



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) PI 0809529-9 B1

(22) Data do Depósito: 28/03/2008

(45) Data de Concessão: 24/09/2024

(54) Título: HERPESVÍRUS DE PERU VETORIZADO RECOMBINANTE COMPREENDENDO UM GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS INFLUENZA AVIÁRIO E VACINA PARA AVES

(51) Int.Cl.: A61K 39/245; C12N 7/00.

(30) Prioridade Unionista: 30/03/2007 US 11/729,978.

(73) Titular(es): CEVA SANTE ANIMALE SA.

(72) Inventor(es): KRISTI M. DORSEY; LAUREN ELIZABETH JENSEN; MOTOYUKI ESAKI.

(86) Pedido PCT: PCT US2008004070 de 28/03/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/121329 de 09/10/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/09/2009

(57) Resumo: HERPESVÍRUS DE PERU VETORIZADO RECOMBINANTE CONTENDO GENES DE INFLUENZA A VIÁRIA A presente invenção fornece um herpesvírus de peru recombinante modificado pela presença do cDNA que codifica a proteína hemaglutinina do vírus influenza aviário sob um promotor. Uma vacina para aves que compreende o herpesvírus de peru recombinante descrito na presente invenção pode induzir respostas sorológicas que podem ser facilmente detectadas através do ensaio de inibição de hemaglutinação, mas não através de kits de ELISA para diagnóstico disponíveis comercialmente; possibilitando assim a fácil diferenciação entre vacinação e infecção no campo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"HERPESVÍRUS DE PERU VETORIZADO RECOMBINANTE
COMPREENDENDO UM GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS
INFLUENZA AVIÁRIO E VACINA PARA AVES".**

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1. CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se de forma geral a vacinas para aves contra o influenza aviário (AI). Mais especificamente, a presente invenção fornece um herpesvírus de peru recombinante modificado pela presença do cDNA que codifica a proteína hemaglutinina (HA) do vírus influenza aviário sob um promotor.

2. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

[002] O influenza aviário é causado por vírus influenzas aviários que são classificados na família Orthomyxoviridae, gênero Influenzavirus A. O genoma do vírus influenza aviário consiste em oito segmentos de RNA de sentido negativo de filamento simples. O genoma viral codifica dez proteínas, das quais oito proteínas são proteínas estruturais incluindo a HA e a neuraminidase (NA) e duas proteínas são não estruturais. Os vírus Influenza A são divididos em subtipos baseados na antigenicidade das proteínas HA e NA. Há 16 antígenos da HA e nove antígenos da NA reconhecidos. A HA é considerada o antígeno principal que pode produzir anticorpos protetores em aves.

[003] Os vírus Influenza A de aves domésticas são caracterizados em dois patotipos com base em sua patogenicidade: vírus influenzas aviários altamente patogênicos (HPAI) e vírus influenzas aviários com baixa patogenicidade (LPAI). A maioria dos vírus influenzas aviários tem virulência baixa, mas alguns vírus dos subtipos H5 e H7 podem causar doença sistêmica grave que resulta em alta mortalidade. Embora apenas alguns vírus influenzas aviários H5 e H7 tenham virulência alta, todos os vírus H5 e H7 são identificados como vírus influenza aviário

notificável pela World Organization for Animal Health (OIE) devido ao risco dos vírus com virulência baixa aumentarem a virulência por mutação.

[004] Desde o final dos anos 90, tem havido um aumento significativo no número de surtos de AI e no número de aves envolvidas em tais surtos (I. Capua e outros, 2004, Avian Pathology, 33: 393-404). O exemplo mais notável é uma série de surtos de H5N1 HPAI na China e no Sudeste da Ásia, que agora se espalharam para outras partes do mundo tais como a Europa, o Oriente Médio e a África. Os surtos custaram tantas quantas 160 vidas humanas em mais de 10 países desde 2003, embora a transmissão ser humano a ser humano evidente ainda tenha que ser confirmada. Estes surtos recentes causaram perdas econômicas enormes para a indústria de aves e aumentaram as preocupações públicas por causa do medo de uma possível pandemia humana.

[005] A vacinação contra o AI não foi realizada extensivamente até agora porque o assim chamado procedimento de "extermínio" tem sido a opção primária. No procedimento de "extermínio", todos os frangos nos bandos infectados com AI são rejeitados. A maioria dos surtos de AI foi erradicada ou controlada pelo "extermínio" no passado. Entretanto, em surtos de AI recentes, especialmente nos surtos de H5N1, havia situações em que a rejeição massiva não era prática ou possível devido aos custos econômicos intoleráveis e às perdas associadas com a rejeição, espalhando amplamente a presença dos assim chamados frangos de fundo de quintal e assim por diante. Em tais situações, a vacinação foi considerada uma ferramenta adequada e poderosa para apoiar a erradicação do AI ou programas de controle do AI porque foi mostrado que a vacinação protege as aves contra sinais clínicos e morte e reduz o espalhamento do vírus em aves vacinadas, reduzindo assim a transmissão do vírus (D. E. Swayne., 2003,

Developments in Biologicals, 114: 201-212). Para utilizar vacinas nos programas de erradicação do AI ou nos programas de controle do AI, é crítico para as finalidades comerciais e de inspeção que as aves vacinadas possam ser diferenciadas daquelas infectadas com o vírus no campo. Na verdade, a exposição no campo em bandos vacinados tem que ser detectada em ensaios sorológicos simples. De outra maneira, o vírus no campo pode circular não detectado nas aves vacinadas. É também importante que a evidência da vacinação possa ser detectada através de ensaios simples com a finalidade de confirmar que a maior parte ou todas as aves nos bandos vacinados estejam vacinadas de forma apropriada.

[006] As vacinas comerciais disponíveis atualmente são constituídas de antígenos de AI inteiro inativado com adjuvante oleoso e uma vacina recombinante em vetores do vírus fowlpox. Embora ambas as vacinas tenham se mostrado eficientes, estas requerem uma vacinação parenteral trabalhosa e cara que envolve o tratamento de cada ave manualmente. Embora as vacinas para AI inativadas tenham sido utilizadas no programa chamado DIVA ("Differentiation of infected from vaccinated animals" – Diferenciação de animais infectados dos vacinados), não havia testes disponíveis comercialmente desenvolvidos para a aplicação em massa. Foi mostrado que frangos pré-imunizados com o vírus fowlpox através da exposição no campo ou através de vacinação com vacinas de fowlpox convencionais não desenvolveriam imunidade protetora consistente contra o AI após serem vacinadas com a vacina para AI recombinante em vetores do vírus fowlpox (D. E. Swayne e outros, 2000, Avian Diseases, 44: 132-137). A vacina para AI recombinante em vetores do vírus fowlpox falhou em ativar uma resposta sorológica detectável pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI) de forma consistente (D.E. Swayne e outros, 1997, Avian Diseases, 41: 910-922). Assim, o desenvolvimento de vacinas que são mais fáceis

de serem administradas e que podem ser facilmente diferenciadas da infecção pelo vírus no campo é desejável para a indústria de aves.

[007] A vacina para AI recombinante em vetores do vírus fowlpox comercial contém o gene da HA do vírus AI A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8) (J.R. Taylor e outros, 1988, *Vaccine*, 6: 504-508). Várias outras vacinas recombinantes em vetores de fowlpox experimentais foram desenvolvidas e foi mostrado que são eficientes contra o desafio com vírus AI em condições experimentais. Os genes dos vírus influenza aviários contidos nas vacinas recombinantes em vetores de fowlpox incluem o gene da HA de A/Chicken/Scotland/59 (H5N1) (CW. Beard e outros, 1991, *Avian Diseases*, 35: 356-359) e os genes HA e NA de A/Goose/Guangdond/3/96 (H5N1) (C. Qiao e outros, 2003, *Avian Pathol.*, 32:25-31). M. Mingxiao e outros fundiram os genes da HA do subtipo H5N1 e do subtipo H7N1 para formar um único quadro aberto e inseriram um vírus fowlpox recombinante junto com a Interleucina-18 de frango (M. Mingxiao e outros, 2006, *Vaccine*, 24: 4304-4311). Foi observada uma proteção cruzada ampla entre os subtipos H5 do vírus AI. Foi demonstrado que a vacina para AI recombinante em vetores do vírus fowlpox e as vacinas para AI inteiro inativado para os subtipos H5 do influenza aviário protegem frangos contra o desafio com um vírus AI distinto do subtipo H5, cujas similaridades das sequências de aminoácidos da HA deduzidas com as vacinas são tão baixas quanto 87% (D.E. Swayne e outros, 2000, *Veterinary Microbiol.*, 74: 165-172).

[008] Vacinas de próxima geração sob desenvolvimento incluem vacinas com o vírus da doença de Newcastle recombinante (D.E. Swayne e outros, 2003, *Avian Diseases*, 47: 1047-1050; J. Veits e outros, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:8197-8202; M. Park e outros, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:8203-8208; e J. Ge e outros, 2007, *J. Virol.* 81: 150-158), vacinas com o vírus da laringotraqueíte infecciosa recombinante (D. Luschow e outros, 2001,

Vaccine 19: 4249-4259 e J. Veits e outros, 2003, J. Gen. Virol. 84: 3343-3352), uma vacina de adenovírus recombinante (W. Gao e outros, 2006, J. Virol. 80: 1959-1964), vacinas de subunidades expressas em baculovírus (J. Crawford e outros, 1999, Vaccine, 17:2265-2274 e D.E. Swayne e outros, 2001, Avian Diseases, 45: 355-365) e vacinas de DNA (Patente U.S. Nº 5.916.879 e M. Cherbonnel e outros, 2003, Avian Diseases, 47: 1181-1186). Apesar das vacinas contra o vírus da doença de Newcastle recombinante, as vacinas com o vírus da laringotraqueíte infecciosa recombinante e a vacina com adenovírus recombinante eram capaz de conferir proteção parcial a semi-completa contra o desafio com AI em frangos isentos de agentes patogênicos específicos, sua eficiência em frangos com anticorpos maternos para os vírus de vetor ou AI ou em frangos com infecção ou vacinação prévia com os vírus de vetor precisa ser demonstrada. As vacinas de DNA também mostraram fornecer imunidade protetora em frangos, mas requerem pelo menos duas vacinações e a administração individual a cada frango. As vacinas de subunidades expressas em baculovírus também requerem administração individual a cada frango.

[009] O herpesvírus de peru (HVT), o vírus da doença de Marek (MDV) sorotipo-3, foi utilizado como um vetor para expressar antígenos de agentes patogênicos de aves. O HVT do tipo selvagem ou o HVT recombinante pode ser administrado no estágio de desenvolvimento tardio de embriões através da via *in ovo* ou frangos de um dia de idade através da via subcutânea nas chocadeiras. É demonstrado que as vacinas para HVT associadas às células recombinantes, após a inoculação em embriões ou frangos de um dia de idade com anticorpos maternos para antígenos inseridos, são capazes de superar as influências de anticorpos maternos e de conferir imunidade protetora aos frangos na forma de anticorpos maternos enfraquecidos (Patente U.S. Nº 6.764.684 e Patente U.S. Nº 6.866.852). A duração excelente

da imunidade é também conseguida através do HVT recombinante (Patente U.S. Nº 6.866.852) provavelmente porque o HVT fica latente e permanece dentro das aves vacinadas durante toda a sua vida. Assim, o HVT pode ser considerado um vetor excelente para agentes patogênicos de aves. Não há relatos de constructo de HVT ou de MDV recombinante com antígenos do influenza aviário. Embora a Reivindicação 15 da Patente U.S. Nº 5.853.733 descreva o HVT recombinante compreendendo um gene de polipeptídeo do vírus AI inserido dentro de uma região que corresponde a um fragmento de EcoRI #9 do genoma do HVT, não há um exemplo real de constructo do HVT recombinante com antígenos do influenza aviário. Em espécies de mamíferos, a Patente U.S. Nº 6.225.111 descreve o constructo de herpesvírus equino recombinante contendo o gene da HA do vírus influenza equino, mas não há dados em relação à eficiência de vacinas destes recombinantes.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0010] A presente invenção fornece um HVT recombinante modificado pela presença do cDNA que codifica a proteína HA do vírus influenza aviário sob um promotor. O HVT recombinante é capaz de ativar uma resposta sorológica que é facilmente detectada através do ensaio de HI, mas não por kits de ELISA para diagnóstico disponíveis comercialmente. Esta característica do vírus recombinante possibilita a fácil diferenciação entre a vacinação e a infecção no campo. É também fornecida uma vacina para aves que compreende o HVT recombinante.

