INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1383795 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/125 (2006.01) ***A61K 39/17*** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2001.10.30**

(30) Prioridade(s): **2000.11.02 EP 0020381**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.01.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.24**
004/2007

(73) Titular(es):
INTERVET INTERNATIONAL B.V.
35, WIM DE KORVERSTRAAT NL-5831 AN BOXMEER **NL**

(72) Inventor(es):
MARCUS JOSEPHUS MARIE KOOLEN **NL**
TESHOME MEBATSION **NL**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MUTANTE DA NUCLEOPROTEÍNA DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE RECOMBINANTE COMO VACINA MARCADORA**

(57) Resumo:

RESUMO

"Mutante da nucleoproteína do vírus da doença de Newcastle recombinante como vacina marcadora"

O presente invento proporciona um mutante de NDV que é adequado como estirpe de vacina marcadora. O mutante de NDV não é capaz de expressar um epítopo imunodominante da nucleoproteína (NP).

DESCRIÇÃO

"Mutante da nucleoproteína do vírus da doença de Newcastle recombinante como vacina marcadora"

O vírus da doença de Newcastle (NDV) é responsável por uma das doenças mais devastantes das aves de criação uma vez que tem uma substancial impacto económico na indústria aviária. A vacinação de galinhas, particularmente das criadas para consumo comercial, é realizada em todo o mundo. Embora estejam actualmente disponíveis vacinas contra a ND vivas ou inactivadas eficazes, o vírus permanece uma ameaça permanente para os bandos comerciais.

O genoma do vírus de ARN de cadeia negativa, do vírus de ND, que tem cerca de 15 kb de comprimento, contém seis genes codificando seis proteínas estruturais principais: a nucleoproteína (NP), a fosfoproteína (P), a proteína da matriz (M), a proteína de fusão (F), a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a ARN-polimerase dependente de ARN (L). O ARN juntamente com as proteínas NP, P e L forma o complexo de ribonucleoproteína (RNP) que serve como molde para a síntese de ARN. Uma característica comum de todos os vírus de cadeia negativa (NSV) é a presença da sua informação genética exclusivamente numa forma de uma RNP. A RNP, mas não o ARN nu, serve como molde para a transcrição e a replicação.

A NP juntamente com as proteínas polimerase, P e L, tem um papel eminente na encapsidação e protecção do ARN contra a degradação enzimática. Para além disso, a NP regula a transcrição e a replicação do genoma viral através da interacção com P sozinha, com P e L (ARN-polimerase) ou consigo própria (interacção NP-NP). Para o paramixovírus Sendai, foi mostrado que uma região N-terminal conservada de NP estava envolvida na interacção NP-ARN e NP-NP (Buchholz *et al.*, *J. Virol.* 67: 5803-5812, 1993), enquanto que se mostrou que o domínio carboxi-terminal era necessário para a função de molde (Curran *et al.*, *J. Virol.* 67: 4358-64). A maioria das partes da NP são assim absolutamente essenciais para a replicação viral devido ao envolvimento múltiplo da NP na montagem e na actividade biológica da RNP.

Em muitos países, já existe legislação para controlar surtos de NDV. Nalguns países, são praticadas políticas de erradicação com eliminação obrigatória de aves infectadas. Para a continuação do sucesso do comércio internacional de aves de criação, é desejável a introdução de medidas sistemáticas de controlo da ND. No entanto, todas as vacinas contra a ND vivas e inactivadas baseadas em vírus inteiros actualmente utilizadas têm uma grande desvantagem, na medida em que os animais vacinados não podem ser distinguidos dos animais infectados com testes serológicos padrão como inibição da hemaglutinação (HI) ou neutralização do vírus (VN). Portanto, existe a necessidade de material imunogénico de NDV compreendendo uma proteína de NDV sem pelo menos um epítopo imunodominante. Um epítopo é uma pequena região estrutural num antigénio que interage com um anticorpo. Um epítopo pode consistir em apenas três aminoácidos de um polipéptido, mas compreende normalmente 5-10 ou, nalguns casos, mais aminoácidos.

Recentemente, as vacinas designadas “vacinas marcadoras” estão a ganhar popularidade na medicina veterinária onde a erradicação de doenças específicas é de interesse nacional ou internacional. Uma vacina marcadora é definida como uma vacina, em conjunto com um teste de diagnóstico, que permite a diferenciação serológica de animais vacinados dos animais infectados.

Abordagens ao desenvolvimento de vacinas marcadoras incluem a deleção de um ou mais genes não essenciais mas imunogénicos. Esta abordagem é principalmente aplicável a vírus de ADN contendo vários genes dispensáveis (p.ex. herpesvírus). Para os vírus de ARN, a maioria dos genes são essenciais ou os não essenciais não são imunogénicos. O NDV, um vírus de ARN de cadeia negativa, contém seis genes estruturais principais, que são todos essenciais para a propagação do vírus. Esperar-se-ia que a deleção de um ou mais genes causasse a perda de actividades biológicas. De facto, embora tais programas de controlo para outras doenças infecciosas virais em animais estejam em desenvolvimento, até ao presente invento não tinha sido ainda descrita uma vacina baseada numa estirpe de vacina de NDV que se encaixasse em programas de controlo da ND.

Uma abordagem alternativa para o desenvolvimento de uma vacina marcadora é a utilização de “vacinas de subunidades”. Esta abordagem foi implementada para NDV através da identificação de duas glicoproteínas, a proteína de fusão (F) e a hemaglutinina-neuraminidase (HN), envolvidas na indução de imunidade protectora. Vectores recombinantes, tais como o herpesvírus dos perus (HVT) e o poxvírus das aves (FPV) expressando F e/ou HN de NDV foram construídos com sucesso e a sua segurança e eficácia foram extensamente estudadas.

As nucleoproteínas (NP) dos vírus de ARN de cadeia negativa (NSV) são altamente imunogénicas por natureza e têm sido utilizadas como antigénios em ELISA de diagnóstico. Estes incluem os vírus da raiva, do sarampo, da peste bovina, da estomatite vesicular e NDV. Estes testes foram principalmente utilizados para monitorizar programas de vacinação. Em conjunto com uma vacina de subunidade de HN de NDV, foi também descrito um imunoensaio baseado em NP como teste de diagnóstico na diferenciação entre animais vacinados e infectados (Makkay *et al.*, *Vet. Microbiol.* 66: 209-222, 1999). No entanto, não existem imunoensaios de NP em conjunto com uma vacina marcadora baseada em NSV inteiro, em particular uma vacina de NDV, principalmente devido ao facto de se esperar que a modificação genética do gene de NP extremamente vital tenha consequências prejudiciais na replicação e infecciosidade do vírus.

Uma desvantagem das vacinas de subunidades de NDV é, no entanto, que a eficácia dos vírus recombinantes expressando a proteína F ou HN de NDV é significativamente reduzida na presença de anticorpos derivados maternalmente (MDA) em galinhas comerciais. Em contraste, as vacinas de ND convencionais baseadas na preparação de vírus inteiros conferem protecção completa mesmo na presença de MDA.

Outra desvantagem geral de vários dos vectores recombinantes é o aparecimento atrasado de imunidade protectora. As vacinas de ND vivas convencionais dão geralmente protecção completa 6-7 dias após a vacinação enquanto que se mostrou que o aparecimento de imunidade induzida por uma vacina baseada num HVT recombinante

expressando a proteína F de NDV ocorre entre 14 e 21 dias após a vacinação (Morgan *et al.*, *Avian Dis.* 37: 1032-1040, 1993).

Tendo em vista estas desvantagens das vacinas de subunidades de ND existe a necessidade de uma vacina marcadora de ND baseada em vírus inteiro que mantenha as suas proteínas F e HN na sua forma nativa e que possa ser serologicamente discriminada dos vírus de tipo selvagem bem como dos vírus de vacinas tradicionais.

O pedido internacional WO 99/66045 divulga uma vacina marcadora de NDV baseada num mutante de NDV geneticamente modificado sem um epítopo imunodominante numa proteína de NDV. No entanto, este vírus de vacina contém uma proteína HN híbrida composta por apenas uma quarta parte da proteína HN de NDV enquanto que a restante parte da proteína HN é derivada de um paramixovírus das aves não aparentado de tipo 2 ou 4. É conceptível que a remoção da maioria da região HN de NDV reduziria o papel da HN na indução de um anticorpo protector contra NDV.

As vacinas contra NDV vivas actualmente disponíveis podem apenas ser administradas a frangos pós-eclosão através da água de beber, aerossóis, gotas nos olhos ou através de vias parentéricas. Estes métodos de aplicação têm algumas desvantagens. Principalmente, estes métodos são dispendiosos devido ao trabalho necessário para a sua aplicação. Recentemente, a utilização de vacinas como vacinas de embriões provou ser eficaz e económica (Sharma e Burmester, *Avian Diseases* 26: 134-149, 1982 e Sharma, *Avian Diseases* 29: 1155-1169, 1985). Para além disso, verificou-se que a vacinação de embriões era vantajosa devido à idade inicial de resistência à doença específica e à administração de uma dose uniforme de vacina em cada ovo utilizando máquinas semi-automáticas com múltiplas cabeças de injecção.

Deve notar-se que muitas vacinas utilizadas convencionalmente para vacinação pós-eclosão de aves não podem ser utilizadas para vacinação *in ovo*. Os embriões de estádio tardio são altamente susceptíveis a infecção com a maioria dos vírus de vacina examinados, incluindo os vírus de vacina que podem ser utilizados de forma segura em frangos eclodidos com

um dia de idade. Consequentemente, as vacinas convencionais não podem ser utilizadas para administração *in ovo*.

Actualmente, não existem vacinas contra ND adequadas comercialmente disponíveis que possam ser aplicadas *in ovo*, principalmente devido ao elevado nível de mortalidade de embriões associada mesmo com duas das estirpes de vacina de NDV comercialmente disponíveis mais suaves: NDW (Patente U.S. N.º 5149530) e C2 (Patente U.S. N.º 5750111).

A Patente U.S. N.º 5427791 (Regents of the University of Minnesota) divulga a utilização de agentes mutagénicos químicos para produzir mutantes de NDV da estirpe Hitchner B1 que não são patogénicos para embriões de estádio tardio. O tratamento químico da estirpe B1 com etilmetaninossulfonato (EMS) resultou no vírus mutante NDV-B1-EMS, que podia ser administrado de forma segura a ovos de galinha ao 18º dia do desenvolvimento embrionário. No entanto, desvantajosamente, cada passo de passagem desta estirpe pelos ovos tem de ser realizado na presença do agente mutagénico EMS devido à propriedade do mutante reverter para a estirpe B1 progenitora que não é segura para os embriões.

É um objecto deste invento proporcionar um mutante de NDV que possa ser utilizado como componente activo numa vacina marcadora de ND baseada em vírus inteiro para permitir a distinção serológica entre animais infectados com NDV de tipo selvagem ou vacinados com estirpes de vacina de NDV convencionais, dos animais imunizados com uma vacina baseada neste mutante de NDV.

É ainda outro objectivo do presente invento proporcionar um mutante de NDV que possa ser utilizado como componente activo numa vacina que possa ser administrada não apenas a aves jovens após a eclosão, mas que possa também ser administrada com segurança *in ovo*.

O presente invento aqui descrito vai ao encontro destes objectos proporcionando um mutante de NDV geneticamente modificado que seja distinto das estirpes (de vacina) de NDV conhecidas devido à remoção de um novo epítopo imunodominante da NP, que é serologicamente muito relevante na infecção por

NDV, mas cuja deleção não afecta adversamente as propriedades protectoras do novo mutante de NDV.

O presente invento proporciona um mutante de NDV sem um epítopo imunodominante numa proteína do NDV em resultado de uma mutação num gene codificando a proteína, caracterizado por o mutante de NDV não possuir um epítopo situado dentro de uma região da nucleoproteína (NP), possuindo a região a sequência de aminoácidos (447-455) mostrada em SEQ ID NO: 1.

Verificou-se que a sequência de aminoácidos (447-455) Phe Leu Asp Leu Met Arg Ala Val Ala da NP, codificada pelos nucleótidos 1460-1486 do genoma do NDV, compreende um epítopo imunodominante da NP de NDV. O mesmo será dizer que os anti-soros obtidos a partir de virtualmente todas as galinhas infectadas com NDV interagem com um epítopo situado nesta região. Os anti-soros interagem com os aminoácidos mencionados acima, mas não interagem substancialmente com os aminoácidos que flanqueiam esta região.

Para além disso, é demonstrado na Figura 2 que o anti-soro de galinha induzido por estirpes de NDV convencionais tanto vivas como inactivadas, reage com o péptido 18-mero de NP que se estende pelos aminoácidos (443-460) Gly Glu Thr Gln Phe Leu Asp Leu Met Arg Ala Val Ala Asn Ser Met Arg Glu (SEQ ID NO: 2) compreendendo a região (447-455). Uma comparação das sequências de aminoácidos englobando esta região revela 100% de identidade de aminoácidos entre a estirpe velogénica Texas GB, a estirpe mesogénica Beaudette C e a estirpe lentogénica Clone-30. Portanto, um dos critérios importantes para o desenvolvimento de uma vacina marcadora, *i.e.* a identificação de um epítopo expresso por uma proteína das estirpes de NDV convencionais que seja reconhecido pelo sistema imunitário da galinha, é cumprido.

A numeração entre parêntesis, tal como aqui utilizada para identificar posições nucleotídicas no genoma de NDV e resíduos de aminoácidos nas proteínas de NDV, é tal como descrita por Römer-Oberdörfer *et al.*, *J. Gen. Virol.* 80: 2987-2995, 1999, n.º de acesso EMBL Y18898).

Inesperadamente, verificou-se ainda que apesar do facto da NP ser uma proteína essencial para a replicação de NDV, os aminoácidos (447-455) não são necessários para a replicação do vírus. Um mutante de NDV recombinante infeccioso que não expressa um epítopo de NP situado dentro desta região foi recuperado com sucesso a partir de células após a transfecção destas células com os plasmídeos apropriados utilizando a tecnologia de "genética inversa" e pode ser propagado eficientemente em ovos de galinha.

Um mutante de NP de NDV de acordo com o presente invento foi gerado através da introdução de uma mutação no gene da NP de modo a perder a capacidade do epítopo imunodominante para induzir anticorpos em galinhas que são reactivos com um epítopo situado dentro do péptido 18-mero possuindo a sequência de aminoácidos (443-460). Os Exemplos 2 e 3 demonstram que (i) o mutante de NP de NDV de acordo com o presente invento é capaz de induzir anticorpos HI e soros policlonais de galinha anti-NDV que reagem com o antigénio do vírus inteiro, mas que (ii) estes anti-soros não mostram reactividade com um epítopo situado dentro do péptido 18-mero.

