AGGCGCGGAGC GTTGAACCGGC CCGACCGCGC CCGCGTTGTT AAATGGGTCT CCGCGCGGCTC      60
                                     |----> eliminado em Difivacl
GTGCTTCAC ACCCGCGGAG AACCGACGCG AGCTTCGCTG CGTGTGTCCC GCGAGCTGCG      120
                                     AsuII
TTCCGGGGAA CCGCGCACGC GAGAGGGTTC GAAAGGGCA TTGGCA      167

ATG CAA CCC ACC GCG CCG CCC CCG CCG CCG TTG CTG CCG CTG CTG CTG      215
Met Gln Pro Thr Ala Pro Pro Arg Arg Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu
  1           5           10           15
=====PEPTIDEO SINAL =====

CCG CAG TTA TTG CTT TTC GCG CTG ATG GCC GAG GCC AAG CCC GCG ACC      263
Pro Gln Leu Leu Leu Phe Gly Leu Met Ala Glu Ala Lys Pro Ala Thr
          20           25           30
=====

SmaI
GAA ACC CCG GGC TCG GGT TCG GTC GAC ACG GTC TTC ACG GCG CCG GGT      311
Glu Thr Pro Gly Ser Ala Ser Val Asp Thr Val Phe Thr Ala Arg Ala
          35           40           45

GGC GCG CCC GTC TTT CTC CCA GGG CCC GCG GCG CCG CCG GAC GTG CCG      359
Gly Ala Pro Val Phe Leu Pro Gly Pro Ala Ala Arg Pro Asp Val Arg
          50           55           60

GCC GTT CCG GGC TGG AGC GTC CTC GCG GGC GCC TGC TCG CCG CCC GTG      407
Ala Val Arg Gly Trp Ser Val Leu Ala Gly Ala Cys Ser Pro Pro Val
          65           70           75           80

CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CCG GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC      455
Pro Glu Pro Val Cys Leu Asp Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala
          85           90           95

CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CCG GTG GCC CCG CTG GCC ATC      503
Leu Asp Ala Ala Cys Leu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile
          100           105           110

GCG GAG CTC GCC GAG CCG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT      551
Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val
          115           120           125

```

PvuII

CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG 599
 Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asp Ala Thr Gly
 130 135 140

GTG CTG ATC GCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GGC GTG TAC TTC CTG 647
 Val Leu Ile Ala Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Gly Val Tyr Phe Leu
 145 150 155 160

TAC GAC CGG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAC GAG GAG ACG CAG TTG GCG 695
 Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Glu Glu Thr Gln Leu Ala
 165 170 175

CTG ACG CTG CAG GTC GCG ACG GCC GGC GCG CAG GGC GCC GCG CGG GAC 743
 Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp
 180 185 190

GAG GAG AGG GAA CCA GCG ACC GGG CCC ACC CCC GGC CCG CCG CCC CAC 791
 Glu Glu Arg Glu Pro Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro Pro His
 195 200 205

CGC ACG ACG ACA CGC GCG CCC CCG CGG CGG CAC GGC GCG CGC TTC CGC 839
 Arg Thr Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg
 210 215 220

GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC CCG GGC GAT TCC TTT CTG 887
 Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu
 225 230 235 240

CTA TCG GTG CGT CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GGT CCC TTC TCG 935
 Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser
 245 250 255

GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CGG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC 983
 Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu
 260 265 270

ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC 1031
 Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys
 275 280 285

CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CGC TCC 1079
 Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser
 290 295 300

GAG ACC GTG TAC AGC CCG CTG TAC GAG CAG TGC CGC CCG GAC CCT GCC 1127
 Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala
 305 310 315 320

GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT 1175
Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Val
325 330 335

GGC CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC 1223
Ala His Leu Arg Pro Ala Asp Asp Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp
340 345 350

GGC CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC 1271
Ala Pro Ala Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn
355 360 365

HindIII
GGC CAC GTG GAA GGT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT 1319
Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg
370 375 380

TTG GTG CGC GCG GTC ACC GAC CAC ACG CGC CCC GAG GCC GCA GCC GCC 1367
Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala Ala
385 390 395 400

GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GGC GCG 1415
Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala
405 410 415

CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG GTG CTG GTG GGC GCG CTT GGA 1463
Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly
420 425 430

===== HÉLICE TRANSMEMBRANA =====

CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CCG GTG TGC GCG 1511
Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala
435 440 445

=====

CGC CGC GCA AGC CAG AAG CCG ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG 1559
Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly
450 455 460

CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG 1607
Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val
465 470 475 480

CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT 1655
Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp
485 490 495

GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC 1703
 Asp Asp Ser Asp Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala
 500 505 510

TAC GAC CTC GCC GGC GCC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC 1751
 Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala
 515 520 525

CCC GCC AAC GGC ACG CGC TCG AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT 1799
 Pro Ala Asp Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe
 530 535 540

AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CGG ACC CCG GCC GCA 1847
 Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala
 545 550 555 560

CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC GCG TAG 1895
 Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *
 565 570 575

GGGCCCCCCC CCCCCCGCGC GGTGTGCGGT CTGACGGAAA GCACCCCGCT GTAGGGCTGC 1955
 ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TCGCGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA 2015
 CGCAGCGTCG TC 2027

SEQ ID N0:2
 COMPRIMENTO: 20 nucleótidos
 TIPO: nucleótido
 TIPO DE CADEIA: única
 ACGTGGTGGT GCCAGTTAGC 20

SEQ ID N0:3
 COMPRIMENTO: 22 nucleótidos
 TIPO: nucleótido
 TIPO DE CADEIA: única
 ACCAAACTTT GAACCCAGAG CG 22

Lisboa, 25 de Agosto de 1992


J. PEREIRA DA CRUZ
 Agente Oficial da Propriedade Industrial
 RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
 1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1ª - Mutante de deleção do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE.

2ª - Mutante de deleção do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE, deleção essa que foi provocada por um procedimento de atenuação.

3ª - Mutante de deleção Difivac-1 do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gE, deleção essa que foi provocada por um procedimento de atenuação.

4ª - Mutante de deleção do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE, deleção essa que foi construída por meio de técnicas de recombinação de DNA.

5ª - Mutante de deleção 1B7 ou 1B8 do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE, deleção essa que foi construída por meio de técnicas de recombinação de DNA.

6ª - Mutante de deleção do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE e uma deleção no gene da quinase de timidina.

7ª - Mutante de deleção do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE e uma deleção no gene da glicoproteína gI.

8ª - Mutante de deleção do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE, uma deleção no gene da quinase de timidina e uma deleção no gene da glicoproteína gI.

9ª - Mutante do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE e conter um gene heterólogo introduzido por meio de técnicas de recombinação de DNA.

10ª - Mutante do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por, na posição do gene da glicoproteína gE, conter um gene heterólogo introduzido por técnicas de recombinação de DNA, o qual está sob o controle de sequências de regulação, por exemplo, da do gene gE ou de um gene heterólogo, e está facultativamente ligado à parte do gene gE que codifica um peptídeo sinal.

11ª - Mutante do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por, para além de uma deleção no gene da glicoproteína gE, apresentar uma deleção no gene da quinase de timidina, uma deleção no gene da glicoproteína gI, ou as duas, e conter um gene heterólogo introduzido por meio de técnicas de recombinação de DNA na posição de pelo menos uma dessas deleções.

12ª - Mutante do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizado por apresentar uma deleção no gene da glicoproteína gE e conter um gene heterólogo que foi introduzido por meio de técnicas de recombinação de DNA e que codifica uma proteína ou

peptídeo imunogénico de outro agente patogénico ou que codifica uma citocina.

13ª - Composição, caracterizada por compreender um ácido nucleico recombinante que contém o gene da glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, uma parte deste gene da glicoproteína gE ou uma sequência de nucleótidos derivada deste gene da glicoproteína gE.

14ª - Composição, caracterizada por compreender um vector de clonagem ou de expressão apresentando uma inserção de um ácido nucleico recombinante que contém o gene da glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, uma parte deste gene da glicoproteína gE ou uma sequência de nucleótidos derivada deste gene da glicoproteína gE.

15ª - Composição, caracterizada por compreender glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, uma parte desta glicoproteína gE, um peptídeo derivado desta glicoproteína gE, ou um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1.

16ª - Composição, caracterizada por compreender um anticorpo que é específico relativamente à glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, a uma parte desta glicoproteína gE, a um peptídeo derivado desta glicoproteína gE, ou a um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1.

17ª - Composição, caracterizada por compreender um anticorpo monoclonal que é específico relativamente à glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, a uma parte desta glicoproteína gE, a um peptídeo derivado desta glicoproteína gE,

ou a um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1.

18ª - Composição, caracterizada por compreender um anticorpo policlonal que é específico relativamente à glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, a uma parte desta glicoproteína gE, a um peptídeo derivado desta glicoproteína gE, ou a um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1.

19ª - Composição de vacina para a vacinação de animais, em particular mamíferos, mais especialmente bovinos, com o objectivo de os proteger do vírus de herpes bovino tipo 1, caracterizada por compreender um mutante do vírus de herpes bovino tipo 1 de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-12, e um veículo ou adjuvante adequados.

