

(11) Número de Publicação: **PT 1539808 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/03 (2007.10) **C12N 5/10** (2007.10)
A61K 39/12 (2007.10) **A61K 39/29** (2007.10)
C07K 14/18 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2003.07.16**

(30) Prioridade(s): **2002.07.19 DE 10233064**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.06.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.04.08**
098/2009

(73) Titular(es):

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
173, BINGER STRASSE D-55216 INGELHEIM
(ALLEMAGNE) DE

(72) Inventor(es):

ANTONIE NEUBAUER DE
CHRISTINA ZIEGLER DE

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MUTANTES DE EHV GM-NEGATIVOS SEM ELEMENTOS HETERÓLOGOS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"MUTANTES DE EHV GM-NEGATIVOS SEM ELEMENTOS HETERÓLOGOS"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se ao campo da saúde animal e em particular de Vírus do Herpes Equino (EHV), em que o gene que codifica a proteína gM está ausente e o qual está isento de elementos heterólogos. Outros aspectos da invenção referem-se a composições farmacêuticas compreendendo os referidos vírus, as suas utilizações e métodos para a profilaxia e tratamento de infecções de EHV. A invenção refere-se também a composições farmacêuticas compreendendo a combinação de vírus EHV-1 e EHV-4 em que o gene que codifica a proteína gM está ausente e o qual está isento de elementos heterólogos.

Antecedentes da invenção

O herpesvírus Equino 1 (EHV-1), um membro da *Alphaherpesvirinae*, é a causa principal de aborto induzido por vírus em equinos e provoca doença respiratória e neurológica. O herpesvírus equino 4 (EHV-4) pode, também, induzir sintomas respiratórios, abortos ou distúrbio neurológico. A sequência de ADN de ambas as espécies (EHV-1: Estirpe Ab4p; EHV-4: Estirpe NS80567) foi determinada (Telford, E. A. R. *et al.*, 1992; Telford, E. A. R. *et al.*, 1998). Contudo, apenas alguns genes e

produtos de genes foram caracterizados em relação à sua relevância para a virulência e propriedades imunogénicas de EHV.

As glicoproteínas de herpesvírus estão crucialmente envolvidas nos estágios precoces de infecção, na libertação de viriões a partir das células e na disseminação directa célula a célula de viriões por fusão das células vizinhas. Até à data, foram identificadas glicoproteínas codificadas por 11 vírus herpes simplex do tipo 1 (HSV-1) e foram designadas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL e gM. Os mutantes de HSV-1 sem gC, gE, gG, gI, gJ e gM são viáveis, indicando que estes genes são dispensáveis para a replicação em células em cultura. A comparação das sequências de nucleótidos de HSV-1 e herpesvírus equino 1 revelaram que todas as glicoproteínas conhecidas de HSV-1 são conservadas em EHV-1. De acordo com a presente nomenclatura, estas glicoproteínas são designadas pelos nomes dos seus homólogos em HSV-1. É conhecido que gC, gE e gI de EHV-1 não são essenciais para o crescimento em cultura de células e em que gB e gD são essenciais para o crescimento do vírus em culturas de células. As contribuições de outras glicoproteínas de EHV-1 para a replicação em células em cultura não são conhecidas (Flowers, C. C. *et al.*; 1992). As análises de transcrição e proteína mostraram que as glicoproteínas gB, gC, gD, gG, gH e gK são expressas em células infectadas por EHV-1. A glicoproteína gM (codificada pelo gene UL10 [Baines, J. D. *et al.*, 1991; Baines, J. D. *et al.*, 1993]) é a única glicoproteína não essencial descrita que é conservada em todas as subfamílias de herpesvírus e foi descrita para citomegalovírus humano e muríneo e os membros EHV-2 de *Gammaherpesvirinae*, herpesvírus saimiri, e vírus Epstein-Barr. Como muitas glicoproteínas de herpesvírus, a gM de HSV-1 está presente em viriões e membranas de células infectadas. Os

mutantes de HSV-1 a que falta apenas gM cresceram em sistemas de cultura de células com títulos reduzidos em, aproximadamente, 10 vezes em relação aos dos vírus de tipo selvagem e mostraram uma virulência reduzida num modelo de murídeo (Baines, J. D. et al., 1991; MacLean, C. A. et al., 1993). A gM de EHV-1 homóloga (gp21/22a; referida daqui em diante como gM de EHV-1) foi inicialmente descrita por Allen e Yeargan (Allen, G. P. et al., 1987) e foi demonstrado que era um dos constituintes principais do envelope do vírus. Outras investigações revelaram que o gene 52, o gene homólogo ao UL10 de HSV-1, codifica o polipéptido de gM de EHV-1 de 450 aminoácidos (Pilling, A. et al., 1994; Telford, E. A. R. et al., 1992). A gM de EHV-1 representa uma proteína múltipla hidrofóbica que contém oito domínios transmembranares deduzidos e foi descrita como estando presente em células infectadas e em viriões purificados como uma proteína com uma Mr de 45000 (Pilling, A. et al., 1994; Telford, E. A. R. et al., 1992). Para o controlo de infecções com EHV-1, foram seguidas duas abordagens diferentes. Primeiro, foram desenvolvidas vacinas vivas modificadas (MLV), incluindo a estirpe Rach (Mayr, A. et al., 1968; Hübert, P. H. et al., 1996) que é largamente utilizada na Europa e nos Estados Unidos. Segundo, vacinas inactivadas e vacinas de subunidades com base em glicoproteínas virais expressas por via recombinante tais como as glicoproteínas (g) B, C, D e H, que induzem protecção parcial contra a exposição subsequente a infecção por EHV-1 num modelo de murídeo. As vacinas de subunidades compreendendo as referidas glicoproteínas, e. g., gB, gC, gD e gH protegiam apenas fracamente contra a reinfeção (Awan et al., 1990, Osterrieder et al., 1995, Tewari et al., 1994, Stokes et al., 1996).

O problema técnico subjacente a esta invenção foi proporcionar vacinas melhoradas que protegem melhor contra a infecção por EHV do que as vacinas anteriores.

Legendas das figuras

Figura 1: Criação de um vírus EHV-1 RacH negativo para gM sem sequências estranhas (HΔgM-w).

Esta figura apresenta o mapa de vírus e plasmídeos utilizados para a construção de HΔgM-w. O vírus de HΔgM de "primeira-geração" foi previamente construído inserindo o *lacZ* de *Escherichia coli* (HΔgM-lacZ) ou a cassete de expressão de proteína verde fluorescente (GFP) (HΔgM-GFP). O mapa de *Bam*HI da estirpe EHV-1 de RacH é apresentado (A) e o fragmento *Bam*HI-*Hind*III contendo gM-ORF está ampliado apresentando a organização genômica da região (B). O vírus gM-negativo, HΔgM-GFP comporta uma cassete de expressão de GFP substituindo a maior parte do gene gM de EHV-1. A sonda específica para GFP, que foi utilizada em transferências de Southern, é apresentada (C). O plasmídeo pBH3.1 comporta o fragmento de interesse *Bam*HI-*Hind*III de EHV-1 e foi utilizado para construir o plasmídeo pXuBaxA. Após cotransfecção de ADN de HΔgM-GFP com o plasmídeo pXuBaxA resultou HΔgM-w(D). Sítios de restrição: *Bam*HI - B, *Hind*III - H, *Sph*I - S, *Hinc*II - Hc, *Apa*I - A, *Pst*I - P

Figura 2: Transferência de Southern de vírus EHV-1 com gM removido sem sequências estranhas (HΔgM-w).

O ADN de Rach, HΔgM-GFP e de HΔgM-w foi clivado com *Bam*HI, *Hind*III ou *Pst*I e analisado com uma sonda específica para GFP (GFP) ou o fragmento *Bam*HI-*Hind*III de pBH3.1 de EHV-1 (pBH3.1). Os híbridos de ADN foram detectados por quimioluminescência utilizando CSPD. Os tamanhos do marcador de peso molecular (Biolabs) são apresentados em kpb na margem esquerda. A seta aponta para um híbrido específico pouco visível.

Figura 3: Formação de um vírus EHV-4 negativo para gM sem sequências estranhas (E4ΔgM-w).

Nesta figura é apresentado um mapa de *Bam*HI da estirpe NS80567 de EHV-4. O fragmento *Bam*HI-e aumentado compreende gM as ORF vizinhas (A). As construções plasmídicas e sítios de iniciação são apresentadas (B). O plasmídeo pgM4GFP+ foi utilizado para a criação de E4ΔgM-GFP, o EHV-4 positivo para GFP e negativo para gM (B, C). A recombinação do ADN de E4ΔgMGFP com qualquer dos plasmídeos pgM4R (B), contendo 3109 pb de sequências de EHV-4 incluindo a gM-ORF, resultou em E4ΔgM, o EHV-4 com gM reparado (A), ou com o plasmídeo pgM4w (B) resultou em E4ΔgMw, o EHV-4 negativo para GFP e gM (D). Sítios de restrição: *Bam*HI - B, *Pst*I - P, *Eco*RI - E, *Sal*I - Sa, *Mlu*I - M, *Asn*I - As, *Eco*RV - EV

Figura 4: Transferência de Southern de um vírus EHV-4 com gM removido sem sequências estranhas (E4ΔgM-w).

Os ADN de EHV-4, E4RgM, E4ΔgM-w e E4ΔgM-GFP foram clivados com *Pst*I, *Eco*RV ou *Hind*III, como indicado e os fragmentos de ADN foram transferidos para membranas de nylon. Membranas paralelas foram hibridadas com sequências específicas para GFP ou com uma sonda, denominada gM3.1, contendo as sequências específicas para EHV-4 retiradas do plasmídeo pgM4R (Fig. 3). Os ADN híbridos foram detectados por quimioluminescência utilizando CSPD. Os tamanhos do marcador de peso molecular (Biolabs) são apresentados em kpb.

Figura 5: Características de cultura do vírus EHV-4 com gM removido, E4ΔgM-w.

As células foram infectadas com uma MOI de 2 dos diferentes vírus, como listado na caixa. As cinéticas da cultura do vírus são apresentadas como títulos dos vírus determinados nos sobrenadantes das células infectadas (atividade extracelular) ou dentro das células infectadas (atividade intracelular) em relação ao ponto de tempo indicado. São apresentados os meios de duas experiências individuais, são apresentados os desvios padrão como barras de erro.

Figura 6: Tamanhos de placa de E4ΔgM-w.

Células Vero ou Vero-gM em placas de 6 poços foram infectadas com 50 PFU de EHV-4, E4RgM, E4ΔgM-GFP ou E4ΔgM-w. Os diâmetros máximos de 150 placas de lise respectivas foram determinados e os tamanhos de placas médios são apresentados em %, em relação aos tamanhos de placas de lise de tipo selvagem que foram estabelecidas como 100%. Os desvios padrão são

apresentados como barras de erro (A). As placas foram coradas por imunofluorescência indirecta (anti-gD Mab 20C4, 1:1000) ao dia 4 p.i. e analisadas num microscópio óptico Axioscope (x100, Zeiss, Alemanha). As imagens foram rastreadas e processadas digitalmente (B).

Figura 7: Penetração de vírus EHV-4 em células Vero.

Penetração de EHV-4, E4RgM, E4ΔgM-w e E4ΔgM-GFP produzida em células Vero não complementares (A) ou em células Vero-gM complementares (B) em células Vero. A determinados pontos de tempo, a eficiência de penetração foi determinada como a percentagem do número de placas presentes após o tratamento com citrato em relação ao das placas presentes após o tratamento de controlo. São apresentados os meios de duas experiências correspondentes. Os desvios padrão são apresentados como barras de erro.