A observação de que os soros de galinha anti-NDV criados contra o mutante de NP de NDV de acordo com o presente invento podem ser distinguidos dos soros de galinha criados contra as estirpes de NDV de ocorrência natural e das estirpes de vacina de NDV convencionais através de exame da interacção dos anti-soros com um epítopo situado dentro da região (447-455) torna este mutante de NP de NDV um candidato adequado para uma vacina marcadora. Em particular, o presente invento inclui também um mutante de NP de NDV sem um epítopo imunodominante situado dentro da região (447-455) que induz anti-soro em galinhas que pode ser distinguido do anti-soro induzido por estirpes de NDV convencionais através de exame da interacção do anti-soro do mutante com um péptido compreendendo a região (447-455) na presença de um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um epítopo imunodominante situado nesta região. No último caso, o exame é habitualmente um ensaio imunológico de competição ou de bloqueio.

Portanto, um determinado mutante de NP de NDV de acordo com o presente invento é caracterizado por o mutante induzir

anti-soro em galinhas sem anticorpos que reajam com um epítopo imunodominante situado dentro da região de aminoácidos (447-455) da NP.

Numa concretização mais preferida é proporcionado um mutante de NP de NDV que induz anti-soro em galinhas que não têm anticorpos que reajam com um péptido 18-mero possuindo a sequência de aminoácidos (443-460) de NP mostrada em SEQ ID NO: 2.

Pela expressão "induz anti-soro em galinhas que não têm anticorpos que reajam com" entenda-se que uma amostra de soro obtida a partir de uma galinha infectada/vacina é classificada como negativa num imunoensaio imunossorvente enzimático (ELISA) directo ou de bloqueio de NP.

Tipicamente, o valor limite de exclusão da absorvância (DO) para o ELISA de NP diferenciar amostras positivas de negativas é estabelecido em três desvios padrão acima das razões médias P/N das amostras de controlo negativo de galinhas SPF (onde P = DO das amostras de poços revestidos com um péptido relevante ligado a uma molécula transportadora e; N = DO das amostras de poços revestidos com a molécula transportadora). Uma molécula transportadora pode ser uma proteína transportadora, tal como BSA, ovalbumina, KLH, uma cadeia de hidratos de carbono ou uma cadeia de aminoácidos sintética.

O gene de NP situa-se no genoma de NDV nas posições nucleotídicas 56 a 1801 (estirpe de NDV Clone 30®). A NP de NDV tem 489 aminoácidos de comprimento e é altamente conservada dentro das estirpes lentogénicas, mesogénicas e velogénicas. A sequência nucleotídica e a sequência de aminoácidos do gene de NP desta estirpe de NDV são mostradas em SEQ ID NO:3 e 4. Uma comparação das sequências de aminoácidos deduzidas da NP do clone-30 com as sequências correspondentes das estirpes Texas GB velogénica e Beaudette C mesogénica de NDV revela uma identidade de 100% e 99,3%. No caso de uma região polipeptídica ser aqui definida com referência a uma sequência de aminoácidos específica derivada da estirpe de NDV específica Clone 30, esta região é

considerada como englobando a região correspondente com uma sequência de aminoácidos desviante de outra estirpe de NDV.

Uma mutação entende-se ser uma alteração da informação genética num gene de NP de “tipo selvagem” ou não modificado de uma estirpe de NDV progenitora que seja capaz de expressar uma NP nativa de modo a que a NP expressa pelo mutante de NDV não possua um epítopo imunodominante situado dentro da região (447-455) da NP.

Outro requisito da mutação introduzida no gene da NP é de que a NP alterada permita a recuperação de NDV infeccioso a partir da cultura celular após transfecção destas células com os plasmídeos apropriados utilizando a tecnologia de “genética inversa” para NDV. Os Exemplos 1 e 2 descrevem experiências que são adequadas para a determinação da capacidade da NP alterada para induzir anticorpos contra NDV e a permissividade da mutação para gerar vírus infecciosos recuperáveis a partir da cultura celular transfectada com os plasmídeos apropriados.

A mutação é, por exemplo, uma substituição, deleção, inserção do ácido nucleico ou uma combinação destas.

Numa concretização preferida do presente invento o mutante de NP de NDV compreende uma deleção ou substituição de um ou mais aminoácidos numa região da NP possuindo a sequência de aminoácidos (447-455) mostrada em SEQ ID NO: 1.

Verificou-se aqui que nem todas as deleções na região do gene da NP compreendendo as sequências de codificação de um epítopo imunodominante são permissíveis. Uma deleção dos nucleótidos correspondentes aos aminoácidos 443-460 da NP (mutante NDV-Δ18) conduziu à recuperação de um mutante de NDV infeccioso a partir da cultura celular após transfecção com os plasmídeos apropriados, enquanto que a deleção dos nucleótidos correspondentes aos aminoácidos 444-455 (mutante NDV-Δ12) ou 442-489 (mutante NDV-Δ48) de NP não.

A análise da estrutura secundária da proteína (análise de Garnier-Osguthorpe-Robson) mostrou que as posições de aminoácidos 444-459 da NP formam uma hélice alfa. Verificou-se que a remoção da hélice completa e dos nucleótidos

flanqueadores (Δ443-460) não impediu a criação de NDV recombinante infeccioso viável, enquanto que a remoção da estrutura parcial da hélice ou de partes adicionais da proteína NP não conduziu à recuperação da NDV infecciosa a partir da cultura celular.

Portanto, um mutante de NDV preferido de acordo com o presente invento compreende uma deleção dos aminoácidos 443±1-460±1.

Num aspecto preferido particular desta concretização do presente invento é proporcionado um mutante de NP de NDV que compreende uma deleção dos aminoácidos 443-460.

Um mutante de NDV particularmente vantajoso de acordo com o presente invento é um mutante de NDV tal como descrito acima que compreende mutações atenuantes adicionais. Tais mutantes de NDV podem ser derivados de qualquer estirpe de vacina de ND convencional. Exemplos de tais estirpes de vacina de NDV adequadas presentes em vacinas de ND comercialmente disponíveis são: Clone-30®, La Sota, Hitchner B1, NDW, C2 e Av4, sendo Clone-30® a estirpe de vacina preferida.

Noutro aspecto desta concretização o presente invento proporciona um vírus vector recombinante baseado no mutante de NDV descrito acima. Um tal vírus vector recombinante pode ser utilizado não só para a preparação de uma vacina contra NDV, como também contra outras doenças infecciosas das aves de criação. Alternativamente, um tal vírus vector recombinante pode também proporcionar uma segurança extra num teste de diagnóstico e torna os vírus recombinantes duplos candidatos a marcadores atractivos.

Um vector NDV pode ser obtido através da substituição em fase (completa ou parcial) da região codificando o epítopo imunodominante da NP definido acima através de uma sequência heteróloga de ácido nucleico codificando um epítopo imunodominante de um polipéptido diferente da NP, p.ex. um polipéptido de outro patogénio das aves. O epítopo imunodominante representa uma região de um polipéptido que interage com virtualmente todos os anti-soros induzidos por (uma composição compreendendo) o polipéptido.

Num vector NDV preferido de acordo com o presente invento os nucleótidos codificando a sequência de aminoácidos de NP 444-459 ou 444-455 são substituídos por uma sequência nucleotídica heteróloga, em particular por uma sequência nucleotídica heteróloga codificando 16 ou 12 aminoácidos, respectivamente.

No Exemplo 5 é demonstrado que pode ser utilizado um epítopo de células B de um vírus não aparentado com NDV em vez do epítopo imunodominante da NP de NDV. Os vectores NDV recombinantes foram capazes de induzir anticorpos específicos contra o epítopo estranho sem induzir anticorpos dirigidos contra o epítopo imunodominante na NP. Para além disso, é demonstrado que o epítopo estranho expresso é capaz de induzir protecção contra a provocação com o vírus de tipo selvagem correspondente.

Um vector NDV pode também ser obtido através da inserção de uma sequência de ácido nucleico heteróloga codificando um polipéptido de outro patogénio das aves numa região não traduzida do mutante de NDV. As regiões não traduzidas adequadas para este fim estão situadas entre o promotor genómico e o início do gene da NP, e nas junções dos genes NP/P, P/M, M/F, F/HN e HN/L bem como entre a extremidade do gene L e o promotor anti-genómico. A sequência de ácido nucleico heteróloga pode codificar um antigénio de um patogénio das aves tal como o vírus da bursite infecciosa, vírus da bronquite infecciosa, vírus da doença de Marek, vírus da encefalomielite das aves, reovírus das aves, vírus *influenza* das aves, vírus da anemia das galinhas, *Salmonella* sps., *E. coli* e *Eimeria* sps.

Um mutante de NP de NDV de acordo com o presente invento pode ser preparado por meio do método bem estabelecido de "genética inversa" que permite a modificação genética de vírus de ARN de cadeia negativa não segmentados (revisto por Conzelmann, *Annu. Rev. Genet.* 32: 123-162, 1998, e Roberts e Rose, *Virology* 247: 1-6, 1998).

Adicionalmente, um tal método foi também divulgado para NDV por Peeters *et al.*, (*J. Virology* 73: 5001-5009, 1999) e

Römer-Oberdörfer *et al.* (*J. Gen. Virol.* 80: 2987-2995, 1999) e é descrito no Exemplo 1.

As mutações desejadas podem ser introduzidas no genoma de NDV por meio de métodos geralmente conhecidos na arte para este fim. Em particular, as mutações são introduzidas por meio de mutagénese dirigida ao local. Um tal método é aqui descrito, mas é também geralmente utilizado na arte (Peeters *et al.*, 1999, *supra*; *Current Protocols in Molecular Biology*, eds.: F.M. Ausubel *et al.*, Wiley, N.Y., edição de 1995, páginas 8.5.1.-8.5.9 e Kunkel *et al.*, *Methods in Enzymology* Vol. 154: 376-382, 1987).

Para além da inesperada verificação de que um mutante de NP de NDV de acordo com o presente invento é capaz de induzir uma resposta de anticorpos em galinhas que pode ser distinguida da induzida pelas estirpes de NDV de ocorrência natural, verificou-se também que o mutante de NP de NDV descrito acima é capaz de induzir uma resposta imunitária protectora.

Portanto, noutra concretização deste invento é proporcionada uma vacina contra a doença de Newcastle em aves de criação que compreende um mutante de NP de NDV tal como definido acima numa forma viva ou inactivada, e um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável.

Uma vacina de acordo com o presente invento pode ser preparada através de métodos convencionais tais como os vulgarmente utilizados para as vacinas contra NDV vivas e inactivadas comercialmente disponíveis.

Resumidamente, um substrato susceptível é inoculado com o mutante de NP de NDV e propagado até o vírus se ter replicado até um título desejado após o que o material contendo NDV é colhido. Subsequentemente, o material colhido é formulado numa preparação farmacêutica com propriedades imunizantes.

Todos os substratos que sejam capazes de suportar a replicação de vírus da ND podem ser utilizados no presente invento, incluindo culturas de células primárias (de aves), tais como fibroblastos de embrião de galinha (CEF) ou células

de rim de galinha (CK), ou linhas celulares de mamífero tais como a linha celular VERO ou a linha celular de rim de *hamster* bebé (BHK).

Um substrato particularmente adequado no qual o mutante de NP de NDV pode ser propagado são ovos embrionados de SPF. Os ovos embrionados podem ser inoculados com, por exemplo, 0,2 ml de fluído alantóico contendo NDV compreendendo pelo menos a $10^{2,0}$ DIE_{50} por ovo. De preferência, os ovos embrionados com 9 a 11 dias de idade são inoculados com cerca de $10^{5,0}$ DIE_{50} e subsequentemente incubados a 37°C durante 2-4 dias. Após 2-4 dias o produto do vírus da ND pode ser colhido de preferência através da colheita do fluído alantóico. O fluído pode ser depois centrifugado durante 10 min a 2500 g seguido de filtração do sobrenadante através de um filtro (100 µm).

A vacina de acordo com o presente invento compreende o mutante de NP de NDV juntamente com um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitável habitualmente utilizado para tais composições.

A vacina contendo o vírus vivo pode ser preparada e comercializada na forma de uma suspensão ou numa forma liofilizada. Os transportadores incluem estabilizantes, conservantes e tampões. Os diluentes incluem água, tampão aquoso e polióis.

Se desejado, a vacina viva de acordo com o presente invento pode conter um adjuvante. Exemplos de compostos e composições adequados com actividade adjuvante são os mesmos que mencionados abaixo para a vacina contra NDV inactivada.

Embora seja possível a administração através de injecção, p.ex. intramuscular, subcutânea, da vacina viva de acordo com o presente invento, a vacina é de preferência administrada através de técnicas de aplicação em massa não dispendiosas vulgarmente utilizadas para vacinação contra NDV. Para a vacinação contra NDV estas técnicas incluem vacinação na água de beber e por pulverização.

Uma propriedade adicional inesperada de um mutante de NP de NDV de acordo com o presente invento é que a sua virulência

para os embriões de galinha é significativamente atenuada de modo a poder ser administrado *in ovo*. Portanto, o presente invento proporciona também uma vacina baseada num mutante de NP de NDV tal como descrito acima que pode ser utilizada para vacinação *in ovo*.

A vacina compreendendo o mutante de NP de NDV pode ser injectada em ovos embrionados de acordo com métodos de vacinação *in ovo* convencionais. Habitualmente, a vacina é injectada em ovos embrionados durante estádios tardios do desenvolvimento embrionário, geralmente durante o último quarto do período de incubação (dia 15-21), de preferência no dia 18 ou 19 do período de incubação. O mecanismo de injecção dos ovos incubados não é particularmente crítico desde que não prejudique demasiado os tecidos e os órgãos do embrião. Por exemplo, é perfurado um pequeno orifício com uma agulha (1-$1^1/_2$ polegadas, cerca de calibre 22) ligada a uma seringa na extremidade maior da casca e a vacina é injectada abaixo da membrana interior da casca e da membrana corioalantóica. Subsequentemente, os ovos embrionados vacinados são transferidos para uma incubadora até à eclosão (Patente U.S. N.º 4458630, 5427791, WO 98/56413 e WO 98/35121). De preferência, todo o processo de vacinação do embrião é realizado utilizando sistemas de vacinação automáticos, tais como o comercialmente disponível Inovoject®.

Noutro aspecto do presente invento é proporcionada uma vacina compreendendo o mutante de NP de NDV numa forma inactivada. As principais vantagens de uma vacina inactivada são a sua segurança e os elevados níveis de anticorpos protectores de longa duração que podem ser induzidos.

O objectivo da inactivação dos vírus colhidos após o passo de propagação é eliminar a reprodução dos vírus. Em geral, isto pode ser alcançado através de meios químicos ou físicos bem conhecidos.

Uma vacina contendo o mutante de NP de NDV inactivado de acordo com o presente invento pode, por exemplo, compreender um ou mais dos transportadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis acima mencionados, adequados para este fim.

De preferência, uma vacina inactivada de acordo com o presente invento compreende um ou mais compostos com actividade adjuvante. Os compostos ou composições adequados para este fim incluem hidróxido, fosfato ou óxido de alumínio, emulsão de óleo-em-água ou de água-em-óleo baseada em, por exemplo, um óleo mineral tal como Bayol F® ou Marcol 52® ou um óleo vegetal tal como acetato de vitamina E, e saponinas.

