



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

(21) **PI0709613-5 A2**

(22) Data de Depósito: 15/03/2007
(43) Data da Publicação: 19/07/2011
(RPI 2115)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/11 2006.01
C12N 15/86 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA PRODUZIR UM VETOR DE VÍRUS MONONEGAVIRALES RECOMBINANTE, VETOR DE VÍRUS MONONEGAVIRALES RECOMBINANTE, E, VACINA CONTRA UM PATÓGENO MICROBIANO**

(30) Prioridade Unionista: 15/03/2006 EP 06111222.3,
15/03/2006 US 60/783,193

(73) Titular(es): Intervet International B.V.

(72) Inventor(es): Angela Römer-Oberdörfer, Jutta Veits

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007052429 de 15/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/104782 de 20/09/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR UM VETOR DE VÍRUS MONONEGAVIRALES RECOMBINANTE, VETOR DE VÍRUS MONONEGAVIRALES RECOMBINANTE, E, VACINA CONTRA UM PATÓGENO MICROBIANO. A presente invenção proporciona um método para produzir um vetor de vírus Mononegavirales recombinante hospedando uma unidade de transcrição adicional compreendendo um gene estranho operativamente ligado com uma sequência de início de gene (GS) de vírus Mononegavirales a montante e uma sequência de final de gene (GE) de vírus Mononegavirales a jusante, caracterizado pelo fato de que a sequência de gene estranho codifica uma proteína, cuja proteína contém um segmento de pelo menos três aminoácidos básicos e a sequência de nucleotídeos dos códons codificadores destes aminoácidos não contém uma sequência que pode ser reconhecida pela polimerase viral do vírus Mononegavirales como uma sequência de final de gene (GE).



PI0709613-5

METODO PARA PRODUZIR UM VETOR DE VÍRUS MONONEGAVIRALES RECOMBINANTE, VETOR DE VÍRUS MONONEGAVIRALES RECOMBINANTE, E, VACINA CONTRA UM PATÓGENO MICROBIANO”

5 Esta invenção refere-se a um vetor de vírus Mononegavirales recombinante hospedando uma unidade de transcrição adicional compreendendo um gene estranho operativamente ligado com uma seqüência de início de gene (GS) de vírus Mononegavirales a montante e uma seqüência de final de gene (GE) de vírus Mononegavirales a jusante. Esta invenção
10 adicionalmente se refere a um método para a produção de um tal vetor de vírus Mononegavirales recombinante, e a uma vacina compreendendo um tal vetor de vírus Mononegavirales recombinante.

 Vírus vivos que são capazes de se replicarem em um hospedeiro infectado induzem uma resposta imune forte de duração longa
15 contra seus antígenos expressados. São efetivos na geração de respostas imunes tanto mediadas por células quanto humorais, bem como estimulam rotas de citocina e de quimiocina. Portanto, vírus atenuados, vivos oferecem vantagens distintas sobre composições de vacina baseadas em imunógenos quer de subunidade quer inativos que tipicamente grandemente apenas
20 estimulam o ramo humoral do sistema imune.

 Durante a última década tecnologia de DNA recombinante tem revolucionado o campo de engenharia genética dos genomas de ambos os vírus de DNA e de RNA. Em particular, agora é possível introduzir genes estranhos dentro do genoma de um vírus de tal modo que sob replicação do
25 vírus vetor novo em um animal hospedeiro é expressada uma proteína estranha que pode exercer efeitos biológicos no animal hospedeiro. Como tais, vírus vetores recombinantes têm sido explorados não apenas para o controle e a prevenção de infecções microbianas, mas também para desenvolvimento de terapias alvo para doenças não-microbianas tais como

malignidades e em terapia de gene.

A geração de vírus de RNA de fita negativa, não-segmentada (vírus da ordem Mononegavirales) inteiramente de cDNA clonado por uma técnica designada como “genética reversa”, primeiro relatada em 1994 (Schnell et al., EMBO J 13, 4195-4203, 1994), tem tornado possível o uso também de vírus da ordem Mononegavirales (MV) como vetores. desde então, têm sido publicados estudos que descrevem o uso de muitos vírus da ordem MV como vetores virais para expressar antígenos estranhos de um patógeno almejando o desenvolvimento de vacinas contra aquele patógeno.

A ordem de Mononegavirales é classificada em quatro famílias principais: Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae e Bornaviridae. Vírus pertencendo a estas famílias possuem genomas que são representados por uma única molécula de RNA de senso negativo (-), i.e. a polaridade do genoma de RNA é oposta à polaridade de RNA mensageiro (mRNA) que é designado como de senso positivo (+). A classificação dos vírus MV veterinários e de humano principais é apresentada na tabela abaixo:

Tabela 1: Classificação de vírus dentro da ordem de Mononegavirales

Família	Gênero	Espécie
Rhabdoviridae	Lyssavirus	Vírus da Raiva (RV)
	Vesiculovirus	Vírus da Estomatite Vesicular (VSV)
	Novirhabdovirus	Vírus da Necrose Hematopoiética Infecciosa (IHNV)
Paramyxoviridae	Respirovirus	Vírus Sendai (SeV)
		Vírus da Parainflunza Humana de tipo 1 e de tipo 3 (hPIV 1/3)
		Vírus da Parainfluenza Bovina de tipo 3 (bPIV 3)
	Morbillivirus	Vírus do Sarampo (MV)
		Vírus da Peste Bovina
		Vírus da Cinomose Canina (CDV)
	Rubulavirus	Vírus Símio 5 (SV-5)
		Vírus da Parainfluenza Humana de tipo 2 (hPIV 2)
		Vírus da Caxumba
	Avulavirus	Vírus da Doença de Newcastle (NDV)
	Pneumovirus	Vírus Sincial Respiratório Humano (hRSV)
		Vírus Sincial Respiratório Bovino (bRSV)

Filoviridae	Vírus tipo Ebola-	Vírus Ebola
		Vírus Marburg

A organização genômica e os detalhes do ciclo de vida dos vírus da ordem MV estão bem entendidos hoje em dia e são revistos por vários autores (Neumann et al., J. Gen. Virology 83, 2635-2662, 2002; Whelan et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203, 63119, 2004; Conzelmann, K., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203, 1-41, 2004). Embora vírus Mononegavirales possuam diferentes hospedeiros e distintas propriedades morfológicas e biológicas, possuem muitas características comuns, tais como organização genômica e elementos essenciais para seu típico modo de replicação e de expressão de gene, ilustrando que têm originado de um ancestral comum. São vírus envelopados que se replicam nos citoplasmas da célula e produzem mRNAs que não são editados.

Um vírus Mononegavirales consiste de duas unidades funcionais maiores, um complexo de ribonucleoproteína (RNP) e um envelope. As seqüências de genoma completas para vírus representativos dos gêneros de todas as famílias mencionadas acima têm sido determinadas. Os genomas variam em tamanho de cerca de 9.000 nucleotídeos a cerca de 19.000 e contêm de 5 a 10 genes. A estrutura e a organização dos genomas dos vírus MV são muito similares e são governadas por seu modo particular de expressão de gene. Todos os genomas de vírus MV compreendem três genes de núcleo codificadores: uma nucleoproteína (N ou NP), uma fosfoproteína (P) e uma RNA-polimerase dependente de RNA (L). O envelope viral é composto de uma proteína de matriz (M) e uma ou mais glicoproteínas de transmembrana (e.g. proteínas G, HN e F) que desempenham um papel em montagem/germinação de vírus bem como na fixação do vírus em célula e/ou entrada do vírus na célula. Dependendo do gênero o repertório de proteínas é estendido pelas proteínas acessórias que exibem certas funções regulatórias específicas em transcrição e replicação de vírus ou que estão envolvidas em reações de hospedeiro - vírus (e.g. proteínas

C, V e NS). A ordem do gene de vírus MV está elevadamente conservada com os genes de núcleo N e P, na ou próxima da terminação 3' e com o gene grande (L) na posição distal 5'. O M, os genes de glicoproteína de superfície, bem como os outros genes acessórios, estão localizados entre os genes N, P e L.

No complexo RNP, o RNA genômico ou antigenômico está firmemente encapsidado com a proteína N e está associado com a RNA-polimerase dependente de RNA que consiste da proteína L e P. Após infecção de uma célula, o complexo RNP, mas não o genoma de RNA nu, serve como um modelo para duas funções de síntese de RNA distintas, i.e., transcrição de mRNAs subgenômicos e replicação de RNA genômico de comprimento total.

Todos os genes serialmente arranjados estão separados por denominadas estruturas “de junção de gene”. Uma junção de gene compreende uma seqüência de “final de gene” (GE) conservada, uma “região intergênica” (IGR) não-transcrita e uma seqüência de “início de gene” (GS) conservada. Estas seqüências são tanto suficientes quanto necessárias para a transcrição de gene. Durante a transcrição cada gene é seqüencialmente transcrito em mRNA pela viral RNA-polimerase dependente de RNA que inicia o processo de transcrição na extremidade 3' do RNA genômico na primeira seqüência GS. Em cada junção de gene transcrição é interrompida como um resultado do desengatamento da RNA polimerase na seqüência GE. Reinício da transcrição ocorre na subsequente seqüência GS, embora com uma eficiência reduzida. Como um resultado deste processo interrompido, também chamado de um processo de “interrupção-iniciação”, atenuação da transcrição ocorre em cada junção de gene como um resultado do qual genes proximais 3' em um genoma de vírus MV são transcritos mais abundantemente do que os genes a jusantes sucessivos. A forma modular de transcrição de genes de vírus MV na qual cada gene é parte de um cistron separado ou de uma unidade de transcrição separada torna estes vírus

extremamente adequados para a inserção e a expressão de genes estranhos. Cada unidade de transcrição em um genoma de vírus MV compreende os seguintes elementos: 3'-GS-matriz de leitura aberta (ORF)-GE-5'.

5 Nas terminações genômicas -3'- e -5' todos os genomas de vírus MV possuem uma região não-transcrita curta chamada "líder" (cerca de 40-50 nt) e "reboque" (cerca de 20-600 nt), respectivamente. As seqüências líder e reboque são seqüências essenciais que controlam a replicação de RNA genômico A, encapsidação e empacotamento virais.

10 Tecnologia de genética reversa e resgate de vírus MV infeccioso têm tornado possível a manipulação de seu genoma de RNA através de sua cópia de cDNA. O complexo de iniciação de replicação mínima requerido para sintetizar RNA viral é o complexo RNP. Vírus MV infeccioso pode ser resgatado por co-expressão intracelular de RNAs (anti)genômicos e as proteínas de suporte apropriadas de plasmídeos acionados por (T7) RNA polimerase. Desde o relatório inicial em 1994 de Schnell et al., 1994 (supra), recuperação confiável de muitas espécies de vírus MV tem sido alcançada baseado no protocolo original (ou suas ligeiras variações).

20 Doença de Newcastle e gripe aviária são doenças importantes de aves domésticas, que podem causar perdas econômicas severas na indústria de aves domésticas em todo o mundo. O vírus da doença de Newcastle é um vírus de RNA de fita negativa, não-segmentada dentro da ordem de MV. O genoma, que é de cerca de 15 kb em comprimento, contém seis genes que codificam a nucleoproteína (NP), fosfoproteína e proteína V (P/V), proteína de matriz (M), proteína de fusão (F), proteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) e RNA-polimerase dependente de RNA ou proteína grande (L). Os genes NDV estão arranjados seqüencialmente na ordem 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', e estão separados por regiões intergênicas de comprimento diferente. Todos os genes são precedidos por uma seqüência de início de gene (GS) que

é seguida por uma região não-codificadora, a matriz de leitura aberta codificadora das proteínas de NDV, uma segunda região não-codificadora e a sequência de final de gene (GE). O comprimento do genoma de NDV é um múltiplo de seus que tem que ser considerado para a introdução de genes estranhos.