[0011] A presente invenção é descrita abaixo em maiores detalhes. (Gene da hemaglutinina do vírus influenza aviário)

[0012] O gene da hemaglutinina pode ser obtido partindo de qualquer subtipo ou qualquer cepa de vírus influenza aviário. Preferencialmente, o gene da HA é obtido de um vírus influenza aviário do subtipo H5. Mais preferencialmente, o gene da HA é obtido do vírus

influenza aviário do subtipo H5N9. Mais preferencialmente, o gene da HA é obtido da cepa do vírus influenza aviário A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9). Uma sequência de nucleotídeos do gene da HA da cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) é mostrada na SEQ ID NO: 1. A sequência na SEQ ID NO: 1 difere da sequência de nucleotídeos publicada do gene da HA da cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) (M. Garcia e outros, 1997, Virus Res. 51 : 115-124, Acesso do GenBank# U79456) em várias bases. Estas diferenças são provavelmente devido à natureza instável geneticamente dos vírus influenzas aviários, que possuem um genoma de RNA. Portanto, a sequência mostrada na SEQ ID NO: 1 é apenas um exemplo e a presente invenção não deve estar restrita à sequência.

(Promotor)

[0013] Adjacente ao gene da HA em um genoma de HVT, tipicamente na região a 5' do gene da HA, uma sequência de DNA reguladora, que é referida aqui como um promotor, é incluída com a finalidade de controlar a transcrição do gene da HA e desta maneira controlar a expressão do gene da HA (produção da proteína HA). Quando a transcrição e assim a expressão de um gene é controlada por um promotor, o gene é considerado sob o controle do promotor. Na presente invenção, o gene da HA está sob o controle do promotor inicial imediato de citomegalovírus (promotor de CMV). Foi observado que o HVT recombinante com o gene da HA em combinação com o promotor de CMV era capaz de conferir títulos sorológicos mais altos e mais uniformes através de HI em frangos que o HVT recombinante com outros promotores tais como o promotor da beta-actina de frango (T.A. Kost e outros, 1983, Nucleic Acids Res. 11: 8287-8301) e um promotor da beta-actina modificado de frango (Patente U.S. Nº 6.866.852). Uma sequência de nucleotídeos do promotor de CMV é descrita na literatura (M. Boshart e outros, 1985, Cell 41: 521-530, Acesso do GenBank#

K03104). Entretanto, contanto que o promotor seja funcional em células ou nos corpos de espécies de aves, a sequência de nucleotídeos de um promotor não tem que ser idêntica à sequência na literatura. O promotor de CMV, cuja sequência é mostrada na SEQ ID NO: 3, é ligeiramente modificada da sequência original pelos inventores, mas foi demonstrado que expressa o gene da HA eficientemente.

(Herpesvírus de peru)

[0014] O herpesvírus de peru é um vírus de DNA linear de filamento duplo na família *Herpesviridae* e na subfamília *Alphaherpesvirinae*. O HVT é ubíquo e não-oncogênico em perus domésticos e é classificado como o sorotipo 3 do vírus da doença de Marek. A vacinação de frangos com HVT tem sido extensivamente realizada para prevenir a doença de Marek em frangos. Contanto que não seja patogênico para os frangos, qualquer HVT pode ser utilizado presente invenção. Por exemplo, as cepas de HVT a seguir, FC126, PB-THV1, H-2, YT-7, WTHV-1 e HPRS-26, são adequadas para o vírus de estrutura básica. Dentre estas, a cepa FC126 é favorável para uso na presente invenção.

(Região para a inserção gênica)

[0015] Na presente invenção, o gene da HA e o promotor de CMV são inseridos em um genoma de DNA de HVT. Preferencialmente, o gene da HA e o promotor de CMV são inseridos em uma região no genoma de HVT que não é essencial para o crescimento do vírus, que é referida aqui como uma região não-essencial. Em outras palavras, uma região não-essencial pode ser definida como uma região em que uma modificação ou uma inserção de um gene estranho não impede o vírus de se replicar de forma bem sucedida *in vitro* ou *in vivo*. Foram relatadas várias regiões não essenciais no genoma de HVT. Por exemplo, o gene da HA e o promotor de CMV podem ser inseridos em, mas não limitados a, UL43 (WO 89/01040), US2 (WO 93/25665) ou na região inter-ORF entre UL44 e UL46 (WO 99/18215). Mais

preferencialmente, o gene da HA e o promotor de CMV são inseridos na região inter-ORF entre UL45 e UL46.

[0016] Para a presente invenção, uma região não-essencial pode ser há pouco identificada seguindo o procedimento geral. Em primeiro lugar, fragmentos de DNA de HVT de comprimentos apropriados são clonados em um plasmídeo de *E. coli* e mapeados fisicamente através da análise com enzimas de restrição. Então, um cassete gênico que consiste em um promotor e um gene marcador é inserido em um sítio de restrição apropriado do fragmento de DNA clonado resultando em um plasmídeo de homologia. Se a recombinação homóloga com o plasmídeo de homologia obtido resultar em um vírus recombinante que expressa o gene marcador inserido e se o vírus for estável *in vitro* e *in vivo*, o fragmento de DNA originalmente selecionado deve ser uma região não-essencial adequada para a inserção do gene da HA e o promotor de CMV.

(Constructo de rHVT)

[0017] Para a presente invenção, qualquer método conhecido de produção de HVT recombinante pode ser aplicado. Um exemplo típico é o seguinte. (1) Em primeiro lugar, como descrito anteriormente, é construído um plasmídeo recombinante que contém uma região não-essencial do genoma de HVT. Então, preferencialmente com um promotor no terminal a 5' e um sinal de poliadenilação no terminal a 3', o gene da HA é inserido na região não-essencial para gerar um plasmídeo de homologia. (2) O plasmídeo de homologia é transfetado em células de fibroblastos de embrião de frango (CEF) infectadas com o HVT original ou co-transfetado nas células CEF com o DNA genômico do HVT infeccioso. A transfecção pode ser realizada através de qualquer método conhecido. (3) As células CEF transfetadas são plaqueadas em placas de cultura de tecido e incubadas até que placas virais se tornem visíveis. (4) As placas que podem ser identificadas

incluem o vírus recombinante assim com o vírus do tipo selvagem original. O vírus recombinante pode ser purificado do vírus do tipo selvagem através de qualquer método conhecido para detectar a expressão de genes estranhos inseridos.

(Vacina bivalente para Influenza aviário - doença de Marek)

[0018] Uma vez que a proteína HA é um antígeno protetor do vírus influenza aviário e a estrutura básica do HVT é uma vacina viva para a doença de Marek, o HVT recombinante que contém o gene da HA na presente invenção pode ser utilizado como uma vacina bivalente contra o AI e a doença de Marek ou como uma vacina monovalente contra o AI.

[0019] A vacina, que consiste principalmente no HVT recombinante na presente invenção, também pode incluir células de aves, ingredientes de meios de cultura, tampões tais como tampão fosfato e tampão HEPES e/ou adjuvantes tais como citocinas e CpG oligodesoxinucleotídeo. Contanto que não seja prejudicial farmacologicamente, a vacina pode conter quaisquer ingredientes tais como conservantes. Em adição, a vacina da presente invenção pode ser utilizada em uma mistura com quaisquer vírus recombinantes ou não recombinantes tais como as cepas vacinas do sorotipo 1 ou do sorotipo 2 de MDV.

[0020] Qualquer método conhecido pode ser aplicado para a preparação da vacina bivalente recombinante na presente invenção. Por exemplo, o HVT recombinante pode ser inoculado em culturas de células permissivas tais como células CEF e crescido até um título apropriado. Então, as células são removidas das placas de cultura de tecido ou garrafas giratórias com raspadores de células ou através do tratamento com tripsina e coletadas por centrifugação. As células peletizadas são então suspensas em meio de cultura contendo dimetil sulfóxido, congeladas lentamente e então armazenadas em nitrogênio

líquido. Alternativamente, o HVT recombinante pode ser liberado das células infectadas através do rompimento das células em diluentes que contêm estabilizantes tais como sacarose e albumina bovina. Este HVT liberado é chamado de HVT isento de células. O HVT isento de células pode ser liofilizado e armazenado a 4°C.

[0021] A vacina de HVT recombinante bivalente pode ser administrada a frangos através de qualquer método conhecido de inoculação da vacina para a doença de Marek. Por exemplo, a vacina da presente invenção é diluída para fornecer 10^1 - 10^5 ou mais favoravelmente 10^2 - 10^4 unidades formadoras de placas (ufp) por dose com um diluente que contém componentes tamponantes, açúcares e corante. A vacina diluída pode ser inoculada de forma subcutânea atrás do pescoço de frangos de um dia de idade ou nos ovos embrionários através da via *in ovo* com seringas ou com qualquer aparelho para injeção.

[0022] A presente vacina bivalente para aves é capaz de conferir um título sorológico através de HI de mais de 50 (título médio geométrico) em grupos de frangos vacinados até 5 semanas após a inoculação, quando são utilizadas quatro unidades de hemaglutinação de um antígeno do subtipo H5 homólogo ao vírus influenza aviário inativado para os testes de HI. Ainda, a vacina bivalente na presente invenção fornecia excelente proteção contra o desafio letal com o vírus influenza aviário altamente patogênico (H5N1).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0023] Fig. 1 Constructo do plasmídeo pGICMVpA

[0024] Fig. 2 Constructo do plasmídeo de homologia p45CMVH5Wis68

[0025] Fig. 3 Constructo do plasmídeo pGIBacpA2nd

[0026] Fig. 4 Constructo do plasmídeo de homologia p45BacH5Wis68

[0027] Fig. 5 Constructo do plasmídeo de homologia p45PecH5Wis68 Fig. 6 Ensaio de Western blot que detecta a expressão da proteína hemaglutinina através do herpesvírus recombinante de peru

[0028] Fig. 7 Títulos de inibição de hemaglutinina em frangos vacinados com o herpesvírus recombinante de peru com o gene da hemaglutinina.

[0029] Fig. 8 Títulos de ELISA em frangos vacinados com o herpesvírus recombinante de peru com o gene da hemaglutinina utilizando um kit para ELISA comercial (EDEXX LABORATORIES, FLOCKCHEK AIV)

[0030] Fig. 9 Títulos de ELISA em frangos vacinados com o herpesvírus recombinante de peru com o gene da hemaglutinina utilizando um kit para ELISA comercial (SYNBiotICS, PROFLOK AIV Ab test kit)

[0031] Fig. 10 Títulos de inibição de hemaglutinina em frangos vacinados com o herpesvírus recombinante de peru com o gene da hemaglutinina (segundo teste)

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0032] A clonagem gênica e o constructo de plasmídeo foram essencialmente realizadas através de técnicas de biologia molecular padronizadas (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3^ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, N.Y. 2001). A cepa de herpesvírus de peru FC126 (R. L. Witter e outros, 1970, Am. J. Vet. Res. 31, 525-538) foi utilizada como um vírus estrutural para gerar um herpesvírus recombinante de peru.