A vacina de acordo com o presente invento compreende uma dosagem eficaz do mutante de NP de NDV como componente activo, *i.e.* uma quantidade de material de NDV imunizante que induzirá imunidade nas aves vacinadas contra a provocação com um vírus virulento. A imunidade é aqui definida como a indução de um nível significativamente superior de protecção numa população de aves contra mortalidade e sintomas clínicos após a vacinação em comparação com um grupo não vacinado. Em particular, a vacina de acordo com o presente invento protege uma grande proporção de animais vacinados contra a ocorrência de sintomas clínicos da doença e mortalidade.

Tipicamente, a vacina viva pode ser administrada numa dose de $10^{2,0}$-$10^{8,0}$ da dose infecciosa para o embrião (DIE_{50}) de preferência numa dose que varia de $10^{4,0}$-$10^{7,0}$ DIE_{50}. As vacinas inactivadas podem conter o equivalente antigénico de $10^{4,0}$-$10^{9,0}$ DIE_{50}.

As vacinas inactivadas são habitualmente administradas parentericamente, p.ex. intramuscularmente ou subcutaneamente.

Embora a vacina contra NDV de acordo com o presente invento possa ser utilizada eficazmente em galinhas, também outras aves de criação tais como perus, pombos, codornizes, faisões, galinhas-da-índia e perdizes, podem ser vacinadas com sucesso com a vacina. Galinhas incluem frangos, reprodutores e poedeiras.

A idade dos animais que recebem após a eclosão uma vacina viva ou inactivada de acordo com o presente invento é a mesma que a dos animais que recebem as vacinas contra NDV vivas ou inactivadas convencionais. Por exemplo, os frangos podem ser vacinados com um dia de idade ou com 1-3 semanas de idade, particularmente os frangos com níveis elevados de MDA. As

poedeiras ou os reprodutores podem ser vacinados com 1-10 dias de idade e receber reforços com uma vacina viva ou inactivada às 6-12 semanas e às 16-20 semanas de idade.

O presente invento inclui também vacinas de combinação compreendendo, para além do mutante de NP de NDV de acordo com o presente invento, uma estirpe de vacina capaz de induzir protecção contra ND ou contra outro patogénio de aves.

De preferência, a vacina de combinação compreende adicionalmente uma ou mais estirpes de vacina do vírus da Doença de Mareks (MDV), vírus da bronquite infecciosa (IBV), vírus da doença de Newcastle (NDV), vírus da síndroma da postura do ovo (EDS), vírus da rinotraqueíte dos perus (TRTV) ou reovírus.

A estirpe de vacina da ND adicional na vacina de combinação, é de preferência um vector de vacina (vírus) recombinante capaz de expressar a proteína F ou HN de NDV. Tais vectores de vacina virais são bem conhecidos e a sua segurança e eficácia foi extensamente estudada: Morgan *et al.*, *Avian Diseases* 36: 858-870, 1992 e *Avian Diseases* 37: 1032-1040, 1993; Heckert *et al.*, *Avian Diseases* 40: 770-777, 1996; Sakaguchi *et al.*, Vaccine 16: 472-479, 1998 e Sonoda *et al.*, *J. Virol.* 74: 3217-3226, 2000.

Numa concretização mais preferida, o vector de vacina recombinante numa vacina de combinação de acordo com o presente invento é um vector HVT recombinante capaz de expressar a proteína F ou HN de NDV.

No caso da vacina de combinação ser administrada através da via *in ovo* a estirpe de vacina adicional deve ser uma estirpe de vacina segura para o embrião, i.e. uma estirpe de vacina viva que, se for inoculada em ovos SPF no dia 18 do desenvolvimento embrionário, resulta na eclosão de pelo menos 70% dos ovos embrionados.

A vacina marcadora de NDV descrita acima, em conjunto com um método de diagnóstico, permite a distinção entre animais que são vacinados com ela e animais que são infectados com

estirpes de NDV de ocorrência natural ou vacinados com vacinas de ND convencionais.

O presente invento proporciona também uma ferramenta de grande valor para monitorizar as medidas de controlo da ND que podem conduzir à erradicação do NDV se aplicadas em programas de sacrifício de grande escala. Esta ferramenta refere-se a um método para determinação de infecção por NDV numa ave de criação compreendendo o passo de exame de uma amostra do animal quanto à presença ou ausência de anticorpos reactivos com um epítopo imunodominante situado dentro de uma região da NP possuindo a sequência de aminoácidos (447-455).

A amostra do animal utilizada neste método pode ser uma amostra qualquer na qual anticorpos contra NDV possam ser detectados, p.ex. uma amostra de sangue, soro ou tecido, sendo preferível uma amostra de soro.

Como antigénio em tal método é utilizado um fragmento da NP compreendendo a região (447-455) como a única região contendo o epítopo. Portanto, um método preferido para determinação de infecção por NDV num animal compreende os passos de:

i) incubar uma amostra suspeita de conter anticorpos anti-NDV, com um fragmento da NP compreendendo a região de aminoácidos (447-455) como a única região contendo epítopo.

ii) permitir a formação do complexo anticorpo-antigénio, e

iii) detectar a presença do complexo anticorpo-antigénio.

Num método de diagnóstico preferido particular o fragmento da NP é o polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos 360-470 ou uma parte deste compreendendo a região (447-455).

Num método de diagnóstico mais preferido o antigénio utilizado é o péptido 18-mero possuindo a sequência de aminoácidos 443-460.

O desenho do imunoensaio pode variar. Por exemplo, o imunoensaio pode ser baseado em competição ou em reacção

directa. Para além disso, os protocolos podem utilizar suportes sólidos ou podem utilizar material celular. A detecção do complexo anticorpo-antigénio pode envolver a utilização de anticorpos marcados; os marcadores podem ser, por exemplo, enzimas, moléculas fluorescentes, quimioluminescentes, radioactivas ou corantes.

Os métodos adequados para a detecção dos anticorpos contra NDV na amostra incluem o ensaio imunossorvente enzimático (ELISA), o teste imunofluorescente (IFT) e a análise "*Western blot*", sendo o ELISA o preferido.

Num ELISA exemplificativo, os poços de uma placa de microtitulação de poliestireno são revestidos com um fragmento apropriado da NP compreendendo um epítopo imunodominante. A seguir, os poços das placas revestidos são cheios com soro de galinha e são feitas diluições em série. Após a incubação, a presença ou ausência dos anticorpos anti-NP do soro de galinha relevantes dirigidos contra um epítopo imunodominante é determinada através de um anticorpo de detecção marcado (p.ex. conjugado com peroxidase de rábano) que se liga aos anticorpos anti-NP capturados (se presentes no soro de teste). A quantidade dos anticorpos relevantes presentes no soro que se ligam ao fragmento de NP pode ser determinada através da incubação das placas com substrato da enzima e leitura do valor da absorvância (DO) num auto-leitor de microplacas.

Numa concretização alternativa do método de diagnóstico a presença de soro de galinha com anticorpos específicos é examinada através da incubação do soro e de um antigénio apropriado na presença de um anticorpo monoclonal que reaja especificamente com um epítopo situado dentro da região (447-455).

Os ELISA baseados na detecção de anticorpos para galinhas infectadas com NDV *versus* vacinadas com NDV (subunidade), com base na NP inteira como antigénio foram descritos por Makkay *et al.* (1999, *supra*) e Errington *et al.* (*J. Virol. Methods* 55: 357-365, 1995) e o princípio aqui descrito pode ser aplicado de forma concordante utilizando o antigénio relevante.

Noutra concretização do presente invento é proporcionado um estojo de teste de diagnóstico que é adequado para a realização do método de diagnóstico de acordo com o presente invento tal como descrito acima.

Em particular, é proporcionado um estojo de teste de diagnóstico que compreende para além dos componentes habitualmente presentes, um fragmento de NP apropriado tal como definido acima, de preferência o péptido 18-mero (443-460), de preferência ligado a uma molécula transportadora (se desejado a revestir uma fase sólida), como reagente de antigénio. Outros componentes habitualmente presentes num tal estojo de teste incluem anticorpos conjugados com biotina ou peroxidase de rábano, substrato de enzima, tampão de lavagem, etc.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Criação de um NDV recombinante sem um epítopo imunodominante na nucleoproteína(NP)

MATERIAIS E MÉTODOS

Introdução da mutação no ADNc do NDV inteiro.

Para criar NDV mutantes, o plasmídeo pflNDV, expressando o ARN do antigenoma inteiro da estirpe de vacina lentogénica de ND, Clone-30 (Römer-Oberdörfer *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 80: 2987-2995, 1999), foi utilizado para introduzir as mutações. As deleções internas na região onde o epítopo imunodominante se situa foram introduzidas utilizando o "estojo de mutagénese dirigida ao local de alteração rápida" ("*quick change site directed mutagenesis kit*") de acordo com as instruções do fabricante (Stratagene). Primeiro foi preparado um fragmento de ADN englobando os nucleótidos 77-2289 do genoma de NDV através da digestão de pflNDV com *Mlu*I, preenchimento com Klenow e tratamento com *Apa*I. O fragmento de ADN de ≈2,2 kb foi ligado no vector pSKT7T digerido com *Apa*I e *Eco*RI. A mutagénese por PCR foi então efectuada sobre o molde acima descrito utilizando os seguintes conjuntos de iniciadores (SEQ ID NO:5-10):

Para eliminar os nucleótidos 1451-1486, correspondentes aos aminoácidos 444-455 de NP:
P1A (5'-CCAGAAGCCGGGGATGGG/AATAGCATGAGGGAG-3') e
P1B (5'-CTCCCTCATGCTATT/CCCATCCCCGGCTTCTGG-3')

Para eliminar os nucleótidos 1448-1501, correspondentes aos aminoácidos 443-460 de NP:
P2A (5'-CCAGAAGCCGGGGAT/GCGCCAAACTCTGCACAGG-3') e
P2B (5'-CCTGTGCAGAGTTTGGCGC/ATCCCCGGCTTCTGG-3')

Para eliminar os nucleótidos 1445-1588, correspondentes aos aminoácidos 442-489 de NP:
P3A (5'-GGCAACCAGAAGCCGGG/TGATGGACAAAACCCAGC-3')
P3B (5'-GCTGGGTTTTGTCCATCA/CCCGGCTTCTGGTTGCC-3')

Os clones sujeitos à mutagénese foram digeridos com *Aat*II/*Apa*I e clonados nos mesmos locais de pflNDV. A presença das mutações introduzidas foi confirmada através de sequenciação dos respectivos clones. Os clones inteiros resultantes, com deleções no gene da NP correspondentes às posições dos aminoácidos 444-455, 443-460 ou 442-489 foram designados NDV-Δ12, NDV-Δ18 e NDV-Δ48, respectivamente (Fig. 1).

Recuperação dos vírus recombinantes.

Aproximadamente $1,5\times10^{6}$ células BSR-T7/5 expressando estavelmente ARN-polimerase do fago T7 foram criadas de um dia para o outro até 90% de confluência em caixas de cultura de 3,2 cm de diâmetro. As células foram transfectadas com misturas de plasmídeos contendo 5 µg de pCite-NP, 2,5 µg de pCite-P, 2,5 µg de pCite-L e 10 µg de um dos clones inteiros utilizando um estojo de transfecção de mamífero (protocolo de transfecção com $CaPO_4$, Stratagene). Três a cinco dias após a transfecção, os sobrenadantes foram colhidos e inoculados na cavidade alantóica de ovos de galinha SPF com 9 a 11 dias de desenvolvimento embrionário. Após 3-4 dias de incubação, a presença do vírus no fluído alantóico foi determinada através do teste rápido de hemaglutinação (HA) em placas utilizando eritrócitos de galinha.

RESULTADOS

Para eliminar o epítopo imunodominante no gene da NP, ou bloquear a expressão da parte C-terminal da NP, foram realizadas as modificações descritas em Materiais e Métodos. Cada clone de ADNc inteiro modificado, juntamente com três plasmídeos de suporte expressando as proteínas NP, P e L de NDV, foi transfectado em células BSR-T7/5. Após 3-5 dias de incubação, os sobrenadantes foram colhidos e inoculados em ovos de galinha SPF com 9 a 11 dias de desenvolvimento embrionário. Após 3-4 dias de incubação, amostras de fluído alantóico foram colhidas e sujeitas a um teste de HA. A HA foi detectada em ovos inoculados com o sobrenadante de células transfectadas com o pflNDV não modificado. Surpreendentemente, foi detectado NDV-Δ18 utilizando o teste de HA após uma passagem extra pelos ovos. O NDV-Δ18 foi então passado em série um total de oito passagens em ovos SPF fertilizados. O ARN foi isolado a partir de células infectadas com cada passagem e sujeito a RT-PCR. Em todas as passagens a deleção introduzida foi mantida, demonstrando a estabilidade do vírus recombinante. O vírus infeccioso não foi detectado no fluído alantóico dos ovos embrionados inoculados com sobrenadantes obtidos a partir das transfecções com NDV-Δ12 e NDV-Δ48, mesmo após três passagens sucessivas pelos ovos.

Exemplo 2

NDV-Δ18 pode ser utilizado como vacina marcadora

MATERIAIS E MÉTODOS

Imunização de galinhas com NDV-Δ18 e análise dos soros.

Quinze galinhas SPF com 3 semanas de idade foram imunizadas com NDV-Δ18 através da via óculo-nasal com uma dose de 6,5 $\log_{10}$ da DIE_{50} por 0,2 ml e receberam um reforço 5 semanas após a primeira imunização com a mesma dose. As amostras de soro foram colhidas imediatamente antes da vacinação e 2, 5 e 7 semanas após a primeira imunização. As amostras de soro foram então testadas através do teste de inibição da hemaglutinação (HI) e de ELISA para determinar o nível de seroconversão.

Ensaio imunossorvente enzimático (ELISA)

Um péptido sintético 18-mero (SEQ ID NO:1) compreendendo a sequência de aminoácidos (443-460) da nucleoproteína foi sintetizado e ligado a albumina de soro bovino (BSA). Resumidamente, um péptido sintético (2 mg) foi ligado a BSA (razão molar de 4:1, respectivamente) através da utilização de glutaraldeído 20 mM em solução salina tamponada com fosfato (PBS) como ligante cruzado. Em paralelo, foi preparado um antigénio de controlo negativo através da ligação cruzada de uma mistura de BSA sem a adição do péptido. Após incubação de um dia para o outro à temperatura ambiente, a reacção de ligação cruzada foi parada através da adição de tampão estabilizante contendo glicina à mistura reaccional. As misturas BSA/péptido foram divididas em alíquotas e armazenadas a -20°C.

As placas de microtítulo foram revestidas de um dia para o outro a 2-8°C com 0,5 µg de péptido sintético ligado a BSA ou BSA apenas em tampão de revestimento (tampão de carbonato, pH 9,6). O antigénio não ligado foi removido através de lavagem dos poços quatro vezes com solução PBST (PBS, Tween-20). Antes do teste as amostras de soro foram diluídas 50 vezes em solução IB-EIA (tampão $Na_2HPO_4.2H_2O$ 0,2 M, pH 7,0, Tween-20 a 0,05%, NaCl 0,5 M, BSA a 0,1%) e adicionadas aos poços revestidos. Após uma incubação de 1,5 horas a 37°C numa atmosfera humidificada, os poços foram lavados com solução PBST e incubados com 100 µl de imunoglobulinas de coelho anti-galinha conjugadas com peroxidase de rábano diluídas em solução IB-EIA. Após 45 minutos a 37°C, os poços foram lavados com PBST e os complexos antigénio-anticorpo foram detectados através da adição de TMB como substrato.

Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente a reacção foi parada através da adição de 50 µl de ácido sulfúrico 2 M a cada poço. As densidades ópticas foram medidas a 450 nm. O valor de limite de exclusão (COV) foi estabelecido em três desvios padrão acima das razões P/N médias da amostra do controlo negativo de galinhas SPF (onde P = DO das amostras de poços revestidos com péptido e; N = DO das amostras de poços revestidos com BSA).

Para medir a resposta de anticorpos específicos para NDV inteiro nos painéis de soro testados, as placas de microtítulo foram revestidas com antigénios do Clone 30 de NDV purificados em gradiente de sacarose. Resumidamente, os poços foram revestidos de um dia para o outro com os antigénios virais tratados com Triton X-100 a 0,5% (1,0 µg/ml) em tampão fosfato 40 mM (PBS, pH 7,2). Após a remoção dos antigénios não ligados através da lavagem com PBST, os poços foram pós-revestidos com soro de cavalo dador a 10% v/v em PBS. Os poços contendo somente antigénios pós-revestidos foram utilizados como controlos negativos. As amostras de soro testadas foram diluídas (1:150) em solução IB-EIA e adicionadas aos poços de controlo positivo e negativo. Os restantes passos de incubação do procedimento ELISA foram idênticos ao ELISA baseado em péptidos tal como descrito acima com a excepção do tampão de diluição do conjugado IB-EIA que foi suplementado com soro de cavalo dador a 5%. O valor limite de exclusão (COV) foi estabelecido em três desvios padrão acima das razões P/N médias da amostra do controlo negativo de galinhas SPF.

RESULTADOS

Os soros dos animais vacinados com o NDV-Δ18 recombinante foram recolhidos às 2, 5 e 7 semanas e sujeitos ao teste de HI e ELISA. Tal como mostrado na Fig. 2 os títulos médios de HI foram 4,7, 4,9 e 7,7 às 2, 5 e 7 semanas após a primeira imunização, respectivamente. Houve também uma elevada reacção correspondente no ELISA baseado em vírus inteiro, mostrando a indução de uma considerável resposta imunitária contra o vírus recombinante. Em contraste, nenhum dos soros reagiu no ELISA revestido com o péptido, mostrando que as galinhas imunizadas com NDV-Δ18 não possuíam de todo anticorpos dirigidos contra o epítopo imunodominante na proteína NP, mesmo após uma imunização de reforço (soros às 7 semanas). A análise dos soros obtida a partir de animais vacinados com vacinas convencionais de vírus inactivado ou vivo mostrou reactividade contra ELISA de vírus inteiro. Para além disso, todos os soros testados foram positivos no ELISA baseado em péptidos (Fig. 2), demonstrando a presença de anticorpos dirigidos contra o epítopo imunodominante de NP nos soros recolhidos de animais imunizados com vacinas de ND convencionais. Portanto, este ELISA baseado em péptidos pode discriminar a resposta de

anticorpos ao NDV-Δ18 recombinante daquela para as estirpes ND convencionais.

Exemplo 3

NDV-Δ18 como vacina marcadora *in ovo* administrada sozinha ou em combinação com outro vector de vacina

MATERIAIS E MÉTODOS

Propagação do vírus em ovos embrionados

Para determinar o título do vírus e a mortalidade dos embriões, foram preparadas diluições em série de 10 vezes do vírus NDV-Δ18 recombinante, e ovos embrionados de galinha SPF com 9 a 11 dias de desenvolvimento embrionário foram inoculados na cavidade alantóica. Os ovos foram observados diariamente quanto à mortalidade dos embriões durante pelo menos 7 dias e a dose letal para 50% dos embriões (DLE_{50}) foi determinada utilizando o método de Reed e Muench (*Am. J. Hyg.* 27: 493-497, 1938). Um teste rápido de HA em placas foi também realizado noutro conjunto de ovos após 4 dias de incubação e o título, expresso como dose infecciosa para 50% dos embriões (DIE_{50}), foi calculado utilizando o mesmo método.

Vacinação *in ovo* e provocação

Ovos de galinha SPF no décimo oitavo dia do desenvolvimento embrionário foram inoculados com o vírus NDV-Δ18 recombinante sozinho ou em combinação com um vector HVT expressando a proteína F de NDV (Morgan *et al.*, *Avian Dis.* 37: 1032-1040, 1993). Utilizando uma agulha 23G, foram injectados 0,1 ml da diluição do vírus ou de fluído alantóico negativo, através de um orifício perfurado na base larga do ovo, imediatamente abaixo da membrana do saco de ar. Os ovos foram incubados ainda até à eclosão. A percentagem dos que eclodiram foi registada e as galinhas foram observadas diariamente quanto à saúde geral. Às três semanas de idade, foram tomadas amostras de sangue e os soros foram ensaiados quanto aos anticorpos contra NDV no teste de inibição da hemaglutinação (HI) de NDV e nos ELISA. Às três semanas de idade, todos os animais foram provocados com a estirpe Herts

de NDV administrada intramuscularmente. As galinhas foram observadas diariamente durante um período de 10 dias quanto à ocorrência de sinais clínicos de doença ou mortalidade.

RESULTADOS

O NDV-Δ18 é atenuado na patogenicidade para os embriões de galinha

Para determinar a mortalidade dos embriões causada por NDV-Δ18, foram inoculadas diluições em série de 10 vezes da passagem 3 de NDV-Δ18 em ovos de galinha SPF com 11 dias de desenvolvimento embrionário (0,2 ml/ovo) e incubou-se durante uma semana. Surpreendentemente, não foi detectada qualquer mortalidade dos embriões específica durante o período de 7 dias de incubação, mostrando que o NDV-Δ18 estava consideravelmente atenuado para os embriões (Fig. 3). Os embriões de galinha inoculados com o vírus progenitor, NDV recombinante (rNDV), tinham logo começado a morrer aos três dias após a inoculação, a doses superiores a 4 $\log_{10}$ da DIE_{50}/ml. A diferença entre a dose infecciosa a 50% e a dose letal a 50% de rNDV foi de apenas 0,3 $\log_{10}$. Em contraste, esta diferença foi tão elevada quanto 8,0 $\log_{10}$ para NDV-Δ18, mostrando que este estava significativamente atenuado (Fig. 3).

O NDV-Δ18 constitui uma vacina *in ovo*/marcadora eficaz.

O NDV-Δ18 estava altamente atenuado para embriões de galinha quando aplicado a embriões de 9 a 11 dias, e por essa razão foi realizada uma experiência de vacinação *in ovo* (embrião) para determinar a segurança e eficácia do NDV-Δ18 (Tabela 1). As galinhas que eclodiram dos ovos embrionados vacinados *in ovo* foram provocadas com uma estirpe Herts velogénica de NDV. As galinhas vacinadas em embrião com NDV-Δ18 desenvolveram elevados níveis de anticorpo e a protecção contra a provocação letal foi de 100%, quer o NDV-Δ18 fosse dado sozinho ou em combinação com HVT recombinante expressando NDV-F (Tabela 1). Todas as galinhas de controlo morreram em 3 dias após a provocação. Estes dados mostram que o NDV-Δ18 pode conferir protecção total quando administrado a embriões de galinha SPF de 18 dias.

Para determinar se os animais vacinados *in ovo* com NDV-Δ18 podiam ser serologicamente distinguidos de animais infectados ou de animais vacinados com vacinas convencionais, foram recolhidas amostras de sangue às três semanas de idade que foram sujeitas a ELISA tal como descrito no Exemplo 2. Tal como esperado, nenhum dos soros de animais vacinados com NDV-Δ18 reagiu com o ELISA baseado no péptido englobando o epítopo imunodominante no gene da NP, enquanto que todos os soros foram reactivos com o ELISA de vírus inteiro e no teste de HI (Fig. 4). Isto mostra que a administração *in ovo* de NDV-Δ18 não afectou a possibilidade de discriminar os animais vacinados com NDV-Δ18 dos animais infectados. A ausência de resposta ao epítopo imunodominante no gene da NP foi também confirmada quando o NDV-Δ18 foi administrado *in ovo* em combinação com HVT-NDV/F, um vector de vacina expressando a proteína de fusão (F) de NDV (Fig. 4). Isto mostra que o NDV-Δ18 pode ser combinado com outras vacinas de vector que não expressem a região imunodominante da nucleoproteína de NDV.

Tabela 1. Segurança e eficácia de NDV-Δ18 ou de NDV-Δ18 mais HVT-NDV/F em galinhas SPF vacinadas *in ovo* aos 18 dias de desenvolvimento embrionário.

Vírus	Embriões	Dose[a]	Quantidade de eclosões/total	Título de HI[b]	Sobrevivência após a provocação[c]
NDV-Δ18	SPF	3,2	25/30 (83%)	5,1±1,2	20/20 (100%)
NDV-Δ18 + HVT-NDV/F	SPF	4,2 2,8	18/27 (67%)	4,6±0,7	18/18 (100%)
Controlo	SPF	-	26/27 (96%)	0,0±0,0	0/20 (0%)

[a] Dose em $\log_{10}$ de DIE_{50} por ovo para NDV e pfu por ovo para HVT-NDV/F calculada após nova titulação das amostras.
[b] Título de inibição da hemaglutinina (HI) (2log) contra NDV às duas semanas de idade
[c] As galinhas foram provocadas com a estirpe Herts de NDV às três semanas de idade com uma dose de 5,5 $\log_{10}$ de DLE_{50}/galinha intramuscularmente.

Tal como é mostrado na Tabela 1, a percentagem de eclosões de animais SPF foi reduzida, particularmente quando foram utilizadas doses maiores de NDV-Δ18. Para determinar se a presença de anticorpos derivados maternalmente (MDA) modula a segurança do NDV-Δ18, galinhas comerciais foram vacinadas

in ovo com NDV-Δ18 sozinho ou em combinação com HVT-NDV/F. A percentagem de eclosões dos ovos de galinhas comerciais fertilizados não foi de todo afectada pela administração *in ovo* de NDV-Δ18 sozinho ou em combinação com HVT-NDV/F (Tabela 2), demonstrando a segurança de NDV-Δ18 em animais com MDA.

Tabela 2. Segurança de NDV-Δ18 ou de NDV-Δ18 em combinação com HVT-NDV/F em galinhas comerciais vacinadas *in ovo* aos 18 dias de desenvolvimento embrionário.

Vírus	Embriões	Dose[a]	Quantidade de eclosões/total
NDV-Δ18	Comercial	4,2	29/30 (97%)
NDV-Δ18 + HVT-NDV/F	Comercial	4,2 2,8	30/30 (100%)
Controlo	Comercial	-	27/30 (90%)

[a] Dose em $\log_{10}$ de DIE_{50} por ovo para NDV e pfu por ovo para HVT-NDV/F calculada após nova titulação das amostras.
[b] O título médio de HI de MDA específicos de NDV no momento da eclosão foi de 5,3±1,1.

Adicionalmente, a percentagem de eclosões foi comparada após administração de NDV-Δ18 aos 18 ou 19 dias de desenvolvimento embrionário. Tal como é mostrado na Tabela 3, a percentagem de eclosões de embriões SPF vacinados aos 19 dias de desenvolvimento embrionário foi de 100% em comparação com 76% para embriões vacinados aos 18 dias de desenvolvimento.

Tabela 3. Segurança de NDV-Δ18 em galinhas SPF vacinadas *in ovo* aos 18 ou aos 19 dias de desenvolvimento embrionário.

Vírus	Idade dos Embriões	Dose $\log_{10}$ de DIE_{50}/ovo	Quantidade de eclosões/total
NDV-Δ18	18 dias	5,0	71% (15/21)
Controlo	18 dias	0	100% (21/21)
NDV-Δ18	19 dias	5,0	100% (22/22)
Controlo	19 dias	0	96% (21/22)

Exemplo 4

NDV-Δ18 como vacina marcadora pós-eclosão eficaz

MATERIAIS E MÉTODOS

Para determinar a segurança e a eficácia de NDV-Δ18 como uma vacina pós-eclosão, galinhas SPF com um dia de idade foram vacinadas através da via de gotas nos olhos a uma dose de 6 $\log_{10}$ de DIE_{50}/galinha. As galinhas foram observadas diariamente quanto a sinais clínicos e às 3 semanas de idade, foram tomadas amostras de sangue e todos os animais foram provocados com a estirpe de NDV virulenta Herts, administrada intramuscularmente. Os soros foram ensaiados quanto aos anticorpos para NDV no teste de inibição da hemaglutinina (HI) de NDV e em ELISA. As galinhas foram observadas diariamente durante um período de 2 semanas após a provocação quanto à ocorrência de sinais clínicos de doença ou mortalidade.

RESULTADOS

As galinhas vacinadas após eclosão com NDV-Δ18 desenvolveram anticorpos específicos de NDV e a protecção contra a provocação letal foi superior a 90% na dose administrada (Tabela 4). Todas as galinhas de controlo morreram em 3 dias após a provocação. Durante o período de observação antes da provocação não foram detectados sinais adversos relacionados com a vacinação. Para determinar se os animais vacinados com NDV-Δ18 podiam ser serologicamente distinguidos dos animais infectados ou de animais vacinados com vacinas convencionais, amostras de sangue colhidas imediatamente antes da provocação foram sujeitas a ELISA tal como descrito no Exemplo 2. Tal como esperado, todos os soros foram reactivos com o ELISA de vírus inteiro e no teste de HI, mas não com o ELISA baseado no péptido englobando o epítopo imunodominante no gene de NP. Tomados em conjunto, estes dados demonstram que NDV-Δ18 é adequado não apenas para administração *in ovo* como também é uma vacina marcadora pós-eclosão segura e eficaz.

Tabela 4. Segurança e eficácia de NDV-Δ18 em galinhas SPF com um dia de idade vacinadas através da via de gotas nos olhos

Vírus	Dose[a]	Título de HI[b]	Sobrevivência após provocação[c]
NDV-Δ18	6,0	3,73	11/12 (92%)
Controlo	-	0,0	0/5 (0%)

[a] Dose em log_{10} de DIE_{50} por galinha
[b] Título de inibição da hemaglutinina (HI) (2log) contra NDV às 3 semanas de idade
[c] As galinhas foram provocadas com a estirpe Herts de NDV às três semanas de idade com uma dose de 6,0 log_{10} de DLE_{50}/galinha intramuscularmente.

Exemplo 5

Uma vacina marcadora que expressa um epítopo estranho

MATERIAIS E MÉTODOS

Construção e criação de vírus recombinantes.