Gripe aviária (AI) é uma doença de ave doméstica caracterizada por sinais respiratórios suaves a doença severa com mortalidade alta. O agente causador é um vírus de gripe aviária A (AIV) pertencendo à família Orthomyxoviridae. AIV contém oito segmentos de RNA genômico de polaridade negativa que codificam 10 proteínas. Baseado na antigenicidade das glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (N), vírus AI são de subtipo. Até agora, são conhecidos 16 subtipos de hemaglutinina (H1 - H16) e nove subtipos de neuraminidase (N1 - N9). Anticorpos para H e N são importantes na resposta imune humoral e inibem infecção ou previnem doença.

Vírus da doença de Newcastle e da gripe aviária podem ser agrupados em dois patótipos distintos de acordo com sua virulência. Sintomas causados por AIV patogênico baixo AIV (LPAI) ou NDV lentogênico são considerados de relevância menor. Em contraste, gripe aviária elevadamente patogênica (HPAI) e doença de Newcastle causada por vírus virulentos elevados (NDV: cepas mesogênicas e velogênicas) são doenças notificáveis.

Embora vacinação rotineira contra NDV com cepas de NDV lentogênicas seja realizada para proteger galinha contra cepas de NDV elevadamente virulentas, vacinação contra HPAI não é realizada na maioria dos países, porque HPAI é controlada por uma estratégia de erradicação. Contudo, vacinação pode ser usada como uma estratégia para minimizar perdas e reduzir a incidência de doença. Imunidade induzida por vacinas é específica para subtipo, o que significa que uma vacina de subtipo H5 pode proteger contra AIV H5 mas não contra outros subtipos H. Normalmente,

replicação do vírus da gripe é restrita aos pulmões porque hemaglutinina de vírus de LPAI pode ser clivada apenas por triptase Clara, a serina protease restrita aos pulmões. Até agora, todos os vírus de HPAI têm sido dos subtipos H5 e H7. Estes vírus de HPAI contêm múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem H de modo que ela pode ser clivada por enzimas semelhantes à subtilisina e furina ubíquas nas subunidades HA1 e HA2. Tais vírus portanto podem crescer em outros órgãos.

Vacinas de subtipos H5 e H7 podem proporcionar proteção de galinhas e perus contra sinais clínicos e morte após infecção com HPAI. Em adição às vacinas de AIV inteiro baseadas em óleo convencionais, tem sido mostrado experimentalmente que as vacinas de vírus vetor, proteína de subunidade e DNA são efetivas para imunização contra AI. Desde o advento de genética reversa para vírus diferentes a geração de vírus recombinantes para uso como vetores de vacina é uma aplicação importante. Vírus de RNA de fita negativa recombinantes diferentes expressando proteínas estranhas têm sido construídos. Também, a hemaglutinina de AIV foi inserida em vírus vetores diferentes como o vírus da laringotraqueite infecciosa (ILTV) (Luschow et al., *Vaccine* 19, 4249-59, 2001), vírus da Peste Bovina (Walsh et al., *J. Virol.* 74, 10165-75, 2000) e vírus da estomatite vesicular (VSV) (Roberts et al., *J. Virol.* 247, 4704-11, 1998). Também NDV foi usado para a expressão de hemaglutinina de AIV. O gene de hemaglutinina da gripe A/WSN/33 foi inserido entre os genes P e M de cepa Hitchner B1 de NDV. Este recombinante protegeu camundongos contra infecção letal embora houvesse uma perda de peso detectável em camundongos que se recuperaram totalmente dentro de 10 dias Nakaya et al. (*J. Virol.* 75, 11868-73, 2001). Um outro NDV recombinante com o mesmo sítio de inserção para gene estranho expressou o H7 de um LPAI mas apenas 40 % das galinhas vacinadas foram protegidas de ambos HPAI e NDV velogênico (Swayne et al., *Avian Dis.* 47, 1047-50, 2003).

Proteínas HA de gripe, são sintetizadas como proteínas precursoras (HA₀). Após tradução o polipeptídeo precursor HA₀ é clivado em um resíduo de arginina (Arg) conservado em duas subunidades, Ha₁ e HA₂. Esta clivagem contribui para a infectividade do vírus. (Quanto mais eficiente a clivagem do precursor HA mais virulento parece ser o vírus). As regiões de junção HA₁-HA₂ de vários vírus da gripe têm sido analisadas. Foi descoberto que as cepas patogênicas contêm um segmento de aminoácidos básicos adjacente ao sítio de clivagem. (Senne et al., *Avian Diseases*, 40: 425-437, 1996; Steinhauser, *Virology*, 258, 1-20, 1999; Kawaoka e Webster, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 85, 1988.).

Especialmente os vírus elevadamente patogênicos são importantes em termos da proteção que deve ser proporcionada por uma vacina contra gripe.

Contudo, quando estes tipos de proteínas, isto é, proteínas como as proteínas HA de uma grupo H5 patogênica, que possuem um segmento básico de aminoácidos em sua seqüência, foram inseridos em um vetor de mononegavirais, foram encontrados certos problemas.

Primeiro a seqüência de gene pareceu instável em uma certa extensão. Após várias passagens em ovo de um vetor de NDV no qual um gene H5 havia sido inserido (NDVH5), ocorreram mutações espontâneas dentro da parte da seqüência de gene codificadora do segmento básico de aminoácidos.

Em adição, a seqüência codificadora do segmento de aminoácidos básicos provavelmente contém uma seqüência que é reconhecida por um mononegavírus como uma seqüência de final de gene (GE). Uma visão geral de seqüências de GE para mononegavirais é dada em Whelan, (*Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 283, 61-119, 2004). As seqüências GE para mononegavirais são caracterizadas por uma seqüência conservada comum: nUUUU.

Foi verificado que partes da seqüência codificadora de um segmento de aminoácidos básicos, tal como presente adjacente ao sítio de clivagem da proteína HA do vírus da gripe aviária de tipo H5 patogênico, parecem-se com a seqüência GE reconhecida pelas polimerases do vetor mononegavirales como uma seqüência GE. Isto pode levar a níveis reduzidos de expressão de proteína da proteína de comprimento total, que pode afetar a eficácia de uma vacina baseada em um tal vetor.

Um objetivo desta invenção é proporcionar um vetor de vírus MV recombinante que exhibe um nível de expressão mais alto de uma proteína codificada por um gene estranho inserido no genoma do vírus vetor e/ou que mostra uma imunogenicidade aumentada do que os vetores de vírus MV existentes.

Os presentes inventores têm verificado que este objetivo pode ser alcançado por um vírus Mononegavirales recombinante de acordo com a invenção.

A presente invenção proporciona um método para produzir um vetor de vírus Mononegavirales recombinante hospedando uma unidade de transcrição adicional compreendendo um gene estranho operativamente ligado com uma seqüência de início de gene (GS) de vírus Mononegavirales a montante e uma seqüência de final de gene (GE) de vírus Mononegavirales a jusante, caracterizado pelo fato de que a seqüência de gene estranho codifica uma proteína, cuja proteína contém um segmento de pelo menos três aminoácidos básicos, citado segmento consistindo de resíduos de Arginina (Arg) e/ou Lisina (Lys) e contendo pelo menos uma Lisina, no qual a seqüência de nucleotídeos do gene estranho é selecionada em um tal modo que ela não contém uma seqüência que pode ser reconhecida pela polimerase viral do vírus mononegavirales como uma seqüência de final de gene (GE).

Uma seqüência que pode ser reconhecida pela polimerase viral do vírus mononegavirales como uma seqüência de final de gene é uma

seqüência que incluiria a seqüência conservada mínima compartilhada pela maioria das seqüências GE de mononegavirales, a saber a/uCUUUU (no senso negativo, que é o senso genômico para um mononegavírus). Em um senso positivo (nível de cDNA) este motivo é t/aGAAAA).

5 Para o vetor de mononegavirales específico usado a seqüência GE específica conhecida na arte aplicaria (Whelan et al. supra). Para NDV por exemplo, a seqüência GE listada em Whelan é aaucUUUUUUu. (senso -, que é o senso genômico para mononegavirales). No senso + (nível de cDNA), a seqüência portanto seria caracterizada por um segmento de resíduos de
10 adenina: gAAAAAA.

Em um vetor de acordo com a invenção uma tal seqüência GE não ocorre dentro da seqüência codificadora da proteína estranha.

Há várias opções abertas para a pessoa experiente para alcançar este objetivo. Pode ser selecionada uma seqüência estranha que, por
15 natureza não contém a seqüência que pode ser reconhecida pela polimerase viral do vírus mononegavirales como uma seqüência de final de gene (GE).

Por exemplo, quando a seqüência de gene estranho codifica uma proteína viral, o gene estranho pode ser obtido de uma cepa do vírus que, por natureza, carrega um gene codificador desta proteína cuja seqüência
20 codificadora não inclui uma seqüência GE potencial (enquanto que o mesmo gene em outra cepa do vírus a inclui).

Contudo, visto que são baixas as chances de que uma tal seqüência de gene variante possa ser obtida de um vírus de tipo selvagem, é preferido mutar uma seqüência de tipo selvagem do gene estranho por
25 mutagênese sítio-direcionada para alterar a seqüência em uma tal extensão que a seqüência GE potencial não esteja mais presente.

O vetor de vírus Mononegavirales recombinante resultante no qual o gene estranho codifica uma proteína cuja proteína contém um segmento de pelo menos três aminoácidos básicos, citado segmento

consistindo de resíduos de Arginina (Arg) e/ou Lisina (Lys) e contendo pelo menos uma Lisina, cujo gene estranho não contém uma sequência que pode ser reconhecida pela polimerase viral do vírus mononegavirales como a sequência de final de gene, é igualmente parte da invenção.

5 A parte do gene estranho que necessita ser modificada, especialmente no caso onde a proteína estranha é a proteína HA de um vírus da gripe aviária H5 patogênico, pode ser parte de uma sequência de gene estranho de tipo selvagem codificadora de um segmento de pelo menos três aminoácidos básicos.

10 Um segmento de aminoácidos básicos é definido como incluindo pelo menos três aminoácidos selecionados do grupo consistindo de Lisina (código de uma letra: K) e Arginina (código de uma letra: R), no qual pelo menos um dos resíduos de aminoácido é Lisina. Isto incluiria a sequência KKK, e combinações de 2K com 1R (KKR, KRK, RKK), e combinações de
15 1K e 2R (KRR, RKR, e RRK), mas também segmentos mais longos de aminoácidos básicos incluindo as sequências de 3 aminoácidos específicas aqui mencionadas. Como pode ser visto de Steinhauser et al. (supra) os segmentos de aminoácidos básicos adjacentes aos sítios de clivagem nas proteínas HA dos vírus de gripe patogênicos podem ser mais longos, e podem
20 incluir sequências como RRKKR, ou RRRKK.