Figura 8: As sequências de iniciador de PCR e a localização dos amplificadores no genoma de EHV-4.

Sequências representando os sítios de reconhecimento de enzimas de restrição são impressas a negrito e as respectivas enzimas são listadas. Os produtos de PCR foram inseridos nos referidos vectores, resultando em plasmídeos pCgM4, pgM4R pgM4Del1 ou pgM4Del2, como indicado. A localização de um fragmento no genoma de EHV-4 é apresentada em relação à sequência determinada por Telford *et al.* (1998).

Figura 9: Análise de soros de cavalo através de transferência de Western.

Os lisados da linha celular que expressam gM de EHV-1 ccgM e células Rk13 foram aquecidos durante 2 min a 56 °C (1,2) ou durante 5 min a 95 °C (3) (gM é altamente hidrofóbica e conhecida por agregar após fervura, de modo que já não entra no gel de separação). Foram incubadas transferências idênticas com vários soros de cavalo (1:3000) ou com o soro de coelho anti-gM. As setas apontam para a reactividade específica a gM em amostras fervidas e não fervidas. São apresentados títulos de teste neutralizantes (NT) para os soros que foram obtidos a partir da unidade de diagnóstico virológica.

Figura 10:

(A) Comparação de gM de EHV-1 com gM de EHV-4 utilizando um anticorpo policlonal anti gM de EHV-1. As células foram infectadas com o vírus indicado (MOI de 0,5-1) e os lisados celulares foram preparados nos momentos referidos, p.i. os viriões EHV-1 ou -4 foram purificados através de centrifugação repetida de uma almofada de sacarose (30%) e ressuspendidas em PBS. As amostras foram misturadas com tampão contendo 5% de 2-mercaptoetanol e depois ou são aquecidas a 99 °C durante 5 min ou deixadas a 4 °C. As proteínas foram separadas por SDS-10% PAGE e transferidas para filtros de nitrocelulose. A ligação ao anticorpo foi visualizada utilizando imunoglobulina G anti-coelho (IgG) conjugado com peroxidase (Sigma) seguido por detecção por ECLTM (Pharmacia-Amersham).

(B) Os viriões foram purificados a partir de células Edmin337 infectadas com EHV-4, E4ΔgM-w, E4ΔgM-GFP ou E4RgM e submetidas a análise de transferência de Western como descrito em (A). A reactividade a gB de viriões foi, depois, comparada com reactividade a gM utilizando anticorpo monoclonal anti-gB de EHV-1 3F6 ou o anticorpo policlonal anti gM de EHV-1.

Descrição da invenção

Definições de termos utilizados na descrição:

Antes das formas de realização da presente invenção deve ser referido que como aqui utilizadas e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referência a plural, salvo os casos em que o contexto indique claramente o oposto. Assim, por exemplo, a referência a "um vírus EHV" inclui uma pluralidade desses vírus EHV compreendendo também todas as subespécies, tais como EHV1, 4 e outras, referência à "célula" é uma referência a uma ou mais células e seus equivalentes conhecidos dos especialistas na técnica e assim por diante. Salvo definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem os mesmos significados que os normalmente entendidos por um especialista na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser utilizados na prática ou teste da presente invenção, os métodos, dispositivos e materiais preferidos são agora descritos. Todas as publicações aqui mencionadas são aqui incorporadas por referência para o objectivo de descrever e revelar as linhas celulares, vectores e metodologias, como descrito nas publicações que podem ser utilizadas de acordo com a invenção.

Nada aqui deve ser entendido como uma admissão de que a invenção não tem o direito de anteceder essa revelação em virtude da invenção anterior.

O termo "EHV", como aqui utilizado refere-se a todos os vírus do herpes equino, tais como as espécies EHV-1 e EHV-4 na família Alphaherpesvirinae. Os termos vírus-EH, vírus EH, vírus EHV, vírus-EHV e EHV todos relacionados com vírus do herpes equino.

Virulência: "virulência", como aqui utilizado refere-se a um vírus EH capaz de propagar na espécie hospedeira alvo (*i. e.* cavalos) com o potencial de induzir doença subclínica e clínica caracterizada por sintomas respiratórios, abortos ou distúrbios neurológicos. Exemplos para EHV virulento são vírus do tipo selvagem induzindo sintomas clínicos fortes. Exemplos para factores de virulência são hemolisinas (que lisam as células de glóbulos vermelhos) ou adesinas (proteínas através das quais o patógeno pode aderir ao hospedeiro e iniciar a colonização ou invasão). Mais especificamente, "virulência" aqui significa que o produto do gene gM, um constituinte principal do envelope do vírus, permite que o vírus penetre o hospedeiro e está envolvido na disseminação célula-a-célula.

Atenuação: "Um vírus-EH atenuado", como aqui utilizado refere-se a EHV infeccioso que não provoca doença subclínica ou clínica associada a EHV. Em particular, de acordo com a invenção, esses vírus-EH atenuados são EHV que podem replicar-se e não expressar gM.

Uma "variante funcional" do vírus-EH de acordo com a invenção é o vírus EHV que possui uma actividade biológica

(funcional ou estrutural) que é substancialmente semelhante a EHV de acordo com a invenção. O termo "variante funcional" também inclui "um fragmento", "uma variante funcional", "variante baseada no código de ácido nucleico degenerativo" ou "derivado químico". Uma tal "variante funcional", e. g., pode comportar uma ou várias trocas, deleções ou inserções de ácido nucleico. As referidas trocas, deleções ou inserções podem ser responsáveis por 10% da sequência inteira. A referida variante funcional, pelo menos parcialmente, retém a sua actividade biológica, e. g., funciona como um clone infeccioso, uma estirpe de vacina ou, ainda, exhibe actividade biológica melhorada.

Uma "variante baseada na natureza degenerativa do código genético" é uma variante que resulta do facto de um determinado aminoácido poder ser codificado por vários tripletos de nucleótidos diferentes. A referida variante retém, pelo menos parcialmente, a sua actividade biológica ou, até mesmo, exhibe actividade biológica melhorada.

Uma "molécula de fusão" pode ser a molécula de ADN ou vírus EHV infeccioso de acordo com a invenção fundida com, e. g., um repórter, tal como um marcador radioactivo, uma molécula química, tal como um marcador fluorescente ou qualquer outra molécula conhecida na técnica.

Como aqui utilizado, um "derivado químico" de acordo com a invenção é uma molécula de ADN ou clone de EHV infeccioso de acordo com a invenção quimicamente modificado ou contendo unidades químicas adicionais, não fazendo normalmente parte da molécula. Essas unidades podem melhorar a solubilidade da molécula, absorção, semi-vida biológica, etc.

Uma molécula é “substancialmente semelhante” a outra molécula se ambas as moléculas possuem sequências de nucleótidos ou actividade biológica substancialmente semelhantes. Deste modo, desde que duas moléculas possuam uma actividade semelhante, estas são consideradas variantes, tal como o termo é aqui utilizado se a sequência de nucleótidos não é idêntica, e duas moléculas que possuem uma sequência de nucleótidos semelhante são consideradas variantes como esse termo é aqui utilizado mesmo se a sua actividade biológica não for idêntica.

O termo “vacina”, como aqui utilizado, refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo, pelo menos, um componente imunologicamente activo que induz uma resposta imunológica num animal e possivelmente, mas não necessariamente, um ou mais componentes adicionais que aumentam a actividade imunológica do referido componente activo. Uma vacina pode compreender adicionalmente outros componentes típicos para composições farmacêuticas. O componente imunologicamente activo de uma vacina pode compreender partículas de vírus completo na sua forma original ou como partículas atenuadas numa denominada vacina viva modificada (MLV) ou partículas inactivadas através de métodos apropriados numa denominada vacina morta (KV). Noutra forma o componente imunologicamente activo de uma vacina pode compreender elementos apropriados dos referidos organismos (vacinas de subunidade) pelos quais estes elementos são criados quer destruindo a partícula total ou as culturas de crescimento contendo essas partículas e opcionalmente passos de purificação subsequentes produzindo a(s) estrutura(s) desejada(s), ou através de processos sintéticos, incluindo uma manipulação apropriada através da utilização de um sistema adequado baseado em, por exemplo, bactérias, insectos, mamíferos ou outra espécie mais, opcionalmente processos subsequentes de isolamento e

purificação, ou através da indução dos referidos processos sintéticos no animal em necessidade de uma vacina através da incorporação directa de material genético utilizando composições farmacêuticas adequadas (vacinação com polinucleótido). Uma vacina pode compreender um ou, simultaneamente, mais do que um dos elementos acima descritos.

O termo "vacina", como aqui entendido é uma vacina para utilização veterinária, compreendendo substâncias antigénicas e é administrado com o objectivo de induzir uma imunidade específica e activa contra uma doença provocada por EHV. A vacina de EHV de acordo com a invenção confere imunidade activa que pode ser transferida passivamente via anticorpos maternos contra os imunogénios que contém e, por vezes também, contra organismos antigenicamente relacionados.

Componentes adicionais para aumentar a resposta imunitária são constituintes normalmente referidos como adjuvantes, como, e. g., hidróxido de alumínio, óleos minerais ou outros ou moléculas ancilares adicionadas à vacina ou geradas pelo corpo após a respectiva indução por esses componentes adicionais, como mas não limitado a interferões, interleucinas ou factores de crescimento.

Uma "composição de vacina ou composição farmacêutica consiste, essencialmente, num ou mais ingredientes capazes de modificar as funções fisiológicas, e. g., imunológicas do organismo ao qual é administrado, ou de organismos que vivem em ou sobre o organismo. O termo inclui, mas não está limitado a antibióticos ou antiparasíticos, bem como outros constituintes normalmente utilizados para alcançar alguns outros objectivos como, mas não limitados a características de processamento,

esterilidade, estabilidade, facilidade de administrar a composição através de vias entérica ou parentérica tais como oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica ou outra via adequada, tolerância após administração, propriedades de libertação controlada.

Revelação da invenção

A solução para o problema técnico acima referido é alcançada pela descrição e pelas formas de realização caracterizadas nas reivindicações.

A invenção supera as dificuldades e o preconceito na técnica de que um vírus de herpes equino não pode ser criado isento de sequências estranhas. Utilizando os métodos de acordo com a invenção, são proporcionados vírus-EH de qualidade superior para utilização nas vacinas. A sequência codificante central para uma proteína gM é removida de um modo que as sequências carboxiterminais de gM restantes estão numa grelha de leitura diferente do que as sequências aminotermiais. O gene vizinho para a proteína essencial homóloga de UL9 (gene 53), a sua orientação e sobreposição com o gene que codifica para uma proteína gM requer que uma sequência de nucleótidos mínima do gene para gM deve permanecer para permitir a expressão do gene 53 e desse modo reter a viabilidade do vírus. Por isso, um EHV de acordo com a invenção refere-se a EHV que são caracterizados por o gene codificante para uma proteína gM estar removido de um modo pelo qual a expressão do gene que codifica para o homólogo de UL9 (gene 53) não é afectada. O termo "não afectada" não se refere a uma certa propriedade quantidade ou qualitativa de UL9 mas simplesmente significa que a expressão do gene não é

afectada, desde que a referida proteína seja expressa pelo vírus e esteja presente numa quantidade essencialmente suficiente para a viabilidade do vírus.

A necessidade duradoura na técnica para uma vacina compreendendo herpesvírus equino 4 recombinante foi satisfeita pela presente requerente que superou as principais dificuldades na técnica. Os vírus EHV-1 e EHV-4 de acordo com a invenção podem ser utilizados vantajosamente para utilização, e. g., numa vacina.