Para determinar a possibilidade de expressar um epítopo estranho através de um NDV recombinante, foi escolhido um epítopo de células B bem caracterizado da glicoproteína S2 do vírus da hepatite de murídeo (MHV) (Talbot *et al.*, *Virology* 132: 250-260, 1984; Luytjes *et al.*, *J. Virol.* 63: 1408-1415, 1989) para substituir o epítopo imunodominante de NP de NDV. A substituição enquadrada substituiu 16 aminoácidos (posições nucleotídicas 1451 a 1499, correspondentes aos aminoácidos 444 a 459 da NP) ou 12 aminoácidos (posições nucleotídicas 1451 a 1486, correspondentes aos aminoácidos 444 a 455 da NP) com duas sequências sobreponíveis de 16 aminoácidos (epítopo 1 de MHV) ou 10 aminoácidos (epítopo 2 de MHV), respectivamente, englobando o epítopo na glicoproteína S2 de MHV.

Sequência do epítopo 1 de MHV (número de acesso NCBI NC_001846; nucleótidos 26464-26511 do genoma inteiro; aminoácidos 845-860 da proteína S2):

5´-AGT CCT CTA CTT GGA TGC ATA GGT TCA ACA TGT GCT GAA GAC GGC AAT-3´
Ser Pro Leu Leu Gly Cys Ile Gly Ser Thr Cys Ala Glu Asp Gly Asn

Sequência do epítopo 2 de MHV (número de acesso NCBI NC_001846; nucleótidos 26470-26499 do genoma inteiro; aminoácidos 847-856 da proteína S2):

5´- CTA CTT GGA TGC ATA GGT TCA ACA TGT GCT-3´

Leu Leu Gly Cys Ile Gly Ser Thr Cys Ala

A mutagénese por PCR foi efectuada no subclone *Mlu*I/*Apa*I de 2,2 kb descrito no Exemplo 1 utilizando os pares de iniciadores apropriados.

Os clones sujeitos a mutagénese foram digeridos através de *Aat*II/*Apa*I e clonados nos mesmos locais de pflNDV. A presença das mutações introduzidas foi confirmada através de sequenciação dos respectivos clones. Os clones inteiros resultantes, nos quais os aminoácidos de NP 444-459 foram substituídos pela sequência do epítopo 1 de MHV ou os aminoácidos de NP 444-455 foram substituídos pela sequência do epítopo 2 de MHV, foram designados NDV-MHV1 e NDV-MHV2, respectivamente. A transfecção e a recuperação dos vírus foram realizadas tal como descrito no Exemplo 1. Três a cinco dias após a transfecção, os sobrenadantes foram colhidos e inoculados na cavidade alantóica de ovos de galinha SPF no dia 9 ou 11 do desenvolvimento embrionário. Após 3-4 dias de incubação, a presença do vírus no fluído alantóico foi determinada através de teste rápido de hemaglutinação em placas (HA) utilizando eritrócitos de galinha.

Análise de imunofluorescência

Para determinar a expressão do epítopo de MHV introduzido, células BSR-T7 foram infectadas a uma multiplicidade de infecção (moi) de 0,01 com o Clone-30 progenitor recombinante, NDV-Δ18, NDV-MHV1 e NDV-MHV2. Após 24 h de incubação, as células infectadas foram fixadas com etanol frio (96%) durante 1 h à temperatura ambiente. Após lavagem três vezes com PBS, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína F, o epítopo imunodominante da proteína NP ou o epítopo de MHV. As células foram lavadas e coradas com anticorpo anti-ratinho conjugado com FITC e examinadas através de microscopia de fluorescência.

Imunização de galinhas com NDV-MHV1 ou NDV-MHV2 e análise dos soros.

Dois grupos de cada dez galinhas SPF com 3 semanas de idade foram imunizados com NDV-MHV1 ou NDV-MHV2 através da via óculo-nasal com uma dose de 6,0 $\log_{10}$ DIE_{50} por 0,2 ml e reforçados 5 semanas após a primeira imunização com a mesma dose. Foram colhidas amostras de soro imediatamente antes da vacinação e às 2, 5 e 7 semanas após a primeira imunização. As amostras de soro foram testadas através do teste de inibição da hemaglutinina (HI) e de ELISA para determinar o nível de seroconversão.

Ensaio imunossorvente enzimático (ELISA).

Para determinar se as galinhas imunizadas com os vírus NDV-MHV1 e NDV-MHV2 tinham desenvolvido anticorpos específicos contra o epítopo de MHV expresso, revestiram-se placas de ELISA com o antigénio da estirpe A59 de MHV purificado em gradiente de sacarose. Os poços foram revestidos de um dia para o outro com antigénio viral tratado com Triton X-100 a 1% em tampão fosfato 40 mM (PBS, pH 7,2). A remoção de antigénios não ligados, o bloqueio e os restantes passos de incubação do procedimento de ELISA foram idênticos aos do ELISA baseado em NDV inteiro tal como descrito no Exemplo 2. Para determinar a ausência de resposta contra o epítopo de NP, o ELISA utilizando o péptido sintético 18-mero englobando o epítopo imunodominante de NP foi realizado tal como descrito no Exemplo 2. De modo semelhante, a resposta de anticorpos específicos para NDV inteiro foi medida em placas de ELISA revestidas com antigénios de Clone 30 purificados em gradiente de sacarose tal como descrito no Exemplo 2.

Imunização e provocação dos ratinhos.

Para determinar a capacidade protectora do epítopo de MHV expresso por NDV, foram utilizados grupos de ratinhos Balb/c fêmeas seronegativos para MHV com 4 semanas de idade para experiências de imunização e provocação. Dois grupos de cada 10 ratinhos foram imunizados com NDV-MHV1 ou NDV-MHV2 a uma dose de 6,0 $\log_{10}$ DIE_{50}/ratinho e receberam um reforço com uma dose semelhante 4 semanas depois. Os animais imunizados bem

como 10 de controlo de idade semelhante foram provocados às 10 semanas de idade (duas semanas após a imunização de reforço) com a estirpe A59 de MHV de tipo selvagem a uma dose de 10 DL_{50}/ratinho através da via intraperitoneal. Os animais foram observados quanto aos sinais clínicos e à mortalidade devidos a MHV durante duas semanas após a provocação.

RESULTADOS

Os sobrenadantes das células transfectadas foram colhidos e passados duas vezes em ovos de galinha SPF com 9 a 11 dias de desenvolvimento embrionário. Amostras de fluído alantóico foram então colhidas e sujeitas a teste de HA. A HA foi detectada em ovos inoculados com o sobrenadante de células transfectadas com recombinantes NDV-MHV1 bem como NDV-MHV2. Os vírus recuperados foram ainda passados mais duas vezes em ovos embrionados. A recuperação destes vírus recombinantes demonstra que o epítopo imunodominante de NP é não só dispensável para a replicação viral como pode também ser substituído por uma sequência ou epítopo inteiramente estranho.

Para determinar se os vírus recombinantes expressam o epítopo recentemente introduzido, células BSR foram infectadas tal como descrito em Material e Métodos e sujeitas análise de imunofluorescência. Utilizando um anticorpo monoclonal (mAb) dirigido contra a proteína de fusão, a expressão da proteína F foi indistinguível em todos os vírus. Em contraste, um mAb dirigido contra o epítopo imunodominante de NP reagiu apenas com o vírus Clone-30 progenitor. Tal como esperado, um mAb dirigido contra o epítopo de MHV reagiu apenas com as células infectadas com NDV-MHV1 ou NDV-MHV2, demonstrando que o epítopo é correctamente expresso dentro do enquadramento de leitura aberto do gene de NP.

Soros recolhidos imediatamente antes da imunização (T=0) e 7 semanas (T=7) após a primeira imunização foram então sujeitos a teste de HI e a ELISA de NDV inteiro. Tal como mostrado nas figuras, os títulos de HI em todas as galinhas às 7 semanas após a vacinação foram acima de 6 $\log_2$ unidades de HI e a reacção medida no ELISA baseado em NDV inteiro foi também consideravelmente elevada (Figuras 5-8).

Interessantemente, 80% a 90% das galinhas imunizadas com NDV-MHV1 ou NDV-MHV2 reagiram positivamente num ELISA baseado em antigénio do vírus MHV inteiro, demonstrando que as galinhas produzem anticorpos específicos contra o epítopo de MHV expresso pelos NDV recombinantes (Figuras 9-11). Em contraste, nenhum dos soros reagiu no ELISA revestido com o péptidos 18-mero, mostrando que as galinhas imunizadas com NDV-MHV1 ou NDV-MHV2 não possuem de todo anticorpos dirigidos contra o epítopo imunodominante na NP. Esta propriedade proporciona uma segurança extra no teste de diagnóstico, tanto como marcador positivo como negativo e torna os vírus recombinantes duplos marcadores candidatos atractivos.

Para demonstrar melhor a capacidade do epítopo introduzido para proteger contra uma provocação letal, imunizámos ratinhos com os vírus recombinantes e provocámo-los 6 semanas após a primeira imunização. Embora os ratinhos não sejam hospedeiros naturais para NDV, foi alcançado um nível de protecção significativo nos ratinhos imunizados contra uma provocação letal de MHV (Tabela 5). Por essa razão, estes vírus recombinantes são não só atractivos como vacinas marcadoras, como também como vectores para expressar epítopos estranhos para proteger contra um patogénio não aparentado.

Tabela 5.

Vírus	**% de sobrevivência após provocação**
NDV-MHV1	70% (7/10)
NDV-MHV2	60% (6/10)
Controlo	20% (2/10)

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1. Construções de NDV recombinantes. Uma representação esquemática da ordem do gene de NDV é mostrada no ARN genómico de cadeia negativa. As sequências em torno do epítopo imunodominante no gene de NP (posição 1442-1501, aminoácidos de NP 441-460) são apresentadas no sentido positivo. As linhas tracejadas mostram deleções de 12 ou 18 aminoácidos em NDV-Δ12 e NDV-Δ18, respectivamente. O NDV-Δ48 possui uma NP truncada no terminal C (48 resíduos) tal como indicado por um sinal de um codão de terminação (*) a seguir ao último aminoácido.

Fig. 2. Quinze galinhas SPF foram vacinadas pela via óculo-nasal com NDV-Δ18 às três semanas de idade e receberam um reforço às 5 semanas de idade. As amostras dos soros recolhidas imediatamente antes da vacinação (D18 S0), 2 semanas (D18 2S), 5 semanas (D18 5S) e 7 semanas (D18 7S) após a primeira vacinação foram sujeitas a ELISA e teste de HI tal como descrito na secção Materiais e Métodos. A resposta serológica contra uma vacina comercial viva de ND, Clone-30, foi avaliada de um modo semelhante a partir de 19 galinhas vacinadas com uma semana de idade e sangradas 4 semanas depois. Para o grupo NEWCAVAC, uma vacina comercial inactivada, foram vacinadas 21 galinhas SPF às 3 semanas de idade e foram efectuados ensaios serológicos semelhantes em amostras de soro colhidas 3 semanas após a imunização (D18 = NDV-Δ18).

Fig. 3. Patogenicidade de rNDV e NDV-Δ18 em embriões de galinha SPF. Ovos de galinha SPF com onze dias de desenvolvimento embrionário foram inoculados com o rNDV progenitor ou o NDV-Δ18 mutante e incubados durante 7 dias ou até ocorrer a morte dos embriões. NDV-Δ18 não causou mortalidade embrionária durante 7 dias em nenhuma das doses indicadas, enquanto que rNDV foi letal mesmo com uma dose tão baixa como 1 DIE_{50}/ml (mortalidade de aproximadamente 10%). Os embriões inoculados com rNDV começaram a morrer logo aos três dias após a inoculação a doses maiores.

Fig. 4. Resposta serológica de galinhas SPF vacinadas *in ovo* com NDV-Δ18 sozinho ou em combinação com HVT-NDV/F, uma vacina vector expressando a proteína de fusão NDV. Os animais foram vacinados aos 18 dias de desenvolvimento embrionário e foi efectuado um teste de HI e ELISA tal como descrito na secção Materiais e Métodos com os soros colhidos às três semanas de idade (D18 = NDV-Δ18).

Fig. 5-8. Resposta serológica de galinhas SPF vacinadas com NDV-MHV1 ou NDV-MHV2. As amostras de soro colhidas imediatamente antes da vacinação (T=0) e 7 semanas (T=7) após a primeira vacinação foram sujeitas ao teste de HI e a ELISA com base no antigénio de NDV inteiro.

Fig. 9-11. As galinhas produzem anticorpos específicos para o epítopo de MHV. Os mesmos soros descritos na Figura 5 (para NDV-MHV1 e NDV-MHV2) ou na Figura 2 (para NDV-Δ18) foram sujeitos a um ELISA baseado no antigénio de MHV inteiro.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> AKZO Nobel N.V.

<120> Mutante da nucleoproteína do vírus da doença de Newcastle recombinante como vacina marcadora

<130> 2000583

<140>
<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Vírus da doença de Newcastle

<220>
<223> péptido 9-mero/epítopo

<400> 1
Phe Leu Asp Leu Met Arg Ala Val Ala
1 5

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Vírus da doença de Newcastle

<220>
<223> péptido 18-mero

<400> 2
Gly Glu Thr Gln Phe Leu Asp Leu Met Arg Ala Val Ala Asn Ser Met
1 5 10 15

Arg Glu

<210> 3
<211> 1801
<212> ADN
<213> Vírus da doença de Newcastle

<220>
<221> CDS
<222> (122)..(1588)
<223> gene de NP: nucleótidos 56-1801; sequência de codificação de NP: nucleótidos 122-1588