 Códons codificadores de Lisina são aaa e aag, enquanto que códons codificadores de Arginina incluem aga e agg. Tem sido verificado que, especialmente na sequência codificadora da proteína HA dos vírus da gripe aviária patogênicos H5, a sequência codificadora do segmento básico de
25 aminoácidos adjacente ao sítio de clivagem da proteína pode conter o motivo de GE t/aGAAAA.

 Para modificar a sequência GE presente dentro do gene estranho de tipo selvagem, pelo menos uma mutação pode ser introduzida por meio da qual uma “A”, do segmento de adenina dentro de uma sequência GE,

possuindo o motivo comum (t/aGAAAA), originalmente presente na sequência de gene estranho de tipo selvagem, é substituído por outro nucleotídeo. Na prática, se uma mutação é introduzida na região “aaaa” que é parte de uma sequência reconhecida como uma sequência GE, pelo menos um dos nucleotídeos adenina teria que ser substituído por outro nucleotídeo (por exemplo uma guanidina (“g”)).

Quando se altera a sequência por mutagênese sítio-direcionada estas alterações preferivelmente são silenciosas (significando que a(s) mutação(ões) não acarreta(m) uma mutação em nível de aminoácido). Contudo mutações em nível de ácido nucleico que levam às mutações conservadas no nível de aminoácido (significando que um aminoácido básico é substituído por outro aminoácido básico, e.g. L torna-se R, ou R torna-se L) também podem ser aceitáveis. Por exemplo, onde, na parte da sequência de gene de tipo selvagem codificadora do segmento básico de aminoácidos, pelo menos um resíduo de Lisina é codificado pelo códon “aaa” este códon pode ser mutado em “aag” no gene estranho modificado inserido em um vetor da invenção. Ou, onde na sequência de tipo selvagem um resíduo particular de Arginina que forma parte do segmento básico de aminoácidos é codificado por “aga”, este códon pode ser mutado em “agg” no gene tal como é feito parte de um vetor de acordo com a invenção.

Pelo menos um códon “aaa” (codificador de uma Lisina) na sequência de tipo selvagem pode ser mutado para criar a sequência de gene estranho modificada que é incorporada em um vetor da invenção. Uma tal mutação pode envolver substituição do códon “aaa” por um códon “aag”. Vetores nos quais o por exemplo o segmento de aminoácidos básicos contém pelo menos dois aminoácidos Lisina em série, e nos quais pelo menos uma destas Lisinas é codificada pelo códon “aag” são preferidos, mas duas ou mais mutações podem ser feitas. Por exemplo, onde a sequência codificadora conteria dois códons “aaa” em série, ambos podem ser substituídos pelos

códons “aag”.

Especialmente em vista da estabilidade desejada do vetor resultante, é preferido a introdução de pelo menos duas mutações no gene estranho. Onde o gene estranho contém dois códons “aaa” em série, ambos
5 são preferivelmente mutados, e podem ser substituídos por códons aag.

Bons resultados foram obtidos com vetores nos quais a parte do gene estranho codificador do segmento básico de aminoácidos continha uma mutação em cada um dos três ou quatro códons consecutivos codificadores de um aminoácido básico. Nos casos onde o segmento básico
10 inclui apenas três aminoácidos, três mutações podem ser feitas, mas quando houver quatro aminoácidos básicos ou mais, mais mutações podem ser realizadas.

Por exemplo, onde a seqüência de tipo selvagem contém a seqüência de aminoácidos RRKK, codificada pela seqüência de nucleotídeos
15 aga aga aaa aaa (seqüência de senso +, na qual o motivo de seqüência GE potencial está sublinhado), esta seqüência codificadora pode ser mutada em agg agg aag aag ainda codificando RRKK.

O vetor de vírus Mononegavirales é preferivelmente um vetor de vírus da Doença de Newcastle (NDV) e o gene estranho a proteína de um
20 vírus da gripe aviária H5 patogênico.

Bons resultados foram obtidos com um vetor de NDV no qual um gene HA modificado de uma gripe aviária H5 patogênica havia sido incorporada (NDVH5m).

O gene HA havia sido incorporado na região intergênica entre
25 os genes de fusão (F) de NDV e de hemaglutinina-neuraminidase (HN) do vetor de NDV. O gene HA foi um gene H5 modificado, no qual a seqüência de tipo selvagem “aga aga aaa aaa” havia sido modificada para uma seqüência “agg agg aag aag” de acordo com o método da presente invenção.

Este vetor produziu significativamente mais transcritos HA de

comprimento total, expressou níveis significativamente mais altos de HA e também incorporou mais proteínas HA em seu envelope.

Além disso, NDVH5m estavelmente expressou o gene HA modificado para mais do que 10 passagens em ovo. Imunização de galinhas com NDVH5m induziu anticorpos específicos para AIVH5 e NDV e protegeu galinhas contra doença clínica após desafio com uma dose letal de NDV velogênico ou AIV elevadamente patogênico, respectivamente. Notavelmente, vazamento de vírus da gripe não foi observado. Ademais, imunização com NDVH5m permitiu discriminação sorológica de animais vacinados e infectados com vírus de campo AIV baseado em anticorpos contra a nucleoproteína (NP) de AIV. Portanto, NDVH5m recombinante é adequado como uma vacina bivalente contra NDV e AIV, e pode ser usado como vacina marcadora para o controle de gripe aviária (AI).

Métodos para a preparação de um vetor de vírus MV recombinante hospedando uma unidade de transcrição adicional compreendendo um gene estranho são bem conhecidos na arte.

Mais em particular, neste método a molécula de ácido nucleico isolada e o genoma do vírus MV são usados em sua forma de cDNA (senso +). Isto permite fáceis manipulação e inserção das moléculas de ácido nucleico desejadas no genoma viral.

Em geral, várias partes do genoma poderiam ser usadas para a inserção do gene estranho, entre dois genes, i.e. em regiões intergênicas (IGR), regiões não-codificadoras 3' ou 5' de um gene bem como extremidade proximal-promotor-3' (antes dos genes N/NP) ou distal-5' (após os genes L) de um genoma.

O gene estranho poderia ser vantajosamente inserido antes do gene N/NP, entre NP-P, P-M, M-G/F, G/F-HN, HN-L e após o gene L.

O modo mais simples é o uso de uma sequência de reconhecimento de enzima de restrição (RE) existente em um destes sítios

pelo corte com a enzima e introdução de um cassete de transcrição apropriado. Visto que seqüências de reconhecimento de enzima de restrição naturalmente existentes nem sempre estão localizadas na localização desejada, os sítios de reconhecimento de RE poderiam ser introduzidos no

5 genoma convencionalmente por mutagênese sítio-direcionada ou por PCR.

A composição do cassete de transcrição a ser inserido depende do sítio de inserção. Por exemplo, no caso de um cassete de transcrição ser inserido em uma IGR o cassete pode compreender os seguintes elementos: 3'-sítio de reconhecimento de RE-GS-região não-codificadora-ORF (de gene

10 estranho)-região não-codificadora-GE-sítio de reconhecimento de RE - 5'.

Alternativamente, no caso de um cassete de transcrição ser introduzido em uma região não-codificadora 5' de um gene de vírus MV natural o cassete pode ser composto de: 3' - sítio de reconhecimento de RE - GE-IGR-GS-região não-codificadora-ORF (de gene estranho)-região de não

15 codificação-sítio de reconhecimento de RE - 5'.

Similarmente, no caso de um cassete de transcrição ser introduzido em uma região não-codificadora 3' de um gene de vírus MV natural o cassete de expressão pode ser composto de: 3' - sítio de reconhecimento de RE-região não-codificadora-ORF (de gene estranho)-

20 região não-codificadora-GE-IGR-GS-sítio de reconhecimento de RE - 5'.

A preparação de tais cassetes de transcrição e a sua inserção em um genoma de vírus MV apenas envolvem técnicas de biologia molecular rotineiras, tais como exemplificadas nas referências de literatura, e nos presentes Exemplos. Em particular, técnicas de tais mutagêneses sítio-

25 direcionada e por PCR podem ser usadas para este propósito (Peeters et al., 1999, supra; Current Protocols in Molecular Biology, eds.: F. M. Ausubel et al., Wiley N.Y., 1995 edition, páginas 8.5.1.-8.5.9; e Kunkel et al., Methods in Enzymology Vol. 154, 376-382, 1987).

Mais em particular, um vetor de vírus MV recombinante de

acordo com a presente invenção pode ser preparado por meio do método de “genética reversa” bem estabelecido que permite a modificação genética de vírus de RNA de fita negativa, não-segmentada da ordem MV (revisto por exemplo por Conzelmann, K.K., *Current Topics Microbiol. Immunol.* 203, 1-41, 2004; e Walpita et al., *FEMS Microbiol. Letters* 244, 9-18, 2005).

Neste método, uma célula apropriada é co-transfectada por um vetor compreendendo uma molécula de cDNA compreendendo uma seqüência de nucleotídeos que codifica um genoma de comprimento total, ou, preferivelmente, um antígenoma (senso positivo) de um vírus MV, e um ou mais vetores compreendendo as moléculas de cDNA compreendendo seqüências de nucleotídeos que codificam as proteínas de suporte requeridas, sob condições suficientes para permitir a transcrição e a co-expressão do (anti)genoma de MV e proteínas de suporte e a produção de um vetor MV recombinante. Neste método, a citada molécula de ácido nucleico codificadora de (anti)genoma de vírus MV de comprimento total compreende uma unidade de transcrição adicional como definida acima.

O termo vetor significa um replicon, tal como plasmídeo, fago ou cosmídeo, no qual outro segmento de DNA pode ser ligado de modo a realizar a replicação do segmento de DNA ligado e suas transcrição e/ou expressão em uma célula transfectada com este vetor.

Preferivelmente, o vetor para a transcrição do genoma de comprimento total é um plasmídeo que compreende uma seqüência de cDNA codificadora do (anti)genoma do vírus MV, flanqueada pelo promotor de T7 polimerase em sua extremidade 5' e uma seqüência de ribozima (hepatite delta) em sua extremidade 3', embora um promotor de T3 ou SP6 RNA polimerase também possa ser usado.

Para a expressão intracelular das proteínas de suporte apropriadas é feito uso, preferivelmente, de plasmídeos compreendendo a seqüência de cDNA codificadora destas proteínas, sob o controle de

seqüências de controle de expressão apropriadas, e.g. um promotor de T7 polimerase.

Em um método particularmente preferido a preparação de um vetor de vírus MV recombinante de acordo com a presente invenção, são
5 usados plasmídeos de expressão que codificam as proteínas N (ou NP), P e L do vírus MV.

As quantidades ou razões de plasmídeos de suporte transfectados a serem usados nesta tecnologia genética reversa cobrem uma faixa ampla. Razões para os plasmídeos de suporte N:P:L podem variar de
10 cerca de 20:10:1 a 1:1:2 e protocolos de transfecção eficientes para cada vírus são conhecidos na arte.

Uma cópia exata do RNA genômico é preparada em uma célula transfectada pela ação combinada do promotor de T7 RNA polimerase e da seqüência de ribozima, e este RNA é subsequenteiramente empacotado e
15 replicado pelas proteínas de suporte virais fornecidas pelos plasmídeos de expressão co-transfectados.