EXEMPLO 1

[0033] Isolamento do Gene da Hemaglutinina do Subtipo H5 do Vírus Influenza Aviário

[0034] A cepa do vírus influenza aviário A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) foi propagada no saco alantoide de ovos de galinha

embrionários isentos de agentes patogênicos específicos. O RNA genômico total do vírus A/Turkey/Wisconsin/68 foi extraído utilizando o RNEASY MINI KIT (QIAGEN, Cat# 74104). O cDNA do primeiro filamento foi sintetizado com o SUPERSCRIPT FIRST-STRAND System para RT-PCR (Invitrogen, Cat# 11904-018). Utilizando o cDNA resultante como um molde, o gene da HA foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com UFPULTRA HIGH FIDELITY DNA Polymerase (STRATAGENE, Cat# 600380) e iniciadores da PCR. Estes iniciadores da PCR, o iniciador BamHA-F (SEQ ID NO: 4) e o iniciador SalHA-R (SEQ ID NO: 5), se anelam às sequências de início e de término do gene da HA e cada iniciador contém uma sequência nas extremidades a 5' para uma enzima de restrição, BamHI ou Sall, respectivamente. Após a reação da PCR, a Taq polimerase (PROMEGA, Cat# M2665) foi adicionada na mistura de PCR para adicionar pontas coesivas A a 3' nos produtos da PCR.

Iniciador BamHA-F (SEQ ID NO: 4) 5'-
TGACGGATCCATGGAAAGAATAG TGATTG-3'

Iniciador SalHA-R (SEQ ID NO: 5) 5'-
CTGACAGTCGACCTAGATGCAAATT CTGC-3'

[0035] O cDNA de HA de 1,8 quilobases (kb) amplificado foi inserido no vetor PCR2.1-TOPO (INVITROGEN, Cat# K4500-01), resultando no pCR2.1-H5Wis68. As sequências de nucleotídeos dos genes da HA em alguns clones do plasmídeo pCR2.1-H5Wis68 e do produto da PCR foram determinadas utilizando o ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS) com seis iniciadores; iniciador BamHA-F (SEQ ID NO: 4), iniciador SalHA-R (SEQ ID NO: 5), iniciador para frente M13 (SEQ ID NO: 6), iniciador para trás M13 (SEQ ID NO: 7), iniciador HA-F (SEQ ID NO: 8) e iniciador HA-R (SEQ ID NO: 9).

Iniciador para frente M13 (SEQ ID NO: 6) 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

Iniciador para trás M13 (SEQ ID NO: 7) 5'-
GGAAACAGCTATGACCATG-3'

Iniciador HA-F (SEQ ID NO: 8) 5'-
CTGGACAATACTAAGGCCGAACGAT-3'

Iniciador HA-R (SEQ ID NO: 9) 5'-CACTGGGTCTGACATTGGTA-3'
[0036] As sequências nos clones do plasmídeo pCR2.1-H5Wis68 eram idênticas uma à outra e à sequência do produto da PCR. Embora a sequência de aminoácidos deduzida fosse diferente da sequência relatada de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) (M. Garcia e outros, 1997, Virus Res. 51 : 115-124, Acesso do GenBank# U79456) em quatro aminoácidos, os aminoácidos que foram obtidos eram os mesmos que os aminoácidos de uma maioria de proteínas HA do subtipo H5. A sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos deduzida do gene da HA obtidas de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) são mostradas na SEQ ID NO: 1 e na SEQ ID NO: 2.

EXEMPLO 2

Constructo de Plasmídeos de Homologia

2-1. Um sumário de Plasmídeos de Homologia e Herpesvírus Recombinantes de Peru

[0037] Na presente invenção, três promotores, o promotor de CMV, o promotor da beta-actina de frango (promotor Bac) e um promotor da beta-actina modificado de frango (promotor Pec), foram utilizados para controlar a expressão do gene da HA da cepa do vírus AI A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9). Em primeiro lugar, os plasmídeos de homologia com o gene da HA e um dos promotores foram construídos e então os herpesvírus recombinantes de Peru foram gerados utilizando os plasmídeos de homologia. Os herpesvírus recombinantes de Peru com promotores diferentes foram comparados em relação às capacidades de conferir títulos sorológicos contra AI em frangos como mostrado no EXEMPLO 6. Um HVT recombinante com o promotor de

CMV é apresentado aqui como um exemplo e os vírus recombinantes com o promotor Bac ou o promotor Pec são apresentados aqui como exemplos comparativos. Uma lista dos plasmídeos de homologia e dos herpesvírus recombinantes de peru construídos na presente invenção é mostrada na TABELA 1.

Tabela 1. Uma lista de plasmídeos de homologia e herpesvírus recombinantes de peru

Item #	Nome dos plasmídeos de homologia	Nome dos vírus recombinantes	Promotores	Exemplos vs. exemplos comparativos
1	p45CMVH5Wis68	rHVT/CMVH5Wis68	Promotor de CMV	Exemplo
2	p45BacH5Wis68	rHVT/BacH5Wis68	Promotor Bac	Exemplo comparativo
3	p45PecH5Wis68	rHVT/PecH5Wis68	Promotor Pec	Exemplo comparativo

2-2. Constructo do Plasmídeo pGICMVpA

[0038] O promotor de CMV foi obtido partindo do pBK-CMV (STRATAGENE, Cat. #212209). Três sítios da enzima de restrição BgII no promotor de CMV foram interrompidos para facilitar o processo de constructo do plasmídeo através da mutagênese *in vitro* com PCR utilizando quatro pares de iniciadores. Os pares de iniciadores eram PrCMV1 (SEQ ID NO: 10) e PrCMV3 (SEQ ID NO: 12), PrCMV4 (SEQ ID NO: 13) e PrCMV5 (SEQ ID NO: 14), PrCMV6 (SEQ ID NO: 15) e PrCMV2' (SEQ ID NO: 11) e PrCMV01 (SEQ ID NO: 16) e PrCMVR1 (SEQ ID NO: 17). Foram realizadas quatro reações da PCR separadamente utilizando cada par de iniciadores e pBK-CMV como um molde. Então quatro produtos da PCR foram combinados e utilizados como um molde para a PCR secundária com os iniciadores PrCMV1 e PrCMVR1, produzindo o fragmento de 604 pb com uma sequência modificada do promotor de CMV. A sequência de nucleotídeos do promotor de CMV utilizada para expressar o gene da HA é fornecida na

SEQ ID. NO. 3. O fragmento do promotor de CMV foi digerido com PstI e XbaI e inserido no pUC18polyASfi digerido com PstI e XbaI (Patente U.S. Nº 6.866.852), resultando em pGICMV(-). O sinal de poliA do SV40 foi obtido do pBK-CMV através da PCR utilizando os iniciadores PolyA-SalKpn (SEQ ID NO: 18) e PolyA-SfiF2 (SEQ ID NO: 19). O fragmento de PCR contendo o sinal de poliA do SV40 foi digerido com Sall e Sfil e ligado ao pGICMV(-) digerido com Sall e Sfil resultando no pGICMVPa (FIGURA 1).

PrCMV1	(SEQ	ID	NO:	10)	5'-
GGGCTGCAGAGTTATTAATAGTAATCAATT-3'					
PrCMV2'	(SEQ ID NO: 11)	5'-CGCGCCATTTACCGTCATTGACGTC-3'			
PrCMV3	(SEQ ID NO: 12)	5'-GGGTCGTTGGCGGTCAGCCGGCGG-3'			
PrCMV4	(SEQ ID NO: 13)	5'-CTTACGGTAAATGGCCCGCCGGCTG-3'			
PrCMV5	(SEQ ID NO: 14)	5'-TACACTTGATGTACTGCCAATGGC-3'			
PrCMV6	(SEQ ID NO: 15)	5'-TATTACGGTAAACTGCCATTGGC-3'			
PrCMV01	(SEQ ID NO: 16)	5'-ACGTCAATGACGGTAAATGGCGCG CCTGGC-3'			
PrCMVR1	(SEQ	ID	NO:	17)	5'-
CGTCTAGAGGATCTGACGGTTCACTAAA CC-3'					
PolyA-SalKpn	(SEQ	ID	NO:	18)	5'-
TGTGGTACCGTCGACGATTACAGT CCCAAGGC-3'					
PolyA-SfiF2	(SEQ	ID	NO:	19)	5'-
CTTGGCCTTATTGGCCTAAGATACATT GATGAG-3'					

2-3. Constructo do Plasmídeo de Homologia p45CMVH5Wis68

[0039] O promotor de CMV e o sinal de poliA do SV40 (940 pb) foram cortados do pGICMVPa por BgII e ligado no p45/46Sfi digerido com Sfil (US 6.866.852), resultando no p45/46CMVPa. Então, o gene da HA de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) foi cortado do pCR2.1-H5Wis68 utilizando Sall e BamHI. O gene da HA de 1701 pb foi inserido

no p45/46CMVpA digerido com Sall e BamHI, resultando no p45CMVH5Wis68 (FIGURA 2). O plasmídeo p45CMVH5Wis68 foi utilizado como um plasmídeo de homologia para gerar o herpesvírus recombinante de peru.

2-4. Constructo do Plasmídeo pGIBacpA2nd

[0040] O promotor Bac foi obtido através da PCR utilizando DNA celular de células CEF como um molde. PrBac1 (SEQ ID NO: 18) e PrBac2' (SEQ ID NO: 19) constituíam o conjunto de iniciadores utilizado para a PCR. Um fragmento de DNA de 1,5 quilobase foi digerido com PstI e XbaI e inserido no pUC18polyASfi digerido com PstI e XbaI, resultando no pGIBac2. Então, o sinal de poliA do SV40 obtido através da PCR utilizando os iniciadores PolyA-SalKpn (SEQ ID NO: 18) e PolyA-SfiF2 (SEQ ID NO: 19) foi digerido com Sall e Sfil e ligado ao pGDBac2 digerido com Sall e Sfil resultando no pGIBacpA2nd (FIGURA 3).

PrBac1 (SEQ ID NO: 20) 5'-

CAGTGTGCGCTGCAGCTCAGTCAGTCATGCACGCTCATTGCC-3'

PrBac2' (SEQ ID NO: 21) 5'-

GCTCTAGAGGCGTGGAGCTTGGGGCT

GCGGAGGAACAGAGAAGGGAAG-3'

2-5. Constructo do Plasmídeo de Homologia p45BacH5Wis68

[0041] O promotor Bac e o sinal de poliA do SV40 (1866 pb) foram cortados do pGIBacpA2nd por BgII e ligado no p45/46Sfi digerido com Sfil, resultando no p45/46BacpA2nd. Então, o gene da HA de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) cortado do pCR2.1-H5Wis68 utilizando Sall e BamHI foi inserido no p45/46BacpA2nd digerido com Sall e BamHI, resultando no p45BacH5Wis68 (FIGURA 4).

2-6. Constructo do Plasmídeo de Homologia p45PecH5Wis68

[0042] O constructo do promotor Pec é descrita na Patente U.S. Nº 6.866.852. O promotor Pec foi sintetizado através da fusão de uma parte

do promotor da beta-actina de frango com a região intensificadora do promotor de CMV. O promotor Pec foi cortado do pGIPec (Patente U.S. Nº 6.866.852) com PstI e BamHI e inserido no p45/46BacpA2nd digerido com PstI e BamHI descrito nos EXEMPLOS 2-4, resultando no p45/46PecpA2nd. Então, o gene da HA de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) cortado do pCR2.1-H5Wis68 utilizando Sall e BamHI foi inserido no p45/46PecpA2nd digerido com Sall e BamHI, resultando no p45PecH5Wis68 (FIGURA 5).

EXEMPLO 3

Produção e Isolamento do Herpesvírus Recombinante de Peru

[0043] O DNA viral da cepa HVT FC126 foi preparado como descrito por Morgan e outros (Avian Diseases, 1990, 34:345-351).