20ª - Composição de vacina para a vacinação de animais, em particular mamíferos, mais especialmente bovinos, com o objectivo de os proteger de um agente patogénico, caracterizada por compreender um mutante do vírus de herpes bovino tipo 1 que apresenta uma deleção no gene da glicoproteína gE e contém um gene heterólogo que foi introduzido por meio de técnicas de recombinação de DNA e que codifica uma proteína ou peptídeo imunogénicos do agente patogénico, e um veículo ou adjuvante adequados.

21ª - Equipamento ("kit") de diagnóstico para a detecção de ácido nucleico de vírus de herpes bovino tipo 1 numa amostra, em particular numa amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo, células existentes no sangue, leite, fluidos do corpo tais como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, esperma, em particular sémen, saliva, expectoração ou



tecidos, em particular tecidos do sistema nervoso, proveniente de um animal, em particular de um mamífero, mais especialmente de um bovino, caracterizado por compreender uma sonda ou iniciador de ácido nucleico com uma sequência de nucleótidos derivada do gene da glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, e um meio de detecção adequado para um teste de detecção de ácidos nucleicos.

22ª - Equipamento de diagnóstico para a detecção de anticorpos específicos relativamente ao vírus de herpes bovino tipo 1, numa amostra, em particular numa amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo, saliva, expectoração, fluidos do corpo tais como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, leite ou tecidos, proveniente de um animal, em particular de um mamífero, mais especialmente de um bovino, caracterizado por compreender glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, uma parte desta glicoproteína gE, um peptídeo derivado desta glicoproteína gE, ou um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1, e um meio de detecção adequado para um teste de detecção de anticorpos.

23ª - Equipamento de diagnóstico de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por compreender ainda um ou mais anticorpos específicos relativamente à glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, ou a um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1.

24ª - Equipamento de diagnóstico para a detecção de proteína do vírus de herpes bovino tipo 1, numa amostra, em particular numa amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo; células existentes no sangue, leite, fluidos do corpo tais como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, esperma, em particular sêmen, saliva, expectoração ou tecidos, em

particular tecidos do sistema nervoso, proveniente de um animal, em particular de um mamífero, mais especialmente de um bovino, caracterizado por compreender um anticorpo específico relativamente à glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, ou a um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1, e um meio de detecção adequado para um teste de detecção de proteínas.

25ª - Método de determinação da infecção por vírus de herpes bovino tipo 1 num animal, em particular num mamífero, mais especialmente num bovino, caracterizado por compreender o exame de uma amostra proveniente do animal, em particular uma amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo, células existentes no sangue, esperma, em particular sémen, saliva, expectoração, fluidos do corpo tais como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, leite ou tecidos, em particular tecidos do sistema nervoso, relativamente à presença de ácido nucleico que inclua o gene da glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1 ou à presença da glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1 ou de um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1, ou à presença de anticorpos específicos relativamente à glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1, ou a um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1.

26ª - Método de determinação da infecção por vírus de herpes bovino tipo 1 num animal, em particular num mamífero, mais especialmente num bovino, caracterizado por compreender o exame de uma amostra proveniente do animal, em particular uma amostra biológica tal como sangue ou soro sanguíneo, células existentes no sangue, esperma, em particular sémen, saliva, expectoração, fluidos do corpo tais como lágrimas, fluido de lavagem dos pulmões, fluido nasal, leite ou tecidos, em particular tecidos do

sistema nervoso, relativamente à presença de ácido nucleico que inclua o gene da glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1 ou à presença do gene da glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1 ou de um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1, ou à presença de anticorpos específicos relativamente à glicoproteína gE do vírus de herpes bovino tipo 1 ou a um complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI do vírus de herpes bovino tipo 1, sendo a amostra a analisar proveniente de um animal que foi vacinado com uma preparação de vacina de acordo com a reivindicação 19.

Lisboa, 25 de Agosto de 1992



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA

Handwritten signature

H P
D I D I

8,4 kb = — — — — —
7,2 kb = — — — — — 6 kb

—
—

1 2 3 4

FIG.1A

HindIII K fragmento

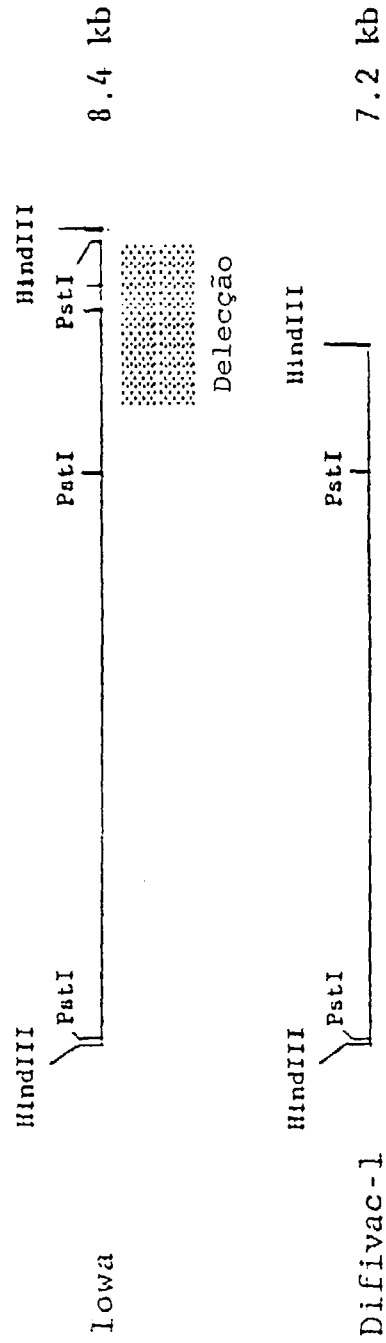


FIG.1B

Handwritten signature or mark.

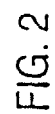


FIG. 3A

CCG GAG CCC GTC TGC CTC GAC GAC CGC GAG TGC TTC ACC GAC GTG GCC 455