É preferido que uma enzima T7 polimerase seja proporcionada por um vírus de vacínia recombinante que infecta a célula transfectada, em particular pelo vírus de vacínia vTF73, ainda também outros vetores de
20 varíola recombinantes, tal como o vírus de epiteloma contagioso, e.g. fpEFLT7pol, ou outros vetores virais podem ser usados para a expressão de T7 RNA polimerase.

Separação do vírus resgatado do vírus da vacínia pode ser facilmente realizada por técnicas físicas simples, tal como filtração. Para
25 resgate do vírus Sendai ou NDV, o resgate pode ser realizado por inoculação do sobrenadante de células transfectadas em ovos embrionados.

Em uma modalidade ainda mais preferida linhagens de célula recombinante são usadas para a transfecção dos vetores de transcrição e expressão que constitutivamente expressam a (T7) RNA polimerase e/ou uma

ou mais das proteínas de suporte requeridas.

Por exemplo, resgate do vírus do Sarampo pode ser realizado em uma linhagem de célula de rim de embrião humano, 293-3-46, que expressa ambos a T7 RNA polimerase e as proteínas de suporte N e P do vírus do Sarampo (Radecke et al., EMBO J. 14, 5773-5784, 1995). Outra
5 linhagem de célula muito útil que pode ser usada vantajosamente na presente invenção é baseada nas células BSR expressando a T7 RNA polimerase, i.e. linhagem celular BSR-T7/5 (Buchholz et al., J. Virol. 73, 251-259, 1999).

Ademais, informação mais detalhada referente à tecnologia de genética reversa a ser usada para a preparação de um vírus MV de acordo com
10 a presente invenção é descrita na revisão por Conzelmann, K.K. (supra) e Exemplo 1.

A capacidade de vetores de vírus MV recombinantes de estavelmente expressarem genes estranhos tem resultado no desenvolvimento
15 de vetores para ambas as aplicações profiláticas e terapêuticas.

Em um vetor de vírus MV recombinante de acordo com a presente invenção o gene estranho pode variar dependendo da espécie de vetor de vírus MV específica e da aplicação do vírus vetor.

O gene estranho pode codificar um antígeno de um (outro) patógeno microbiano (e.g., um vírus, uma bactéria de parasita), especialmente
20 o gene estranho codifica um antígeno de um patógeno que é capaz de produzir uma resposta imune protetora.

Por exemplo, seqüências de gene heterólogas que podem ser inseridas nos vetores de vírus da invenção incluem, mas não são limitadas aos
25 genes de glicoproteína de vírus da gripe, em particular, genes de hemaglutininas H5 e H7 do vírus da gripe aviária, genes derivados de Vírus da Doença Bursal Infecciosa (IBDV), especificamente VP2 de (IBDV), genes derivados de Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), vírus da leucemia felina, vírus da cinomose canina, vírus da anemia infecciosa eqüina, vírus da raiva,

organismo ehrlichia, em particular Ehrlichia canis, vírus sinciciais respiratórios, vírus da parainfluenza, vírus do sarampo e metapneumovírus de humano.

5 Alternativamente, o gene estranho pode codificar um imuno-
modulador polipeptídeo que é capaz de intensificar ou modular a resposta
imune à infecção de vírus, por exemplo por co-expressão de uma citocina tal
como uma interleucina (e.g. IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF).

10 A ordem dos vírus MV inclui ambos os vírus que são capazes
de se replicarem em humanos e animais, ou em ambos (e.g. vírus da raiva e
vírus da doença de Newcastle). Portanto, o gene estranho pode ser
selecionado de uma ampla variedade de patógenos microbianos veterinários e
humanos.

15 Embora todos os vírus possam ser usados como um vírus vetor
na presente invenção, em uma modalidade preferida da invenção o vetor de
vírus MV recombinante é um vírus da família Rhabdoviridae, preferivelmente
do gênero Lyssavirus ou Novirhabdovirus, mais preferivelmente da espécie
do vírus da raiva ou IHNV, respectivamente.

20 Em uma modalidade também preferida o vírus MV
recombinante é um vírus da família Paramyxoviridae, preferivelmente do
gênero Respovirus, em particular a espécie hPIV3 ou bPIV3; Morbillivirus,
em particular a espécie CDV; Pneumovirus, em particular a espécie RV; e
Avulavirus, em particular a espécie NDV.

25 Em uma maneira particularmente preferida da presente
invenção é proporcionado um vetor de vírus MV recombinante no qual o
vírus é Vírus da doença de Newcastle (NDV). Como NDV é capaz de se
replicar em ambos humanos e animais, em particular aves domésticas, mais
em particular, galinhas, um vetor de NDV recombinante de acordo com a
invenção pode compreender um gene estranho que codifica um antígeno de
um patógeno, em particular de um patógeno respiratório, ou um imuno-

modulador que é capaz de produzir uma resposta imune em humanos ou qualquer um destes animais.

Métodos de genética reversa para a manipulação genética de NDV têm sido descritos para NDV por Peeters et al. (*J. Virology* 73, 5001-5009, 1999), Römer-Oberdörfer et al. (*J. Gen. Virol.* 80, 2987-2995, 1999), e na revisão por Conzelmann, K.K. (supra). Ademais, também é sabido que NDV pode ser usado como um vetor para a expressão de genes estranhos, por exemplo, para a produção de uma resposta imune em animais infectados com o vetor de NDV (Nakaya et al., 2001, supra) e Swayne et al., *Avian Dis.* 47, 1047-50, 2003).

Um gene estranho pode ser vantajosamente introduzido em um genoma de NDV em várias posições como descrito em geral para os vírus MV acima. Em particular, em um vetor de NDV recombinante de acordo com a invenção, um gene estranho (como parte de uma unidade de transcrição apropriada) pode ser inserido entre os seguintes genes NDV: NP-P, P-M, M-F, F-HN, HN-L e no locus proximal 3' e distal 5' (Zhao et al., 2003, supra; Nakaya et al., 2001, supra), preferivelmente nas regiões proximal 3', P-M, M-F e F-HN, a região F-HN sendo mais preferida.

Em uma modalidade particular da invenção um vetor de NDV recombinante é aqui proporcionado no qual a unidade de transcrição adicional está localizada entre os genes F-HN.

Um vetor de NDV recombinante de acordo com a presente invenção pode ser vantajosamente usado para induzir uma resposta imune em ave doméstica, em particular galinhas, contra outros patógenos. Portanto, o vetor de NDV recombinante, preferivelmente compreende um gene estranho que codifica um antígeno protetor de um patógeno aviário, em particular de vírus da gripe, vírus da doença de Marek (MDV), vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILTV), vírus da bronquite infecciosa (IBV), vírus da doença bursal infecciosa (IBDV), vírus da anemia de galinha (CAV), reovírus,

retrovírus aviário, adenovírus de ave, vírus da rinotraqueíte de peru (TRTV), E. coli, espécie Eimeria, Cryptosporidia, Mycoplasmas tais como M. gallinarum, M. synoviae e M. meleagridis, Salmonella, Campylobacter, Ornithobacterium (ORT) ou Pasteurella sp.

5 Mais preferivelmente, o vetor de NDV recombinante compreende um gene estranho que codifica um antígeno de AIV, MDV, ILTV, IBV, TRTV, E. coli, ORT ou Mycoplasma.

Em particular, o vetor de NDV recombinante mutante compreende um gene de hemaglutinina (HA) de um vírus da gripe, 10 preferivelmente de um vírus da gripe aviária (AIV), mais preferivelmente de um AIV elevadamente patogênico, em particular de AIV H5 ou H7.

Em princípio, o gene HA de todas as cepas de gripe (aviária) pode ser usado nesta invenção. As seqüências de nucleotídeos de muitos genes HA têm sido descritas na arte e os genes HA relevantes podem ser 15 resgatados de bancos de dados de seqüências de ácido nucleico, tais como os bancos de dados GenBank ou NCBI.

O gene de hemaglutinina (HA) do subtipo H5N2 de AIV A/chicken/Italy/8/98 elevadamente patogênico pode ser vantajosamente usado como um gene estranho na presente invenção como descrito acima. O gene é 20 reversamente transcrito, clonado no vetor de expressão eucariótico pcDNA3 (Invitrogen), e seqüenciado (Lüschow et al., Vaccine, vol. 19, p. 4249-4259, 2001, e No. de Acesso no GenBank de AJ305306). Do plasmídeo de expressão obtido pCD-HA5 o gene HA pode ser obtido por amplificação pelo uso de iniciadores específicos que geram sítio de reconhecimento de REs 25 artificial que permite a inserção do gene HA nas seqüências genômicas de NDV.

Em uma outra modalidade o gene HA do subtipo H7N1 de AIV A/chicken/Italy/445/99 elevadamente patogênico pode ser usado como um gene estranho na presente invenção como descrito acima. O gene HA é

reversamente transcrito, e amplificado por PCR. O produto de 1711 pb é clonado no vetor pUC18 digerido por SmaI (Amersham) e seqüenciado (Veits et al., J. Gen. Virol. 84, 3343-3352, 2003; e No. de Acesso no GenBank de AJ580353).

5 Em um vetor de vírus MV recombinante particularmente vantajoso de acordo com a presente invenção o vírus vetor MV é atenuado, isto é, o vírus vetor não é patogênico para o animal alvo ou exibe uma redução substancial de virulência comparado com o vírus de tipo selvagem. Muitos vírus MV aqui usados como vetores de vírus possuem um registro de
10 segurança longo como vacinas atenuadas vivas tais como o vírus do sarampo e NDV, enquanto que outros vírus, tais como SeV e VSV são considerados não-patogênicos para humanos. Em adição, existem técnicas comerciais para obter e triar vírus atenuados que mostram um potencial limitado de infectividade ou replicação. Tais técnicas incluem passagem serial (fria) do
15 vírus em um substrato heterólogo e mutagênese química.

 Um vetor de NDV recombinante de acordo com a invenção pode ser derivado de qualquer cepa de vacina ND convencional. Exemplos de tais cepas de NDV adequadas presentes em vacinas ND comercialmente disponíveis são: Clone-30®, La Sota, Hitchner B1, NDW, C2 e AV4; Clone-
20 30® a cepa preferida.

 Também tem sido verificado pelos presentes inventores que um vetor de vírus MV recombinante de acordo com a presente invenção é capaz de induzir uma resposta imune protetora em animais.

 Portanto, em outra modalidade desta invenção é proporcionada
25 uma vacina contra um patógeno microbiano que compreende um a vetor de vírus MV recombinante como definido acima em uma forma viva ou inativada, e um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável.

 Uma vacina de acordo com a invenção pode ser preparada por métodos convencionais tais como aqueles comumente usados para vacinas de

vírus MV inativado ou vivo comercialmente disponíveis.

Resumidamente, um substrato suscetível é inoculado com o vetor de vírus MV recombinante e propagado até que o vírus replicado tenha o título desejado após o qual o material contendo o vírus é colhido.

5 Subseqüentemente, o material colhido é formulado em uma preparação farmacêutica com propriedades imunizantes.

Cada substrato que é capaz de suportar a replicação do vetor de vírus MV recombinante pode ser usado na presente invenção. Como um substrato células hospedeiras podem ser utilizadas de ambas as origens
10 procariótica e eucariótica, dependendo do vírus MV. Células hospedeiras apropriadas podem ser células de vertebrado, e.g. de primata. Exemplos apropriados são as linhagens de células humanas HEK, WI-38, MRC-5 ou H-239, a linhagem de célula simiana Vero, a linhagem de célula de roedor CHO, BHK, a linhagem de célula canina MDCK ou as linhagens de células aviárias
15 CEF ou CEK.