<400> 3

```
accaaacaga gaatccgtaa gttacgataa aaggcgaagg agcaattgaa gtcgcacggg 60

tagaaggtgt gaatctcgag tgcgagcccg aagcacaaac tcgagaaagc cttctgccaa 120

c atg tct tcc gta ttt gat gag tac gaa cag ctc ctc gcg gct cag act 169
  Met Ser Ser Val Phe Asp Glu Tyr Glu Gln Leu Leu Ala Ala Gln Thr
    1               5                  10                  15

cgc ccc aat gga gct cat gga ggg gga gaa aaa ggg agt acc tta aaa   217
Arg Pro Asn Gly Ala His Gly Gly Gly Glu Lys Gly Ser Thr Leu Lys
            20                  25                  30

gta gac gtc ccg gta ttc act ctt aac agt gat gac cca gaa gat aga   265
Val Asp Val Pro Val Phe Thr Leu Asn Ser Asp Asp Pro Glu Asp Arg
        35                  40                  45

tgg agc ttt gtg gta ttc tgc ctc cgg att gct gtt agc gaa gat gcc   313
Trp Ser Phe Val Val Phe Cys Leu Arg Ile Ala Val Ser Glu Asp Ala
    50                  55                  60

aac aaa cca ctc agg caa ggt gct ctc ata tct ctt tta tgc tcc cac   361
Asn Lys Pro Leu Arg Gln Gly Ala Leu Ile Ser Leu Leu Cys Ser His
65                  70                  75                  80

tca cag gta atg agg aac cat gtt gcc ctt gca ggg aaa cag aat gaa   409
Ser Gln Val Met Arg Asn His Val Ala Leu Ala Gly Lys Gln Asn Glu
                85                  90                  95

gcc aca ttg gcc gtg ctt gag att gat ggc ttt gcc aac ggc acg ccc   457
Ala Thr Leu Ala Val Leu Glu Ile Asp Gly Phe Ala Asn Gly Thr Pro
            100                 105                 110

cag ttc aac aat agg agt gga gtg tct gaa gag aga gca cag aga ttt   505
Gln Phe Asn Asn Arg Ser Gly Val Ser Glu Glu Arg Ala Gln Arg Phe
        115                 120                 125

gcg atg ata gca gga tct ctc cct cgg gca tgc agc aac gga acc ccg   553
Ala Met Ile Ala Gly Ser Leu Pro Arg Ala Cys Ser Asn Gly Thr Pro
    130                 135                 140

ttc gtc aca gcc ggg gcc gaa gat gat gca cca gaa gac atc acc gat   601
Phe Val Thr Ala Gly Ala Glu Asp Asp Ala Pro Glu Asp Ile Thr Asp
145                 150                 155                 160

acc ctg gag agg atc ctc tct atc cag gct caa gta tgg gtc aca gta   649
Thr Leu Glu Arg Ile Leu Ser Ile Gln Ala Gln Val Trp Val Thr Val
                165                 170                 175

gca aaa gcc atg act gcg tat gag act gca gat gag tcg gaa aca agg   697
Ala Lys Ala Met Thr Ala Tyr Glu Thr Ala Asp Glu Ser Glu Thr Arg
            180                 185                 190

cga atc aat aag tat atg cag caa ggc agg gtc caa aag aaa tac atc   745
Arg Ile Asn Lys Tyr Met Gln Gln Gly Arg Val Gln Lys Lys Tyr Ile
        195                 200                 205

ctc tac ccc gta tgc agg agc aca atc caa ctc acg atc aga cag tct   793
```

```
Leu Tyr Pro Val Cys Arg Ser Thr Ile Gln Leu Thr Ile Arg Gln Ser
    210                 215                 220

ctt gca gtc cgc atc ttt ttg gtt agc gag ctc aag aga ggc cgc aac   841
Leu Ala Val Arg Ile Phe Leu Val Ser Glu Leu Lys Arg Gly Arg Asn
225                 230                 235                 240

acg gca ggt ggt acc tct act tat tat aac ctg gta ggg gac gta gac   889
Thr Ala Gly Gly Thr Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Val Gly Asp Val Asp
                245                 250                 255

tca tac atc agg aat acc ggg ctt act gca ttc ttc ttg aca ctc aag   937
Ser Tyr Ile Arg Asn Thr Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Thr Leu Lys
            260                 265                 270

tac gga atc aac acc aag aca tca gcc ctt gca ctt agt agc ctc tca   985
Tyr Gly Ile Asn Thr Lys Thr Ser Ala Leu Ala Leu Ser Ser Leu Ser
        275                 280                 285

ggc gac atc cag aag atg aag cag ctc atg cgt ttg tat cgg atg aaa  1033
Gly Asp Ile Gln Lys Met Lys Gln Leu Met Arg Leu Tyr Arg Met Lys
    290                 295                 300

gga gat aat gcg ccg tac atg aca tta ctt ggt gat agt gac cag atg  1081
Gly Asp Asn Ala Pro Tyr Met Thr Leu Leu Gly Asp Ser Asp Gln Met
305                 310                 315                 320

agc ttt gcg cct gcc gag tat gca caa ctt tac tcc ttt gcc atg ggt  1129
Ser Phe Ala Pro Ala Glu Tyr Ala Gln Leu Tyr Ser Phe Ala Met Gly
                325                 330                 335

atg gca tca gtc cta gat aaa ggt act ggg aaa tac caa ttt gcc agg  1177
Met Ala Ser Val Leu Asp Lys Gly Thr Gly Lys Tyr Gln Phe Ala Arg
            340                 345                 350

gac ttt atg agc aca tca ttc tgg aga ctt gga gta gag tac gct cag  1225
Asp Phe Met Ser Thr Ser Phe Trp Arg Leu Gly Val Glu Tyr Ala Gln
        355                 360                 365

gct cag gga agt agc att aac gag gat atg gct gcc gag cta aag cta  1273
Ala Gln Gly Ser Ser Ile Asn Glu Asp Met Ala Ala Glu Leu Lys Leu
    370                 375                 380

acc cca gca gca agg agg ggc ctg gca gct gct gcc caa cgg gtc tcc  1321
Thr Pro Ala Ala Arg Arg Gly Leu Ala Ala Ala Ala Gln Arg Val Ser
385                 390                 395                 400

gag gag acc agc agc ata gac atg cct act caa caa gtc gga gtc ctc  1369
Glu Glu Thr Ser Ser Ile Asp Met Pro Thr Gln Gln Val Gly Val Leu
                405                 410                 415

act ggg ctt agc gag ggg ggg tcc caa gct cta caa ggc gga tcg aat  1417
Thr Gly Leu Ser Glu Gly Gly Ser Gln Ala Leu Gln Gly Gly Ser Asn
            420                 425                 430

aga tcg caa ggg caa cca gaa gcc ggg gat ggg gag acc caa ttc ctg  1465

Arg Ser Gln Gly Gln Pro Glu Ala Gly Asp Gly Glu Thr Gln Phe Leu
        435                 440                 445

gat ctg atg aga gcg gta gca aat agc atg agg gag gcg cca aac tct  1513
```

```
Asp Leu Met Arg Ala Val Ala Asn Ser Met Arg Glu Ala Pro Asn Ser
    450                 455                 460

gca cag ggc act ccc caa tcg ggg cct ccc cca act cct ggg cca tcc  1561
Ala Gln Gly Thr Pro Gln Ser Gly Pro Pro Pro Thr Pro Gly Pro Ser
465                 470                 475                 480

caa gat aac gac acc gac tgg ggg tat tgatggacaa aacccagcct        1608
Gln Asp Asn Asp Thr Asp Trp Gly Tyr
                485

gcttccacaa aaacatccca atgccctcac ccgtagtcga cccctcgatt tgcggctcta
1668

tatgaccaca ccctcaaaca aacatccccc tctttcctcc ctccccctgc tgtacaactc
1728

cgcacgccct agataccaca ggcacaatgc ggctcactaa caatcaaaac agagccgagg
1788

gaattagaaa aaa
1801
```

<210> 4
<211> 489
<212> PRT
<213> Vírus da doença de Newcastle

<400> 4

```
Met Ser Ser Val Phe Asp Glu Tyr Glu Gln Leu Leu Ala Ala Gln Thr
  1               5                  10                  15

Arg Pro Asn Gly Ala His Gly Gly Gly Glu Lys Gly Ser Thr Leu Lys
             20                  25                  30

Val Asp Val Pro Val Phe Thr Leu Asn Ser Asp Asp Pro Glu Asp Arg
         35                  40                  45

Trp Ser Phe Val Val Phe Cys Leu Arg Ile Ala Val Ser Glu Asp Ala
     50                  55                  60

Asn Lys Pro Leu Arg Gln Gly Ala Leu Ile Ser Leu Leu Cys Ser His
 65                  70                  75                  80

Ser Gln Val Met Arg Asn His Val Ala Leu Ala Gly Lys Gln Asn Glu
                85                  90                  95

Ala Thr Leu Ala Val Leu Glu Ile Asp Gly Phe Ala Asn Gly Thr Pro
            100                 105                 110

Gln Phe Asn Asn Arg Ser Gly Val Ser Glu Glu Arg Ala Gln Arg Phe
        115                 120                 125

Ala Met Ile Ala Gly Ser Leu Pro Arg Ala Cys Ser Asn Gly Thr Pro
    130                 135                 140

Phe Val Thr Ala Gly Ala Glu Asp Asp Ala Pro Glu Asp Ile Thr Asp
145                 150                 155                 160

Thr Leu Glu Arg Ile Leu Ser Ile Gln Ala Gln Val Trp Val Thr Val
```

```
                165                 170                 175

Ala Lys Ala Met Thr Ala Tyr Glu Thr Ala Asp Glu Ser Glu Thr Arg
            180                 185                 190


Arg Ile Asn Lys Tyr Met Gln Gln Gly Arg Val Gln Lys Lys Tyr Ile
        195                 200                 205

Leu Tyr Pro Val Cys Arg Ser Thr Ile Gln Leu Thr Ile Arg Gln Ser
    210                 215                 220

Leu Ala Val Arg Ile Phe Leu Val Ser Glu Leu Lys Arg Gly Arg Asn
225                 230                 235                 240

Thr Ala Gly Gly Thr Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Val Gly Asp Val Asp
                245                 250                 255

Ser Tyr Ile Arg Asn Thr Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Thr Leu Lys
            260                 265                 270

Tyr Gly Ile Asn Thr Lys Thr Ser Ala Leu Ala Leu Ser Ser Leu Ser
        275                 280                 285

Gly Asp Ile Gln Lys Met Lys Gln Leu Met Arg Leu Tyr Arg Met Lys
    290                 295                 300

Gly Asp Asn Ala Pro Tyr Met Thr Leu Leu Gly Asp Ser Asp Gln Met
305                 310                 315                 320

Ser Phe Ala Pro Ala Glu Tyr Ala Gln Leu Tyr Ser Phe Ala Met Gly
                325                 330                 335

Met Ala Ser Val Leu Asp Lys Gly Thr Gly Lys Tyr Gln Phe Ala Arg
            340                 345                 350

Asp Phe Met Ser Thr Ser Phe Trp Arg Leu Gly Val Glu Tyr Ala Gln
        355                 360                 365

Ala Gln Gly Ser Ser Ile Asn Glu Asp Met Ala Ala Glu Leu Lys Leu
    370                 375                 380

Thr Pro Ala Ala Arg Arg Gly Leu Ala Ala Ala Ala Gln Arg Val Ser
385                 390                 395                 400

Glu Glu Thr Ser Ser Ile Asp Met Pro Thr Gln Gln Val Gly Val Leu
                405                 410                 415

Thr Gly Leu Ser Glu Gly Gly Ser Gln Ala Leu Gln Gly Gly Ser Asn
            420                 425                 430

Arg Ser Gln Gly Gln Pro Glu Ala Gly Asp Gly Glu Thr Gln Phe Leu
        435                 440                 445


Asp Leu Met Arg Ala Val Ala Asn Ser Met Arg Glu Ala Pro Asn Ser
    450                 455                 460

Ala Gln Gly Thr Pro Gln Ser Gly Pro Pro Pro Thr Pro Gly Pro Ser
465                 470                 475                 480


Gln Asp Asn Asp Thr Asp Trp Gly Tyr
                485
```

<210> 5
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador de NP, P1A

<400> 5
ccagaagccg gggatgggaa tagcatgagg gag 33

<210> 6
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador de NP, P1B

<400> 6
ctccctcatg ctattcccat ccccggcttc tgg 33

<210> 7
<211> 34
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador de NP, P2A

<400> 7
ccagaagccg gggatgcgcc aaactctgca cagg 34

<210> 8
<211> 34
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador de NP, P2B

<400> 8
cctgtgcaga gtttggcgca tccccggctt ctgg 34

<210> 9
<211> 35
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador de NP, P3A

<400> 9
ggcaaccaga agccgggtga tggacaaaac ccagc 35

<210> 10
<211> 35
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: iniciador de NP, P3B

<400> 10
gctgggtttt gtccatcacc cggcttctgg ttgcc 35

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Mutante do vírus da doença de Newcastle (NDV) sem um epítopo imunodominante numa proteína de NDV em resultado de uma mutação num gene codificando a proteína, caracterizado por o mutante de NDV não possuir um epítopo situado dentro de uma região da nucleoproteína (NP), possuindo a região a sequência de aminoácidos (447-455) mostrada em SEQ ID NO:1.

2. Mutante de NDV de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, em galinhas, o mutante de NDV induzir anti-soro sem anticorpos que reajam com um epítopo imunodominante situado dentro da região dos aminoácidos (447-455) da NP.

3. Mutante de NDV de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o anti-soro induzido em galinhas não possuir anticorpos que reajam com um péptido 18-mero possuindo a sequência de aminoácidos de NP (443-460) mostrada em SEQ ID NO:2.

4. Mutante de NDV de acordo com as reivindicações 1-3, caracterizado por o mutante compreender uma deleção ou substituição de um ou mais aminoácidos numa região do gene de NP possuindo a sequência de aminoácidos (447-455).

5. Mutante de NDV de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por os aminoácidos 443±1-460±1 estarem eliminados.

6. Mutante de NDV de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por os aminoácidos 443-460 estarem eliminados.

7. Mutante de NDV de acordo coma reivindicação 4, caracterizado por os nucleótidos codificando um ou mais aminoácidos na região estarem substituídos por uma sequência de ácido nucleico heteróloga codificando um epítopo imunodominante de um polipéptido.

8. Mutante de NDV de acordo com as reivindicações 1-7, caracterizado por o mutante de NDV compreender mutações atenuantes adicionais.

9. Mutante de NDV de acordo com as reivindicações 1-8, caracterizado por o mutante de NDV compreender adicionalmente uma sequência de ácido nucleico heteróloga codificando um antigénio de um patogénio de aves.

10. Vacina contra a doença de Newcastle em aves de criação, caracterizada por compreender um mutante de NDV tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-9 numa forma viva ou inactivada, e um transportador ou diluente farmaceuticamente aceitáveis.

11. Vacina de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por a vacina compreender adicionalmente uma estirpe de vacina capaz de induzir protecção contra o NDV ou contra outro patogénio de aves.

12. Vacina de acordo com a reivindicação 11, caracterizada por a estirpe de vacina adicional ser um vector de vacina recombinante capaz de expressar a proteína F ou HN de NDV.

13. Vacina de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por o vector de vacina recombinante ser HVT.

14. Vacina de acordo com as reivindicações 11-13, caracterizada por a estirpe de vacina adicional ser uma estirpe de vacina segura para embriões.

15. Utilização de um mutante de NP de NDV definido nas reivindicações 1-9 para o fabrico de uma vacina contra a doença de Newcastle em aves de criação para administração *in ovo*.

16. Método para determinação de infecção por NDV em aves de criação compreendendo o passo de exame de uma amostra do animal quanto à presença ou ausência de anticorpos reactivos com um epítopo imunodominante situado dentro da região de aminoácidos (447-455) da NP.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por compreender os passos de:

i) incubar uma amostra suspeita de conter anticorpos anti-NDV, com um fragmento da NP compreendendo a região de aminoácidos (447-455) como única região contendo epítopo,

ii) permitir a formação do complexo anticorpo-antigénio, e

iii) detectar a presença do complexo anticorpo-antigénio.