 Pro Glu Pro Val Cys Ileu Asp Arg Glu Cys Phe Thr Asp Val Ala 95
 85
 CTG GAC GCG GCC TGC CTG CGA ACC GCC CGC GTG GCC CCG CTG GCC ATC 503
 Leu Asp Ala Ala Cys Ileu Arg Thr Ala Arg Val Ala Pro Leu Ala Ile 110
 100
 GCG GAG CTC GCC GAG CGG CCC GAC TCA ACG GGC GAC AAA GAG TTT GTT 551
 Ala Glu Leu Ala Glu Arg Pro Asp Ser Thr Gly Asp Lys Glu Phe Val 125
 115
 CTC GCC GAC CCG CAC GTC TCG GCG CAG CTG GGT CGC AAC GCG ACC GGG 599
 Leu Ala Asp Pro His Val Ser Ala Gln Leu Gly Arg Asn Ala Thr Gly 140
 130
 PvuII
 GTG CTG ATC CCG GCC GCA GCC GAG GAG GAC GGC GGC GTG TAC TTC CTG 647
 Val Leu Ile Ala Ala Ala Glu Glu Asp Gly Val Tyr Phe Leu 160
 145
 TAC GAC CCG CTC ATC GGC GAC GCC GGC GAG GAG GAG ACC CAG TTG GCG 695
 Tyr Asp Arg Leu Ile Gly Asp Ala Gly Asp Glu Thr Gln Leu Ala 175
 165
 CTG ACG CTG CAG GTC CCG ACG GCC GGC CAG GGC GCC GCG CGG GAC 743
 Leu Thr Leu Gln Val Ala Thr Ala Gly Ala Gln Gly Ala Ala Arg Asp 190
 180

FIG. 3A

GAG GAG AGG GAA CCA GCG ACC GGG CCC ACC CCC GGC CCG CCG CCC CAC 791
 Glu Glu Arg Glu Pro Ala Thr Gly Pro Thr Pro Gly Pro Pro His
 195 200 205

 CGC ACG ACG ACA CGC GCG CCC CCG CGG CAC GGC GCG CCG TTC CGC 839
 Arg Thr Thr Arg Ala Pro Pro Arg Arg His Gly Ala Arg Phe Arg
 210 215 220

 GTG CTG CCG TAC CAC TCC CAC GTA TAC ACC CCG GGC GAT TCC TTT CTG 887
 Val Leu Pro Tyr His Ser His Val Tyr Thr Pro Gly Asp Ser Phe Leu
 225 230 235
 SmaI
 CTA TCG GTG CGT CTG CAG TCT GAG TTT TTC GAC GAG GCT CCC TTC TCG 935
 Leu Ser Val Arg Leu Gln Ser Glu Phe Phe Asp Glu Ala Pro Phe Ser
 245 250 255

 GCC AGC ATC GAC TGG TAC TTC CTG CCG ACG GCC GGC GAC TGC GCG CTC 983
 Ala Ser Ile Asp Trp Tyr Phe Leu Arg Thr Ala Gly Asp Cys Ala Leu
 260 265 270

 ATC CGC ATA TAC GAG ACG TGC ATC TTC CAC CCC GAG GCA CCG GCC TGC 1031
 Ile Arg Ile Tyr Glu Thr Cys Ile Phe His Pro Glu Ala Pro Ala Cys
 275 280 285

 CTG CAC CCC GCC GAC GCG CAG TGC AGC TTC GCG TCG CCG TAC CGC TCC 1079
 Leu His Pro Ala Asp Ala Gln Cys Ser Phe Ala Ser Pro Tyr Arg Ser
 290 295 300

FIG. 3A

GAG ACC GTG TAC AGC CCG CTG TAC GAG CAG TGC CCG CCG GAC CCT GCC 1127
 Glu Thr Val Tyr Ser Arg Leu Tyr Glu Gln Cys Arg Pro Asp Pro Ala 320
 305 310

GGT CGC TGG CCG CAC GAG TGC GAG GGC GCC GCG TAC GCG GCG CCC GTT 1175
 Gly Arg Trp Pro His Glu Cys Glu Gly Ala Ala Tyr Ala Pro Val 335
 325

GCG CAC CTG CGT CCC GCC AAT AAC AGC GTA GAC CTG GTC TTT GAC GAC 1223
 Ala His Leu Arg Pro Ala Asn Asn Ser Val Asp Leu Val Phe Asp Asp 350
 340 345

GCG CCG GCT GCG GCC TCC GGG CTT TAC GTC TTT GTG CTG CAG TAC AAC 1271
 Ala Pro Ala Ala Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Leu Gln Tyr Asn 365
 355 360

HindIII
 GGC CAC GTG GAA GCT TGG GAC TAC AGC CTA GTC GTT ACT TCG GAC CGT 1319
 Gly His Val Glu Ala Trp Asp Tyr Ser Leu Val Val Thr Ser Asp Arg 380
 370 375

TTG GTG CCG GCG GTC ACC GAC CAC ACG CCG CCC GAG GCC GCA GCC GCC 1367
 Leu Val Arg Ala Val Thr Asp His Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ala 400
 385 390 395

GAC GCT CCC GAG CCA GGC CCA CCG CTC ACC AGC GAG CCG GCG GGC GCG 1415
 Asp Ala Pro Glu Pro Gly Pro Pro Leu Thr Ser Glu Pro Ala Gly Ala 415
 405

FIG. 3A

CCC ACC GGG CCC GCG CCC TGG CTT GTG CTG GTG GGC GCG CTT GGA 1463
 Pro Thr Gly Pro Ala Pro Trp Leu Val Val Leu Val Gly Ala Leu Gly
 420 425 430
 ===== HELICE TRANSMEMBRANA =====
 CTC GCG GGA CTG GTG GGC ATC GCA GCC CTC GCC GTT CGG GTG TGC GCG 1511
 Leu Ala Gly Leu Val Gly Ile Ala Ala Leu Ala Val Arg Val Cys Ala
 435 440 445
 =====
 CGC CGC GCA AGC CAG AAG CGC ACC TAC GAC ATC CTC AAC CCC TTC GGG 1559
 Arg Arg Ala Ser Gln Lys Arg Thr Tyr Asp Ile Leu Asn Pro Phe Gly
 450 455 460
 CCC GTA TAC ACC AGC TTG CCG ACC AAC GAG CCG CTC GAC GTG GTG GTG 1607
 Pro Val Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Asn Glu Pro Leu Asp Val Val Val
 465 470 475 480
 CCA GTT AGC GAC GAC GAA TTT TCC CTC GAC GAA GAC TCT TTT GCG GAT 1655
 Pro Val Ser Asp Asp Glu Phe Ser Ser Leu Asp Glu Asp Ser Phe Ala Asp
 485 490 495
 GAC GAC AGC GAC GAT GAC GGG CCC GCT AGC AAC CCC CCT GCG GAT GCC 1703
 Asp Asp Ser Asp Asp Gly Pro Ala Ser Asn Pro Pro Ala Asp Ala
 500 505 510

FIG. 3A

TAC GAC CTC GCC GGC GGC CCA GAG CCA ACT AGC GGG TTT GCG CGA GCC 1751
 Tyr Asp Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Thr Ser Gly Phe Ala Arg Ala
 515 520 525
 CCC GCC AAC GGC ACC GCG CTC AGT CGC TCT GGG TTC AAA GTT TGG TTT 1799
 Pro Ala Asn Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ser Gly Phe Lys Val Trp Phe
 530 535 540
 AGG GAC CCG CTT GAA GAC GAT GCC GCG CCA GCG CCG ACC CCG GCC GCA 1847
 Arg Asp Pro Leu Glu Asp Asp Ala Ala Pro Ala Arg Thr Pro Ala Ala
 545 550 555 560
 CCA GAT TAC ACC GTG GTA GCA GCG CGA CTC AAG TCC ATC CTC CGC TAG 1895
 Pro Asp Tyr Thr Val Val Ala Ala Arg Leu Lys Ser Ile Leu Arg *
 565 570 575
 GCGCCCCCCC CCCCCCGCGC GCTGTGCCGT CTGACGGGAA GCACCCGCGT GTAGGGCTGC 1955
 ATATAAATGG AGCGCTCACA CAAAGCCTCG TCGGGCTGCT TCGAAGGCAT GGAGAGTCCA 2015
 CGCAGCGTCG TC 2027

ECONI

FIG. 3A

BHV-1 gE



575 aminoácidos

sp = Peptideo sinal 26 res.

• = local de N-glicosilação putativo

tm = Hélica transmembrana 423-450

FIG.3B

11

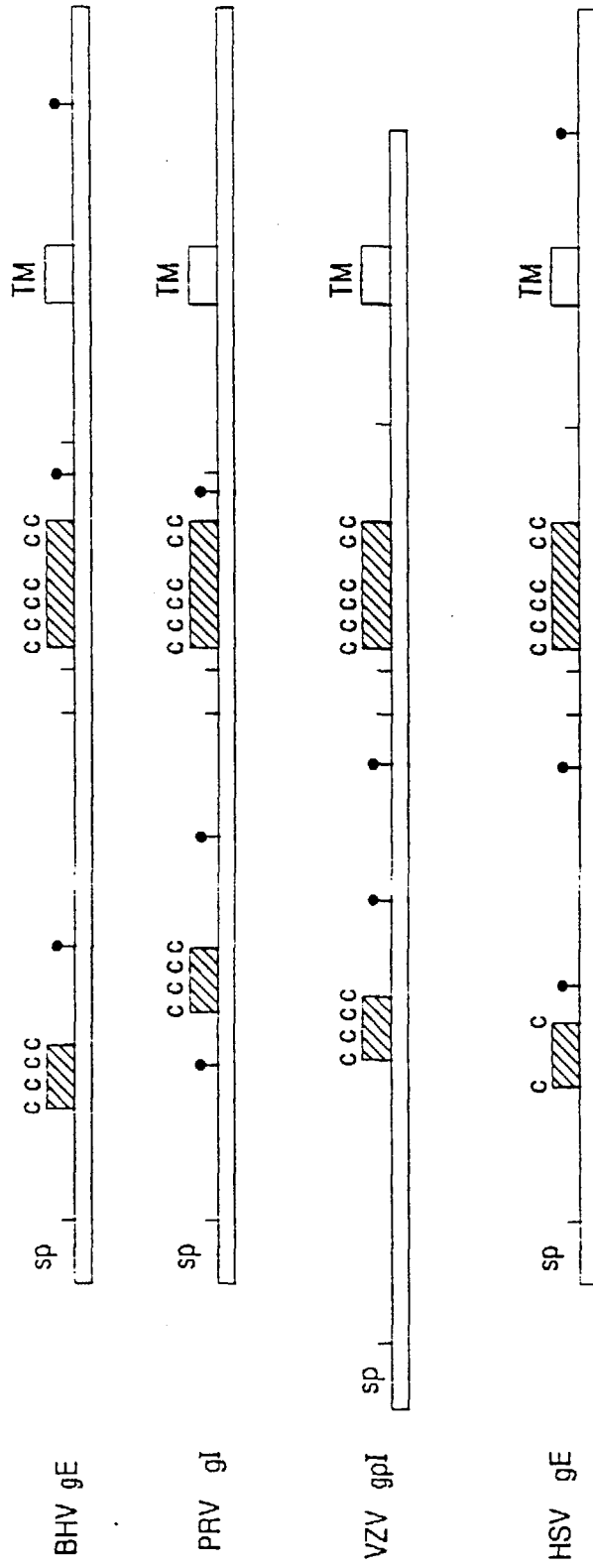


FIG.4A

11/30

Tabela de comparação
de símbolos:

	1	10	20	30	40	50	60
PRV	HSQLESPGDTFOLMPRVVSDMCHDSRENTFTATLDWYARAPRCLLYVVEPCYIYHPRAP						
VZV	HSIVFESVGDTEFLAMILQYKI..EAPFDLLEWLYVPIDFTCCQPMKLYSTCLYHPNAP						
BHV	HSVYVTPGDSFLLSVRLQSEFFD..EAPFASIDWYFLRTAGDCALIRIYETCIFIHPEAP						
HSV	EALFSPGETESTNVSITHAHD..DOTYSMDVVWIREVDVPTSCAEMRIYESCLYHPQLP						
	1	10	20	30	40	50	
PRV	ECLRPVDPACSFETSPARAALVARRAYASCSPLLGDRWLTCFPDAGGEEVH.....						