Um substrato particularmente adequado sobre o qual um vetor de NDV recombinante de acordo com a presente invenção pode ser propagado refere-se ao ovos embrionados SPF. Ovos embrionados podem ser inoculados com, por exemplo, 0,2 mL de fluido alantóico contendo NDV
20 compreendendo pelo menos $10^{2,0}$ EID₅₀ por ovo. Preferivelmente, ovos embrionados de 9- a 11-dias de idade são inoculados com cerca de $10^{5,0}$ EID₅₀ e subseqüentemente incubados a 37°C por 2-4 dias. Após 2-4 dias o produto de vírus ND pode ser colhido preferivelmente por coleta do fluido alantóico. O fluido pode ser depois centrifugado a 2,500 g seguido por filtração do
25 sobrenadante através de um filtro (100 µm).

A vacina de acordo com a invenção compreende o vetor de vírus MV recombinante juntamente com um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável costumeiramente usado para tais composições.

A vacina contendo o vírus vivo pode ser preparada e

comercializada na forma de uma suspensão ou em uma forma liofilizada. Veículos incluem estabilizadores, conservantes, e tampões. Diluentes incluem água, tampão aquoso e polióis.

5 Em outro aspecto da presente invenção é proporcionada uma vacina compreendendo o vetor de vírus MV recombinante em uma forma inativada. As vantagens maiores de uma vacina inativada são sua segurança e os níveis altos de anticorpos protetores de duração longa que podem ser induzidos.

10 O objetivo da inativação dos vírus colhidos após a etapa de propagação é a eliminação da reprodução dos vírus. Em geral, isto pode ser alcançado por meios físicos ou químicos bem conhecidos.

Se desejado, a vacina de acordo com a invenção pode conter um adjuvante. Exemplos de compostos e composições adequados com atividade adjuvante para este propósito são hidróxido de alumínio, fosfato de 15 alumínio 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 óleo vegetal tal como acetato de vitamina E, e saponinas.

A administração de uma vacina de acordo com a invenção pode ser por qualquer uma das formas bem conhecidas e pode depender do 20 tipo de vetor de vírus . Modos de administração adequados incluem vacinação parenteral, intranasal, oral e por borrifo.

Uma vacina de vetor de NDV de acordo com a invenção é preferivelmente administrada por técnicas de aplicação em massa baratas comumente usadas para vacinação contra NDV. Para vacinação contra NDV 25 estas técnicas incluem vacinação por borrifo e água potável.

A vacina de acordo com a invenção compreende uma dosagem efetiva do vetor de vírus MV recombinante com o componente ativo, i.e. uma quantidade de material de vírus MV imunizante que induzirá imunidade nas aves vacinadas contra desafio por um organismo microbiano virulento.

Imunidade é aqui definida como a indução de um nível mais alto significativo de proteção em uma população de humanos ou de animais contra mortalidade e sintomas clínicos após vacinação comparada com um grupo não-vacinado. Em particular, a vacina de acordo com a invenção previne uma proporção

5 grande de animais ou humanos vacinados contra a ocorrência de sintomas clínicos da doença e mortalidade.

Tipicamente, a vacina viva pode ser administrada em uma dose de $10^{2,0}$ - $10^{8,0}$ cultura de tecido/dose infecciosa para embrião (TC/EID₅₀), preferivelmente em uma dose variando de $10^{4,0}$ - $10^{7,0}$ TC/EID₅₀. Vacinas

10 inativadas podem conter o equivalente antigênico de $10^{4,0}$ - $10^{9,0}$ TC/EID₅₀.

A invenção também inclui vacinas de combinação compreendendo, em adição ao vetor de vírus MV recombinante de acordo com a invenção, uma cepa de vacina capaz de induzir proteção contra um outro patógeno.

15 BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

Figura 1

Construção de NDV recombinante expressando AIV H5. Sinais de controle de transcrição estão marcados por um triângulo cinza para seqüência de iniciação de transcrição e um retângulo cinza para seqüência de

20 terminação de transcrição. A HN ORF de NDV foi substituída pela H5 ORF de AIV e o gene HN foi subsequenteiramente inserido como descrito em material e métodos (etapas A-C). NDVH5 recombinante (etapa D) contém a seqüência HA autêntica, enquanto que NDVH5m recombinante transporta um HA no qual a seqüência de sítio de clivagem foi alterada por mutação

25 silenciosa (etapas E-F).

Figura 2

Análises de Northern blot dos transcritos produzidos por recombinantes de NDV. RNA total de células CEK infectadas com NDV Clone 30 (NDV), NDVH5, NDVH5m ou AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) e

de células não-infectadas (NI) foram preparados após 8 horas de infecção. RNA foi separado em geles de agarose desnaturantes, transferido para membranas de náilon, e hibridizados com cRNAs de anti-senso específicos de gene marcado com ^{32}P de NDVF (esquerda), AIV-H5 (meio) e NDV-HN (direita). Seis μg do respectivo RNA foram submetidos à hibridização de Northern, exceto para a pista de AIV no blot do meio onde apenas 2 μg foram carregados para evitar sinal de AIV excessivo. Tamanhos de marcador de RNA estão indicados em quilobases (kb) à esquerda.

Figura 3

Análises de Western blot de proteínas produzidas em células infectadas ou incorporadas em recombinantes de NDV expressando AIV HA. Lisados de células infectadas (AS) ou vírions purificados (B) de NDV Clone 30, NDVH5, NDVH5m ou AIV (H5N2) foram incubados quer com um anti-soro específico para subtipo AIV H5 (α -AIV; painéis superiores) quer com um anti-soro específico para NDV (α -NDV; painéis inferiores). Ligação foi visualizada por quimioluminescência após incubação com anticorpos secundários conjugados em peroxidase. Localizações de proteínas marcadoras estão indicados à esquerda e as formas não-clivadas (HA_0) e processadas (HA_1 , HA_2) de hemaglutinina de AIV estão indicadas à direita. Em vírions ou células infectadas com AIV proteínas virais adicionados correspondentes às indicadas à direita. Vírions ou células infectadas com AIV proteínas virais adicionais NP/NA e M também são detectáveis.

Figura 4

Anticorpos específicos para HA medidos pelo teste HI (A, barras cinzas) ou pelo teste IF (A, barras brancas). Taxas de mortalidade e índices clínicos de galinhas imunizadas uma vez (B, C) ou duas vezes (D) com NDVH5m (H5m) e animais de controle (C) após desafio com os NDV Herts velogênicos (B) ou H5N2 AIV elevadamente patogênico (C, D). Os animais foram observados diariamente por um período de 10 dias para sinais

clínicos e classificados como saudáveis (0), doentes (1), severamente doentes (2), ou mortos (3). Foi calculado um índice clínico que representa o valor médio de todas as galinhas por grupo para este período.

Figura 5

5 Exames sorológicos por NP-ELISA. Soros das galinhas foram investigados por um NP-ELISA indireto em uma diluição de 1:500. As razões de P/N produzidas foram plotadas para soros de galinhas imunizadas com rNDV/AIVH5-BMUT coletados no dia 21 após a imunização (p.i.) e 21 d
10 após o desafio subsequente com AIV (p.c.). O valor de corte de 2,0 está marcado por uma linha pontilhada.

EXEMPLOS:

Exemplo 1: Construção de vetores de NDV compreendendo gene H5 não-modificado (de tipo selvagem) e gene H5 modificado e expressão da proteína.

15 Vírus da doença de Newcastle (NDV) expressando hemaglutinina (HA) de vírus da gripa aviária (AIV) de subtipo H5 foi construído por genética reversa. Uma cópia totalmente clonada do genoma da cepa de NDV lentogênica Clone 30 foi usada para inserção da matriz de
20 leitura aberta codificadora de HA do isolado de AIV elevadamente patogênico (HP) A/chicken/Italy/8/98 (H5N2, Número de acesso no GenBank der AJ305306) na região intergênica entre os genes de fusão (F) de NDV e de hemaglutinina-neuraminidase (HN).

25 Após três passagens em ovo, o título de recombinante de NDVH5 foi similar àquele do vírus parental Clone 30 (10^9 TCID₅₀/mL), e a presença do gene H5 inserido foi confirmada por RT-PCR. Para verificar a transcrição correta do gene estranho, análise de Northern blot foi realizada (Fig.2). Embora a H5 ORF no NDV recombinante e AIV (H5N2) seja idêntica, a H5 ORF clonada em NDV é flanqueada por aproximadamente 270 nucleotídeos derivados de seqüências não-codificadoras do gene HN.

Portanto, a diferença de tamanho entre os mRNAs de NDVH5 e de AIV é uma concordância boa com o tamanho esperado de mRNAs de ~ 2kb e 1,7kb, respectivamente (Fig. 2, meio). Contudo apareceu um transcrito secundário de cerca de 1 kb em NDVH5. (Fig 2, meio, pista 3).

5 Como revelado pela análise de Northern blot, NDVH5m recombinante produziu apenas o tamanho esperado de transcrito H5 de 2kb (Fig. 2, meio, pista 4), confirmando que o transcrito curto em NDVH5 termina no sítio de clivagem de HA e mais provavelmente representa apenas a região HA₁.

10 Como um resultado da modificação, NDVH5m produziu 1,8 vezes mais HA de comprimento total HA (HA₀) do que NDVH5. Transcritos de HA de comprimento total em células infectadas com AIV foram 3,4- e 6- vezes maiores do que aquele de NDVH5m e NDVH5, respectivamente. Diferente da seqüência de sítio de clivagem H5 de NDVH5, que tem sido
15 alterada em 5 passagens, a seqüência de NDVH5 nesta região permaneceu estável durante as 10 passagens testadas (Tabela 1). Hibridização com sondas NDV F e HN confirmou a transcrição correta dos genes NDV flanqueadores, porque não houve diferença para F e NH mRNA de NDV Clone 30 parental (Fig. 2). Ademais, apenas uma redução ligeira na taxa de transcrição do gene
20 HN foi observada como um resultado da inserção da HA ORF (Fig. 2, direita).

 Para confirmar a expressão específica de AIV H5 pelos recombinantes de NDV, células CEF infectadas foram submetidas ao teste IF indireto. Incubação com um anti-soro específico para NDV revelou uma
25 fluorescência pronunciada em células infectadas com NDV Clone 30, NDVH5 e NDVH5m mas não em células infectadas com AIV-H5N2. Um anti-soro específico para AIV de subtipo H5 por outro lado mostrou expressão específica de H5 em células infectadas com AIV, NDVH5 e NDVH5m, enquanto que as células infectadas com o NDV parental foram negativas.

Embora a intensidade da expressão de H5 por células infectadas com AIV seja considerada mais alta do que aquela de ambos os recombinantes, foi verificado que o nível de expressão de H5 pelos recombinantes de NDV é notável.

5 De acordo com isto, apenas quantidades 3 vezes maiores de NDVH ou NDVH5 RNA foram carregadas em geles de RNA para obter sinais de hibridização comparáveis, mostrados em Fig. 2 (meio), indicando que AIV produziu aproximadamente 3 vezes mais transcritos e presumivelmente assim muito mais proteína. O interessante é que expressão
10 de H5 pelas células infectadas com NDVH5m parece mais eficiente do que em células infectadas com NDVH5, que poderia ser atribuído à mutação silenciosa anulando a terminação de transcrição prematura de H5.