Deste modo, numa primeira forma de realização importante, a invenção refere-se a um Vírus de Herpes Equino (EHV), em que o gene que codifica a proteína gM e, por isso, o próprio gM, está ausente, caracterizado por estar isento de elementos heterólogos. "Isento de elementos heterólogos" significa que nenhuma sequência estranha, i. e., nenhuma sequência não-EHV, tal como uma cassete que codifica lacZ ou GFP está presente na sequência codificante para o referido vírus de acordo com a invenção (um denominado "clone branco"). Deste modo, o EHV de acordo com a invenção é inteiramente codificado pelas sequências de EHV. O EHV de acordo com a invenção, está isento de elementos bacterianos ou ácidos nucleicos que codificam os referidos elementos bacterianos. Além disso, quase toda a sequência codificante inteira para a proteína gM e, desse modo, a proteína gM codificada acima mencionada é removida. Por isso, de um modo preferido, o referido EHV de acordo com a invenção é caracterizado por a proteína gM estar ausente devido a deleção do gene que codifica para a proteína gM. Contudo, como referido *supra*, "o gene que codifica proteína gM está ausente" também requer que uma sequência gM mínima permaneça de modo a que pelo menos a sequência sobreponível do gene 53 está ainda presente,

as restantes sequências de gM podem ser removidas (ver *infra*). Isto pode ser tudo realizado através de técnicas de biologia molecular (ver *infra*) de modo a que sejam criados EHV recombinantes.

A utilização de *lacZ* como um marcador para a deleção com sucesso do gene gM de EHV-1 ou 4 não conduziu à formação com sucesso de vírus de acordo com a invenção (ver exemplos 1, 2). Os inventores desenvolveram por isso um método inventivo para obter o referido vírus. Foi construído um vírus-EH em que o gene gM foi removido por inserção de uma cassete contendo o marcador GFP. Esta abordagem permitiu, surpreendentemente, a diferenciação entre a entrada de vírus (placas de lise verdes fluorescentes) e novas placas recombinantes (placas não fluorescentes).

É preferido um EHV que se pode obter através de um método compreendendo os passos de

- a) isolar um EHV de tipo selvagem;
- b) estabelecer um plasmídeo que codifica o gene gM de EHV, opcionalmente com sequências flanqueadoras;
- c) produzir uma linha celular complementar expressando gM ou partes deste;
- d) estabelecer um vírus EH comportando uma inserção de cassete que codifica GFP na sua sequência codificante de gM por co-transfecção da linha celular complementar do passo b) com ácido nucleico de EHV e um plasmídeo que codifica gM que é interrompido por uma inserção de cassete que codifica GFP;
- e) remover a cassete que codifica GFP; e

f) seleccionar os clones EHV, em que a cassete que codifica GFP é removida com sucesso.

“lacZ” é conhecido do especialista na técnica como o gene que codifica β -galactosidase. De acordo com a invenção, “GFP” refere-se à proteína verde fluorescente (GFP) produzida pela alforreca bioluminescente (Chalfie *et al.*, 1994).

“Linha celular complementar” refere-se a uma linha celular, na qual um gene normalmente não presente no genoma da linha celular é introduzido e expresso constitutivamente. Linhas celulares úteis incluem, mas não estão limitadas à linha celular de rim de coelho Rk13, Linha celular cc (Seyboldt *et al.*, 2000) ou as linhas celulares Vero (ATCC N° de catálogo CRL- 1586), tal como o clone 1008, como também revelado nos exemplos 1 e 2 e qualquer outra linha celular conhecida do especialista na técnica. Normalmente, pode ser seleccionado para clones celulares que expressam esta proteína adicional. Esta linha celular expressa o gene que é removido no vírus, complementando esta deficiência e permite a cultura do vírus após a deleção do gene.

São conhecidos na técnica métodos convencionais de biologia molecular para utilização de enzimas de restrição, ligação, PCR, transfecção etc. (ver, e. g., Sambrook *et al.*, (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque. De um modo preferido, esse EHV de acordo com a invenção é caracterizado por ser EHV-1. De um modo mais preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por terem sido removidos 850-1100 pb da grelha de leitura aberta de gM de 1332 pb. De um modo ainda mais preferido, o EHV-4 de acordo com a invenção é caracterizado por

terem sido removidos 900-1000 pb da grelha de leitura aberta de gM. Também mais preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por terem sido removidos 960-970 pb da grelha de leitura aberta de gM (960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969 ou 970 pb). Mais preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por terem sido removidos 962 pb da grelha de leitura aberta de gM.

De um modo mais preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por a sequência codificante para gM ser removida, excepto para 150-200 pares de bases (pb) da sequência codificante que codifica a porção C-terminal de gM e 150-250 pb da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Nesta forma de realização mais preferida, a sequência codificante de gM é removida, apenas os nucleótidos 93118-93267 a 93118-93317 da sequência que codifica a porção C-terminal de gM e os nucleótidos 94223-94472 a 94323-94472 da sequência codificante que codifica a porção N-terminal da restante gM. Assim, é mais preferido que um EHV-1 de acordo com a invenção caracterizado por os nucleótidos 93268-93318 a 94222-94322 (que codifica a porção nuclear de gM) seja removido (numeração de acordo com Telford, 1992). Nos intervalos dados, qualquer número de nucleótidos pode ser removido. Assim, de acordo com a invenção, as deleções podem começar não abaixo da posição de nucleótido 93268, mas tem de começar na posição 93318. A deleção pode terminar tão precocemente como na posição 94222, mas não mais tarde do que a posição 94322. Assim, um EHV-1 preferido de acordo com a invenção é caracterizado por os nucleótidos 93268 a 94322 da sequência codificante de gM como correspondendo às posições Telford (1992) serem removidos. Qualquer combinação está dentro do âmbito da invenção, tal como 93272 a 94312, 93300 a 94300 e assim por diante.

Ainda mais preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por a sequência codificante para gM ser removida excepto para 160-190 pb da sequência codificante que codifica a porção C-terminal de gM e 190-220 pb da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Nesta forma de realização mais preferida, a sequência codificante de gM é removida, apenas os nucleótidos 93118-93277 a 93118-93307 da sequência que codifica a porção C-terminal de gM e os nucleótidos 94253-94472 a 94283-94472 da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM permanecem. Assim, é mais preferido um EHV-1, de acordo com a invenção caracterizado por os nucleótidos 93278-93308 a 94252-94282 (que codificam a porção nuclear de gM) serem removidos (numeração de acordo com Telford, 1992).

Também mais preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por a sequência codificante para gM ser removida, excepto para 180 a 190 (180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190) pb da sequência codificante que codifica a porção C-terminal da sequência codificante de gM e 200 a 210 (200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209 ou 210) pb da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Nesta forma de realização mais preferida, a sequência codificante de gM é removida, apenas os nucleótidos 93118-93297 a 93118-93307 (93297, 93298, 93299, 93300, 93301, 93302, 93303, 93304, 93305, 93306, 93307) da sequência que codifica a porção C-terminal de gM e os nucleótidos 94263-94472 a 94273-94472 (94263, 94264, 94265, 94266, 94267, 94268, 94269, 94270, 94271, 94272, 94273) da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM permanecem. Deste modo, é mais preferido um EHV-1 de acordo com a invenção caracterizado por os nucleótidos 94298-94308 a

94262-94272 (que codificam a porção do núcleo de gM) serem removidos (numeração de acordo com Telford, 1992). Isto significa, que quaisquer nucleótidos dentro dos restantes nucleótidos acima mencionados podem ser removidos de acordo com a invenção, e. g., nucleótidos 94299-94263 ou 94299-94264 ou 94300-94272 ou qualquer combinação destes.

Muito preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por a sequência codificante para gM ser removida excepto para 184 pb da sequência codificante que codifica a porção C-terminal da sequência codificante de gM e 209 pb da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Nesta forma de realização mais preferida, a sequência codificante de gM é removida, apenas os nucleótidos 93118-93301 da sequência que codifica a porção C-terminal de gM e os nucleótidos 94264-94472 da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM permanece. Deste modo, é mais preferido um EHV-1 de acordo com a invenção caracterizado por os nucleótidos 94263 a 93302 (que codificam a porção nuclear de gM) serem removidos (numeração de acordo com Telford, 1992). Nesta forma de realização mais preferida, 962 nucleótidos da sequência que codifica gM são removidos. Isto é exemplificado de um modo não limitativo no exemplo 1.

Também mais preferido é um EHV-1 caracterizado por o gM ser removido e estar isento de elementos heterólogos e ser uma variante recombinante com base numa estirpe seleccionada a partir do grupo de AB69 (ATCC VR2581), EHV-1 Ts-mutante ECACC V99061001, KyA, KyD, Ab1, Ab4, RacH, RacL11 ou RacM de EHV-1 e não estão presentes nenhuns elementos heterólogos, tais como os elementos GFP ou lacZ. Também mais preferido, um EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por gM ser removido e estar

isento de elementos heterólogos tais como os elementos GFP ou lacZ e é uma variante recombinante com base na estirpe RacH de EHV-1. Mais preferido, um EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por gM ser removido e estar isento de elementos heterólogos, tais como os elementos GFP ou lacZ e é o isolado variante recombinante à base de RacH HΔgM-w como revelado no exemplo 1. O referido EHV-1 HΔgM-w de acordo com a invenção foi depositado no "Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR) e European Collection of Cell Cultures (ECACC)", Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK, como depósito de patente de acordo com o Tratado de Budapeste. A data do depósito foi 16 de Outubro de 2002, a referência de identificação preliminar é H-delta-gM-w e o número de acesso dado pela autoridade depositária internacional ECACC/CAMR é 02101663. Também preferidos são EHV-1 possuindo todas as características identificáveis do referido EHV-1 depositado.

Todos os EHV-1 anteriormente mencionados possuem propriedades superiores em relação aos vírus com elementos heterólogos, tal como GFP. O referido EHV-1 de acordo com a invenção possui uma infecciosidade extracelular altamente vantajosa, em relação àqueles que ainda compreendem elementos heterólogos. Isto é exemplificado na figura 5 (e. g., entre 4 e 12 horas).

Até ter sido realizada a presente invenção, ninguém na técnica foi capaz de formar um vírus EHV-4 recombinante que pode ser utilizado como uma vacina. EHV-1 e EHV-4 são homólogos e apresentam reacção cruzada até certo ponto. Contudo, havia uma duradoura necessidade na técnica para vírus EHV-4 atenuados na medida em que EHV-1 não parece proporcionar protecção suficiente contra infecção por EHV-4. Assim, de um modo preferido, um EHV

de acordo com a invenção é caracterizado por ser EHV-4. De um modo mais preferido, o EHV-4 de acordo com a invenção é caracterizado por 900-1150 pb da grelha de leitura aberta de gM de 1332 pb serem removidos. De um modo ainda mais preferido, o EHV-4 de acordo com a invenção é caracterizado por 1000-1150 pb da grelha de leitura aberta de gM serem removidos. De um modo também mais preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por 1110-1115 pb da grelha de leitura aberta de gM serem removidos (1110, 1111, 1112, 1113, 1114 ou 1115 pb). De um modo muito preferido, o EHV-1 de acordo com a invenção é caracterizado por 1110 pb da grelha de leitura aberta de gM serem removidos.