VZV	QCLSHMNSGCTFTSPHIAQRVASTVYQNC..EHADNYTAYCIGISHMEPSFGLILHDGGT						
BHV	ACLHPADAQCTEASPYRSETVYSRLYEQCRRDPAGRPHECEGAAYAPVAHLRPANNSV						
HSV	ECLSPADAPC..AASTWTSRLAVRSYAGCSRTNP...PPRCSAEAHMEPVPGLAWQAASV						
	60	70	80	90	100	110	
PRVTNATADESGLYVLVMTNTHNGHVATWDYTLVAT						
VZV	TLKFVDTPESLSGLYVEFYVFNHGHVEAVAYTVVST						
BHV	DLVFDDAPAAASGLYVEVLQYNGHVEAWDYSLVVT						
HSV	NLEFRDASPQHSGLYLCVVVYVNDHIHAWGHITIST						
	120	130	140	148			

FIG.4B

11

Handwritten signature

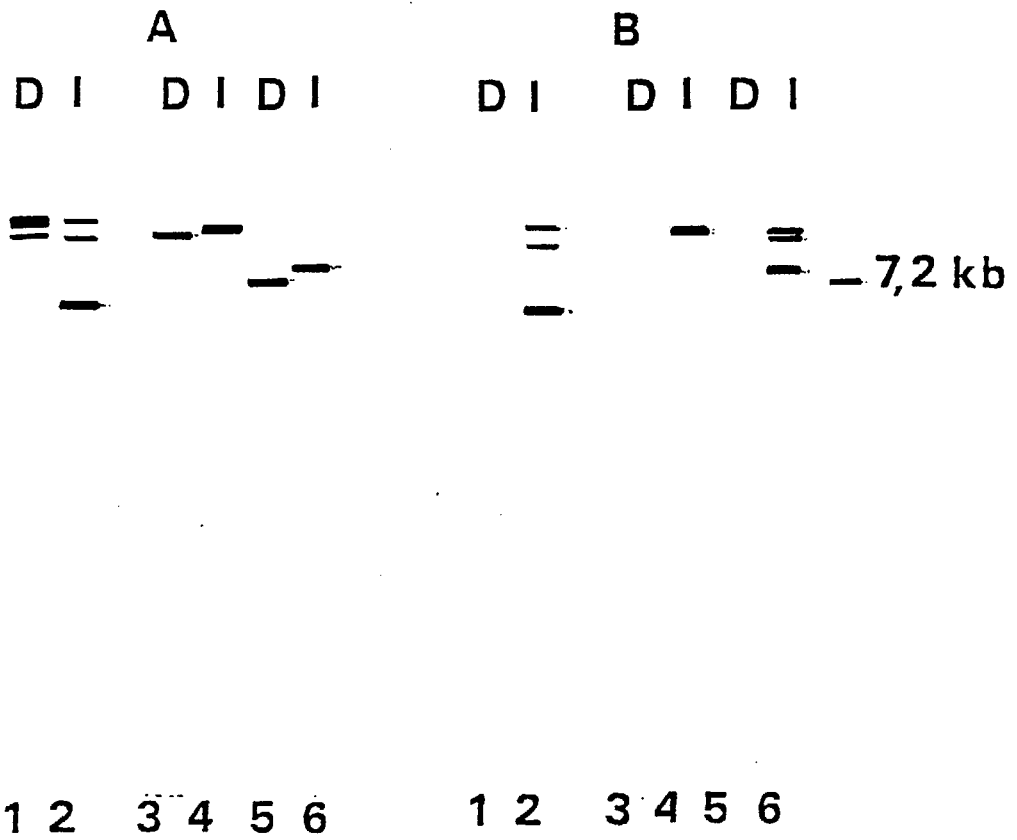
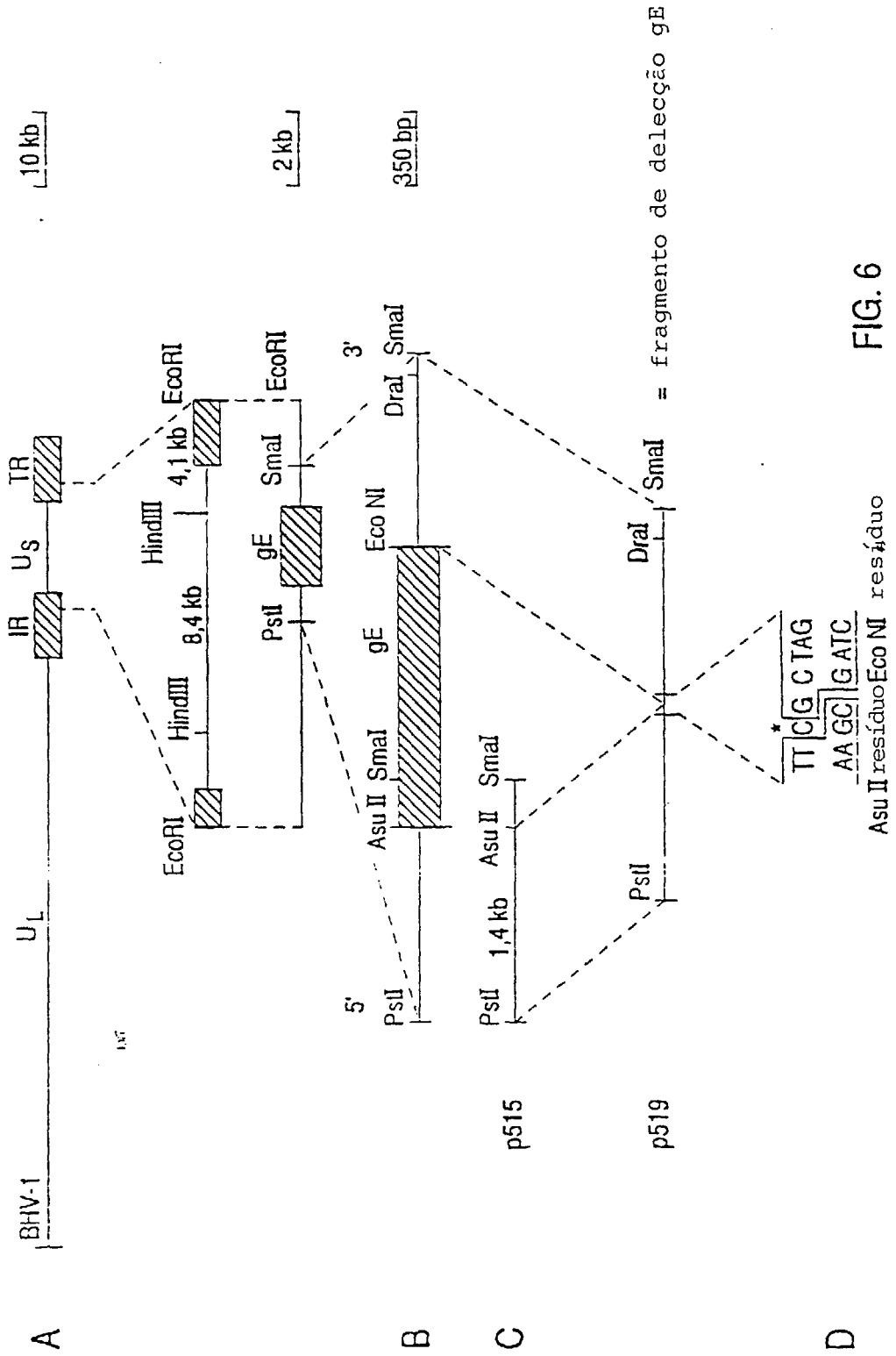


FIG.5



Handwritten signature or mark

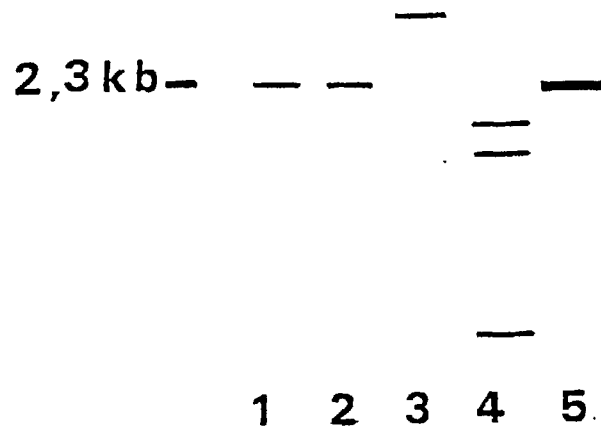


FIG.7A

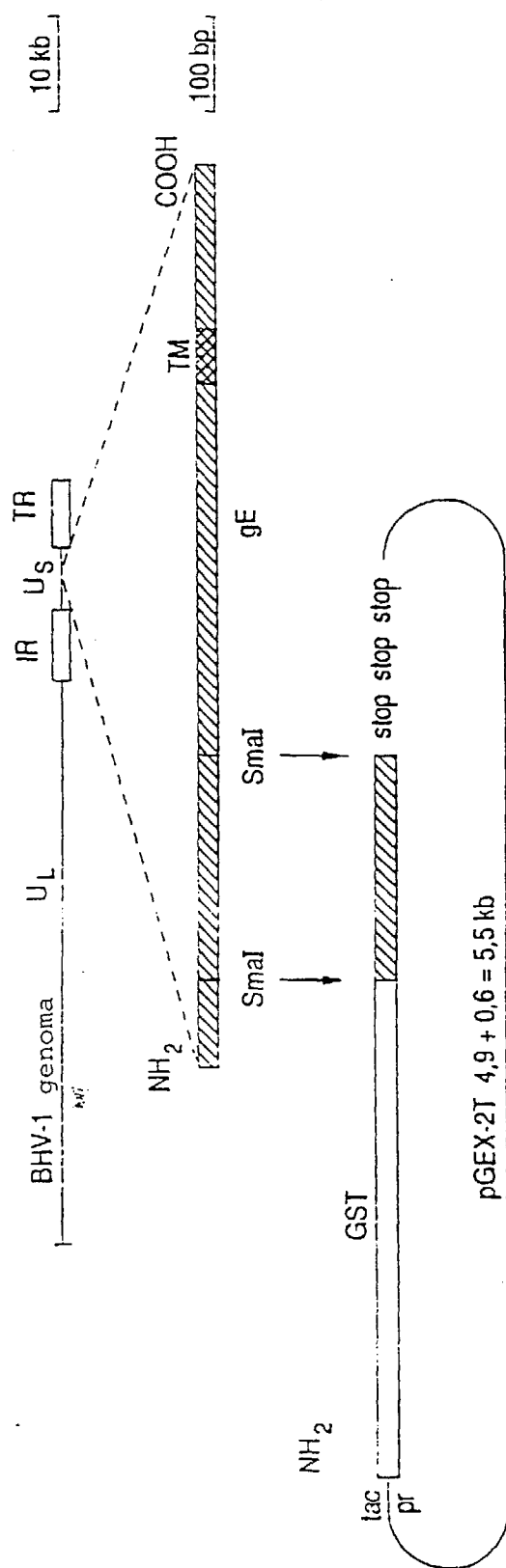


FIG. 8A

11

Handwritten signature

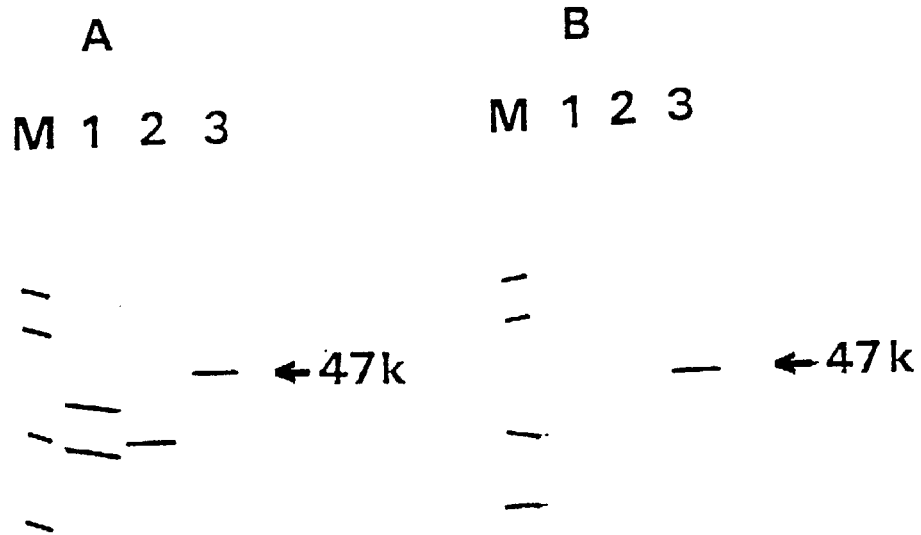
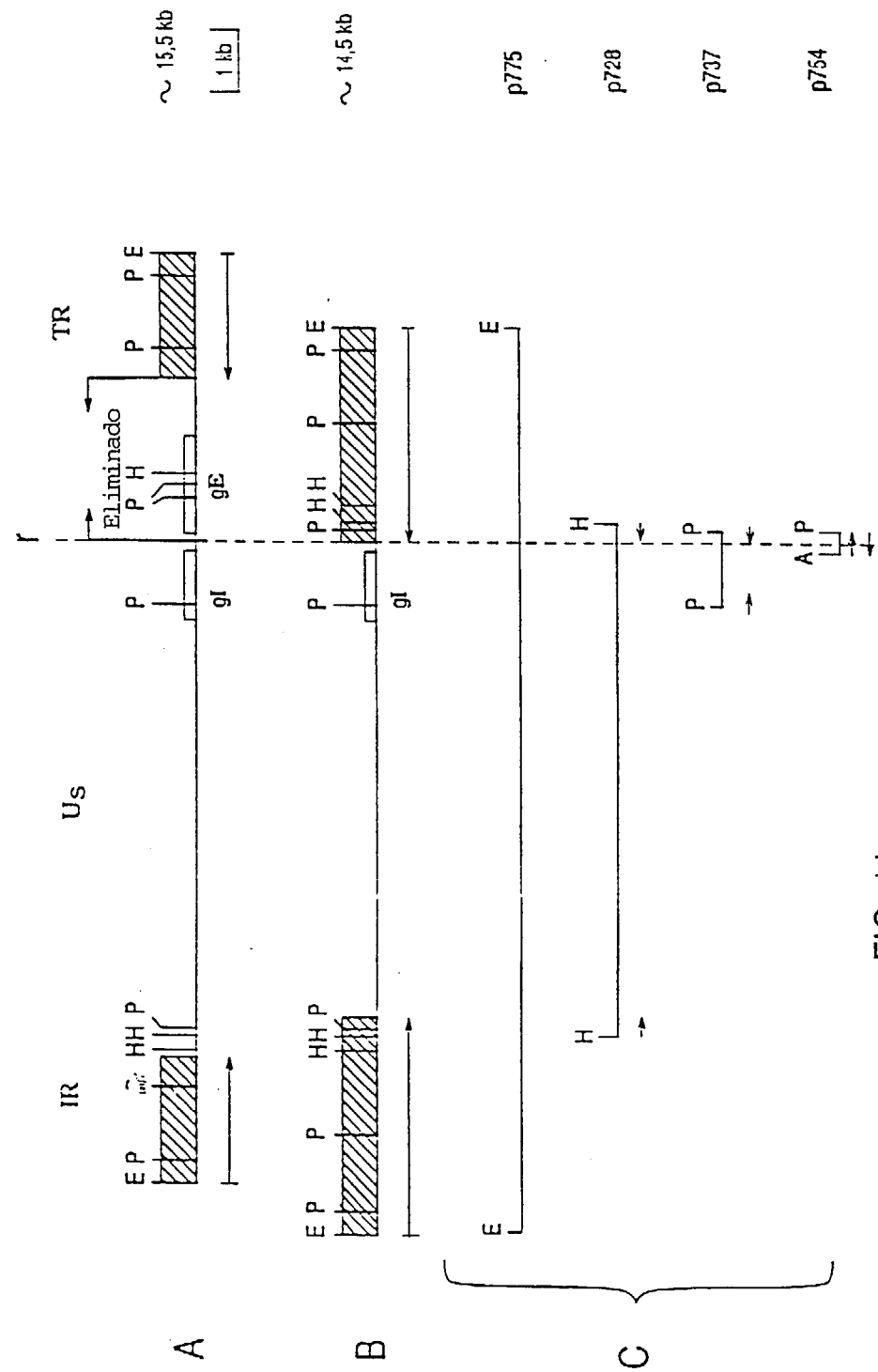


FIG.8B

1272 GGCACGTGGAAGCTTGGGACTACAGCCCTAGTCGTTACTTCGGACCGTTTGGTGCGCGGTCACC