Exemplo 2: A proteína AIV H5 é incorporada no envelope de partículas de NDV.

15 Estudos prévios mostraram que a incorporação de proteínas estranhas no envelope de vírus não-relacionados poderia ocorrer passivamente na ausência de sinais de incorporação específicos (Kretzschmar, E. et al., 1997, J. of Virology, vol. 71, p. 5982-5989). Visto que a eficiência de tal incorporação passiva principalmente depende do nível de expressão das
20 proteínas, determinamos se a proteína HA expressada pelos vírus recombinantes foi apropriadamente clivada e também incorporada no envelope de recombinantes de NDV (Fig. 3). Em células infectadas com ambos recombinantes, o anti-soro específico para subtipo AIV H5 detectou três proteínas de aproximadamente 70, 50 e 25 kDa presumivelmente
25 representando as proteínas HA₀ não-clivada e as proteínas HA₁ e HA₂ clivadas (Fig. 3A). Isto demonstra que a HA expressada pelos recombinantes é acessível às enzimas proteolíticas. A proteína HA total produzida em células infectadas com vírus NDVH5 foi notavelmente menor do que aquela de NDVH5m e a proteína HA₂ em células infectadas com NDVH5 dificilmente

visível. Como esperado, nenhuma reatividade pôde ser detectada em células infectadas com NDV Clone 30, enquanto que todas as espécies de proteína HA correspondentes foram detectadas em células infectadas com AIV-H5N2. Como o soro específico para AI foi produzido contra o vírus inteiro, outras espécies de proteína presumivelmente correspondendo a NP/NA e M também foram detectadas em células infectadas com AIV (Fig. 3). O interessante é que análises de Western blot de vírions purificados indicaram que a proteína HA foi incorporada eficientemente no envelope de ambos os recombinantes (Fig. 3B). Embora, mais proteína viral NDVH5 fosse submetida à análise de Western blot, a quantidade de proteína HA₂ incorporada em NDVH5 ainda foi consideravelmente menor do que a de HA₂ em vírions NDVH5m. Isto demonstra que NDVH5 produz e incorpora muito menos proteína HA₂, presumivelmente devido à disponibilidade de menos proteína como um resultado da terminação prematura no sítio de clivagem.

Exemplo 3: NDV recombinante trazendo proteína AIV HA é seguro em galinhas.

Um dos modos sensíveis de medir o grau de virulência de um dado isolado de NDV é pela avaliação da patogenicidade do vírus para galinhas de 1 dia de idade após inoculação intracerebral (CEC (1992) Official Journal of the European Community L 260, 1-20.). Os vírus mais virulentos darão índices que se aproximam do escore máximo de 2,0, enquanto que cepas lentogênicas darão valores próximos de 0,0. Visto que a hemaglutinina de AIV é um determinante de virulência importante, is índices de patogenicidade intracerebral (ICPI) para NDVH5 e NDVH5m foram determinados para avaliar se expressão de H5 de um vírus HPAI altera a virulência de NDV. Os valores de ICPI foram 0,0, de um escore máximo possível de 2 para ambos os recombinantes, demonstrando que a expressão de AIV H5 em adição às suas próprias proteínas não afetou notavelmente a virulência de NDV. Para comparação, o ICPI de uma cepa de vacina de NDV

lentogênica tem que estar abaixo de 0,5 para um possível uso em vacina de vírus vivo.

Exemplo 4: NDV recombinante expressando a proteína AIV HA protege galinhas contra desafios de NDV e AIV.

5 Por causa de uma expressão mais alta de proteína H5 por NDVH5m, apenas este recombinante foi testado nos experimentos em animal. NDVH5 recombinante foi assim administrado a 25 galinhas de três semanas de idade em uma dose de 10^6 EID₅₀ por animal pela rota oculonasal. Durante o período de observação, todos os animais permaneceram saudáveis sem
10 reações adversas ou quaisquer sinais clínicos de doença. Como determinado pelo teste HI, anticorpos específicos para AIV H5 foram primeiro detectáveis apenas no dia 14 em 28% dos soros e aumentou para 92% no dia 21 após a vacinação (Fig. 4A). Um início precoce de imunidade contra AI foi, contudo, detectado em 96% dos soros em 7 dias após a imunização usando um teste IF
15 indireto (Fig. 4A).

Para determinar o efeito protetor de uma vacinação única, grupos de 5 a 10 animais vacinados, juntamente com número apropriado de animais de controle, foram submetidos a uma primeira rodada de desafios letais contra NDV e AIV, respectivamente. Não inesperadamente, 100% dos
20 animais vacinados foram protegidos contra desafio de NDV velogênico letal, enquanto que todos os animais de controle morreram dentro de 4 dias exibindo sinais típicos de ND (Fig. 4B). A infecção de desafio de AIV-H5N2 elevadamente patogênico causou doença severa em galinhas não-imunizadas com uma taxa de mortalidade de 100 %. Em contraste, todos os animais de
25 grupo imunizado com NDVH5m sobreviveram à dose letal de AIV elevadamente patogênico. Sete de dez galinhas permaneceram completamente saudáveis, enquanto que três animais exibiram sintomas respiratórios muito suaves. Contudo, o escore clínico resultante de 0,05 foi desprezível comparado com o escore clínico de 2,61 para o grupo de controle (Fig. 4C).

Para determinar o efeito de uma vacinação de reforço em galinhas protegidas contra AI, as dez galinhas restantes receberam uma segunda imunização no dia 42 após a primeira vacinação e foram desafiadas duas semanas depois. Todos os animais foram completamente protegidos contra doença clínica após
 5 uma dose letal do vírus de HPAI homólogo, enquanto que todos os animais de controle desenvolveram doença severa e morreram dentro de 4 dias resultando em um escore clínico de 2,66 (Fig. 4D).

Exemplo 5: Vacina contra NDV-AI reduz derramamento de AIV:

10 Para uma vacina contra AI ser bem sucedida, a vacina deve ser efetiva na prevenção de derramamento de vírus além de ser segura e eficaz na prevenção da doença. Para determinar a quantidade de derramamento de vírus, esfregaços traqueais e cloacais foram submetidos à PCT-RT de tempo real quantitativa em tempos diferentes após desafio. RNA viral foi detectado
 15 em todas as galinhas não-imunizadas mas desafiadas de ambos os grupos de controle no dia 2 após o desafio. Os valores de ciclo (Ct) limite de esfregaços das galinhas de controle dos primeiro e segundo desafios com AIV variaram entre 32,2-38,1 e 29,2-35,5, respectivamente. Visto que todos os animais de controle morreram dentro de 4 dias de desafio, nenhum outro teste foi
 20 realizado neste grupo. Em contraste, nenhum vRNA foi detectado na maioria dos animais imunizados (49 dos 60 esfregaços).

Exemplo 6: NP-ELISA detecta AIV circulante.

Uma dos maiores temores da vacinação rotineira de aves domésticas é a probabilidade de que a vacinação possa permitir que o vírus circule não detectado dentre as aves. Visto que a vacina de NDV recombinante apenas contém o gene HA, um ELISA baseado em gene de nucleoproteína elevadamente imunogênico foi empregado para analisar os
 25 soros coletados de animais vacinados antes e em tempos diferentes após desafio. Embora anticorpos contra AIV NP estivessem ausentes em soros de

todos os animais antes da infecção por desafio, soroconversão de NP pôde ser detectada em 90% e 100% das galinhas nos dias 7 e 21 após o desafio de AIV, respectivamente. (Fig. 5). Isto demonstra que o teste ELISA baseado em NP permite não apenas a diferenciação de animais vacinados daqueles infectados, mas também facilita a detecção de qualquer vírus circulante dentre as aves vacinadas.

Exemplo 7: Material e Métodos para exemplos 1-6.

Vírus e células:

O NDV recombinante baseado em cepa de vacina de Clone-30 tem sido descrito previamente (Römer-Oberdörfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U. J. & Mettenleiter, T. C. (1999), J. Gen. Virol. 80 (Pt 11), 2987-2995.). O isolado de vírus da gripe A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) foi gentilmente proporcionado por I. Capua. A cepa de NVD velogênica Herts 33/56 e a vacina NDV Clone 30 (Nobilis®) foram obtidas de Intervet Int. BV, Boxmeer, Países-Baixos. Os vírus foram propagados em ovos de galinha embrionados de 10 dias de idade livres de patógeno específico (SPF). Células BSR-T7/5 estavelmente expressando fago T7 RNA polimerase (Buchholz, U. J., Finke, S. & Conzelmann, K. K. (1999) J. Virol. 73, 251-259) foram usadas para recuperar NDV infeccioso de cDNA. Fibroblastos de embrião de galinha (CEF) primários, células de rim de embrião de galinha (CEK) primárias ou células de músculo de codorna (QM9-R) foram usadas para investigar a expressão de proteína e a replicação de vírus.

Construção de vírus recombinantes expressando o gene AIV

H5:

O plasmídeo pfINDV-1, expressando o RNA antigenômico de comprimento total de Clone 30 (Römer-Oberdörfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U. J. & Mettenleiter, T. C. (1999) J. Gen. Virol. 80 (Pt 11), 2987-2995) foi usado para introduzir o gene AIV H5. Primeiro, um fragmento NotI/BsiWI (nt 4953 - 8852) de genoma Clone 30 foi clonado em

plasmídeo pUC18 (etapa A, Fig. 1). Sítios NcoI e AflII recém-criados foram então introduzidos (etapa B) usando iniciadores MP1 (5'-gacaacagtcctcaaccatggaccgcgcgcg 3', SEQ ID NO: 1) e MP2 (5'-ctggctagt tgagtcaattcctaaggagttggaaagatggc 3', SEQ ID NO: 2). A matriz de leitura

5 aberta (ORF) de AIV H5, que tem sido amplificada do plasmídeo pCD-HA5 (Lüschow, D., Werner, O., Mettenleiter, T. C. & Fuchs, W. (2001) Vaccine 19, 4249-4259) por iniciadores específicos contendo sítios de restrição artificiais NcoI ou AflII (PH5F2: 5'-ccttccatggagaaaatagtgcctc 3', SEQ ID NO: 3' e PH5R2: 5'-cctccttaagtataattgactcaattaaatgcaaattctgcactgcaatgatcc 3', SEQ ID

10 NO: 4), foi usado para substituir a HN ORF de Clone 30 após digestão com NcoI e AflII (etapa C). Em adição, novos sítios SgfI e SnaBI foram introduzidos na região intergênica na frente do gene L (etapa C) usando iniciadores MP3 (5'-caaaacagctcatggtacgtaatacgggtaggacatgg 3', SEQ ID NO: 5) e MP4 (5'-gaaaaaactaccggcgatcgctgaccaaaggacgatatacggg 3', SEQ

15 ID NO: 6). Sítios similares flanqueando o gene HN (etapa D) foram gerados usando iniciadores MP3 e MP5 (5'-gaaaaaactaccggcgatcgctgaccaaaggacgatatacggg 3', SEQ ID NO: 7) para o propósito de clonar o gene HN após a H5 ORF (etapa E). A sequência de clivagem de H5 parecendo-se com a sequência de terminação de transcrição

20 de NDV foi modificada por mutação silenciosa usando o iniciador MPH5F2 (5'-ggaatgtccctcaaagaaggaggaagaagagaggactatttggggc 3', SEQ ID NO: 8) como mostrado em etapa F de Fig.1. Finalmente, o fragmento NotI/BsiWI de pflNDV-1 foi substituído por um fragmento similar obtido das etapas E ou F para criar clones de comprimento total NDVH ou NDVHm, respectivamente

25 (Fig. 1). O comprimento dos clones resultantes (17196 nucleotídeos) é divisível por seis atendendo deste modo a “regra dos seis”. Todas as reações de mutagênese aqui descritas foram feitas usando o kit de mutagênese sítio-direcionada Quik Change II XL (Stratagene).