De um modo mais preferido, o EHV-4 de acordo com a invenção é caracterizado por a sequência codificante para gM ser removida excepto para 0-50 pares de bases (pb) da sequência codificante que codifica a porção C-terminal de gM e 150-250 pb da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Nesta forma de realização mais preferida, a sequência codificante de gM é removida, apenas os nucleótidos 92681-92680 a 92681-92730 da sequência que codifica a porção C-terminal de gM e nucleótidos 93766-94033 a 93866-94033 da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM permanecem. Assim, é mais preferido um EHV-4 de acordo com a invenção caracterizado por os nucleótidos 92681-92731 a 93765-93865 (que codificam a porção nuclear de gM) serem removidos (numeração de acordo com Telford, 1998). Nos intervalos apresentados, qualquer número de nucleótidos pode ser removido. Assim, de acordo com a invenção, as deleções podem começar não inferior ao nucleótido na posição 92681, mas tem de começar na posição 92731. A deleção pode terminar tão precocemente como na posição 93765, mas não mais adiante do que a posição 93865. Assim, de um modo preferido, um EHV-4 de acordo

com a invenção é caracterizado por nucleótidos 92681 a 93865 da sequência codificante de gM como correspondendo às posições de Telford (1998) são removidos. Qualquer combinação está dentro do âmbito da invenção, tal como 92672 a 93801, 92700 a 93800 e semelhantes.

De um modo ainda mais preferido, o EHV-4 de acordo com a invenção é caracterizado por a sequência codificante para gM estar removida, excepto para 10-40 pb da sequência codificante que codifica a porção C-terminal de gM e 190-220 pb da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Nesta forma de realização mais preferida, a sequência codificante de gM é removida, apenas os nucleótidos 92681-92690 a 92681-92720 da sequência que codificam a porção C-terminal de gM e os nucleótidos 93806-94033 a 93836-94033 da sequência codificante que codificam a porção N-terminal de gM permanecem. Deste modo, é mais preferido um EHV-4, de acordo com a invenção, caracterizado por os nucleótidos 92691-92721 a 93805-93835 (que codificam a porção nuclear de gM) serem removidos (numeração de acordo com Telford, 1998).

Também, de um modo mais preferido, o EHV-4 de acordo com a invenção é caracterizado por a sequência codificante para gM ser removida, excepto para 30 a 40 (30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40) pb da sequência codificante que codifica a porção C-terminal da sequência codificante de gM e 200 a 210 (200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209 ou 210) pb da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Nesta forma de realização mais preferida, a sequência codificante de gM é removida, apenas os nucleótidos 92681-92710 a 92681-92720 (92710, 92711, 92712, 92713, 92714, 92715, 92716, 92717, 92718, 92719, 92720) da sequência que codifica a porção C-terminal de

gM e os nucleótidos 93816-94033 a 93826-94033 (93824, 93825, 93826, 93827, 93828, 93829, 93830, 93831, 93832, 93833, 93834) da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM permanecem. Assim, é mais preferido um EHV-4 de acordo com a invenção caracterizado por os nucleótidos 92711-92721 a 93823-93833 (que codificam a porção nuclear de gM) serem removidos (numeração de acordo com Telford, 1998). Isto significa que quaisquer nucleótidos dentro dos restantes nucleótidos acima mencionados podem ser removidos de acordo com a invenção, e. g. nucleótidos 94299-94257 ou 94299-94256 ou 94300-94257 ou qualquer combinação destes.

De um modo muito preferido, o EHV-4 de acordo com a invenção é caracterizado por a sequência codificante para gM ser removida, excepto para 34 pb da sequência codificante que codifica a porção C-terminal da sequência codificante de gM e 209 pb da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Nesta forma de realização mais preferida, a sequência codificante de gM é removida, apenas permanecem os nucleótidos 92681-92714 da sequência que codifica a porção C-terminal de gM e os nucleótidos 93825-94033 da sequência codificante que codifica a porção N-terminal de gM. Assim, é muito preferido um EHV-4 de acordo com a invenção caracterizado por os nucleótidos 92715 a 93824 (que codificam a porção nuclear de gM) serem removidos (numeração de acordo com Telford, 1998). Nesta forma de realização mais preferida, 1110 nucleótidos da sequência que codifica gM são removidos. Isto é exemplificado de um modo não limitativo no exemplo 2.

Também mais preferido, um EHV-4 de acordo com a invenção é caracterizado por gM ser removido e está isento de elementos heterólogos tais como os elementos GFP ou lacZ e é uma variante

recombinante com base na estirpe MSV Lote 071398 de EHV-4. É muito preferido um EHV-4 de acordo com a invenção, caracterizado por gM ser removido e estar isento de elementos heterólogos, tais como os elementos GFP ou lacZ e baseia-se na estirpe MSV Lote 071398 e no isolado E4ΔgM-4 como revelado no exemplo 2. O referido EHV-1 HΔgM-w de acordo com a invenção foi depositado no "Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR) e European Collection of Cell Cultures (ECACC)", Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK, como depósito de patente de acordo com o Tratado de Budapeste. A data do depósito foi 14 de Janeiro de 2003, a referência de identificação preliminar é EHV-4 e o número de acesso fornecido pela autoridade depositária internacional ECACC/CAMR é 03011401. Também preferidos são EHV-4 possuindo todas as características do referido EHV-4 depositado.

Todos os EHV-4 acima mencionados possuem propriedades superiores em relação aos vírus conhecidos na técnica anterior, na medida em que não existem na técnica EHV-4 recombinantes disponíveis. Além disso, o referido EHV-4 de acordo com a invenção possui uma infecciosidade extracelular altamente vantajosa em relação àqueles que ainda compreendem elementos heterólogos, tal como GFP. Isto é exemplificado na figura 10 (e. g., às 24 horas).

Outro elemento importante da invenção é um ácido nucleico codificando para um EHV como revelado *supra*. O especialista na técnica pode facilmente determinar a sequência correspondente através de métodos de biologia molecular convencionais conhecidos na técnica.

Havia uma dificuldade particular na técnica para obter o EHV de acordo com a invenção. A presente requerente construiu o

vírus EHV negativo para gM introduzindo um gene marcador (lacZ) no gene gM. Quando foi tentado remover esta cassette, em ambos os mutantes EHV-1 e EHV-4 produzidos pela inserção de lacZ todos os clones que eram fenotipicamente negativos para lacZ ainda continham a cassette lacZ. A requerente desenvolveu, por isso, um método inventivo para obter os referidos vírus. Foi construído um vírus EH em que o gene gM foi removido por inserção de uma cassette contendo o marcador GFP. Esta abordagem permitiu surpreendentemente a diferenciação entre os vírus de entrada (placas verdes fluorescentes) e as novas placas recombinantes (placas não fluorescentes). Também, foi criada pela presente requerente uma linha celular Vero (baseada no clone celular Vero 1008) que expressa constitutivamente EHV4-gM para ultrapassar as dificuldades na técnica. A referida linha celular foi criada por transfecção do gene gM apropriado e subsequente selecção para células Vero que expressam gM. Apenas as referidas células permitiram à requerente replicar vírus EHV4 negativos para gM.

A referida linha celular Vero de complementação de gM de acordo com a invenção foi depositada no "Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR) e European Collection of Cell Cultures (ECACC)", Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK, como depósito de patente de acordo com o Tratado de Budapeste. A data de depósito foi 28 de Janeiro de 2003, a referência de identificação preliminar é VERO GM e o número de acesso fornecido pela autoridade depositária internacional ECACC/CAMR é 03012801. Também preferidas são linhas celulares possuindo todas as características de identificação da referida linha celular VERO GM depositada.

É preferido um método para obter um EHV recombinante, compreendendo os passos de

- a) isolar um EHV de tipo selvagem;
- b) estabelecer um plasmídeo que codifica o gene gM de EHV, opcionalmente com sequências flanqueadoras;
- c) criar uma linha celular complementar expressando gM ou partes deste;
- d) estabelecer um vírus EH contendo uma cassette que codifica GFP inserida na sua sequência codificante de gM cotransfectando a linha celular complementar do passo b) com ácido nucleico de EHV e um plasmídeo que codifica gM que é interrompido por uma cassette inserida que codifica GFP;
- e) remover a cassette que codifica GFP; e
- f) seleccionar os clones EHV em que a cassette que codifica GFP é removida com sucesso.

Como as células captadas acima referidas são uma forma de realização importante da presente invenção. Deste modo, a invenção refere-se a uma linha celular para utilização num método de acordo com a invenção, caracterizado por o gene que codifica a proteína gM ser transfectado para a referida linha celular e a referida linha celular expressa gM. A invenção de um modo preferido refere-se a uma linha celular de acordo com a invenção, caracterizada por ser uma linha celular seleccionada do grupo de células Vero (células Vero-gM), RK-13, e cc (cc-gM).

Como revelado *supra* para EHV-1, a utilização de lacZ como um marcador em vez de GFP também em EHV-4 não conduziu à criação com sucesso de vírus de acordo com a invenção (ver num modo não limitante no exemplo 2). As células "positivas para LacZ" de um modo geral coraram menos intensamente em células Vero do que em células Rk13 e foram, desse modo, mais difíceis de identificar e

o sistema EHV-4 foi replicado mais lentamente do que EHV-1 e assim deu menos tempo entre a identificação das placas e o isolamento da progenia de vírus viáveis. Por isso, a utilização de GFP representou o único modo de obter o referido vírus EHV-4. O processo foi realizado como descrita *supra* para EHV-1 e, surpreendentemente, também conduziu à identificação bem sucedida de vírus EHV-4 com gM removido, em virtude de placas fluorescentes de identificação.

O isolamento de EHV de tipo selvagem é conseguido recolhendo tecido de pulmão de necropsia de animais que se suspeita terem adoecido devido a EHV, e isolando EHV nas células do tecido como é conhecido na técnica. A sequência completa do genoma de EHV 1 foi publicada por Telford *et al.* (1992). De igual modo, a sequência do genoma completo para EHV-4 foi publicada por Telford *et al.* (1998). A amplificação por PCR de sequências de ADN pela utilização de iniciadores específicos que se ligam a cadeias complementares de ADN alvo flanqueando a porção de ADN de interesse representa um método convencional de biologia molecular. São conhecidos do especialista na técnica métodos para ligar sequências de ADN apropriadas nos plasmídeos adequados para as construções pretendidas, para a transfecção do ADN em células eucariotas, para análises de transferência de Southern e transferência de Western, para excisão de fragmentos de ADN dirigida a um sítio através de enzimas de restrição e para a selecção de linhas celulares que expressam o gene heterólogo desejado ou plasmídeos contendo o gene desejado ou vírus em que um determinado gene é removido. São conhecidos do especialista na técnica métodos convencionais de biologia molecular, tal como as técnicas acima mencionadas e podem também ser encontradas em, *e. g.*, em Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque e Bertram, S. e Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, G. Fischer Verlag, Stuttgart, Nova Iorque, 1991).

“Deleção” significa a remoção de um ou vários nucleótidos ou aminoácidos.

Outra forma de realização importante da invenção é uma composição farmacêutica ou vacina compreendendo um EHV de acordo com a invenção, opcionalmente em combinação com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

Também uma parte importante da presente invenção é uma composição farmacêutica compreendendo um ácido nucleico de acordo com a invenção como revelado *supra*.

De um modo preferido, uma vacina de acordo com a invenção refere-se a uma vacina como definido acima. O termo “vacina viva” refere-se a uma vacina compreendendo uma partícula capaz de replicação, em particular, um componente viral de replicação activa.