HindIII
GACCACACGGGCCCCGAGGCGCGAGCCCGGACGCTCCCGAGCCAGGCCACCGCTCACCAGCGAGCCGGGGGCGG
CCACCGGGCCCCGTGGCTTGTGGTGCTGGTGGCGCGCTTGGACTCGCGGGACTGGTGGGCAATCGCAGCCCTC
GCGGTTGCGGCTGTGCGCGCGCGCAAGCCAGAGCGCACCTACGACATCCTCAACCCCTTCGGGCCCCGATACACC
AGCTTGCCGACCAACGAGCCGCTCGACGTGGTGGTGCCAGTTAGCGACGACGAATTTCCCTCGACGAAGACTCTTTT
P3 TaqI
GCGGATGACGACAGCGACGATGACGGGCCCCGCTAGCAACCCCTGCGGATGCCCTACGACCTCGCCGGCCCCAGAG
CCAACTAGCGGGTTTGCGGAGCCCCGCCAACGGCACGGGCTCGAGTGGCTCTGGGTTCAAAGTTTGGTTAGGGAC
P4 TaqI
CCGCTTGAAGACGATGCCGGCCAGCGCGGACCCCGGCGCACCAAGATTACACCGTGGTAGCAGCGCGACTCAAGTCC
ATCCTCCGCTAGGGCCCCCCCCCCCCCGCGCTGTGCCGTCTGACGGAAAGCACCCGCGGTAGGGCTGCATATAA
EcoNI
ATGGAGCGCTCACACAAGCCCTCGTGGCGGTGCTTCGAAGGCATGGAGAGTCCACGCAGCGTCGTC 2027

FIG.10

11



4

A

```

-----> gE região promotora----->
5' GAGCGGCGCGACCGCGCGCGGGTTGTTAAATGGGTCTCGCGCGGCTCGTGGTTCCACACCGCGCGAGAA