Transfecção e recuperação de vírus:

Para recuperar NDV recombinante expressando o H5 de AI, os clones de comprimento total juntos com plasmídeos expressando as proteínas NP, P e L foram transfectados em células BSR-T7 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) na razão de DNA:Lipofectamine 2000 de 1:1,5. Propagação de vírus e confirmação da recuperação de vírus infeccioso foram essencialmente realizadas como descrito previamente (Römer-Oberdörfer, 1999, supra; Engel-Herbert, I., Werner, O., Teifke, J. P., Mebatsion, T., Mettenleiter, T. C. & Römer-Oberdorfer, A. (2003) J. Virol. Methods 108, 19-28).

Análises de Northern blot:

Células CEK foram infectadas com NDV Clone 30, NDVH5, NDVH5m ou AIV-H5N2 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 por célula e incubadas por 8 h a 37°C. RNA total de células infectadas e não-infectadas foi preparado (Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Analytical Biochemistry 162, 156-159), separado em geles de agarose desnaturantes e hibridizados com cRNAs radiomarcados como descrito alhures (Fuchs, W. & Mettenleiter, T. C. (1996) J. Gen. Virol. 77 (Pt 9), 2221-2229). Plasmídeos contendo as matrizes de leitura aberta de AIV-H5N2 hemaglutinina, NDV Clone 30 F e HN foram usados para transcrição in vitro de CRNA marcado com ³²P (SP6/T7 Transcription kit, Roche).

Análises de Western blot:

Células CEK foram infectadas em uma MOI de 5 com NDV Clone 30, NDVH5, NDVH5m ou AIV-H5N2 e incubadas por 30 h a 37°C. Lisados de células infectadas ou vírions purificados por gradiente de sacarose contínuo (30-60%) foram separadas por SDS-PAGE e transferidos para filtros de nitrocelulose (Trans-Blot SD cell, Bio-Rad). Blots foram incubados com anti-soro policlonal de coelho contra NDV, ou anti-soro policlonal de galinha contra AIV do subtipo H5 (Intervet Int. BV, Boxmeer, NL). Ligação de anticorpos secundários específicos para espécie conjugados com peroxidase

(Dianova) foi detectada por quimioluminescência usando SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) sobre filmes de raios-X (Hyperfilm MP, Amersham).

Experimentos em animais:

5 A segurança dos recombinantes de NDV foi avaliada pela determinação do índice de patogenicidade intracerebral (ICPI) em galinhas de 1 dia de idade de acordo com o descrito em European Community Council Directive (CEC (1992) Official Journal of the European Community L 260, 1-20.). Experimentos de vacinação foram realizados pela administração de 10^6 EID₅₀ de NDVH5m oculonasalmente em 25 galinhas SPF de três semanas de idade. Para avaliar a capacidade protetora do recombinante após uma vacinação única, cinco dos vacinados juntos com 5 controles adicionais foram desafiados com $10^{5,3}$ ELD₅₀ de NDV cepa Herts 33/56 intramuscularmente três semanas após a vacinação. Igualmente, 10 dos vacinados juntos com nove animais de controle foram desafiados oculonasalmente com $10^{7,7}$ EID₅₀ de AIVH5N2 elevadamente patogênico. As dez galinhas restantes receberam uma imunização secundária seis semanas após a primeira vacinação e foram submetidas a um desafio de AI similar juntas com cinco animais de controle adicionais duas semanas depois. Após as imunizações e as infecções de desafio, todas as aves foram observadas diariamente por um período de 10 dias para sinais clínicos.

Análise de derramamento de vírus por RT-PCR de tempo real:

25 Esfregaços orofaríngeais e cloacais foram colhidos para analisar derramamento de AIV por RT-PCR de tempo real nos dias 2, 4, 8 e 14 após desafio. RNA de esfregaços orofaríngeais ou cloacais foram preparados quer por Tecan-Automat usando o Núcleo Spin kit (Macherey-Nagel) quer manualmente utilizando o viral RNA kit (Qiagen). Para a detecção de derramamento de AIV após infecção de desafio, o método de RT-PCR de tempo real de vírus de gripe A baseado em amplificação do gene M

foi usado (18). A extração de RNA e fatores de inibição durante a RT-PCR foram checados por um sistema de controle interno heterólogo (19). O ensaio duplex foi realizado no ciclador MX3000p (Stratagene) usando o one step RT-PCR kit (Superscript™ III One-Step RT-PCR system com Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)). O perfil de temperatura foi 30 min 50°C, 2 min 94°C, seguido por 42 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 57°C e 30 s a 68°C.

HI e NP-ELISA:

Para determinar a presença de anticorpos NDV e AIVH5, amostras de sangue foram colhidas a 0, 7, 14 e 21 dias e submetidas ao teste de inibição de hemaglutinação(HI) como descrito em European Community Council Directive (CEC (1992) Official Journal of the European Community L 260, 1-20; CEC (1992) Official Journal of the European Communities L 167, 1-1620, 21). Para avaliar a presença de anticorpos AIV-H5 após imunização, os soros foram adicionalmente usados para imunofluorescência indireta (IF) por incubação de diluição 1:100 dos soros com CEF infectado com AIV. Anticorpos contra nucleoproteína (NP) de AIV foram investigados por ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISAs) indiretos baseados em nucleoproteína (NP-ELISA). Para este propósito, uma proteína de fusão de glutathione-S-transferase-NP derivada de baculovírus recombinante purificada incluindo a região de codificação completa do gene AIV NP, foi usada como antígeno. Soros diluídos 1:300 em PBS contendo 0,05% de Tween 20 foram investigados em duplicata. Ligação de anticorpos secundários IgG (H+L) de cabra- α -galinha conjugados com POD (ROCKLAND) foi detectada por uma reação colorida usando o-fenileno-diamina e Absorção foi medida a 492 nm.

Exemplo 8: Construção de vetores de NDV compreendendo um gene H7 modificado:

Em experimentos essencialmente similares àqueles descritos acima, um construto de vetor de NDV foi preparado trazendo um gene H7

modificado. O inserto foi derivado do isolado HP H7N1 AIV :
A/chicken/Italy/445/99, cuja seqüência está publicada no GenBank sob o
número de acesso de AJ 580353; veja também: Veits, J. et al. 2003 (J. of Gen.
Virol., vol. 84, p. 3343). O gene H7 foi inserido no vetor de NDV entre os
5 genes F e HN, e foi flanqueado por seqüências não-codificadoras do gene HN.

Uma seqüência de final de gene potencial está presente após a
região de sítio de clivagem do gene H7 HA. A seqüência original em
nucleotídeos 1195-1206: ata gaa alfa-amilase ácida act, codificadora dos
aminoácidos IEKT, foi mutada em: ata gag aag act, ainda codificadora de
10 IEKT.

Isto resultou em uma expressão estável e melhorado e
apresentação da seqüência H7 modificada via o vetor NDV, comparado com a
expressão de um gene H7 não modificado.

Listagem de Sequências

<110> Intervet International BV
 <120> Vetor de vírus mononegavirales recombinante
 <130> 2006-008-FF
 <150> EP 06111222.3
 <151> 2006-03-15
 <160> 8
 <170> PatentIn versão 3.3
 <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de clonagem
 <400> 1
 gacaacagtc ctcaaccatg gaccgcgccg 30
 <210> 2
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de clonagem
 <400> 2
 ctggctagtt gagtcaattc ttaaggagtt ggaaagatgg c 41
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de clonagem
 <400> 3
 ccttccatgg agaaaatagt gcttc 25
 <210> 4
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de clonagem
 <400> 4
 cctccttaag tataattgac tcaattaaat gcaaattctg cactgcaatg atcc 54
 <210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador de clonagem
 <400> 5
 caaacacagct catggtacgt aatacgggta ggacatgg 38

 <210> 6
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador de clonagem
 <400> 6
 gaaaaaacta ccggcgatcg ctgaccaaag gacgatatac ggg 43

 <210> 7
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador de clonagem
 <400> 7
 gaaaaaacta ccggcgatcg ctgaccaaag gacgatatac ggg 43

 <210> 8
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador de clonagem
 <400> 8
 ggaatgtccc tcaaagaagg aggaagaaga gaggactatt tggggc 46

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um vetor de vírus Mononegavirales recombinante hospedando uma unidade de transcrição adicional compreendendo um gene estranho operativamente ligado com uma seqüência de início de gene (GS) de vírus Mononegavirales a montante e uma seqüência de final de gene (GE) de vírus Mononegavirales a jusante, caracterizado pelo fato de que a seqüência de gene estranho codifica uma proteína cuja proteína contém um segmento de pelo menos três aminoácidos básicos, citado segmento consistindo de resíduos de Arginina (Arg) e/ou Lisina (Lys) e contendo pelo menos uma Lisina, no qual a seqüência de nucleotídeos do gene estranho é selecionada em um tal modo que ela não contém uma seqüência que pode ser reconhecida pela polimerase viral do vírus mononegavirales como uma seqüência de final de gene (GE).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a parte de uma seqüência de gene estranho de tipo selvagem gene estranho codificadora de citado segmento de pelo menos três aminoácidos básicos é modificada por mutagênese sítio-direcionada para eliminar qualquer seqüência que pode ser reconhecida pela polimerase viral do vírus mononegavirales como uma seqüência de final de gene (GE), para criar uma seqüenciada de gene estranho modificada.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que dentro de uma seqüência t/aGAAAA originalmente presente na seqüência de gene estranho de tipo selvagem, pelo menos uma mutação é introduzida por meio da qual uma “A, do segmento de adenina é substituída por outro nucleotídeo.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a(s) mutação(ões) é\ (são) silenciosa(s).

5. Método de acordo com as reivindicações 3-4, caracterizado pelo fato de que pelo menos um códon aaa é substituído por um códon aag.

6. Método de acordo com as reivindicações 3-5, caracterizado pelo fato de que são feitas pelo menos duas mutações pontuais.

7. Método de acordo com as reivindicações 3-6, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois códons aaa são substituídos por um códon aag.

8. Método de acordo com as reivindicações 3-7, caracterizado pelo fato de que a seqüência codificadora aga aga aaa aaa é substituída pela seqüência codificadora agg agg aag aag.

9. Método de acordo com as reivindicações 1-8, caracterizado pelo fato de que o vetor de vírus Mononegavirales é um vetor de vírus da Doença de Newcastle (NDV) e o gene estranho codifica a proteína HA de um vírus da gripe aviária H5 patogênico.