De um modo preferido, uma vacina de acordo com a invenção compreende um EHV-1 com gM removido de acordo com a invenção como revelado *supra* combinado com um EHV-4 com gM removido de acordo com a invenção como revelado *supra* ou opcionalmente qualquer outro grupo antígeno e opcionalmente um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. A referida vacina pode ser administrada como uma vacina combinada no mesmo ponto de tempo. De um modo muito preferido, o referido EHV-1 atenuado de acordo com a invenção pode ser administrado primeiro seguido pela administração de um EHV-4 atenuado de acordo com a invenção

três a quatro semanas mais tarde. Também, de um modo muito preferido, o referido EHV-1 atenuado de acordo com a invenção pode ser administrado em combinação com um EHV-4 atenuado de acordo com a invenção num esquema de vacinação típico, em que são administradas duas ou três vacinações básicas. Um esquema de vacinação típico de uma tal vacina é duas vacinações com um intervalo de quatro semanas (vacinação básica), seguido por reforços regulares a cada seis meses. Contudo, qualquer das referidas vacinas de acordo com a invenção como revelado *supra* podem também ser administradas a diferentes intervalos, e. g. a cada três meses.

O especialista na técnica pode escolher dividir a administração em duas ou mais aplicações que podem ser aplicadas pouco tempo uma após a outra, ou um outro intervalo de tempo predeterminado. De um modo preferido, esse intervalo pode ser: 1ª imunização, 2ª imunização aprox. 4 semanas depois e, opcionalmente, 3ª imunização 5-6 meses depois. Dependendo da duração desejada e da eficácia do tratamento, as vacinas podem ser administradas uma vez ou várias vezes, também intermitentemente. As vacinas de acordo com a invenção podem ser administradas a uma égua antes de se reproduzir e novamente durante a sua gravidez para prevenir abortos associados a EHV. Podem ser vacinados outros cavalos, e. g., uma vez por ano. Os potros podem ser vacinados pouco tempo após o nascimento.

As vacinas da presente invenção podem ser aplicadas através de diferentes vias de aplicação conhecidas pelo especialista, nomeadamente injeção intravenosa ou injeção directa nos tecidos alvo. Para aplicação sistémica, são preferidas as vias intravenosa, intravascular, intramuscular, intra-arterial, intraperitoneal, oral, ou intramucosa (e. g., spray nasal ou

respiratório ou injeção). Pode ser realizada uma aplicação mais local subcutaneamente, intracutaneamente, intrapulmonarmente ou directamente no ou próximo do tecido a ser tratado (tecido conjuntivo, ósseo, muscular, nervoso, epitelial). Uma composição de vacina de acordo com a invenção pode também ser administrada através de um implante ou oralmente. De um modo muito preferido, a administração é intramuscular.

Para preparar preparações de vacina adequadas para as aplicações descritas acima, o perito pode utilizar soluções estéreis conhecidas injectáveis, fisiologicamente aceitáveis. Para preparar uma solução pronta a utilizar para injeção parentérica ou infusão, estão rapidamente disponíveis soluções isotónicas aquosas, tais como, e. g., soro fisiológico ou soluções de proteína de plasma correspondentes. As preparações de vacina podem estar presentes como liofilisatos ou preparações secas, que podem ser reconstituídos com uma solução injectável conhecida directamente antes da utilização em condições estéreis, e. g., como um kit de partes. A preparação final das preparações de vacina da presente invenção são preparadas para injeção, infusão ou perfusão misturando o vírus purificado de acordo com a invenção com uma solução estéril fisiologicamente aceitável que pode ser suplementado com substâncias veículo ou/ excipientes conhecidos. A dose aplicada de cada vírus-EH de acordo com a invenção presente na formulação da vacina de um modo preferido pode estar entre 10^4 e 10^8 TCID₅₀/por animal, entre 10^5 e 10^7 TCID₅₀/por animal, de um modo muito preferido, 10^6 TCID₅₀/ por animal.

A invenção refere-se ainda à utilização de EHV de acordo com a invenção no fabrico de um medicamento para a profilaxia e/ou tratamento de estados associados a EHV.

A invenção refere-se ainda à utilização de um ácido nucleico de acordo com a invenção no fabrico de um medicamento para a profilaxia e/ou tratamento de estados associados a EHV.

A invenção refere-se ainda a um método para a profilaxia e/ou tratamento de um animal, caracterizado por uma composição farmacêutica de acordo com a invenção ser aplicada ao referido animal e o sucesso terapêutico ser monitorizado.

A invenção refere-se, de um modo preferido, a um método de tratamento de um animal equino infectado com EHV com um EHV com gM removido de acordo com a invenção como descrito *supra*, em que o referido EHV atenuado ou a composição de vacina como revelado *supra* é administrado a um animal equino que dele necessite a uma dose adequada como é conhecido do especialista na técnica e a redução de sintomas de EHV, tais como viremia e leucopenia e/ou tosse e/ou pirexia e/ou corrimento nasal e/ou diarreia e/ou depressão e/ou aborto, é monitorizada. O referido tratamento, de um modo preferido, pode ser repetido. Assim, a invenção refere-se a um método para a profilaxia e/ou tratamento de um animal caracterizado por uma composição farmacêutica de acordo com a invenção ser aplicada ao referido animal e o sucesso terapêutico ser monitorizado. O tratamento pode ser realizado como revelado para a composição de vacina *supra*.

A invenção refere-se, de um modo preferido, a um método de detecção de anticorpos contra estruturas específicas de infecção de EHV-1 ou EHV-4 e a um método de diferenciação de infecções do tipo selvagem a partir da presença de EHV-1 ou EHV-4 com gM revelado, como descrito acima através de um método imunológico. Os métodos imunológicos são conhecidos do especialista na área e

incluem, mas não estão limitados a ELISA (**e**nzyme-**l**inked **i**mmuno-**s**orbent **a**ssay ou ELISA de Sanduíche, transferências em gota, imunotransferências, radioimunoensaios (**R**adioimuno**a**ssay RIA), testes de Ouchterlony à base de difusão, ensaios imunofluorescentes de rocket ou transferências de Western. Exemplos para métodos imunológicos são, e. g., descritos em: *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdão. Holanda (1986); Bullock *et al.*, *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdão, Holanda (1985). O referido ELISA pode utilizar, mas não está confinado à utilização de produto de gene gM imobilizado ou uma parte do produto do gene gM ou qualquer outro produto do gene de vírus EH 1 ou vírus EH 4 numa superfície plástica adequada para análise de ELISA.

Um ELISA de acordo com a presente invenção compreende, mas não está limitado aos passos de

- a) imobilizar um produto de gene gM ou um seu fragmento num suporte plástico
- b) lavar a superfície plástica com um tampão de lavagem apropriado (e. g., PBS-Tween)
- c) adicionar as amostras aos poços seleccionados e incubar a placa de ELISA de acordo com métodos padronizados
- d) lavar os poços da placa de ELISA e adicionar um anticorpo adequado acoplado a uma enzima tal como HRP (peroxidase de rábano)

detectar o conjugado de anticorpo/HRP ligado adicionando um substrato adequado, seguido por leitura fotométrica de densidade óptica dos poços individuais. Anticorpos adequados, e. g., Ig de coelho anti-cavalo, são conhecidos na técnica.

Os seguintes exemplos servem para ilustrar ainda mais a presente invenção; mas a mesma não deve ser considerada como limitativa do âmbito da invenção aqui revelada.

Exemplos

Exemplo 1: Isolados de EHV-1 com gM removido

O EHV-1 negativo para gM foram construídos inserindo o lacZ de *Escherichia coli* (HΔgM-lacZ) ou a cassette de expressão da proteína verde fluorescente (GFP) (HΔgM-GFP) substituindo assim 74,5% das sequências do gene gM. A expressão de uma proteína marcadora facilita a identificação e subsequente purificação de um vírus recombinante. Para evitar a presença de quaisquer sequências "não-EHV-1" no vírus vacina, foi decidido remover as sequências do gene marcador e construir outro EHV-1 de segunda geração negativo para gM, um HΔgM "branco" (HΔgM-w).

Para este objectivo, foi construído o plasmídeo pXuBaxA (Figura 1). Primeiro foi tentada a recombinação de sequências de pXuBaxA no vírus HΔgM-lacZ marcado com lacZ. Num primeiro passo, as transfecções de ADN mediadas pelo método de fosfato de cálcio foram optimizadas, de modo a que resultaram várias placas brancas após plaqueamento de 100-1000 PFU de sobrenadantes de transfecção. Consequentemente, foram seleccionadas várias placas

para purificação de vírus da progenia e sujeitos a quatro a cinco rondas de isolamento de placas simples.

Populações de vírus múltiplos, independentemente isolados, fenotipicamente negativos para o *lacZ* foram analisadas genotipicamente através de transferência de Southern e revelaram ainda comportar sequências da cassete de *lacZ*. Foram antecipadas dificuldades no isolamento de populações de vírus verdadeiramente negativos para o *lacZ* devido ao “silenciamento de *lacZ*” e deste modo, um grande número de populações de vírus fenotipicamente negativos para *lacZ* foram purificadas e analisadas sem sucesso. Por isso, a estratégia de criar um vírus RaCH “branco” negativo para gM foi alterada mudando para cotransfecções com o EHV-1 negativo para gM, que tinha sido construído por inserção de uma cassete de *GFP*. A utilização do vírus que expressa *GFP* facilitou a distinção entre os vírus de entrada (placas verdes fluorescentes) e novos vírus recombinantes (placas não fluorescentes) e deste modo aumentou a eficiência do isolamento de placas fenotipicamente negativas para *GFP*. Alterar a “entrada” de RaCH negativo para gM não era suposto influenciar o genotipo do vírus recombinante esperado como (i) ambos vírus de HΔgM da primeira geração, para além do marcador, geneticamente idêntico e como (ii) o genotipo final na região de interesse é determinado pelo plasmídeo de recombinação (pXuBaxA).

Para a construção do plasmídeo pXuBaxA (construção necessária para obter o EHV-1 “branco” negativo para gM) o fragmento de 962 pb *ApaI* - *HincII* na grelha de leitura aberta de 1352 pb de gM de EHV-1 foi removido do plasmídeo pBH3.1 (Figura 1 D). O plasmídeo pBH3.1 comporta o fragmento EHV-1 *BamHI*-*HindIII* que cerca o gene gM (Seyboldt et al., 2000). Para

prevenir a expressão de qualquer produto de gM truncado, foram escolhidas as endonucleases de restrição *ApaI* e *HincII*, de modo a que após o ajuste de extremidades rombas e ligação das restantes sequências gM C-terminais (183 pb) não estavam em grelha com as restantes sequências N-terminais (208 pb).

A linha celular que expressa gM de EHV-1 ccgM (Seyboldt et al., 2000; obtido do Dr. N. Osterrieder) foi mantida em meio mínimo essencial suplementado com 5 - 10% de soro de vitela fetal (Biochrom, irradiado com γ). A recombinação homóloga para EHV-1 foi alcançada por cotransfecção mediada por fosfato de cálcio de células de ccgM com 5-10 μ g de plasmídeo pXuBaxA (Figura 1D) e 2 μ g de ADN de H Δ gM-*lacZ* ou H Δ gM-*GFP*, respectivamente.

A análise subsequente de ADN de H Δ gM-*GFP* com uma sonda marcada do digoxigenina específica para o fragmento *BamHI-HindIII* do plasmídeo pBH3.1 (Figura 2) revelou

- (i) um fragmento de 2757 pb e um de 9043 pb em *BamHI*,
- (ii) um fragmento de 10006 pb e um de 825 pb em *HindIII*,
- (iii) e para um fragmento de 5415 pb e um de 4474 pb em ADN digerido com *PstI*.

As enzimas de restrição utilizadas (*BamHI*, *HindIII*, *PstI*) cortam nas sequências da cassete GFP-marcador, alterando desse modo o padrão de fragmentos relativo ao respectivo ADN sem a respectiva cassete GFP-marcador.

A sonda de GFP ligada aos respectivos primeiros fragmentos (i-iii) e não detectaram sequências específicas para GFP no ADN de Rach ou de H Δ gM-w.