      r
----->|<----- Sequência de repetição invertida-----
CCAGCGC|TGGGAGGGGGGGGCTTGGTGGCTGGCGACTCTTTAAGGCGTGGCGCCACGAGCAAGAAGACGGC
      |
<-----Sequência de repetição invertida-----
CTGTATGCTATGCTCCCGCGGACTATTTTCGGTGGTGGCGCTCGTCCAAGCGCGCTGCTGGTGAAAGTT 3'

```

B(I)

	curta única	r	Sequência de repetição invertida
Fronteira da sequência de repetição oposta:			
(sequência invertida)	: CCGACCGGTCCCGGA		TGGGAGGGGGGGGCTTGG
Região recombinada	: CCGGAGAACCAGCGC		TGGGAGGGGGGGGCTTGG

B(II)

		r	
Região recombinada	: CCGGAGAACCAGCGC		TGGGAGGGGGGGGCTTGG
	: *****		* * * *
Registo gE tipo selvagem	: CCGGAGAACCAGCGC		GAGCTTCGCTGGCTGTT
			gE líder --->

FIG.12



10 20 30 40 50 60
CTACCACGCCGCGGGCGACTGCTTCGTTATGCTGCAGACGACCGCGTTTCGCCTCCTGCCC
Y H A A G A C F V M L Q T T A F A S C P

70 80 90 100 110 120
GCGCGTCGCGAACGACGCCTTTCGCTCCTGCCTGCACGCCGACACGCGCCCCGCTCGCAG