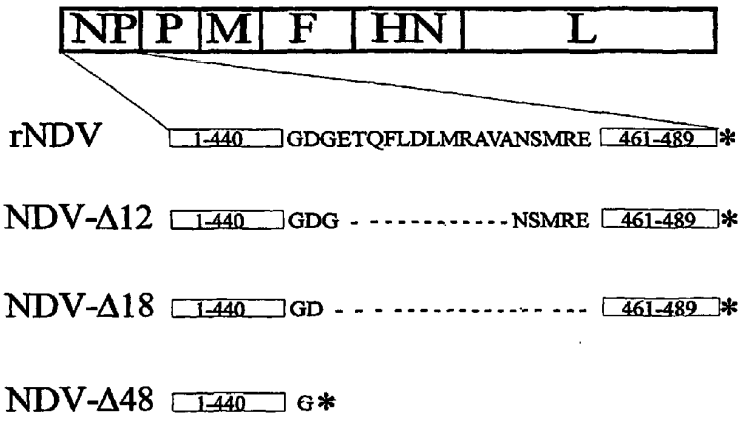
18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o fragmento de NP ser um péptido 18-mero possuindo a sequência de aminoácidos (443-460).

19. Estojo de teste de diagnóstico adequado para a realização de um método de acordo com as reivindicações 16-18 contendo um fragmento de NP compreendendo a região de aminoácidos (447-455), de preferência a região de aminoácidos (443-460).

20. Utilização de uma vacina definida nas reivindicações 10-14 num programa de controlo da doença de Newcastle para distinguir os animais vacinados dos animais infectados com NDV de ocorrência natural.

Lisboa,

Figura 1


NP
P
M
F
HN
L
rNDV
1-440
GDGETQFLDLMRAVANSMRE
461-489
*
NDV-Δ12
1-440
GDG
NSMRE
461-489
*
NDV-Δ18
1-440
GD
461-489
*
NDV-Δ48
1-440
G*

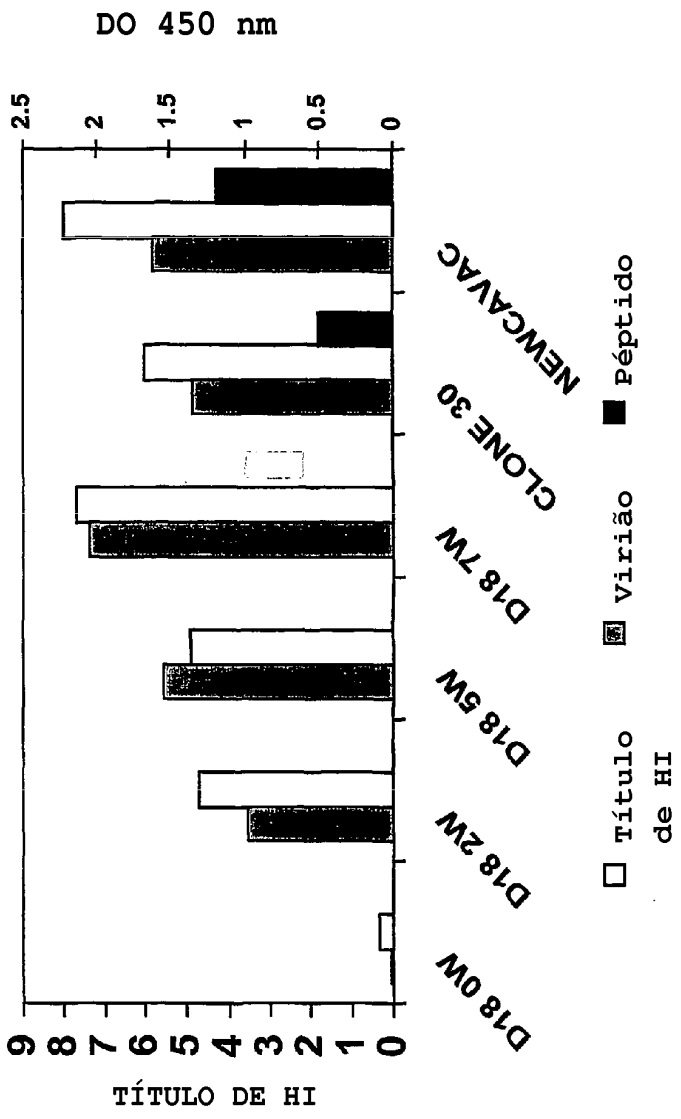


Figura 2 Resposta serológica de galinhas SPF imunizadas com vacinas contra a ND inactivadas ou vivas, NDV-Δ18

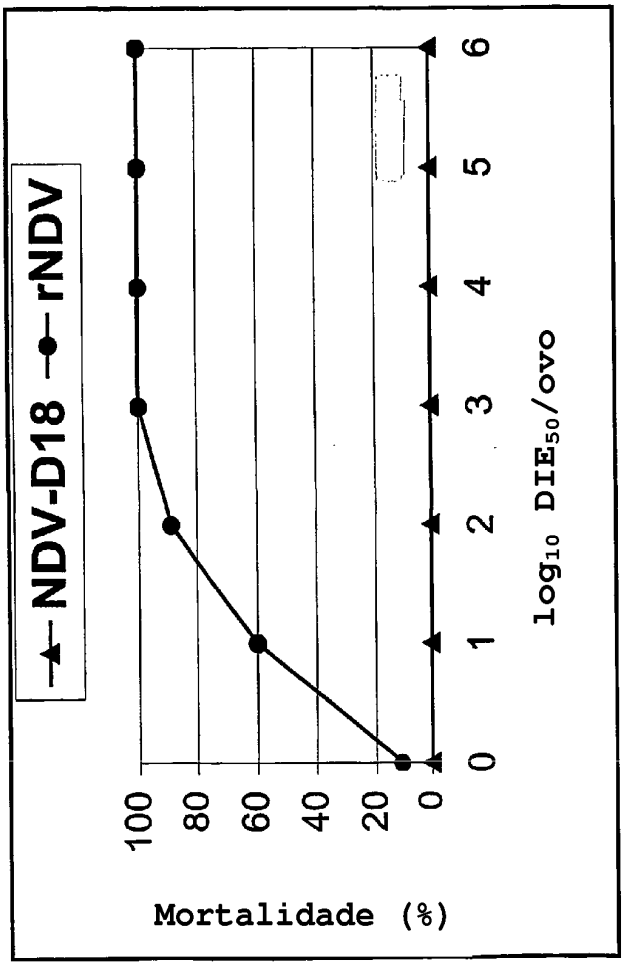


Figura 3 Atenuação de NDV-Δ18

Figura 4 NDV-Δ18 *in ovo* sozinho ou combinado com outra vacina vector

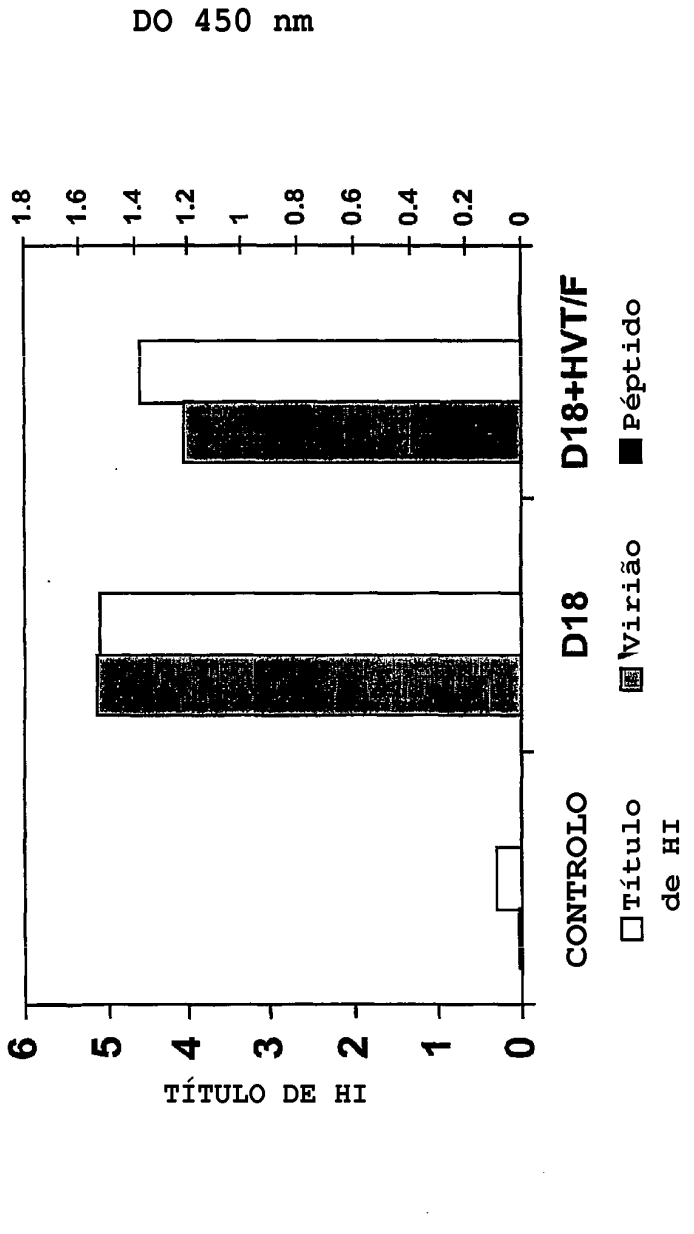
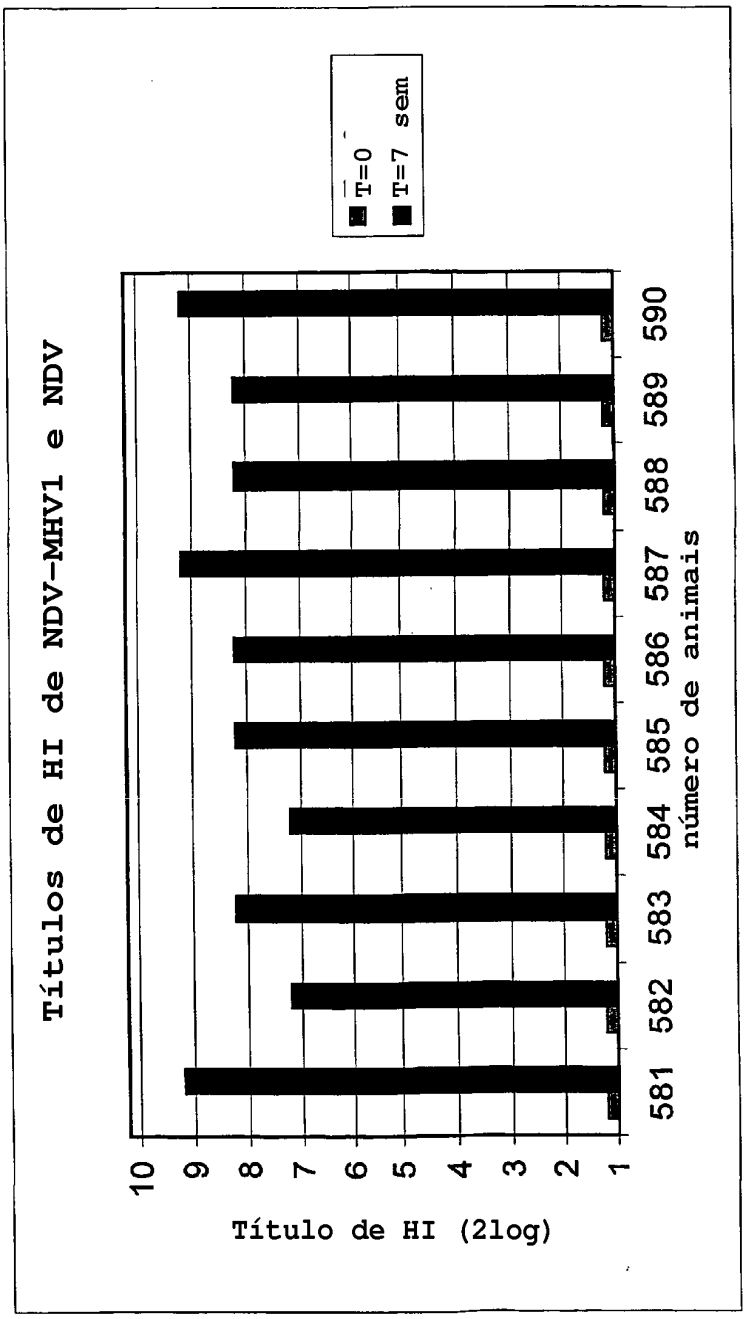