[0044] 10^7 células de fibroblastos de embrião de frango (CEF) secundárias foram suspensas em Solução Salina G (0,14 M de NaCl, 0,5 mM de KCl, 1,1 mM de Na_2HPO_4 , 1,5 mM de NaH_2PO_4 , 0,5 mM de MgCl_2 e 0,011% de glicose) e co-transfetadas com o DNA viral de HVT e 5 até 25 μg do plasmídeo de homologia, p45CMVH5Wis68, p45BacH5Wis68 ou p45PecH5Wis68 por eletroporação. A eletroporação foi realizada utilizando o BIO-RAD GENE PULSER. As células transfetadas foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e transferidas para poços de placas de 96 poços. Após incubação a 37°C durante 7 dias em 4-5% de CO_2 ou até as placas ficarem visíveis, as células foram descoladas das placas através de tratamento com tripsina, transferidas igualmente para duas placas de 96 poços com CEF secundário e incubadas durante 3 até 4 dias até que as placas fossem observadas. A verificação foi realizada através do ensaio de placa negra, corando apenas as placas expressando a proteína HA. Sucintamente, uma das duas placas foi fixada com uma mistura de metanol:acetona (1:2) e incubada com antissor anti-HA de frango. A seguir, incubada com anticorpo anti-IgG de frango biotinilado (VECTOR

LABORATORIES, Cat# BA-9010) e então com o VECTASTAIN ABC-AP kit (Vector Laboratories, Cat# AK-5000), as placas expressando a proteína HA foram coradas através da adição da solução BCIP/NBT (BIO-RAD LABORATORIES, Cat# 170-6539 e 170-6532). Os poços contendo as placas recombinantes coradas foram identificados e as células dos poços correspondentes na outra placa de 96 poços foram tratadas com tripsina. As células foram então diluídas em células CEF secundárias frescas e transferidas para placas de 96 poços para completar a primeira rodada de purificação.

[0045] O procedimento de purificação foi repetido até que todas as placas fossem coradas positivamente no ensaio de placa negra. O vírus recombinante purificado com o gene da HA sob o promotor de CMV foi denominado de rHVT/CMVH5Wis68 (a presente invenção). Os vírus recombinantes com o promotor Bac ou com o promotor Pec foram denominados de rHVT/BacH5Wis68 e rHVT/PecH5Wis68, respectivamente (exemplos comparativos).

EXEMPLO 4

Verificação da Estrutura e da Estabilidade do Genoma do HVT Recombinante

4-1. Análise de Southern Blot

[0046] As células de fibroblastos de embrião de frango em uma placa de 100 mm que foram infectadas com o vírus recombinante, rHVT/CMVH5Wis68 ou a cepa original HVT FC126 foram utilizadas na análise de Southern para confirmar a inserção do gene da HA no sítio de inserção desejado. As células foram coletadas através de um raspador de células e por centrifugação a 913 x g durante 5 minutos. As células coletadas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e ressuspensas em 1,0 mililitro (mL) de tampão de lise (0,5% de TRITON X-100, 100 mM de 2-mercaptopetanol e 20 mM de EDTA em PBS). A suspensão de células foi agitada em vortex durante

um total de 30 segundos e incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente. O núcleo das células e os restos celulares foram removidos por centrifugação a 2.060 x g durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Os vírus foram coletados por centrifugação a 20.800 x g durante 20 minutos a 4°C. O pélete foi suspenso em 0,33 mL de uma solução de nuclease (12,5 mM de Tris-Cl (pH 7,5), 1 µg/mL de DNase I e 1 µg/mL de RNase A) e incubada a 37°C durante 30 minutos. Então, 83 µL de solução de SDS-protease (50 mM de EDTA, 5% de SDS, 0,5 mg/mL de protease K e 25 mM de 2-mercaptoetanol) foram adicionados à suspensão viral e incubados a 55°C durante 30 minutos para romper os envelopes virais. A extração com fenol clorofórmio foi realizada duas vezes e o DNA foi precipitado através da adição de 2,5 volumes de etanol a 100% e NaCl gelados em uma concentração final de 0,16 M. Após a centrifugação a 20.800 x g durante 30 minutos a 4°C, o pélete foi lavado com etanol a 70% e seca por exposição ao ar. O pélete foi dissolvido em tampão TE (10 mM de Tris-Cl (pH 8,0) e 1 mM de EDTA).

[0047] O DNA viral no tampão TE e o plasmídeo de homologia (controle positivo) foram digeridos com Xhol, BamHI e Spel e separados através de eletroforese em gel de agarose utilizando um gel de agarose a 0,6%. Os fragmentos de DNA no gel foram transferidos para uma membrana de náilon BIODYNE A (PALL, Cat# BNXF3R). A membrana foi hibridizada com sonda para HA marcada com Digoxigenina (DIG) ou sonda IS45/46 marcada com DIG. A sonda para HA e a sonda IS45/46 marcadas com DIG foram preparadas com o PCR DIG Probe Synthesis Kit (ROCHE APPLIED SCIENCE, Cat# 11636090910) utilizando os iniciadores HA1P-F (SEQ ID NO: 22) e HA1P-R (SEQ ID NO: 23) e os iniciadores 45/46-F (SEQ ID NO: 24) e 45/46-R (SEQ ID NO: 25), respectivamente.

HA1P-F (SEQ ID NO: 22) 5'-GGGGTGGCAAGGAATG-3'

HA1P-R (SEQ ID NO: 23) 5'-GCTAGGGAACTCGCCACTGT-3'
45/46-F-B (SEQ ID NO: 24) 5'-TAGCGGCACGGAAACAGATAGAGA-3'
45/46-R-B (SEQ ID NO: 25) 5'-TGGCGATACGGTTCCTGGTTGAC-3'
[0048] A membrana foi lavada com solução 2 X SSC à temperatura ambiente e então com solução 0,5 X SSC a 68°C. A membrana foi bloqueada e incubada com fragmentos de Fab anti-Digoxigenin-AP (ROCHE APPLIED SCIENCE, Cat# 11093274910) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem duas vezes com o tampão de lavagem com ácido maléico (0,1 M de ácido maléico, 0,15 M de NaCl e 0,3% de Tween20, pH 7,5), as bandas de DNA que foram hibridizadas com as sondas foram visualizadas através da incubação da membrana com a solução BCIP/NBT. A sonda para HA se hibridizou com bandas de 3,6 kb no DNA do vírus recombinante e no plasmídeo de homologia, enquanto que não foram detectadas bandas com o HVT original. A sonda IS45/46 se hibridizou com bandas de 3,6 kb e 1,2 kb no DNA recombinante e no plasmídeo de homologia e com uma banda de 2,3 kb no HVT original. Estes resultados demonstraram que o rHVT/CMVH5Wis68 obtido no EXEMPLO 3 tinha uma estrutura genômica esperada.

[0049] A análise de Southern blot do rHVT/BacH5Wis68 e do rHVT/PecH5Wis68 foi realizada de uma maneira similar àquela do rHVT/CMVH5Wis68, exceto pelo fato de que as enzimas de restrição Xhol e Spel foram utilizadas para o rHVT/BacH5Wis68. Para o rHVT/BacH5Wis68, a sonda para HA se hibridizou com bandas de 4,9 kb no DNA do vírus recombinante e no plasmídeo de homologia, enquanto que não foram detectadas bandas com o HVT original. A sonda IS45/46 se hibridizou com bandas de 4,9 kb e 0,8 kb no DNA recombinante e no plasmídeo de homologia e com uma banda de 2,3 kb no HVT original. Para o rHVT/PecH5Wis68, a sonda para HA se hibridizou com bandas 3,6 kb no DNA do vírus recombinante e no

plasmídeo de homologia, enquanto que não foram detectadas bandas com o HVT original. A sonda IS45/46 se hibridizou com bandas de 3,6 kb e 1,2 kb no DNA recombinante e no plasmídeo de homologia e com uma banda de 2,3 kb no HVT original. Foi também demonstrado que estes vírus recombinantes possuíam estruturas genômicas esperadas.

4.2. Estabilidade do HVT Recombinante

[0050] Os vírus recombinantes, rHVT/CMVH5Wis68, rHVT/BacH5Wis68 e rHVT/PecH5Wis68, foram passados 20 vezes de forma cega em células CEF. Após as 20 passagens, os vírus foram analisados através da análise de Southern blot como descrito no EXEMPLO 4.1. As bandas detectadas no DNA isolado do vírus após 20 passagens eram idênticas às bandas descritas no EXEMPLO 4.1, demonstrando que os vírus recombinantes eram estáveis mesmo após 20 passagens.

EXEMPLO 5

Expressão da Proteína HA pelo HVT Recombinante

[0051] A expressão da proteína HA pelos vírus recombinantes, rHVT/CMVH5Wis68, rHVT/BacH5Wis68 e rHVT/PecH5Wis68, foi confirmada através do ensaio de placa negra e do ensaio de Western blot. Os procedimentos para o ensaio de placa negra são descritos no EXEMPLO 3. O western blot foi realizado utilizando células CEF infectadas com os vírus recombinantes e antissoro anti-HA de frango. Sucintamente, as células CEF em placas de 100 mm foram infectadas com um dos vírus recombinantes ou com a cepa HVT FC126 original a uma multiplicidade de infecção de aproximadamente 0,01. Dois até três dias após a inoculação, as células foram coletadas com raspadores de células e centrifugadas a 913 x g durante 5 minutos. O pélete foi lavado com PBS duas vezes e ressuspenso com 50 até 100 µL de PBS. Após a adição do mesmo volume de tampão de amostra 2 x SDS (130 mM de Tris-Cl (pH 6,8), 6% de SDS, 20% de Glicerol, 10% de 2-Mercaptoetanol

e 0,01% de Azul de Bromo Fenol), a suspensão de células foi fervida durante 5 minutos. As amostras foram separadas por SDS-PAGE utilizando um gel de poliacrilamida a 8% e transferidas para uma membrana PVDF (IMMOBILON-P, MILLIPORE). A membrana foi seca completamente e então incubada com antissoro anti-HA de frango. Após o antissoro anti-HA ser extraído por lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo Fc anti-IgG de frango conjugado com fosfatase alcalina (BETHYL, Cat# A30-104AP). A proteína ligada com o antissoro anti-HA de frango foi visualizada através da adição da solução BCIP/NBT. Como mostrado na FIGURA 3, uma banda de proteína de 74 quilodaltons (kDa) foi observada apenas na faixa com as células infectadas com vírus recombinante, que era o tamanho esperado da proteína HA não processada.

EXEMPLO 6

Avaliação Sorológica de Frangos Inoculados com HVT Recombinante

[0052] Foram avaliadas as respostas sorológicas contra o AI em frangos que foram vacinados com os vírus recombinantes, rHVT/CMVH5Wis68, rHVT/PecH5Wis68 e rHVT/BacH5Wis68. Frangos isentos de agentes patogênicos específicos de um dia de idade (SPAFAS, Flock T-10) foram vacinados de forma subcutânea com um dos vírus recombinantes. Os Grupos 1 e 2 foram inoculados com 1638 ufp por dose (0,2 mL) e 375 ufp por dose de rHVT/CMVH5Wis68, respectivamente (TABELA 2). Os Grupos 3 e 4 continham frangos vacinados com 2800 ufp (Grupo 3) ou 550 ufp (Grupo 4) de rHVT/PecH5Wis68. Os Grupos 5 e 6 foram inoculados com 4350 ufp e 720 ufp por dose de rHVT/BacH5Wis68, respectivamente. Um grupo de frangos (Grupo 8) foi mantido como controles negativos não inoculados. Um outro grupo de frangos (Grupo 7) foi vacinado de forma subcutânea com a vacina de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) inativada com três semanas de idade como um controle de vacina inativada. Foi retirado o

sangue dos frangos entre 3 até 7 semanas de idade e o soro obtido foi avaliado através de testes de HI do AI e de testes de ELISA de AIV. Os testes de HI do AI foram realizados utilizando quatro unidades de hemaglutinação de um antígeno homólogo ao do vírus influenza aviário inativado da cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9), cujo gene da HA foi utilizado nos vírus recombinantes, como descrito por D. E. Swayne e outros (D.E. Swayne e outros, 1998, Avian Influenza. Em: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 150-155). Sucintamente, antes do ensaio de HI, o número das unidades de hemaglutinação no antígeno de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) inativado foi determinado como a maior diluição do antígeno que fornecia a aglutinação completa e o antígeno foi diluído para conter quatro unidades de hemaglutinação em 25 µL. Nas placas de 96 poços de fundo arredondado, os soros foram inicialmente diluídos 1:5 e então diluídos em série duas vezes ao longo das placas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para conterem 25 µL por poço. Quatro unidades de hemaglutinação do antígeno em 25 µL foram adicionadas em cada poço e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, 50 µL de 0,5% de eritrócitos de frango em PBS foram adicionados em cada poço e incubados durante aproximadamente 40 minutos à temperatura ambiente. Os títulos de HI são a maior diluição do soro que exibe inibição da hemaglutinação. Os títulos de HI iguais ou maiores que 10 foram considerados positivos. Os testes de ELISA foram realizados utilizando dois kits de ELISA para AIV comerciais (IDEXX Laboratories, FLOCKCHEK AIV e SYNBIOTICS, PROFLOK AIV Ab test kit) que estão disponíveis nos Estados Unidos.