R V A N D A F R S C L H A D T R P A R S

130 140 150 160 170 180
CGAGCGGCGCGCGAGCGCCGCGGTGAAAACACGTGCTCTTCTCCATCGCCCATCCGCG
E R R A S A A V E N H V L F S I A H P R

190 200 210 220 230 240
CCCAATAGACTCAGGGCTCTACTTTCTGCGCGTCGGCATCTACGGCGGCACCGCGGGCAG
P I D S G L Y F L R V G I Y G G T A G S

250 260 270 280
CGAGCGCCGCGGAGACGTCTTCCCTTGGCCGCGTTTGTACACA
E R R R D V F P L A A F V H

FIG. 13

Tabela de composição
de símbolos:

DAYHOFF.DAT;"gap penalty": 8

	1	10	20	30	40	50
BHV1	YHAAGD.CFVMLQTTAFASCPRVAN.AFRSCLHADTRP.ARSERRASAAVENHVLFSIA					
	*	:	****	: *** **:	:	***** : *:
PRV	RLDPKRA.CYTREYAAEYDLCPRVHHEAFRGCLR...KR.EPLARRASAAVEARRLLFVS					
	:	*	***	** *	:	*
HSV1	YPMGHK.CPRVHVVTVTACPRRPAVAFALCRATDSTH.SPAYPTLELNLAQQPLLVRQ					
	*	* * *:	***	** **	*	*
VZV	YADTVAFCFRSVQVIRYDGCPRIRTSAFISCYKHSWHYGNSTDRISTEPDAGVMLKIT					