Figura 5 Medição de soros de galinhas em HI



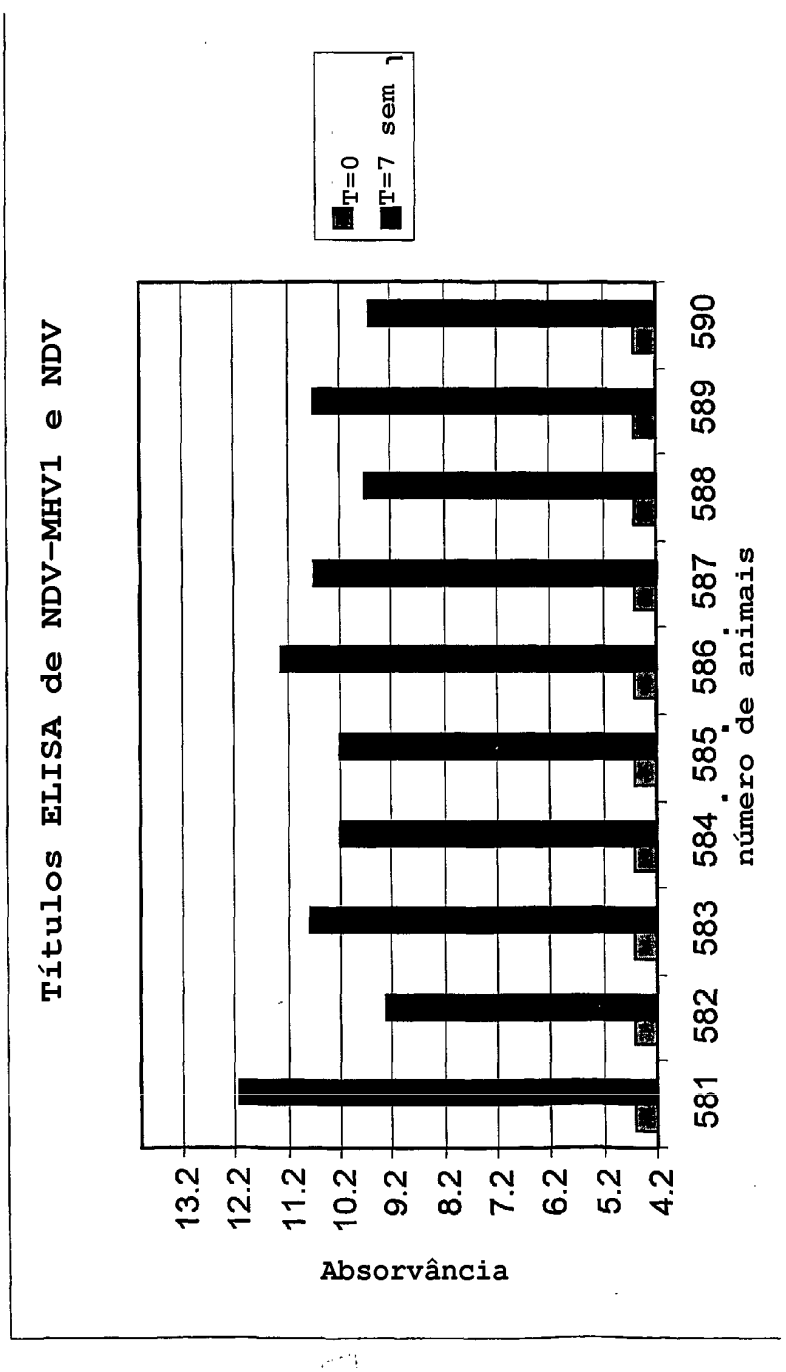


Figura 6 Medição de soros de galinha em ELISA de vírus inteiro NDV

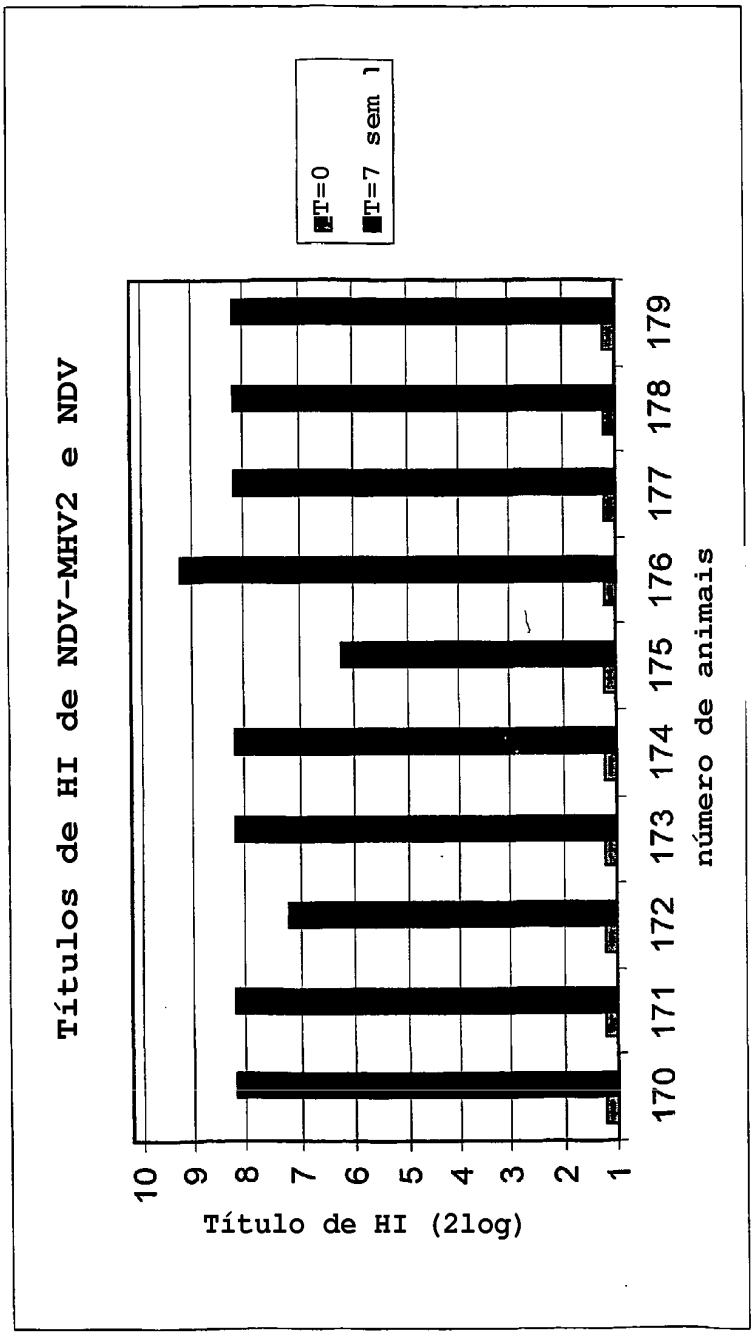


Figura 7 Medição de soros de galinha em HI

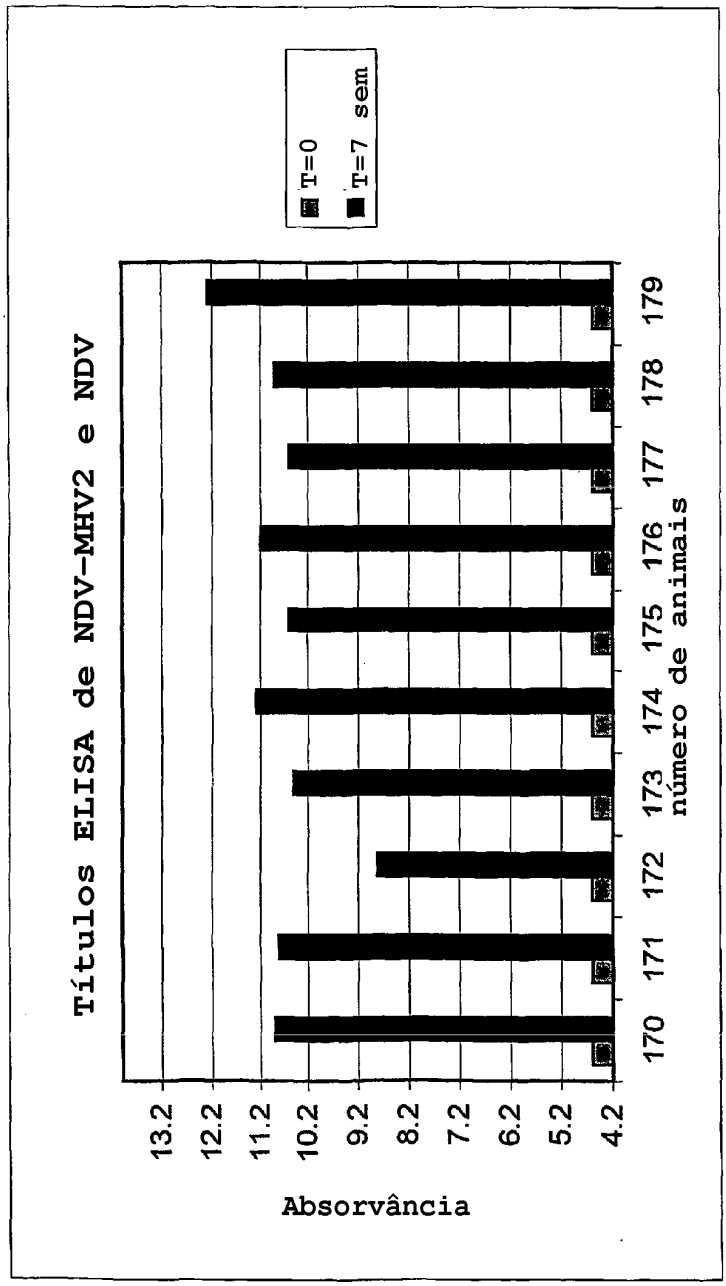


Figura 8 Medição de soros de galinha em ELISA de vírus inteiro NDV

Figura 9 Medição de soros de galinha em ELISA de MHV

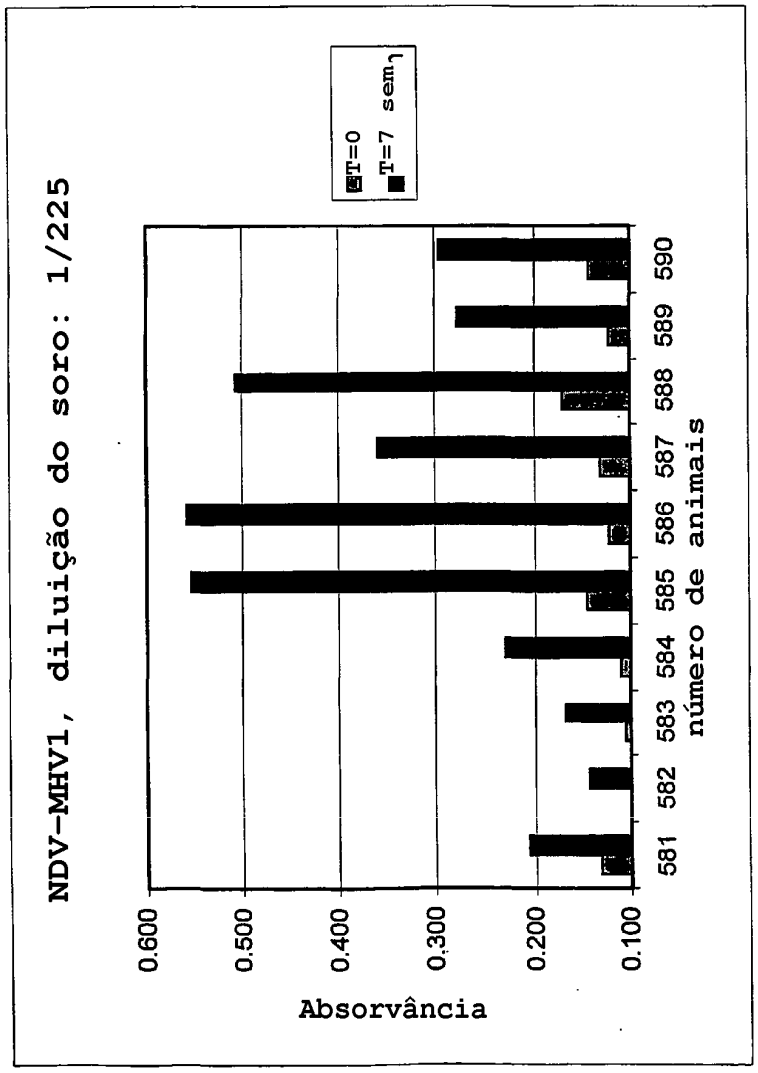
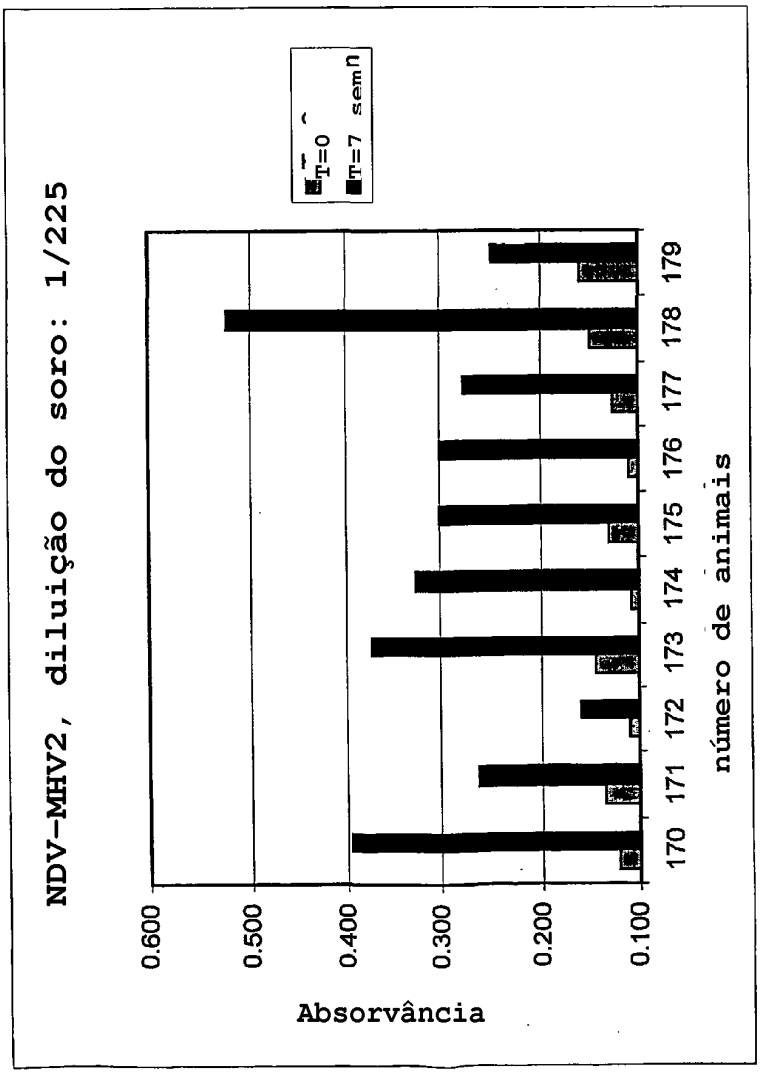


Figura 10 Medição de soros de galinha em ELISA de MHV



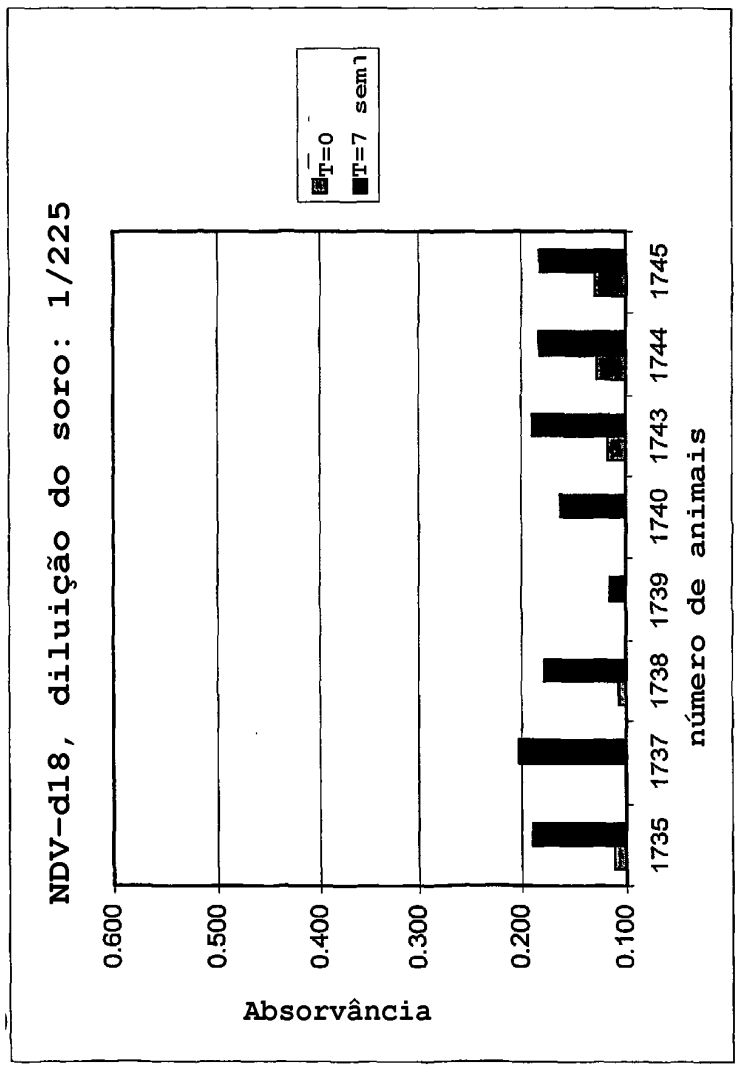


Figura 11 Medição de soros de galinha em ELISA de MHV