No ADN de RacH foram detectados os fragmentos esperados de *Bam*HI (11166 pb), *Hind*III (10199 pb) e *Pst*I (9257 pb), que diminuíram em tamanho após a remoção de 962 pb das sequências de gM correspondentemente (para: 10204 pb, 9237 pb e 8279 pb; figura 3B).

Foram realizadas as cinéticas de crescimento de passo único dos vírus negativos para gM (HΔgM-w ou HΔgM-GFP) que tinham sido construídos como descrito na legenda da Figura 1 e RacH. As células Rk13 em placas de 24 poços foram infectadas a uma MOI de 2 do vírus respectivo. Sobrenadantes e sedimentos de células infectadas foram recolhidos separadamente a vários tempos p.i. (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h p.i.). Os sobrenadantes foram limpos de resíduos celulares por centrifugação de baixa velocidade e as células foram sujeitas a congelação-descongelação antes da infecciosidade associada à célula ser ensaiada. Todos os títulos dos vírus foram determinados individualmente em células Rk13 ou ccgM, respectivamente, em placas de 24 poços. Os resultados (dados não apresentados) podem ser sumarizados como se segue: infecciosidade associada à célula de ambos os vírus HΔgM foi reduzida entre o factor 1,6 (4 h p.i.) e 45 (20 h p.i.) em células Rk13 quando comparado com os títulos de células infectadas com RacH (infecciosidade intracelular). Os títulos de vírus extracelulares de ambos os vírus HΔgM foram reduzidos ao máximo em 186 (HΔgM-w) ou 650 (HΔgM-GFP) vezes (12 h p.i.) comparado com os de RacH (infecciosidade extracelular), apoiando um papel de gM também na regressão do vírus de RacH.

Exemplo 2: isolados de EHV-4 com gM removido

Para um paralelo a construção de EHV-1 negativo para gM, a selecção de *lacZ* foi escolhida para a selecção de EHV-4. Para permitir o isolamento de um EHV-4 negativo para gM, foi construída uma linha celular Vero expressando constitutivamente gM de EHV-4. O clone de células Vero C1008 (número ATCC: CRL-1586 foi mantido em meio mínimo essencial suplementado com 5-10% de soro de vitela fetal (Biochrom, irradiado com γ). A linha celular recombinante Vero-gM foi criada por transfecção mediada por Effectene™ (Qiagen) de 1 μ g de plasmídeo pCgM4 (Figura 3B) e 0,1 μ g do plasmídeo pSV2neo (conferindo resistência a G418; Neubauer et al., 1997) em células Vero. Os clones celulares foram primeiro seleccionados para resistência a G418 (Calbiochem), depois para trans-complementação de um EHV-4 negativo para gM. Foi adicionado G418 ao meio de cada 5ª passagem de linhas celulares recombinantes (500 μ g/mL). Todas as células foram analisadas regularmente para Mycoplasma por PCR e para o antigénio do Vírus da Diarreia de Bovino Viral (BVDV) por análise de FACS. O clone de células seleccionado foi denominado Vero-gM e utilizado nas experiências seguintes.

O ADN de EHV-4 foi cotransfectado com o plasmídeo pgM4 β + (Figura 3B) em células Vero-gM. A recombinação resultou em várias placas “positivas para *lacZ*”, que foram isoladas e replaqueadas. Mas depois a purificação de um mutante removido em EHV-4 revelou-se mais difícil e mais lento do que em EHV-1 como: (i) placas “positivas para *lacZ*” coraram geralmente de modo menos intenso em células Vero do que em células Rk13 e eram assim mais difíceis de identificar e como (ii) o sistema EHV-4 replicou mais lentamente do que EHV-1 e depois originou menos

tempo entre a identificação de placa e isolamento de progenia de vírus viável.

Todas as placas positivas para *lacZ* que foram isoladas, foram perdidas na primeira ronda de purificação que tornou imperativo para pesquisar outra solução. Foi por isso tentado utilizar também o marcador de GFP para EHV-4. Num primeiro passo, o plasmídeo pgM4GFP+ (Figura 3B) foi construído e utilizado para recombinação no ADN de EHV-4. As placas resultantes positivas para GFP foram purificadas através de três rondas de isolamento de placas únicas na linha celular Vero-gM. Uma população de vírus homogénea positiva para GFP foi seleccionada e o ADN viral sujeita a análise de transferência de Southern (Figura 4). O ADN dos vírus resultantes, E4ΔgM-GFP (Figura 3C), foi então co-transfectado com o plasmídeo pgM4R ou pgM4w (Figura 3B). O plasmídeo pgM4R foi utilizado para a construção de um EHV-4 reparado para gM, denominado E4RgM (Figura 3A). O plasmídeo pgM4w foi a base para produzir E4ΔgMw, o EHV-4 simultaneamente negativo para gM- e o gene marcador (Figura 3D). As populações de vírus E4RgM e E4ΔgM-w foram isoladas para um fenótipo negativo para GFP, purificadas em células Vero ou em Vero-gM e finalmente analisadas por transferência de Southern (Figura 4). Para expressar gM de EHV-4 em células eucariotas foi produzido o plasmídeo pCgM4 (Figura 3B). A ORF completa de gM de EHV-4 foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores dados na Figura 8 e a Taq polimerase (MBI Fermentas). O produto de PCR resultante foi inserido no vector pCDNAI/Amp (Invitrogene).

O plasmídeo pgM4R resultou após amplificação por PCR dos nucleótidos 91 699 a 94 808 (Telford et al., 1998) de EHV-4 e inserção do produto de amplificação no vector pGEM3Zf+ (Promega)

(Figura 3B; Figura 8). Este plasmídeo foi utilizado para a construção de EHV-4 reparado para gM, E4RgM (Figura 3A).

Para construir o plasmídeo pgM4 β + (Figura 3B), que foi concebido para remover inicialmente 1 110 pb das 1352 pb da gM de EHV-4, foi escolhida uma estratégia multipasso. Num primeiro passo, ambas as sequências de flanco necessárias para a recombinação de ADN foram amplificadas, independentemente, por PCR utilizando a PFU polimerase (Stratagene). Os sítios de restrição necessários para a clonagem passo a passo foram adicionados pelas sequências do iniciador (Figura 8). Os produtos de PCR foram inseridos no vector pTZ18R (Pharmacia), resultando nos plasmídeos pgM4Del1 e pgM4Del2 (Figura 8). Num passo seguinte a cassette de expressão de 3,9 kpb de lacZ de *E. coli* foi libertado a partir do plasmídeo ptt264A+ (Osterrieder *et al.*, 1996) por digestão com *SalI* e *BamHI* e foi inserido no plasmídeo pgM4Del1 resultando no plasmídeo pgM4Del1b+. Então, as sequências específicas para EHV-4, tiradas de pgM4Del2, foram introduzidas em pgM4Del1b+ utilizando *PstI* e *SalI*, de modo que a cassette do gene marcador foi flanqueada por sequências específicas de EHV-4 no plasmídeo pgM4 β + resultante (Figura 3B).

O plasmídeo pgM4 β + foi, depois, digerido com *SalI* e *BamHI*, libertando de novo a cassette de lacZ, as proeminências resultantes da religação foi denominada pgM4w (Fig. 3B). De novo, foi concebido um deslocamento de grelha entre os 208 nt N-terminais e os restantes 33 nt C-terminais da sequência de gM.

Para produzir o plasmídeo pgM4GFP+ (Fig. 3B), a cassette lacZ foi tirada de pgM4 β + (Figura 3B) utilizando os sítios *SalI* e *BamHI* e substituída pela cassette GFP (incluindo o promotor de

CMV e poliA de SV40), que foi removida do vector pEGFP-C1 (Clontech) via digestão com *AsnI* e *MluI*. As proeminências produzidas pela enzima de restrição foram preenchidas pela Klenow polimerase.

A amplificação correcta de todos os produtos de PCR foi confirmada por sequenciação em ciclos (MWG Biotech) e a comparação com a sequência publicada da estirpe NS80567 de EHV-4 (Telford *et al.*, 1998).

A recombinação em EHV-4 foi efectuada utilizando a linha celular Vero-gM e o plasmídeo pgM4 β + ou pgM4GFP+ (Figura 3B) foi cotransfectado com ADN de EHV-4 para produzir uma primeira geração de EHV-4 negativo para gM (Figura 3C). O plasmídeo pgM4w (Figura 3B) em combinação com ADN do EHV-4 negativo para gM resultou no E4 Δ gM-w (Figura 3D). Finalmente, o EHV-4 reparado para gM, E4RgM (Figura 3A), foi isolado após co-transfecção do plasmídeo pgM4R (Figura 3B) com ADN de E4 Δ gM-GFP em células Vero.

O ADN de EHV-4, E4RgM, E4 Δ gM-w e E4 Δ gM-GFP foi clivado com *PstI*, *EcoRV* ou *HindIII* e os fragmentos de ADN transferidos para membranas de nylon. As membranas paralelas foram hibridadas com sequências específicas para GFP (identicamente à Figura 2) ou com uma sonda, denominada gM3.1, contendo as sequências específicas de EHV-4 retiradas do plasmídeo pgM4R (Figura 3B).

Os resultados da digestão obtidos (Figura 4) foram como se segue:

(i) No ADN de E4 Δ gM-GFP a sonda GFP reconheceu os fragmentos a 5531 pb, quando *PstI* clivou, às 8383 pb após a digestão com

EcoRV e às 4 528 pb após digestão com *HindIII*. Fragmentos idênticos mais fragmentos às 1792 pb (*PstI*), 1801 pb (*EcoRV*) e 826 mais 5487 pb (*HindIII*) reagiram com a sonda gM3.1.

(ii) Nem o EHV-4parental, nem o vírus reparado E4RgM ou E4DgM-w eram portadores de sequências específicas para GFP.

(iii) Os fragmentos de ADN reactivos com gM3.1 em EHV-4 e E4RgM foram detectados às 6806 pb (*PstI*), a 7874 pb mais 1801 pb (*EcoRV*) e às 4837 mais 5487 pb (*HindIII*), respectivamente.

(iv) Os vírus negativos para a cassete de gM e de GFP E4DgM-w, não hibridam com as sequências GFP, mas com as respectivas sequências específicas para EHV-4 (gM3.1). A última sonda detectou fragmentos, sem 1110 pb de sequências de gM, quando comparadas com as do vírus do tipo selvagem, *i. e.*, às 5696 pb (*PstI*), às 6764 pb mais 1801 pb (*EcoRV*) e às 3727 pb mais 5487 pb (*HindIII*), respectivamente.

No ADN de todos estes vírus, clivado por *HindIII*, existe um outro fragmento sonda específico para gM3.1 aos 126 pb (Fig. 2C), mas este fragmento é demasiado pequeno para ser mostrado nesta transferência de Southern.