	1	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	93	
BHV1	HPRFIDSGLYFLRVGIYGG.TAGSERRRDVFPPLAAFVH					
	: * * * * *	***	*	:	*	*
PRV	RPAPPDAGSYVLRVR..NG.TTDLFVLTALVPPRGRPHU					
	*	** *****:	:	****	:	*
HSV1	RATRDYAGVYVLRVWVGDAPNASLFLGMAIAAEG					
	:	: ***** *:	:	*:**:	:	*
VZV	KPGINDAGVYVLLVRLDHSRSTDGFI LGVNVYTAG					
		70	80	90	94	

FIG.14

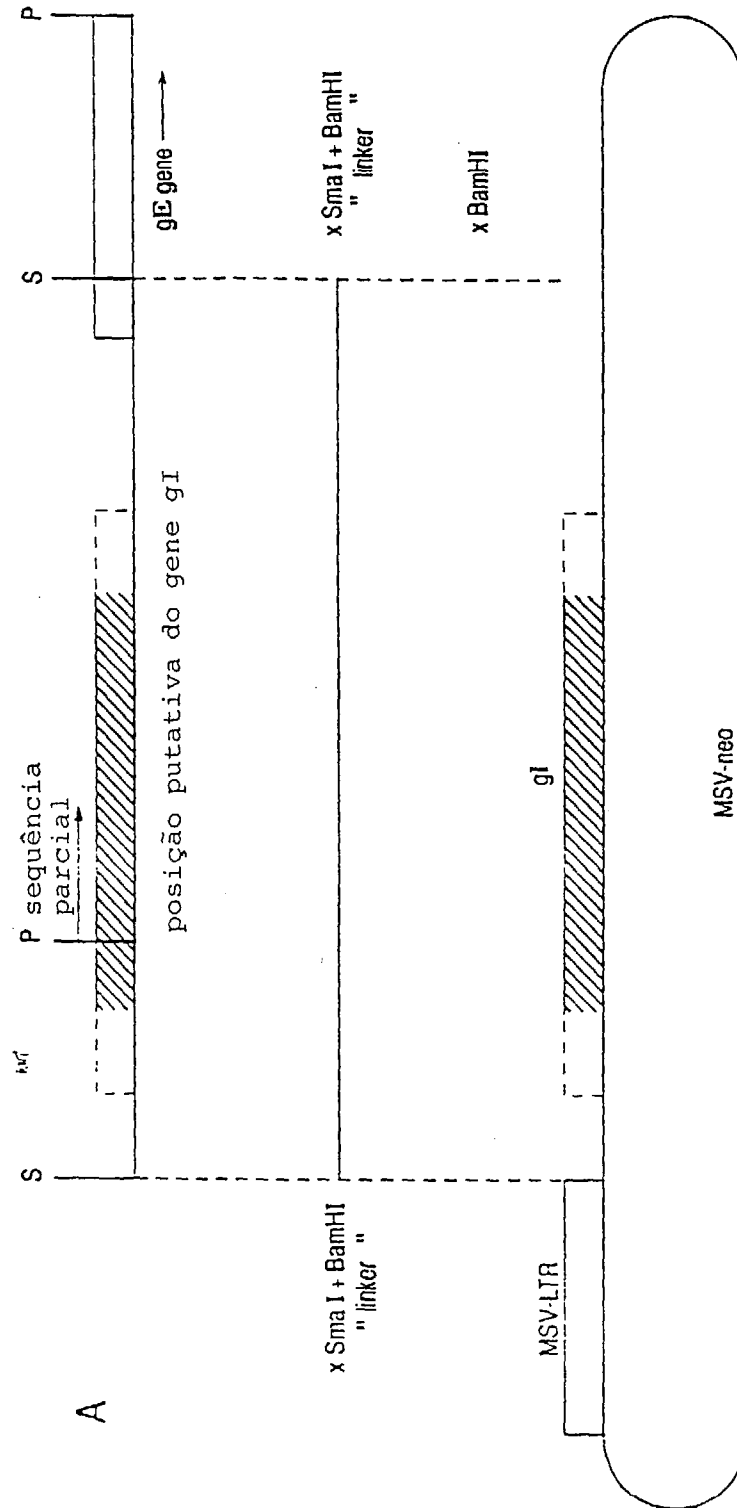


FIG. 15

11

11

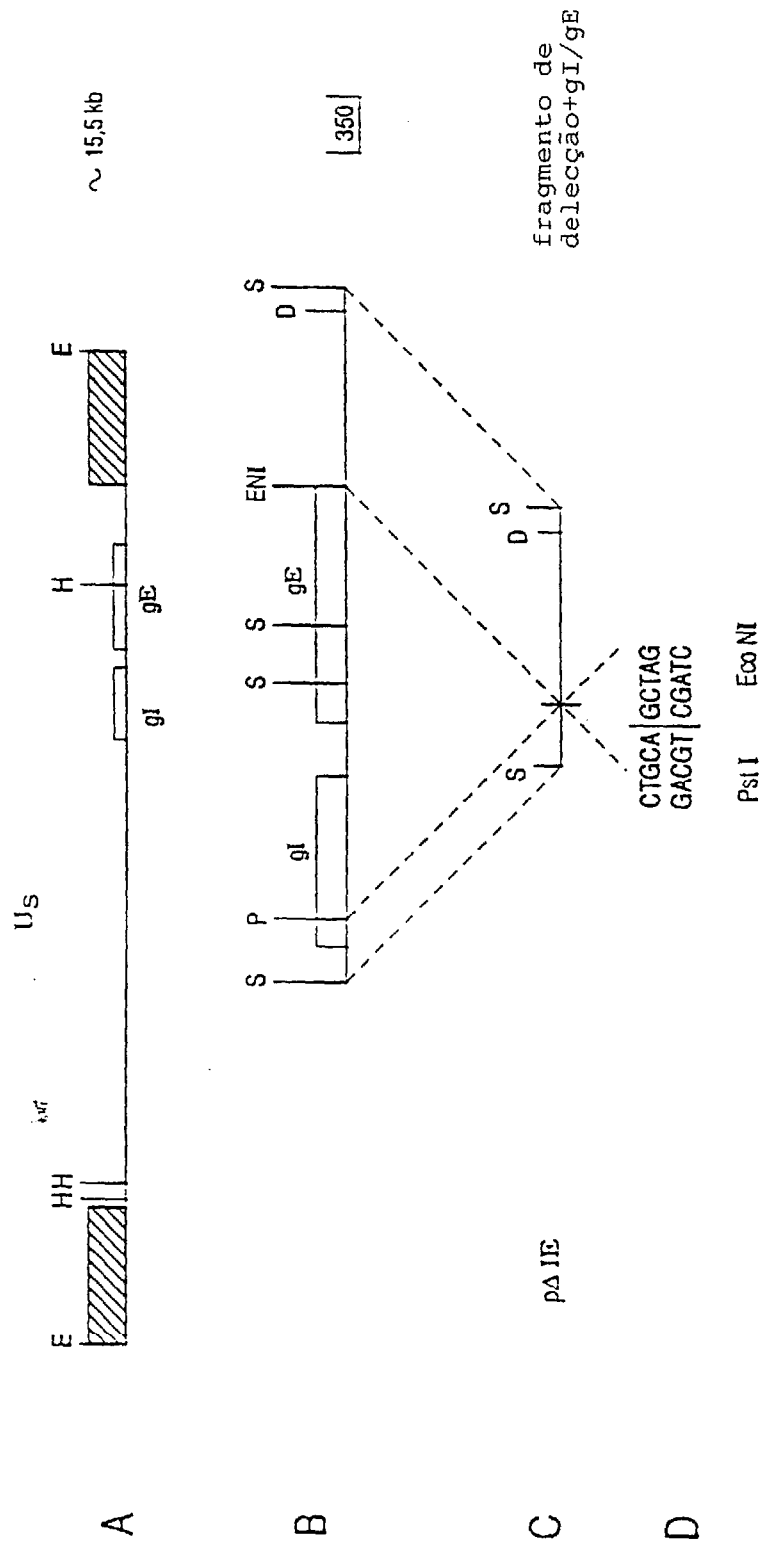


FIG. 16

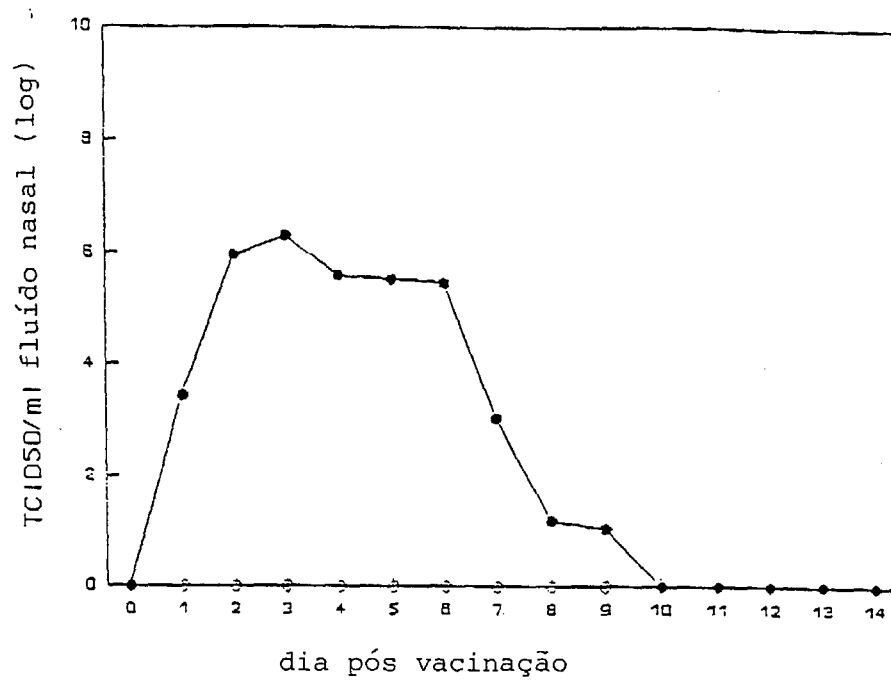


FIG.17

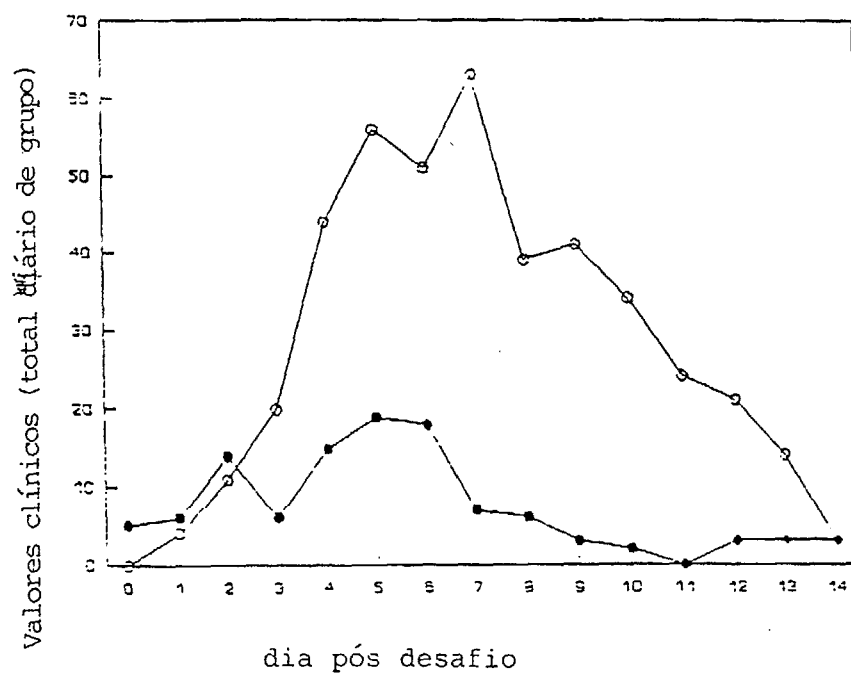


FIG.18

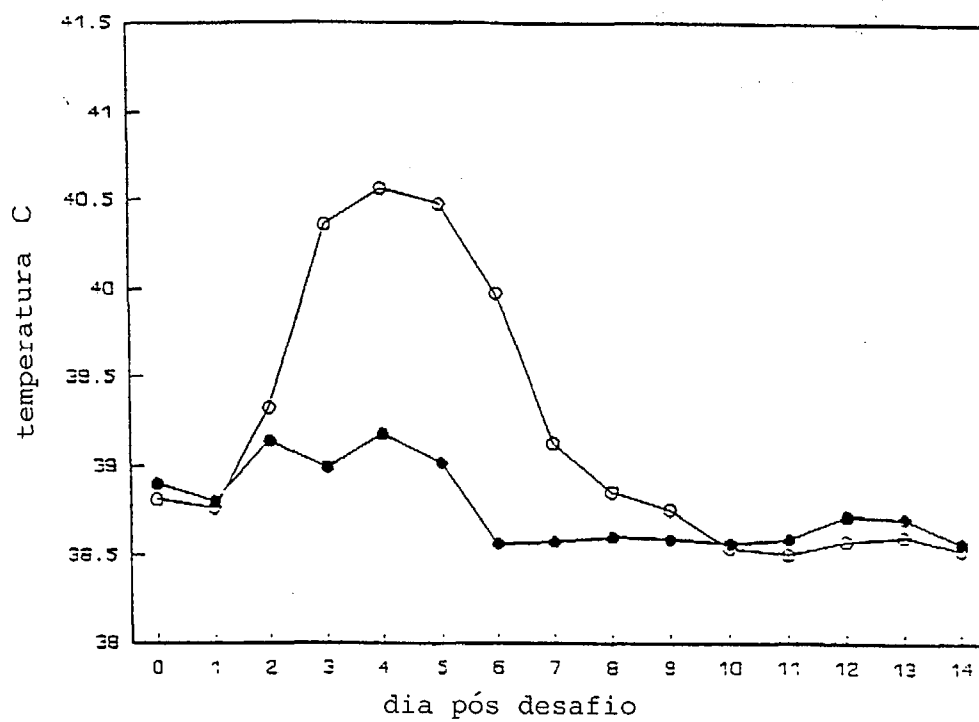


FIG.19

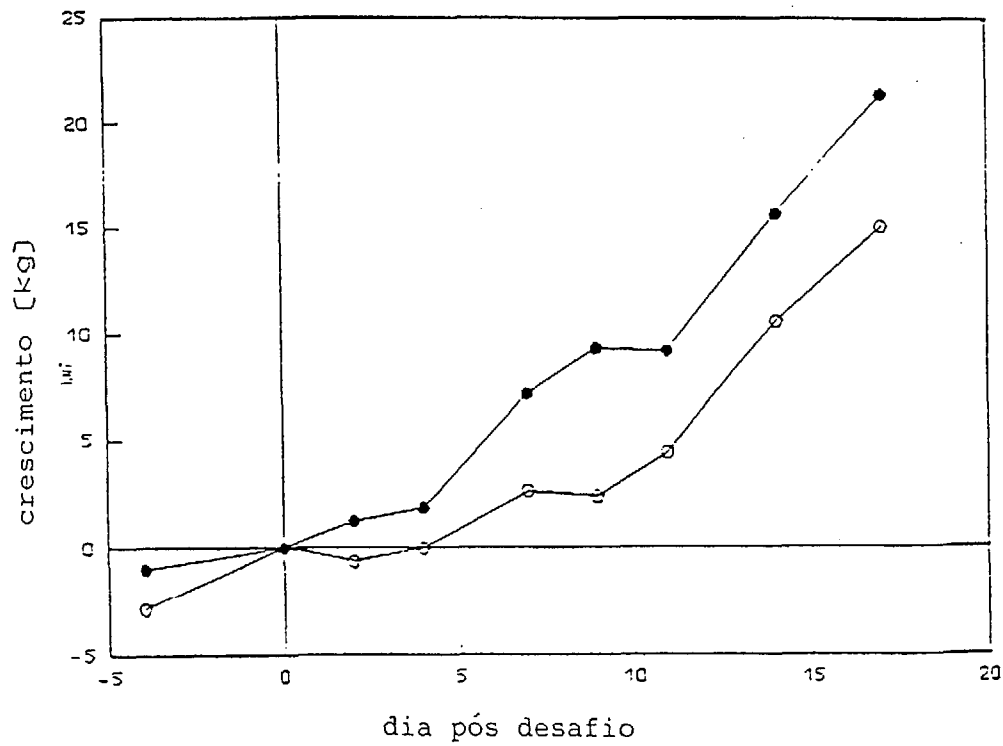


FIG.20

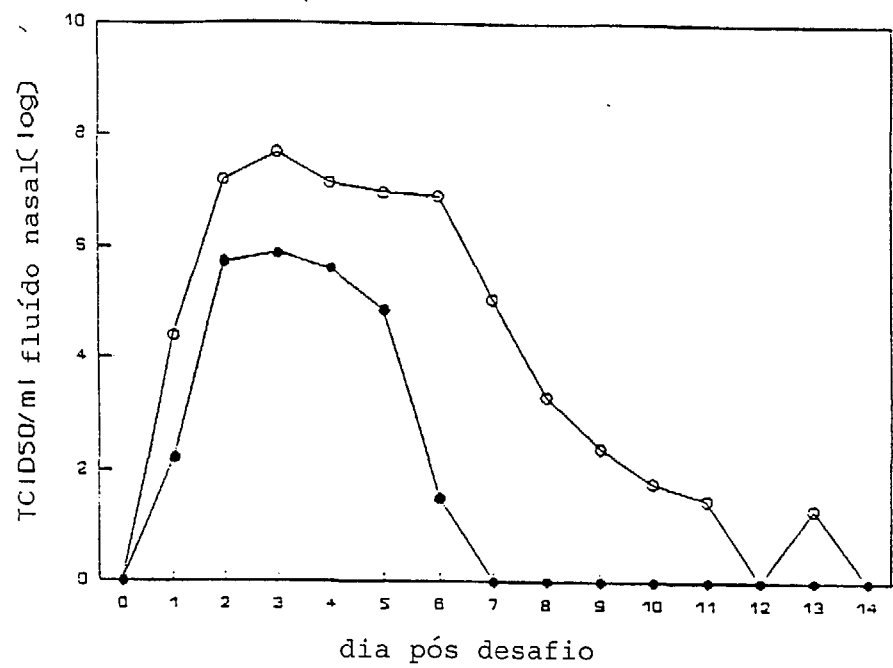


FIG. 21

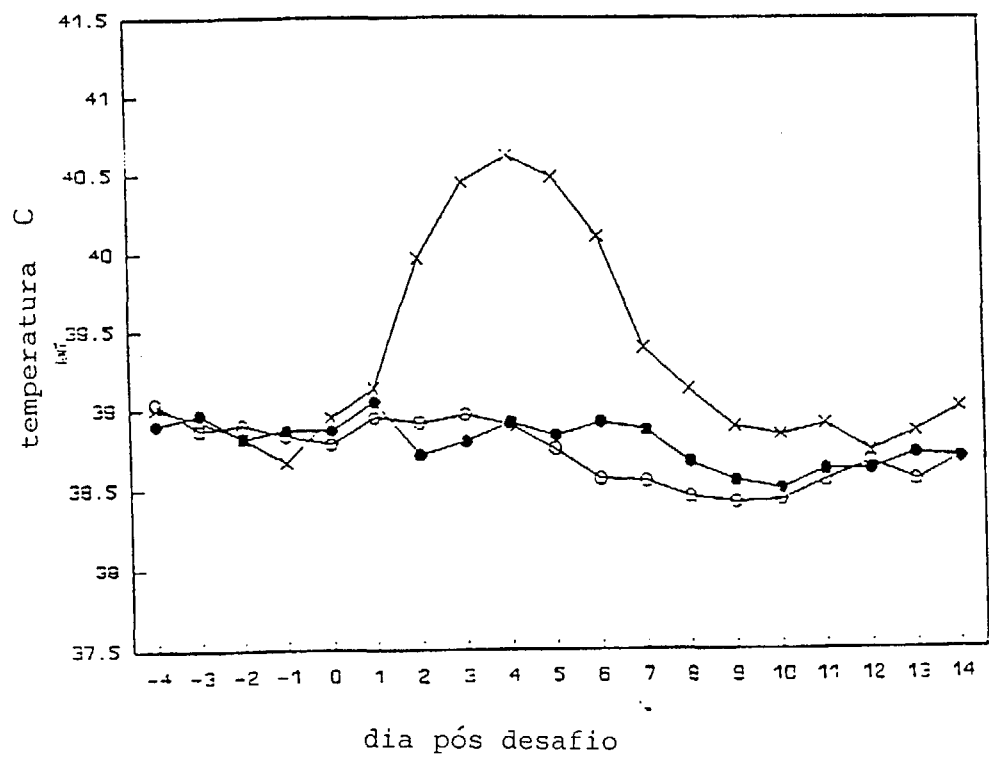


FIG. 22

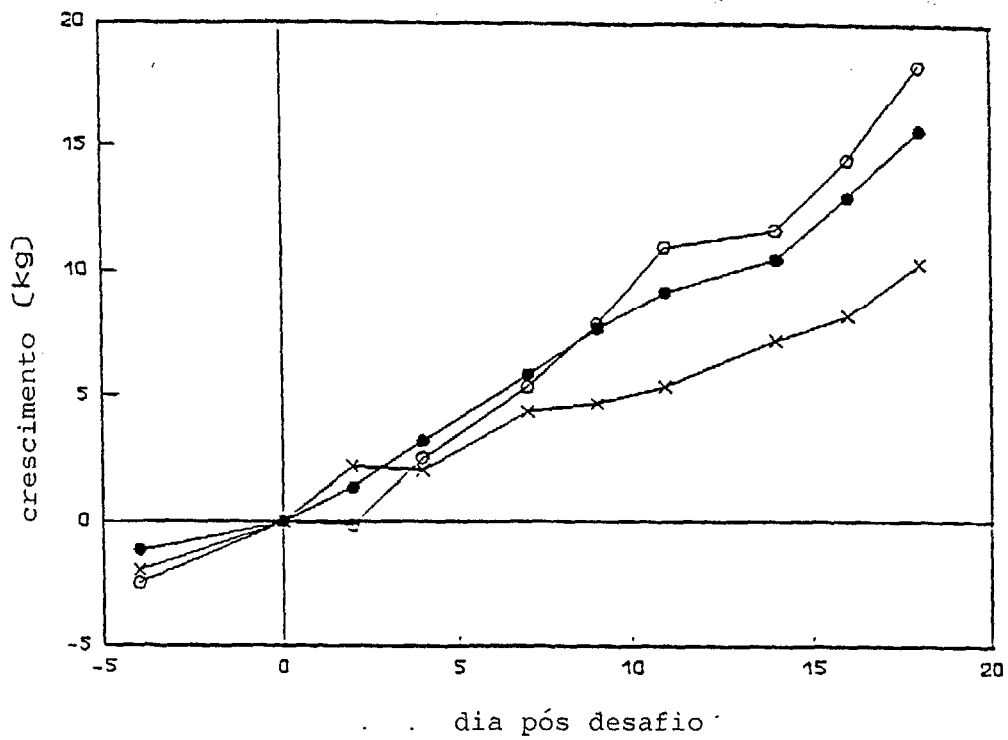


FIG. 23

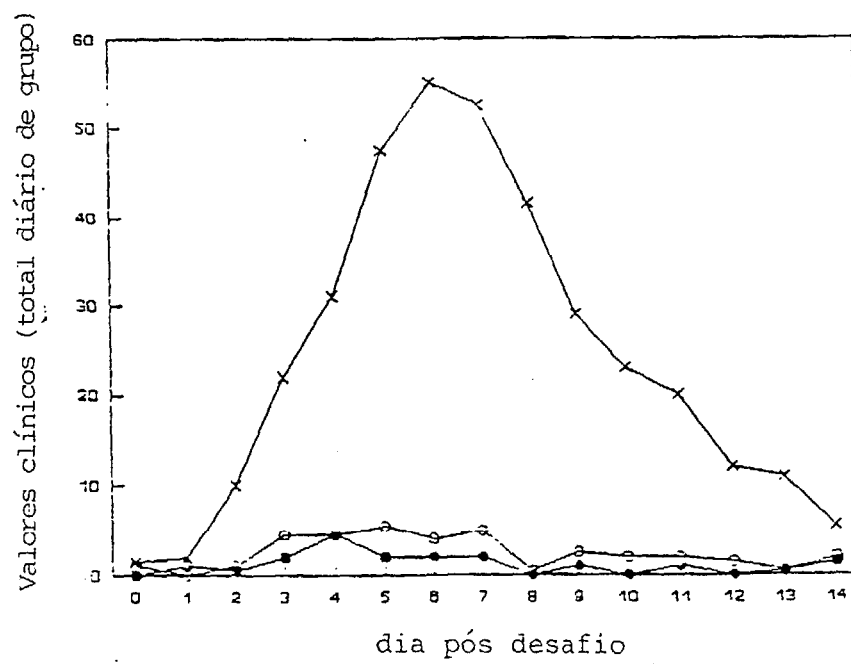


FIG. 24