[0053] Como mostrado na TABELA 3 e na FIGURA 7, o soro proveniente de frangos vacinados com rHVT/CMVH5Wis68 (Grupos 1 e 2) começou a exibir títulos de HI tão logo quanto três semanas após a vacinação e os títulos de HI continuavam a aumentar até o título de HI

de 100 (título médio geométrico) em seis semanas após a vacinação. Ainda, mais de 80% dos frangos vacinados três semanas após a vacinação e todos os frangos vacinados após cinco semanas após a vacinação tinham títulos de HI equivalentes ou maiores que 10 (TABELA 3). Os altos níveis dos títulos de HI não foram observados de forma consistente com a vacina para AIV em vetores de fowlpox comerciais e isto não era facilmente realizado. A diferença de doses entre os grupos vacinais (1638 ufp e 375 ufp) não tinha uma influência significativa sobre as respostas sorológicas. De forma surpreendente, quando testados com os kits de ELISA para AIV comerciais, estes soros provenientes de frangos vacinados com rHVT/CMVH5Wis68 que eram altamente positivos através dos testes de HI não forneciam títulos positivos de ELISA até 3 e 7 semanas após a vacinação, enquanto que os soros coletados do controle de vacina inativada (Grupo 7) exibiam títulos positivos de ELISA altos com ambos os kits de ELISA comerciais (FIGURAS 8 e 9). Esta característica da vacina com rHVT/CMVH5Wis68 tornaria extremamente fácil diferenciar as reações da vacina da exposição ao vírus no campo e rastrear os frangos vacinados. Os títulos médios geométricos de HI dos soros provenientes de frangos vacinados com rHVT/PecH5Wis68 (Grupos 3 e 4) ou com rHVT/BacH5wis68 (Grupos 5 e 6) não eram tão altos quanto os conferidos pelo rHVT/CMVH5Wis68. Ainda, o rHVT/PecH5Wis68 e o rHVT/BacH5wis68 falharam em conferir título sorológico por HI aos frangos vacinados de forma consistente como mostrado na TABELA 3. Os controles negativos não inoculados (Grupo 8) não exibiam resultados sorológicos positivos nos testes de HI ou nos testes de ELISA ao longo de todo o período de observação.

[0054] Em resumo, o HVT recombinante com o gene da HA em combinação com o promotor de CMV (rHVT/CMVH5wis68) fornecia frangos vacinados com títulos sorológicos mais altos e mais uniformes

por HI que o HVT recombinante com o promotor Bac (rHVT/BacH5Wis68) e o HVT recombinante com o promotor Pec (rHVT/PecH5Wis68), que são apresentados aqui como exemplos comparativos. Os soros coletados de frangos vacinados com rHVT/CMVH5Wis68 eram negativos através dos kits de ELISA para AIV disponíveis comercialmente, embora os soros fossem altamente positivos através dos testes de HI do AI, possibilitando assim a fácil diferenciação entre a reação proveniente da vacinação e da infecção no campo.

EXEMPLO 7

Segunda Avaliação Sorológica de Frangos Inoculados com HVT Recombinante

[0055] Para investigar adicionalmente a potência do HVT recombinante com o gene da HA, foi realizado outro teste de avaliação sorológica. Os frangos isentos de agentes patogênicos específicos (SPAFAS, Flock R105) foram divididos em quatro grupos neste estudo (TABELA 4). Os embriões em 18 dias de incubação no Grupo 1 foram vacinados com 980 pfu por dose (0,1 mL) de rHVT/CMVH5Wis68 através da via *in ovo*. O Grupo 2 e o Grupo 3 foram vacinados de forma subcutânea com um dia de idade com 695 ufp por dose (0,2 mL) de rHVT/CMVH5Wis68 ou 1155 ufp por dose de rHVT/BacH5Wis68, respectivamente. Um grupo de frangos (Grupo 4) foi mantido como controle negativo não inoculado. Foi retirado o sangue dos frangos entre 2 até 7 semanas de idade e os soros obtidos foram avaliados através dos testes de HI do AI e dos testes de ELISA para AIV. Os testes de HI do AI foram realizados utilizando quatro unidades de HA de um antígeno de A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) inativado como descrito por D. E. Swayne e outros (D. E. Swayne e outros, 1998, Avian Influenza. Em: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 150-155).

[0056] Como mostrado na TABELA 5 e na FIGURA 10, o rHVT/CMVH5Wis68 através de administração subcutânea (Grupo 2) mostrou novamente excelente potência no primeiro teste. Os títulos de HI neste grupo atingiram 100 (título médio geométrico) em três semanas após a vacinação e altos níveis de títulos de HI foram mantidos até sete semanas após a vacinação. Ainda, neste estudo, foi observado que a administração *in ovo* de rHVT/CMVH5Wis68 (Grupo 1) é tão potente quanto a administração subcutânea. Os títulos de HI no Grupo 1 eram muito similares aqueles no Grupo 2. Os títulos de frangos vacinados com rHVT/BacH5Wis68 (Grupo 3) eram de alguma maneira menores que aqueles de frangos vacinados com rHVT/CMVH5Wis68 (Grupos 1 e 2) novamente exceto 5 semanas após a vacinação quando o Grupo 3 tinha títulos de HI mais altos que os outros grupos, mas o título de HI caiu nas semanas seguintes. Não foram observados títulos de HI detectáveis dos controles negativos não inoculados ao longo de todo o período de observação.

EXEMPLO 8

Eficiência do HVT Recombinante Contra o Desafio com o Vírus Influenza Aviário Altamente Patogênico (H5N1)

[0057] No terceiro teste, foi verificada a eficiência do HVT recombinante com o gene da HA contra o vírus influenza aviário altamente patogênico (subtipo H5N1). Os frangos isentos de agentes patogênicos específicos foram divididos em quatro grupos neste estudo (TABELA 6). Os frangos de um dia de idade nos Grupos 1 e 2 foram vacinados com 1075 ufp por dose (0,2 mL) de rHVT/CMVH5Wis68 e 1080 ufp por dose de rHVT/BacH5Wis68, respectivamente. Os frangos no Grupo 3 (controle positivo desafiado não vacinado) foram inoculados com o diluente da vacina e desafiados com quatro semanas de idade. O grupo 4 foi mantido como controles negativos não desafiados não vacinados.

[0058] Com quatro semanas de idade, os frangos nos Grupos 1, 2 e 3 foram desafiados de forma intranasal com $10^{5,0}$ de EID₅₀ (200 LD₅₀) da cepa do vírus influenza aviário altamente patogênico A/Viet Nam/1203/04 (H5N1). A proteção foi avaliada através da mortalidade e dos sinais clínicos do influenza aviário. Todos os frangos no Grupo 3 (controle positivo desafiado não vacinado) morreram dentro do período de dois dias após o desafio, confirmando a gravidade do desafio (Tabela 7). O rHVT/CMVH5Wis68 exibia excelente proteção contra o desafio com influenza aviário altamente patogênico letal, uma vez que no Grupo 1, vacinado com rHVT/CMVH5Wis68, 95% (19 de 20 frangos) estavam protegidos. Por outro lado, apenas 65% (13 de 20) dos frangos no Grupo 2 (rHVT/BacH5Wis68) sobreviveram ao desafio. Todos os frangos no Grupo 4 (controle negativo não desafiado não vacinado) estavam livres de mortalidade e sinais clínicos do influenza aviário. Como é coerente com os dois estudos de avaliação sorológica descritos nos EXEMPLOS 6 e 7, o HVT recombinante com o gene da HA em combinação com o promotor de CMV (rHVT/CMVH5wis68) fornecia uma proteção muito melhor contra o desafio com o vírus influenza aviário altamente patogênico (H5N1) que o HVT recombinante com o promotor Bac (rHVT/BacH5Wis68), que é apresentado aqui como um exemplo comparativo.

Tabela 2. Grupos de tratamento

Grupo #	Grupo de Tratamento	Promotores	Idade de vacinação	Dose de vacina (ufp ¹)	Via da vacina	# de frangos
4	rHVT/CMVH5Wis68	CMV(Ex ²)	Um dia de idade	1638	SQ ³	17
2	rHVT/CMVH5Wis68	CMV(Ex)	Um dia de idade	375	SQ	17
3	rHVT/PecH5Wis68	Pec (CE ⁴)	Um dia de idade	2800	SQ	17

4	rHVT/PecH5Wis68		Pec(CE)		Um dia de idade	550	SQ	17
5	rHVT/Bach5Wis68		Bac(CE)		Um dia de idade	4350	SQ	17
6	rHVT/Bach5Wis68		Bac(CE)		Um dia de idade	720	SQ	17
7	Vacina H5N9 inativada		N/A ⁵		3 semanas de idade	0,5 mL ⁶	SQ	17
8	Controles negativos		N/A		N/A	nenhuma	N/A	10

ufp¹ = unidades formadoras de placas

Ex² = exemplo

SQ³ = subcutânea

CE⁴ = exemplo comparativo

N/A = não aplicável

mL⁶ = mililitro

Tabela 3. Títulos de HI

Grupo #	3 semanas		4 semanas		5 semanas		6 semanas		7 semanas	
#	Positivo ¹ /Total	Título GMT ²	Positivo /Total	Título GMT ²	Positivo ¹ / Total	Título GMT ²	Positivo ¹ / Total	Título GMT ²	Positivo /Total	Título GMT ²
1	16/17 (94%)	23,5	15/17 (88%)	47,1	17/17 (100%)	62,6	17/17 (100%)	94,2	17/17 (100%)	70,8
2	14/17 (82%)	18,4	17/17 (100%)	47,1	17/17 (100%)	53,2	16/16 (100%)	113,1	16/16 (100%)	118,1
3	15/17 (88%)	17,7	16/17 (94%)	24,5	16/17 (94%)	28,9	17/17 (100%)	38,4	16/17 (94%)	47,1
4	14/17 (82%)	23,5	16/17 (94%)	28,9	15/17 (88%)	23,5	13/17 (76%)	23,2	14/17 (82%)	28,9
5	16/17 (94%)	35,4	16/17 (94%)	32,6	15/17 (88%)	25,5	14/17 (82%)	21,4	13/17 (76%)	28,5
6	11/17 (65%)	11,0	11/17 (65%)	11,6	12/17 (71%)	9,5	10/17 (59%)	13,9	10/16 (63%)	10,9
7	N/A ³	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	17/17 (100%)	294,9	17/17 (100%)	461,9
8	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A

Positivo¹ = títulos de HI equivalentes ou maiores que 10 foram

considerados positivos.