Os vírus E4DgM-GFP e E4DgM-w perderam a sua capacidade de expressar gM e, adicionalmente, E4DgM-w perdeu a sequência do gene marcador.

a) Crescimento do vírus em cultura de células. As propriedades de crescimento do vírus dos vários vírus mutantes, como detalhado acima, foram comparadas em células Vero e em Vero-gM. As células semeadas em placas de 24 poços foram

infectadas com um MOI de 1-2 e os títulos de vírus extracelulares (infecciosidade extracelular) e intracelulares (infecciosidade intracelular) foram determinados em diferentes pontos de tempo p.i. (Fig. 5). Enquanto as propriedades de crescimento do vírus E4RgM resgatante correspondeu bem aos de EHV-4, existiu uma surpreendente inibição na produção de títulos de vírus extracelular E4ΔgM-w e E4ΔgM-GFP em células não complementares. Nesta série de experiências (média de duas experiências independentes), a infecciosidade extracelular não pode nunca ser detectada antes de 24 h p.i. Mesmo 30 horas p.i. apenas títulos muito baixos foram extracelularmente observados (máximo de 1,5 placas/mL na menor diluição de 10^{-1}), embora as células apresentem um grave efeito citopático. As diferenças na infecciosidade intracelular, contudo, nunca atingiram as 100 vezes e apresentaram um pico às 24 horas p.i. (84 vezes entre EHV-4 e E4ΔgM-w). O atraso na detecção da infecciosidade intracelular foi apenas de um ponto de tempo (12 h *versus* 15 h. p.i.). Tomado em conjunto, pode ser surpreendentemente demonstrado que a deleção de sequências de gM de EHV-4 de fundo influenciaram massivamente a replicação do vírus *in vitro*, mas que a expressão de gM não é essencial para a replicação. Decresceram especialmente os vírus extracelulares infecciosos e a capacidade de infectar directamente células adjacentes foi diminuída - como reflectido pelo tamanho das placas.

b) Tamanho das placas. Os diâmetros de 150 placas após infecção de células Vero ou Vero-gM com EHV-4, E4RgM, E4ΔgM-w ou E4ΔgM-GFP foram medidos e os tamanhos médios das placas foram determinados em relação a aos tamanhos das placas do tipo selvagem, que foram estabelecidas como 100%. Foi claramente demonstrado, que os vírus negativos para gM foram capazes de infectar e replicar em células Vero, mas que os diâmetros

máximos de placas foram marcadamente reduzidos, amenos do que 20% dos diâmetros das placas do tipo selvagem (Fig. 6). A infecção com o vírus parental ou o resgatante resultou no aparecimento de placas do tipo selvagem, indicando que o fenótipo observado foi de facto induzido pela deleção de gM. Isto foi adicionalmente corroborado pelo facto de que a formação de placas por E4ΔgM-w e E4ΔgM-GFP foi completamente restaurada na linha celular Vero-gM (Dados não apresentados).

c) Experiências de Penetração. Nesta experiência, a influência da gM de EHV-4 na cinética de entrada de EHV-4 foi avaliada. 100 PFU de diferentes vírus, EHV-4 parental, o vírus E4RgM reparado para gM, assim como os mutantes de deleção de gM e E4ΔgM-GFP (ver Figura 3), foram permitidos adsorver a 4 °C a células Vero em placas de 6 poços. Após 90 min, o respectivo inóculo foi substituído por meio fresco e a penetração foi iniciada por alteração da temperatura de incubação para 37 °C. Em diferentes tempos após a alteração de temperatura - a começar imediatamente (= 0 min) - a infecciosidade extracelular foi inactivada por pH através do tratamento das células com um tampão citrato (pH 3,0). As amostras paralelas foram lavadas do mesmo modo, mas o tampão citrato foi substituído por PBS, de modo que em qualquer ponto de tempo a "infecciosidade adsorvida" pode ser comparada à "infecciosidade penetrada". Os números de placas foram determinados após incubação das células durante quatro dias sob uma camada methocell.

c) Foram efectuados alguns conjuntos de experiências: Na figura 7A os resultados são apresentados para genotipicamente e fenotipicamente para vírus negativos para gM após propagação em células Vero não complementares, enquanto a figura 7B representa a cinética de E4ΔgM-w e E4ΔgM-GFP fenotipicamente

complementados, uma vez que os vírus foram cultivados em células Vero-gM que expressam gM.

Uma média de 52,8% (56,7%) do EHV-4 infeccioso parental (E4RgM) foi protegida do tratamento com ácido extracelular 40 min após o início da penetração (Fig. 7A, círculos vazios) enquanto apenas 33,7% (E4ΔgM-w-rectângulos a cheio) e ainda 38,5% (E4ΔgM-GFP triângulos a cheio) de vírus negativos para gM foram protegidos. Em pontos mais tardios da cinética de entrada, os diferentes gráficos começam a sobrepor-se de forma variada e é alcançada uma eficiência de penetração máxima entre 61,7% e 78,9% após 150 min de tempo de penetração, indicando que se pode contar com uma certa variabilidade do ensaio para as ligeiras diferenças observadas (Fig. 7A). Quando vírus negativos para gM foram preparados em células complementares Vero-gM não foi observada nenhuma diferença na sua eficiência de penetração (7B). Em oposição a um atraso na cinética de entrada de EHV-1 negativo para gM de cerca de 20% (estirpe RacL11; Osterrieder *et al.*, 1996) até 40% (estirpe KyA; Seyboldt *et al.*, 2000), o efeito da remoção de gM de EHV-4 tem de ser notado com reserva. No entanto, podem ser delineadas as seguintes conclusões: (i) Foi observada uma diferença na cinética de vírus negativos para gM fenotipicamente complementados em relação aos não complementados (Fig. 7A-B), mas (ii) a influência da remoção de gM na penetração de EHV-4 é virtualmente negligenciável.

Exemplo 3: Análise de soro de cavalo para anticorpos anti gM utilizando um teste serológico específico para gM

Para certificar que gM pode ser utilizada como um marcador serológico para distinguir a infecção do tipo selvagem versus a

vacinação com uma vacina negativa para gM, têm de ser testadas várias hipóteses. Inicialmente é necessário verificar se os soros de cavalos infectados com vírus do campo contêm anticorpos específicos para gM. Para a análise inicial foi iniciado um teste de transferência de Western, uma vez que este sistema permitiu identificar uma secção específica contra uma reactividade de fundo. Quando se utilizam soros altamente neutralizantes (títulos neutralizantes de EHV-1 e/ou -4 entre 1:128 e 256), foi estabelecido (dados não apresentados) que lisados da linha celular que expressa gM de EHV-1 ccgM permitiram a detecção de um sinal específico de soros de cavalo e que uma diluição de soros de 1:3000 parecia funcionar melhor.

Consequentemente, os soros de todos os 12 potros (6 vacinados e 6 controlos) que participaram num ensaio de vacina de gM de EHV-1 foram analisados quanto a reactividade de gM em transferência de Western. Foram testados individualmente três diferentes soros de cada cavalo: Tirados antes de integrarem o ensaio (Pre), 4 semanas após a segunda vacinação (V2) e duas semanas após exposição a infecção (C), respectivamente.

Resumidamente, através das análises de transferência de Western (Figura 9) foi também mostrado que (i) soros de cavalos, exibindo actividade de neutralização de EHV-1, testaram todos positivos para gM, que (ii) a reactividade de gM nunca foi detectada em qualquer das amostras analisadas antes de contacto conhecido com EHV-1 ou após vacinação com o EHV-1 negativo para gM e que (iii) após infecção da cavalos do ensaio da vacina com o vírus de exposição positivo para gM, a gM foi claramente detectável em 10 de 12 casos. Finalmente (iv) foi observado que os títulos de anticorpo anti EHV-1 e a intensidade da

reactividade de gM não parecia estar directamente correlacionada.

Devido à elevada reactividade de fundo dos soros de cavalo, o estabelecimento dos testes serológicos é difícil. Com base nos dados de imunofluorescência indirecta (IIF) obtidos em soros de cavalo, foi confirmado que terá de ser estabelecido um sistema de teste indirecto ou um de bloqueamento ou será necessário utilizar polipéptidos altamente purificados de gM num teste de ELISA. Para este fim, foi estabelecida uma ELISA como se segue. Polipéptidos purificados de gM ou a gM completa foi immobilizada num suporte sólido de uma placa de 96 poços que foi revestida para assegurar uma boa ligação da proteína em captura. Para o ensaio, foram bloqueados sítios de ligação não específicos seja por leite condensado ou substâncias semelhantes para evitar ligação não específica. A seguir a isto, a superfície plástica foi lavada com um tampão de lavagem apropriado (e. g., PBSTween) para remover o excesso de agente de bloqueamento. Então, as amostras de teste foram adicionadas a poços seleccionados e a placa de ELISA foi incubada a 37 °C de acordo com métodos padronizados, permitindo aos anticorpos na amostra de teste ligarem-se à proteína de captura immobilizada. No passo seguinte, os poços da placa de ELISA foram lavados exaustivamente várias vezes passando tampão de lavagem, seguido pela adição de um anticorpo anti-cavalo adequado acoplado a uma enzima tal como HRP (peroxidase de rábano). A detecção do conjugado anticorpo/HRP ligado foi finalmente efectuada pela adição de um substrato adequado, seguido por uma leitura fotométrica da densidade óptica dos poços individuais. O valor obtido foi comparado com os controlos positivos e negativos utilizados no mesmo ensaio.

Exemplo 4: Identificação de gM de EHV-4

Embora a sequência de aminoácidos deduzida de gM de EHV-4 fosse calculada como sendo 86,7% idêntica à de gM de EHV-1 (Telford *et al.*, 1998), o Mab 13B2 anti gM de EHV-1 (Allen e Yeargan, 1987) reage especificamente numa transferência de Western com apenas a proteína específica para o tipo (Crabb *et al.*, 1991). Para, no entanto, identificar o homólogo de EHV-4 neste estudo, outros anticorpos anti-gM de EHV-1 (Seyboldt *et al.*, 2000; Day, 1999) foram testados em viriões EHV-4 purificados, em lisados de células infectadas com EHV-4 ou em lisados de células Vero-gM. Sendo a última uma linha celular recombinantes desenvolvida para sintetizar gM de EHV-4 sob controlo do promotor IE-HCMV. A reactividade de todos os anticorpos monoclonais anti-gM de EHV-1 contra gM de EHV-4 estavam abaixo do limite de detecção em transferência de Western, em que amostras de EHV-1 paralelas foram sempre prontamente reactivas (dados não apresentados). Apenas o anti-soro policlonal, que foi produzido em coelhos contra um polipéptido derivado de uma gM de EHV-1 marcada com His (aminoácidos 376 - 450; Seyboldt *et al.*, 2000), reagiu de modo suficientemente forte com a gM heteróloga para permitir a identificação de gM de EHV-4 (Fig. 10 A). Utilizando este anticorpo, foi observada uma reactividade específica a uma Mr de cerca de 50 000 a 55 000 em viriões EHV-4 purificados. De acordo com as suas propriedades hidrofóbicas deduzidas a proteína gM detectada agregou-se após fervura. Pelo contrário, a forma de gM expressa em células Vero-gM recombinantes migrou essencialmente a uma Mr de cerca de 46000 a 48000, indicando que as proteínas gM de EHV-4 são processadas de modo semelhante ao que foi

apresentado para EHV-1 (Osterrieder *et al.*, 1997; Rudolph e Osterrieder, 2002).

Algumas experiências foram conduzidas para analisar o fenótipo da deleção de gM em EHV-4. Para comparar a expressão de outras glicoproteínas, lisados de células Vero infectadas com EHV-4, E4RgM, E4ΔgM-w ou E4ΔgMGFP foram submetidas a análise de transferência de Western. É demonstrado que a deleção de gM não influencia a produção das proteínas tardias gB ou gD, indicando que passos precoces na replicação do vírus não foram substancialmente afectadas pela deleção. Em outra experiência pode ser demonstrado pela análise de preparações de viriões do tipo selvagem reparados ou com gM de EHV-4 removida, uma vez que não foi de todo detectada reactividade de gM com vírus negativos para gM, em que a proteína foi prontamente reactiva nos viriões de controlo. A presença de viriões na respectiva preparação foi apresentada numa pesquisa num transferido paralelo contra gB (Fig. 10B).