10. Vetor de vírus Mononegavirales recombinante hospedando uma unidade de transcrição adicional compreendendo um gene estranho operativamente ligado com uma seqüência de início de gene (GS) de vírus Mononegavirales a montante e uma seqüência de final de gene (GE) de vírus Mononegavirales a jusante, caracterizado pelo fato de que o gene estranho codifica uma proteína cuja proteína contém um segmento de pelo menos três aminoácidos básicos, citado segmento consistindo de resíduos de Arginina (Arg) e/ou Lisina (Lys) e contendo pelo menos uma Lisina, cujo gene estranho não contém uma seqüência que pode ser reconhecida pela polimerase viral do vírus mononegavirales como uma seqüência de final de gene.

11. Vetor de vírus Mononegavirales recombinante de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o gene estranho codifica a proteína hemaglutinina (HA) de um vírus da gripe aviária patogênico, no qual o segmento de aminoácidos básicos contém pelo menos dois aminoácidos Lisina em série, e no qual pelo menos uma destas Lisinas é codificada pelo códon aag.

12. Vetor de vírus Mononegavirales recombinante de acordo

com as reivindicações 10-11, caracterizado pelo fato de que o segmento de aminoácidos básicos contém a seqüência de aminoácidos Arg Lys Lys, codificada pela seqüência de nucleotídeos aggaagaag.

- 5 13. Vacina contra um patógeno microbiano, caracterizada pelo fato de compreender um vetor de vírus MV recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 10-12 e um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável.

FIGURA 1

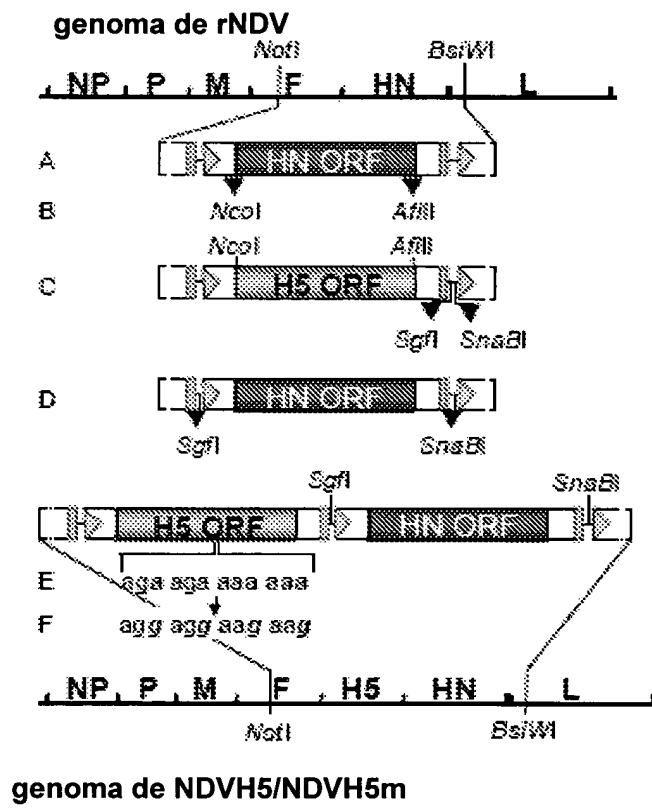


FIGURA 2

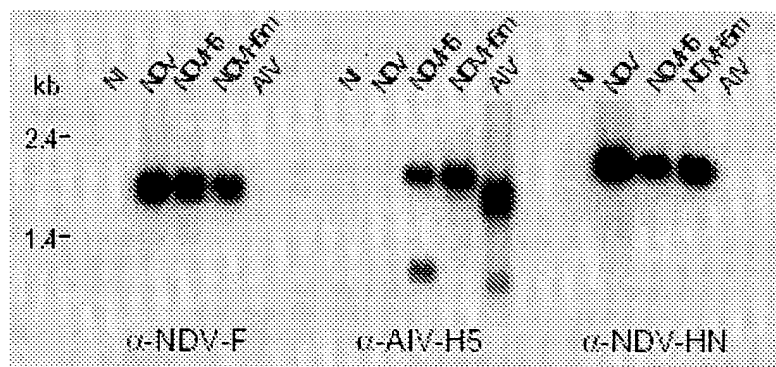


FIGURA 3

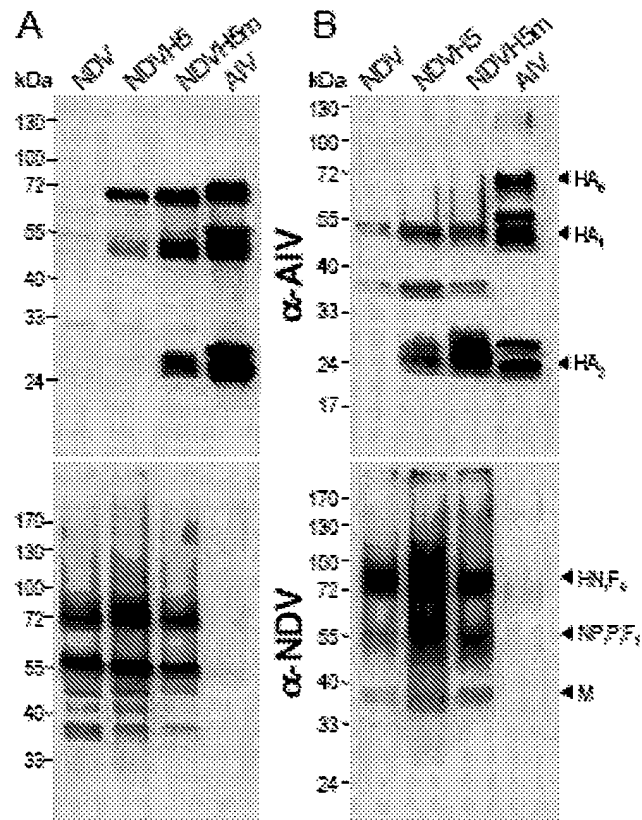


FIGURA 4

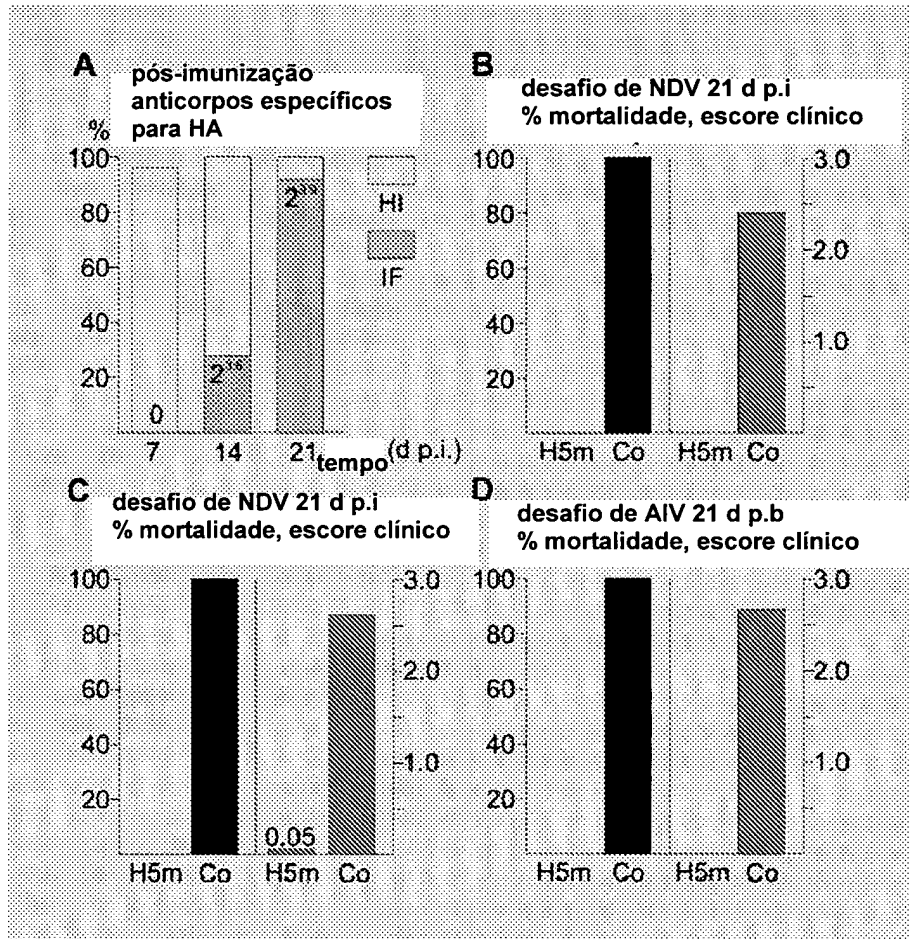
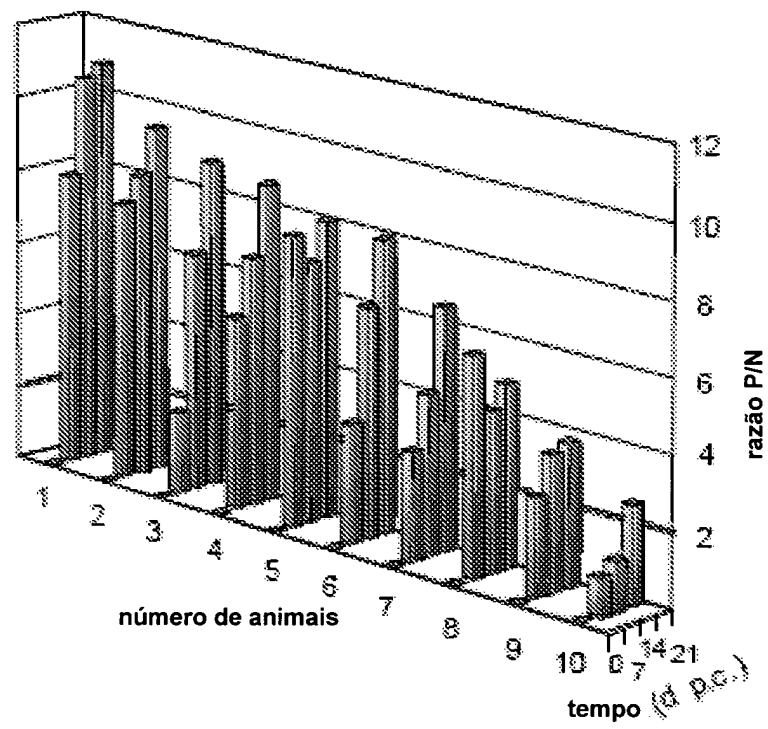


FIGURA 5



RESUMO

“MÉTODO PARA PRODUZIR UM VETOR DE VÍRUS
MONONEGAVIRALES RECOMBINANTE, VETOR DE VÍRUS
MONONEGAVIRALES RECOMBINANTE, E, VACINA CONTRA UM
5 PATÓGENO MICROBIANO”

A presente invenção proporciona um método para produzir um
vetor de vírus Mononegavirales recombinante hospedando uma unidade de
transcrição adicional compreendendo um gene estranho operativamente
ligado com uma sequência de início de gene (GS) de vírus Mononegavirales a
10 montante e uma sequência de final de gene (GE) de vírus Mononegavirales a
jusante, caracterizado pelo fato de que a sequência de gene estranho codifica
uma proteína, cuja proteína contém um segmento de pelo menos três
aminoácidos básicos e a sequência de nucleotídeos dos códons codificadores
destes aminoácidos não contém uma sequência que pode ser reconhecida pela
15 polimerase viral do vírus Mononegavirales como uma sequência de final de
gene (GE).