Título GMT² = Título médio geométrico

N/A³ = não aplicável

Tabela 4. Grupos de tratamento para a segunda avaliação sorológica

Grupo #	Grupo de Tratamento	Promotores	Idade de vacinação	Dose de vacina (ufp ¹)	Via de vacina	# de frangos
1	rHVT/CMVH5Wis68	CMV(Ex ²)	Embriões de 18 dias de idade	980	In ovo	18
2	rHVT/CMVH5Wis68	CMV(Ex)	Um dia de idade	695	SQ ³	10
3	rHVT/BacH5Wis68	Bac(CE ⁴)	Um dia de idade	1155	SQ	10
4	Controles negativos	N/A ⁵	N/A	Nenhuma	N/A	10

ufp¹ = unidades formadoras de placas

Ex² = exemplo

SQ = subcutânea

CE⁴ = exemplo comparativo

N/A⁵ = não aplicável

Tabela 5. Títulos de HI para a segunda avaliação sorológica

Grupo #	2 semanas		3 semanas		4 semanas		5 semanas		6 semanas		7 semanas	
	Positivo ¹ Total	Título GMT ²	Positivo ¹ Total	Título GMT	Positivo/T otal	Título GMT	Positivo/T otal	Título GMT	Positivo/T otal	Título GMT	Positivo/T otal	Título GMT
1	12/18 (67%)	8,3	18/18 (100%)	66,0	18/18 (100%)	83,1	18/18 (100%)	148,1	18/18 (100%)	201,6	18/18 (100%)	179,6
2	9/10 (90%)	17,0	10/10 (100%)	105,6	10/10 (100%)	171,5	10/10 (100%)	91,9	10/10 (100%)	105,6	10/10 (100%)	80,0
3	7/10 (70%)	7,1	10/10 (100%)	45,9	10/10 (100%)	65,0	10/10 (100%)	211,1	10/10 (100%)	60,6	10/10 (100%)	49,2
4	0/10 (0%)	N/A ³	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A

Positivo¹ = títulos de HI equivalentes ou maiores que 10 foram considerados positivos

Título GMT² = Título médio geométrico

N/A³ = não aplicável

Tabela 6. Grupos de tratamento para o teste de eficiência contra o vírus influenza aviário altamente patogênico

Grupo #	Grupo de Tratamento	Promotores	Idade de vacinação	Dose de vacina (ufp ¹)	Via de vacina	# de frangos
1	rHVT/CMVH5Wis68	CMV(EX ²)	Um dia de idade	1075	SQ ³	20
2	rHVT/BacH5Wis68	Bac(CE ⁴)	Um dia de idade	1080	SQ	20
3	Controles de desafio	N/A ⁵	N/A	Nenhuma	N/A	20
4	Controles negativos	N/A	N/A	Nenhuma	N/A	5

ufp¹ = unidades formadoras de placas

Ex² = exemplo

SQ = subcutânea

CE⁴ = exemplo comparativo

N/A⁵ = não aplicável

Tabela 7. Proteção do HVT recombinante contra o vírus influenza aviário altamente patogênico

Grupo #	Grupo de Tratamento	# protegido/total	% de proteção
1	rHVT/CMVH5Wis68	19/20	95%
2	rHVT/BacH5Wis68	13/20	65%
3	Controles de desafio	0/10	0%
4	Controles negativos	5/5	100%

REIVINDICAÇÕES

1. Herpesvírus de peru recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um gene da hemaglutinina do vírus influenza aviário, sendo que o dito gene da hemaglutinina está sob o controle de um promotor inicial imediato de citomegalovírus, em que o promotor inicial imediato de citomegalovírus compreende SEQ ID NO: 3.

2. Herpesvírus de peru recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito gene da hemaglutinina e dito promotor estão presentes em uma região não-essencial do genoma de herpesvírus de peru.

3. Herpesvírus de peru recombinante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a dita região não-essencial fica entre UL45 e UL46 do genoma de herpesvírus de peru.

4. Herpesvírus de peru recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o dito vírus influenza aviário é do subtipo H5.

5. Herpesvírus de peru recombinante, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o dito vírus influenza aviário é da cepa A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9).

6. Herpesvírus de peru recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma sequência de nucleotídeos do dito gene da hemaglutinina é mostrada na SEQ ID NO: 1.

7. Vacina para aves, caracterizada pelo fato de que compreende um herpesvírus de peru recombinante, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Vacina para aves, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante e/ou um tampão.

Fig.1

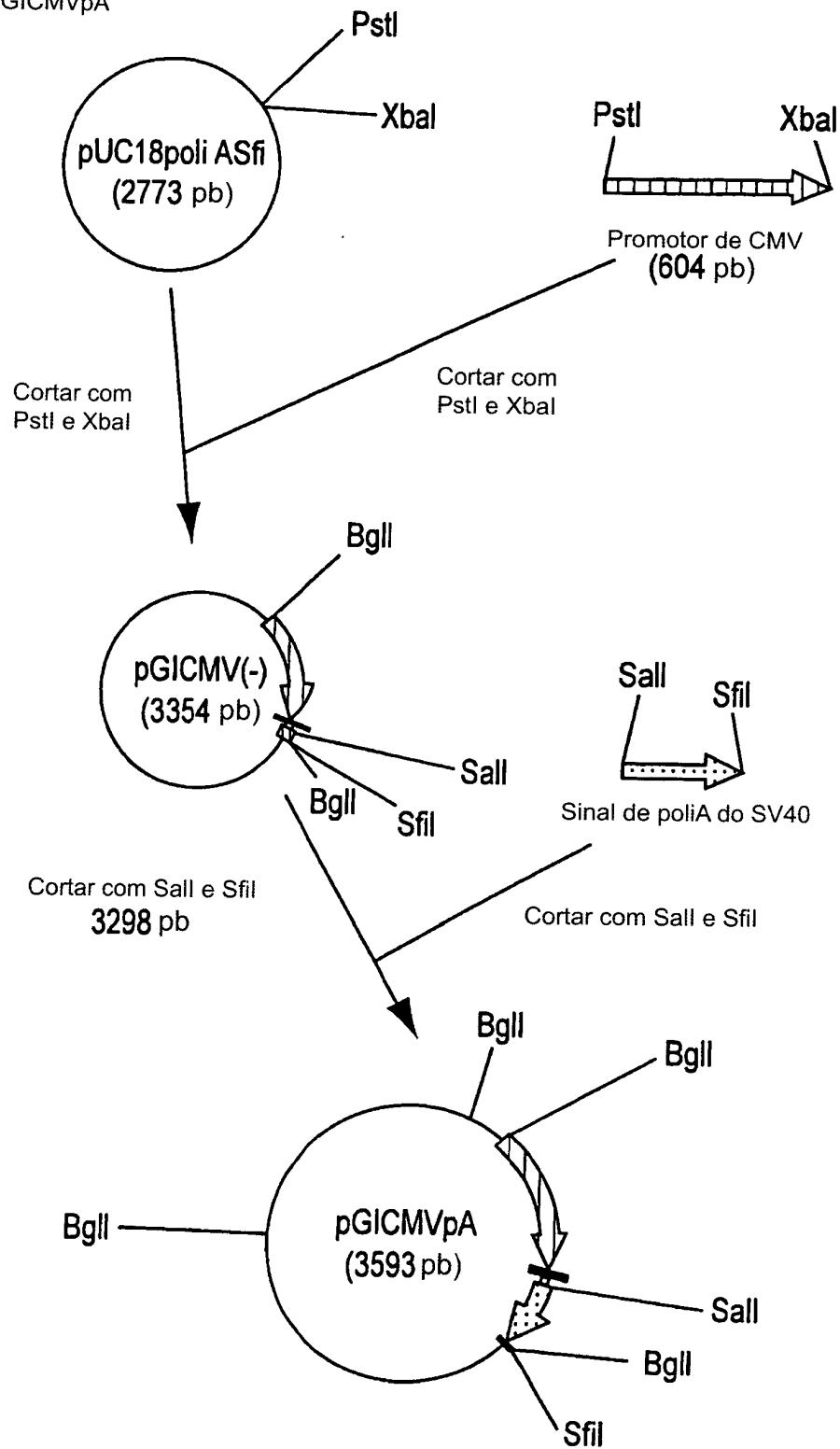
Construção do
plasmídeo pGICMVpA

Fig.2

Construção do plasmídeo p45CMVH5Wis68

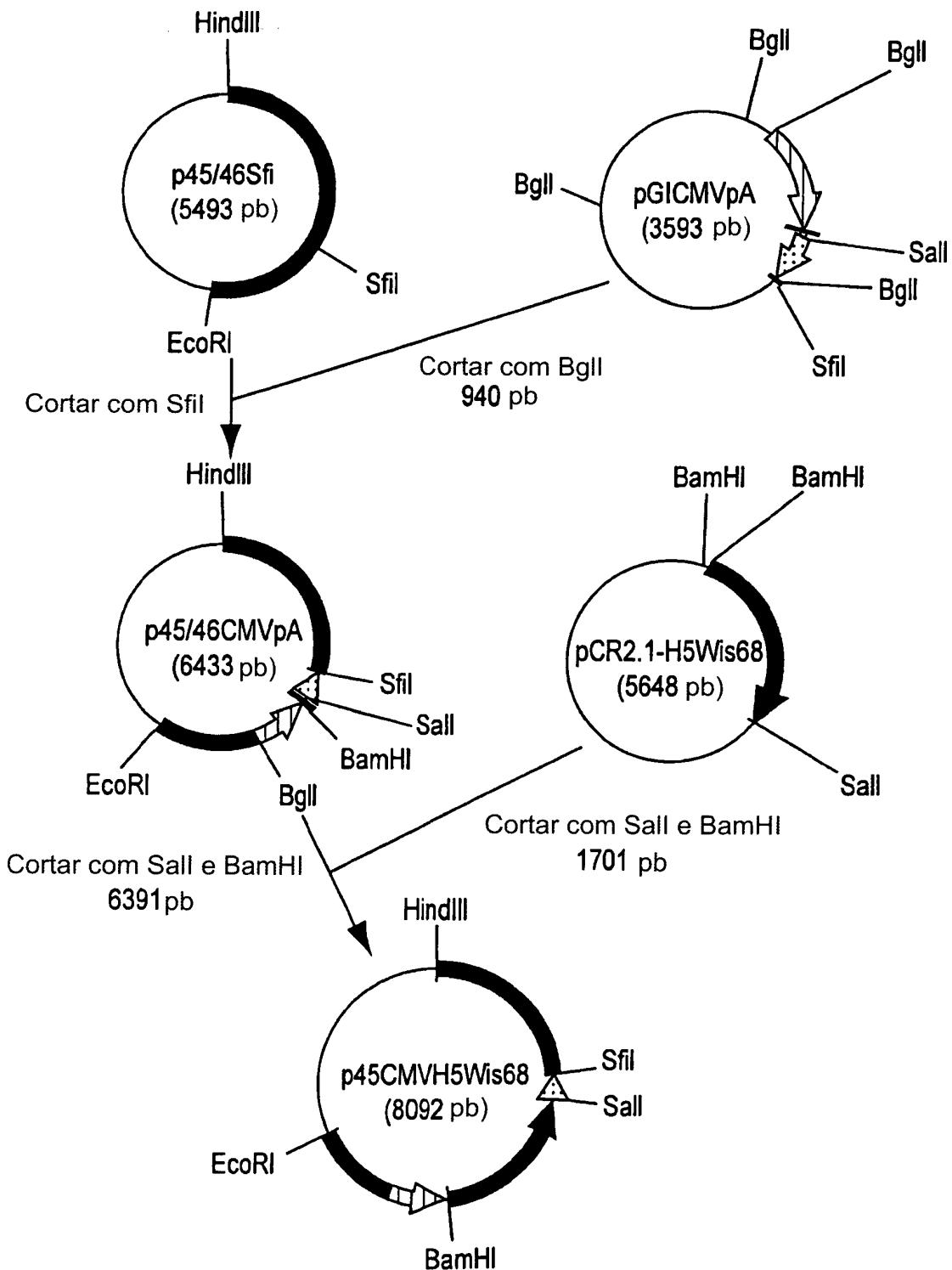


Fig.3

Construção do plasmídeo
pGIBacpA2nd

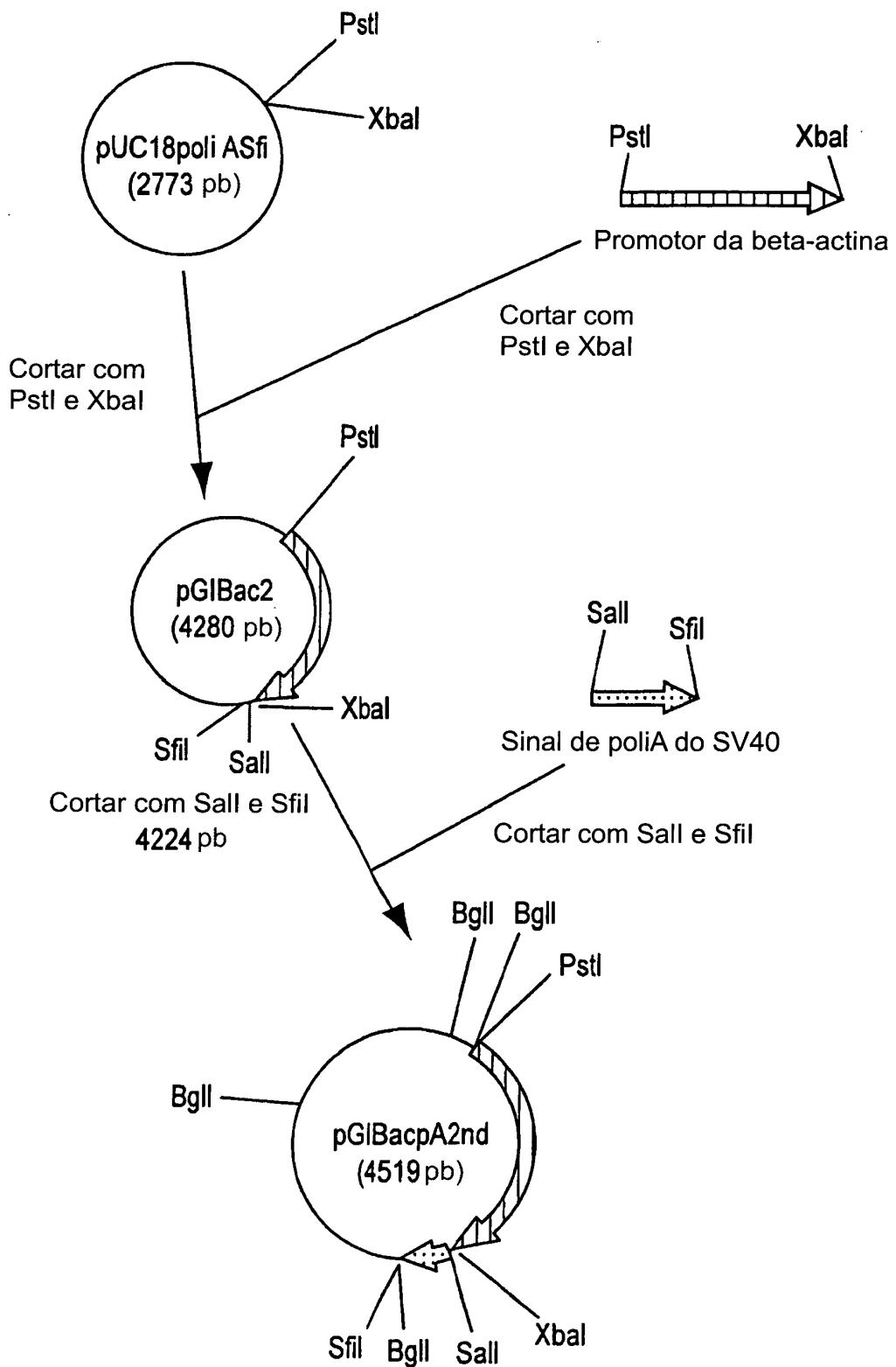


Fig.4

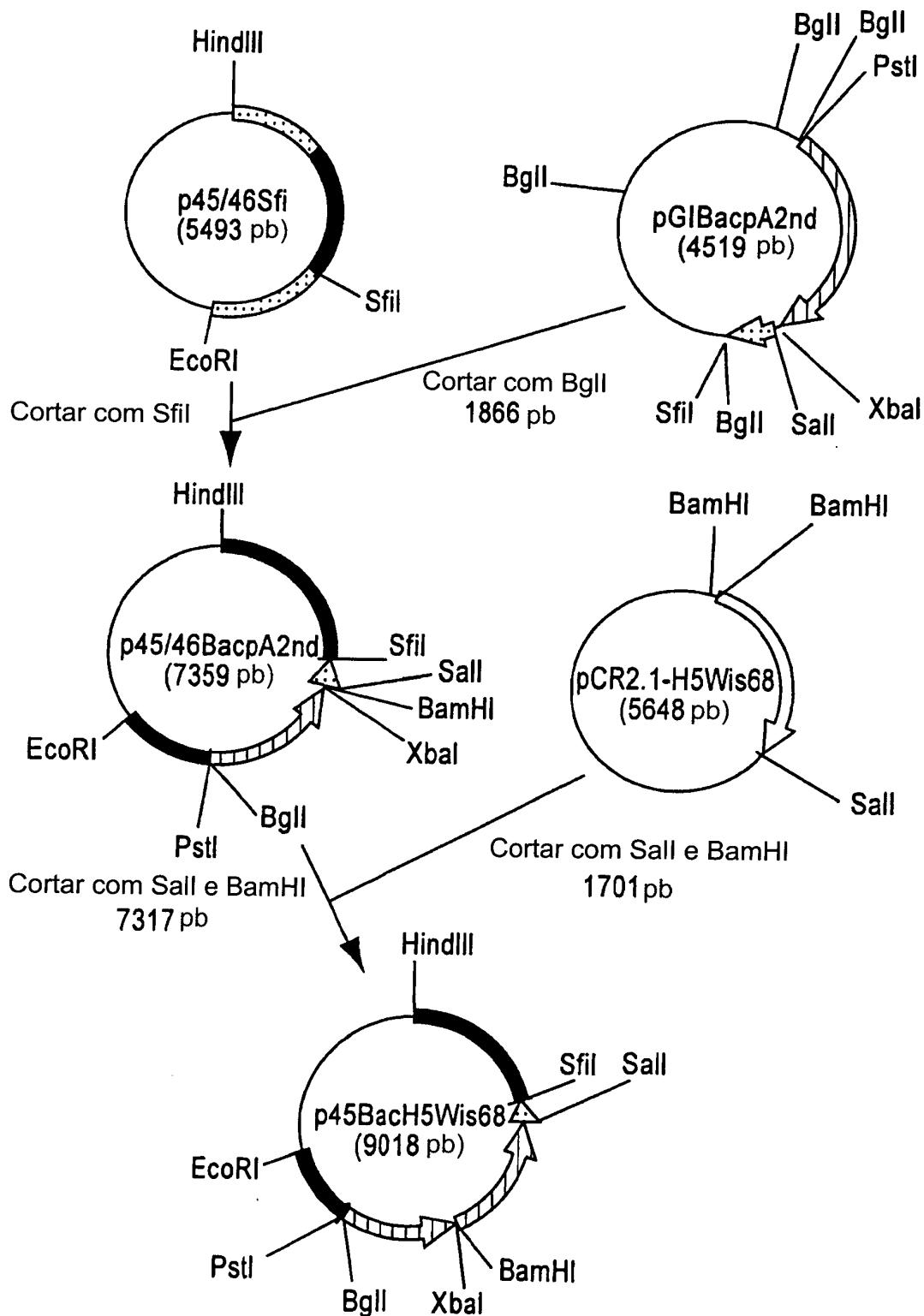
Construção do plasmídeo
p45BacH5Wis68

Fig.5

Construção do plasmídeo
p45PecH5Wis68

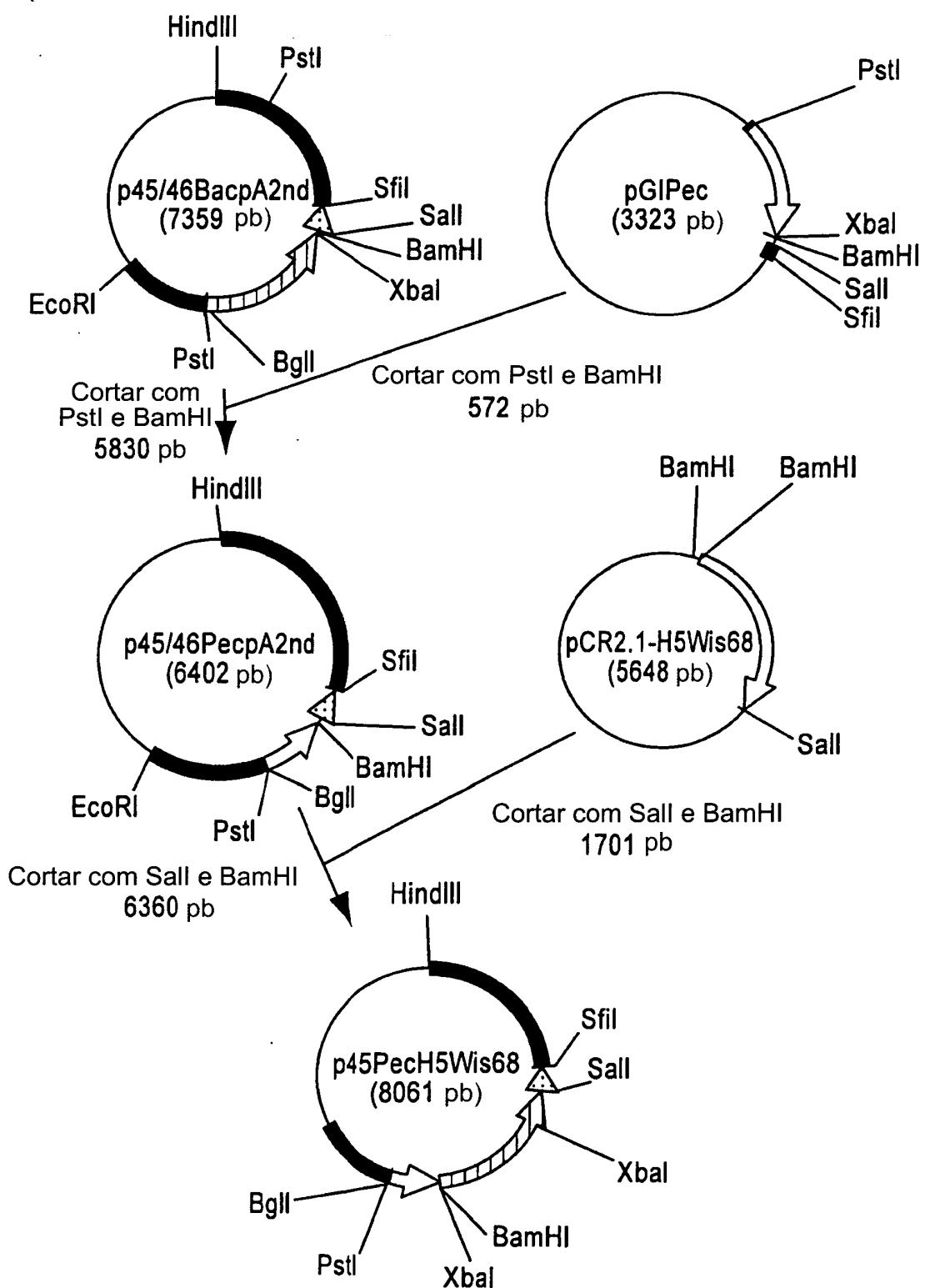


Fig.6

Ensaio de Western blot detectando a expressão da proteína hemaglutinina pelo herpesvírus recombinante de Peru. Faixa 1 = Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad Laboratories, Cat# 161-0373); Faixa 2 = controle de CEF; Faixa 3 = cepa original HVT FC126; Faixa 4 = HVT recombinante com o gene da hemaglutinina. Uma seta indica a proteína hemaglutinina com um peso molecular de 74 quilotons.

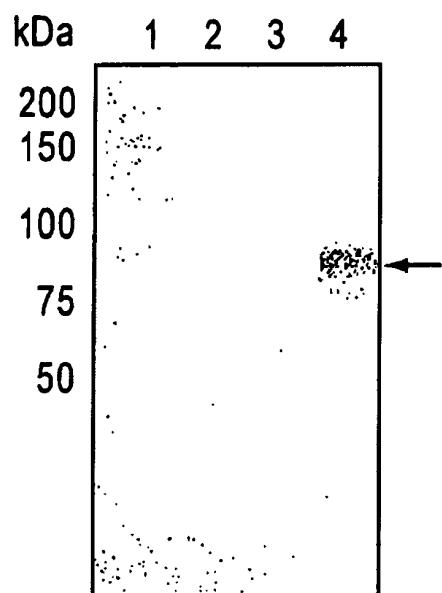
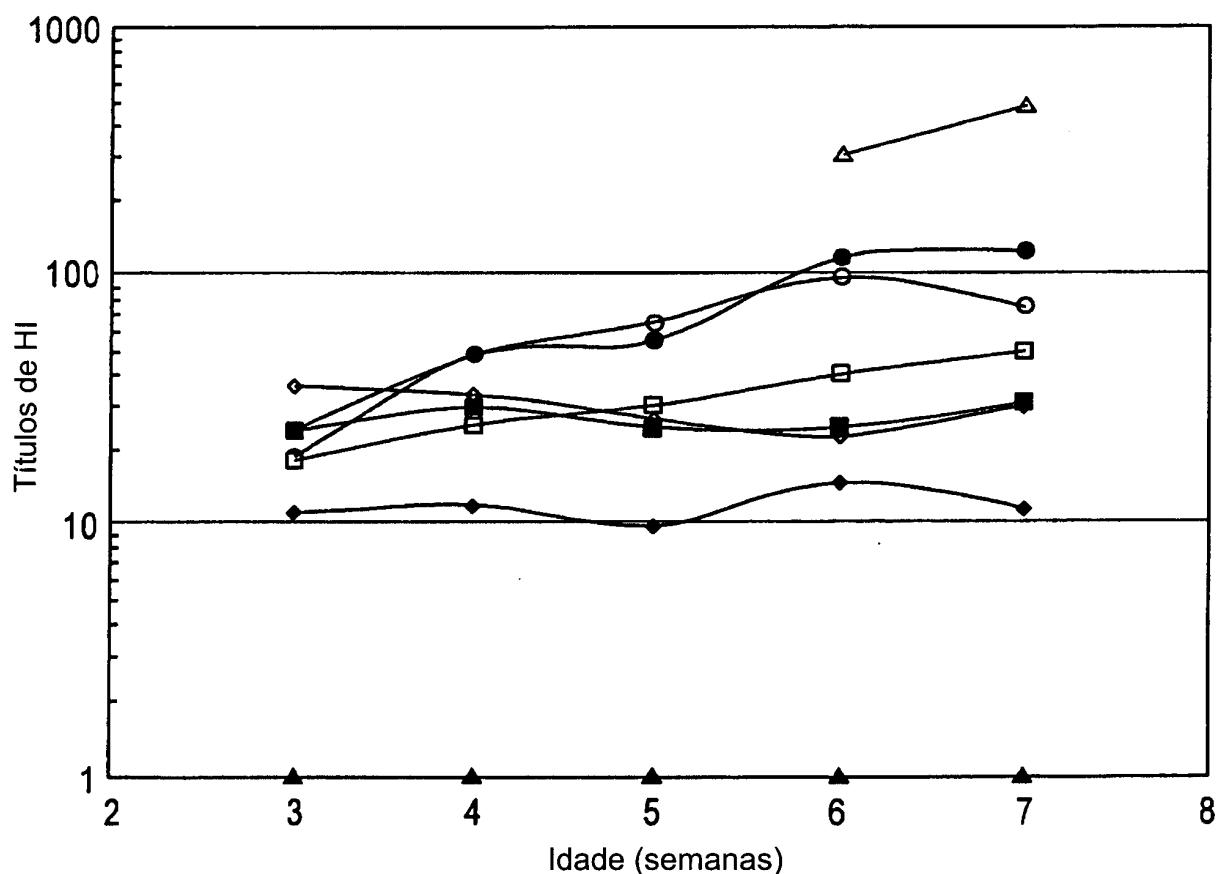


Fig.7

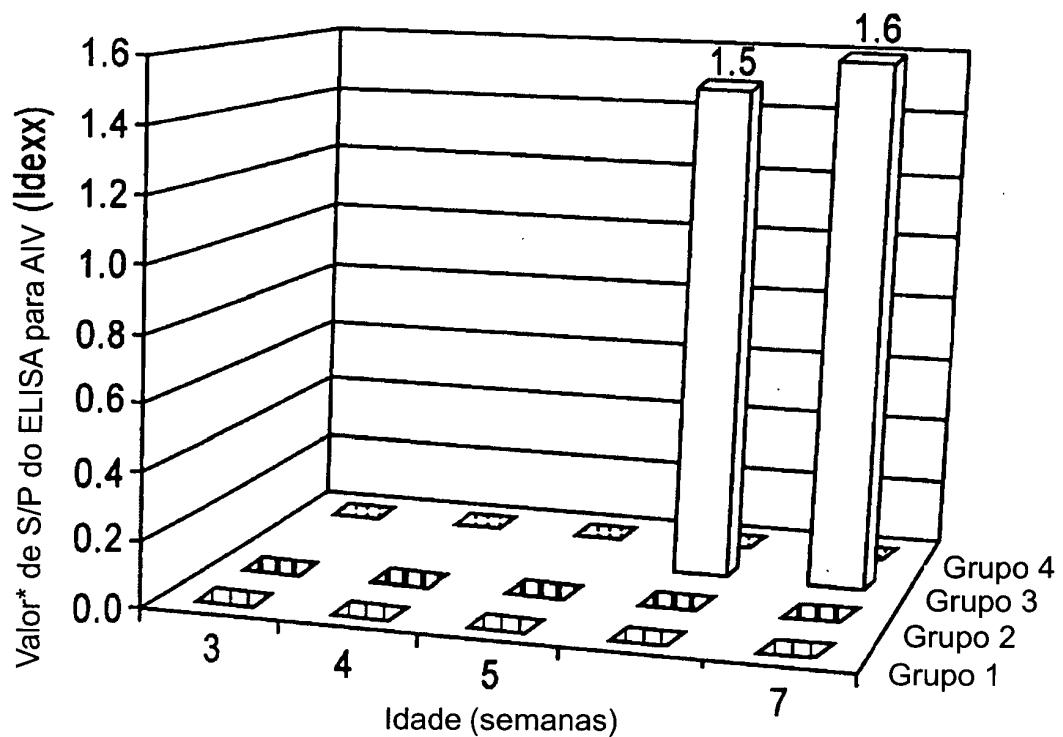
Títulos de inibição da hemaglutinação em frangos vacinados com o herpesvírus recombinante de peru com o gene da hemaglutinina



- Grupo 1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 ufp
- Grupo 2 rHVT/CMVH5Wis68 375 ufp
- Grupo 3 rHVT/Pech5Wis68 2800 ufp
- Grupo 4 rHVT/Pech5Wis68 550 ufp
- ◇— Grupo 5 rHVT/Bach5Wis68 4350 ufp
- ◆— Grupo 6 rHVT/Bach5Wis68 750 ufp
- △— Grupo 7 AI H5N9 vírus inativado (3 semanas de idade)
- ▲— Grupo 8 Controles não Vacinados

Fig.8

Títulos de ELISA em frangos vacinados com o herpesvírus recombinante de peru com o gene da hemaglutinina utilizando um kit de ELISA comercial (Idexx Laboratories, FlockCheck AIv)

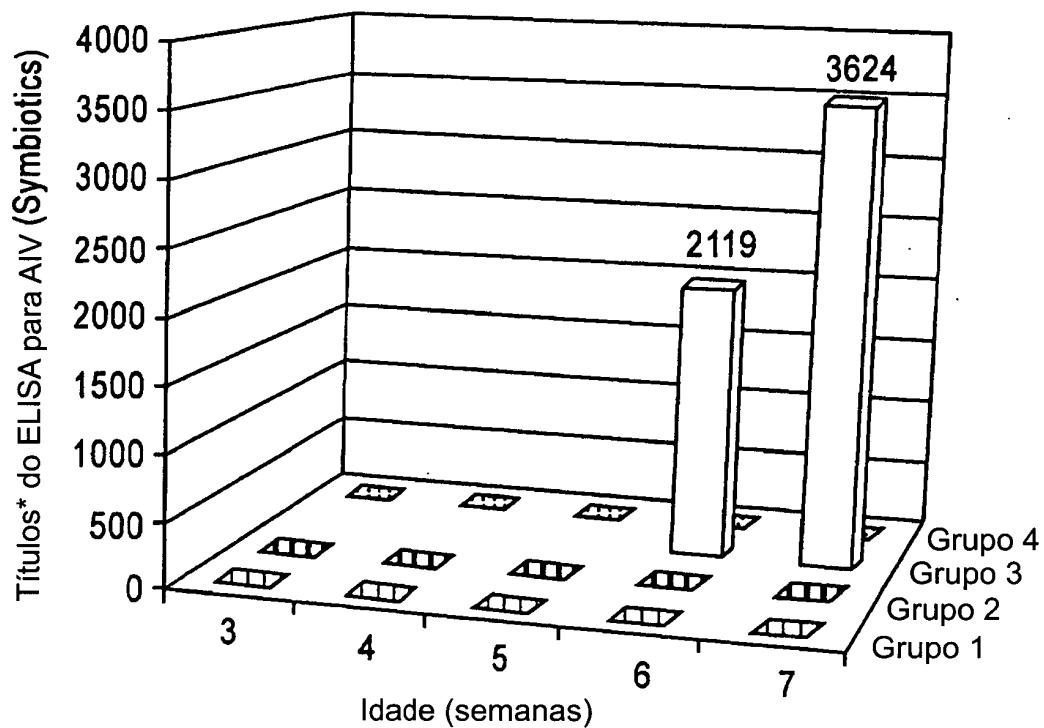


Valor* de S/P = Valores de S/P iguais ou maiores que 0,5 são considerados positivos.

- | | |
|---------|--|
| Grupo 1 | rHVT/CMVH5Wis68 1638 ufp |
| Grupo 2 | rHVT/CMVH5Wis68 375 ufp |
| Grupo 3 | AI H5N9 vírus inativado (3 semanas de idade) |
| Grupo 4 | Controles não Vacinados |

Fig.9

Títulos de ELISA em frangos vacinados com o herpesvírus recombinante de peru com o gene da hemaglutinina utilizando um kit de ELISA comercial
(Synbiotics, ProFLOK AIV Ab test kit)



Títulos* de ELISA = Títulos de ELISA iguais ou maiores que 570 são considerados positivos.

- Grupo 1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 ufp
- Grupo 2 rHVT/CMVH5Wis68 375 ufp
- Grupo 3 AI H5N9 vírus inativado (3 semanas de idade)
- Grupo 4 Controles não Vacinados

10/10

Fig.10

Títulos de inibição da hemaglutinação em frangos vacinados com o herpesvírus recombinante de peru com o gene da hemaglutinina (segundo teste)