Referências

Allen, G.P., Yeargan, M., Costa, L.R.R. e Cross, R., 1995. Major histocompatibility complex class I restricted cytotoxic T-lymphocyte responses in horses infected with equine herpesvirus 1. *J. Virol.* 69, 606-612.

Allen, G.P. and Yeargan, M.R., 1987. Use of λgt11 and monoclonal antibodies to map the genes for the six major glicoproteins of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* 61, 2454-2461.

Awan, A.R., Chong, Y.-C. e Field, H.J., 1990. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: A new model for studying host responses to the infection. *J. Gen. Virol.* 71, 1131-1140.

Baines, J.D. e Roizman, B., 1991. The open reading frames UL3, UL4, UL10 and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J. Virol.* 65, 938-944.

Baines, J.D. e Roizman, B., 1993. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* 67, 1441-1452.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC, 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

Crabb, B.S.; Allen, G.P., Studdert, M.J., 1991. Characterization of the major glycoproteins of equine herpesvirus 4 and 1 and asinine herpesvirus 3 using monoclonal antibodies. *J.Gen. Virol.* 72, 2075-82.

Day, L. 1999. Characterization of selected glycoproteins of equine herpesvirus-1: immune responses in the murine model. Ph.D. thesis. Universidade de Leeds, Leeds, Reino Unido.

Flowers, C.C. e O'Callaghan, D.J., 1992. The equine herpesvirus type 1 (EHV-1) homologous of herpes simplex virus type 1 US9 and the nature of a major deletion within the unique short segment of the EHV-1 KyA strain genome. *Virology* 190, 307-315.

- Hübert, P.H., Birkenmaier, S., Rziha, H.J. e Osterrieder, N.,** 1996. Alterations in the equine herpesvirus type-1 (EHV-1) strain RaCh during attenuation. *J. Vet. Med. B* 43, 1-14.
- Kyhse-Andersen, J.,** 1984. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-210.
- Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- MacLean, C.A., Robertson, L.M. e Jamieson, F.E.,** 1993. Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo. *J. Gen. Virol.* 74, 975-983.
- Malik, A.K., Martinez, R., Muncy, L., Carmichael, E.P. e Weller, S.K.,** 1992. Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL9 gene: isolation of a LacZ insertion mutant and expression in eukaryotic cells. *Virology* 190 (2), 702-715.
- Mayr, A., Pette, J., Petzoldt, K. e Wagener, K.,** 1968. Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde. *J. Vet. Med. B* 15, 406-418.
- Neubauer, A., Beer, M., Brandmüller, C., Kaaden, O.-R. e Osterrieder, N.,** 1997. Equine herpesvirus 1 mutants devoid of glycoprotein B ou M are apathogenic for mice but induce protection contra challenge infection. *Virology* 239, 36-45.

Osterrieder, N., Wagner, R., Brandmüller, C., Schmidt, P., Wolf, H. e Kaaden, O.-R., 1995. Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB). *Virology* 208, 500-510.

Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Braun, B., Kaaden, O.-R. e Baines, J.D., 1996. The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *Journal of virology*, Junho 1996, p. 4110-4115.

Osterrieder, N.; Neubauer, A.; Fakler, B.; Brandmüller, C.; Seyboldt, C.; Kaaden, O.R.; Baines, J.D., 1997. Synthesis and processing of the equine herpesvirus 1 glycoprotein M. *Virology* 232, 230-239.

Pilling, A., Davison, A.J., Telford, E.A.R. e Meredith, D.M., 1994. The equine herpesvirus do tipo 1 glycoprotein homologous to herpes simplex virus do tipo 1 glycoprotein M é a major constituent of the virus particle. *J. Gen. Virol.* 75, 439-442.

Rudolph, J.; Seyboldt, C.; Granzow, H.; Osterrieder, N., 2002. O gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J. Virology* 76, 2952-2963.

Sambrook, J., Fritsch, D.F. e Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Seyboldt, C., 2000. Structural and functional analysis of the equine herpesvirus type 1 glycoprotein M. Tese de doutoramento, Universidade Ludwig-Maximilians, Munique, Alemanha.

Seyboldt, C.; Granzow, H.; Osterrieder, N. 2000. Equine herpesvirus 1 (EHV-1) Glycoprotein M: Effect of deletions of transmembrane domains. *Virology* 278, 477-489.

Stokes, A., Alber, D.G., Greensill, J., Amellal, B., Carvalho, R., Taylor, L.A., Doel, T.R., Killington, R.A., Halliburton, I.W. e Meredith, D.M., 1996. The expression of the proteins of equine herpesvirus 1 that share homology with herpes simplex virus 1 glycoproteins H and L. *Virus Res.* 40, 91-107.

Telford, E.A.R., Watson, M.S., McBride, K. e Davison, A.J., 1992. The sequence of DNA of equine herpesvirus-1. *Virology* 189, 304-316.

Telford, E.A.R., Watson, M.S., Perry, J., Cullinane, A.A. e Davison, A.J., 1998. The sequence of DNA of equine herpesvirus-4. *Journal of Gen. Virol.* 79, 1197-1203.

Tewari, D., Whalley, J.M., Love, D.N. e Field, H.J., 1994. Characterisation of immune responses to baculovirus expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model. *J. Gen. Virol.* 75, 1735-1741.

Lisboa 13 de Maio de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus do Herpes Equino em que a proteína gM está ausente, caracterizado por o referido Vírus do Herpes Equino ser isento de elementos heterólogos.
2. Vírus do Herpes Equino de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o gene que codifica para a proteína gM estar removido.
3. Vírus do Herpes Equino de acordo com a reivindicação 1 ou 2, obténivel através de um método compreendendo os passos de
 - a) isolar um Vírus do Herpes Equino de tipo selvagem;
 - b) estabelecer um plasmídeo que codifica o gene gM do Vírus do Herpes Equino, opcionalmente com sequências flanqueadoras;
 - c) produzir uma linha celular complementar expressando gM ou partes desta;
 - d) estabelecer um Vírus do Herpes Equino comportando uma inserção de cassete que codifica GFP na sua sequência codificante de gM por co-transfecção da linha celular complementar do passo b) com o ácido nucleico do Vírus do Herpes Equino e um plasmídeo que codifica gM que é interrompido por uma inserção de cassete que codifica GFP;
 - e) remover a cassete que codifica GFP; e

f) seleccionar clones do Vírus do Herpes Equino, em que a cassette que codifica GFP é removida com sucesso.

4. Vírus do Herpes Equino de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser o Vírus do Herpes Equino-1.
5. Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por estarem removidas 850-1100 pb da grelha de leitura aberta de gM.
6. Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com as reivindicações 4 ou 5, caracterizado por estar removida a sequência codificante total de gM excepto para as 150-200 pb da sequência codificante para a porção C-terminal e excepto para as 150-250 pb da sequência codificante para a porção N-terminal.
7. Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado por estarem removidos os nucleótidos 93268-93318 a 94222-94322 da sequência codificante de gM, em que as posições de nucleótido se referem às posições de nucleótido da sequência do Vírus do Herpes Equino como descrito em Telford 1992.
8. Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizado por estarem removidos os nucleótidos 93268 a 94322 da sequência codificante de gM, em que as posições de nucleótido se referem às posições de nucleótido da sequência do Vírus do Herpes Equino como descrito em Telford 1992.

9. Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado por estar removida a sequência codificante de gM total excepto para as 184 pb da sequência codificante para a porção C-terminal e excepto para as 209 pb da sequência codificante para a porção N-terminal.
10. Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com qualquer das reivindicações 5 a 9, caracterizado por estarem removidos os nucleótidos 94263 a 93302 da sequência codificante de gM, em que as posições de nucleótido se referem às posições de nucleótido da sequência de EHV como descrito em Telford 1992.
11. Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizado por ser uma variante recombinante com base na estirpe RacH de EHV-1.
12. Vírus do Herpes Equino-1 caracterizado por ser o isolado HDgM-w depositado no ECACC/CAMR em 16 de Outubro de 2002 com o número de acesso 02101663.
13. Vírus do Herpes Equino de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser o Vírus do Herpes Equino-4.
14. Vírus do Herpes Equino-4 de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por estarem removidas as 900-1150 pb da grelha de leitura aberta de gM.

15. Vírus do Herpes Equino-4 de acordo com as reivindicações 13 ou 14, caracterizado por estar removida a sequência codificante de gM total excepto para as 0-50 pb da sequência codificante para a porção C-terminal e excepto para as 150-250 pb da sequência codificante para a porção N-terminal.
16. Vírus do Herpes Equino-4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, caracterizado por estarem removidas os nucleótidos 92681-92731 a 93765-93865 da gM sequência codificante, em que as posições de nucleótido se referem às posições de nucleótido da sequência do Vírus do Herpes Equino como descrito em Telford 1998.
17. Vírus do Herpes Equino-4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado por estarem removidos os nucleótidos 92681 a 93865 da sequência codificante de gM, em que as posições de nucleótido se referem às posições de nucleótido da sequência do Vírus do Herpes Equino como descrito em Telford 1998.
18. Vírus do Herpes Equino-4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 17, caracterizado por estar removida a sequência codificante de gM total excepto para as 34 pb da sequência codificante para a porção C-terminal e excepto para as 209 pb da sequência codificante para a porção N-terminal.
19. Vírus do Herpes Equino-4 de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 18, caracterizado por estarem removidos os nucleótidos 92715 a 93824 da sequência codificante de gM, em que as posições de nucleótido se referem às posições

de nucleótido da sequência do Vírus do Herpes Equino como descrito em Telford 1998.

20. Vírus do Herpes Equino-4 caracterizado por ser o isolado E4DgM-w depositado no ECACC/CAMR em 14 de Janeiro de 2003 com o número de acesso 03011401.
21. Ácido nucleico codificante para um Vírus do Herpes Equino de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20.
22. Preparação de vacina compreendendo um Vírus do Herpes Equino de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20.
23. Preparação de vacina compreendendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 21.
24. Utilização do Vírus do Herpes Equino de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20 na preparação de um medicamento para a profilaxia e/ou tratamento de Infecções com o Vírus do Herpes Equino.
25. Utilização de um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 21 na preparação de um medicamento para a profilaxia e/ou tratamento de Infecções com o Vírus do Herpes Equino.
26. Preparação de vacina compreendendo, pelo menos, um Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com as reivindicações 1 a 12 e um Vírus do Herpes Equino-4 de acordo com as reivindicações 13 a 20.

27. Utilização de, pelo menos, um Vírus do Herpes Equino-1 de acordo com as reivindicações 1 a 12 e um Vírus do Herpes Equino-4 de acordo com as reivindicações 13 a 20 na preparação de um medicamento para o tratamento de Infecções com o Vírus do Herpes Equino.
28. Método para obter um Vírus do Herpes Equino recombinante de acordo com a reivindicação 1, compreendendo os passos de
- a) isolar um Vírus do Herpes Equino de tipo selvagem;
 - b) estabelecer um plasmídeo que codifica o gene gM do Vírus do Herpes Equino, opcionalmente com sequências flanqueadoras;
 - c) produzir uma linha celular complementar expressando gM ou partes desta;
 - d) estabelecer um Vírus do Herpes Equino comportando uma inserção de cassete que codifica GFP na sua sequência codificante de gM por co-transfecção da linha celular complementar do passo b) com ácido nucleico de EHV e um plasmídeo que codifica gM que é interrompido por uma inserção de cassete que codifica GFP;
 - e) remover a cassete que codifica GFP; e
 - f) seleccionar os clones de EHV clones, em que a cassete que codifica a GFP é removida com sucesso.

29. Linha celular que complementa gM caracterizada por ser VERO GM depositada na ECACC/CAMR em 28 de Janeiro de 2003, com o número de acesso 03012801.

Lisboa, 13 de Maio de 2009

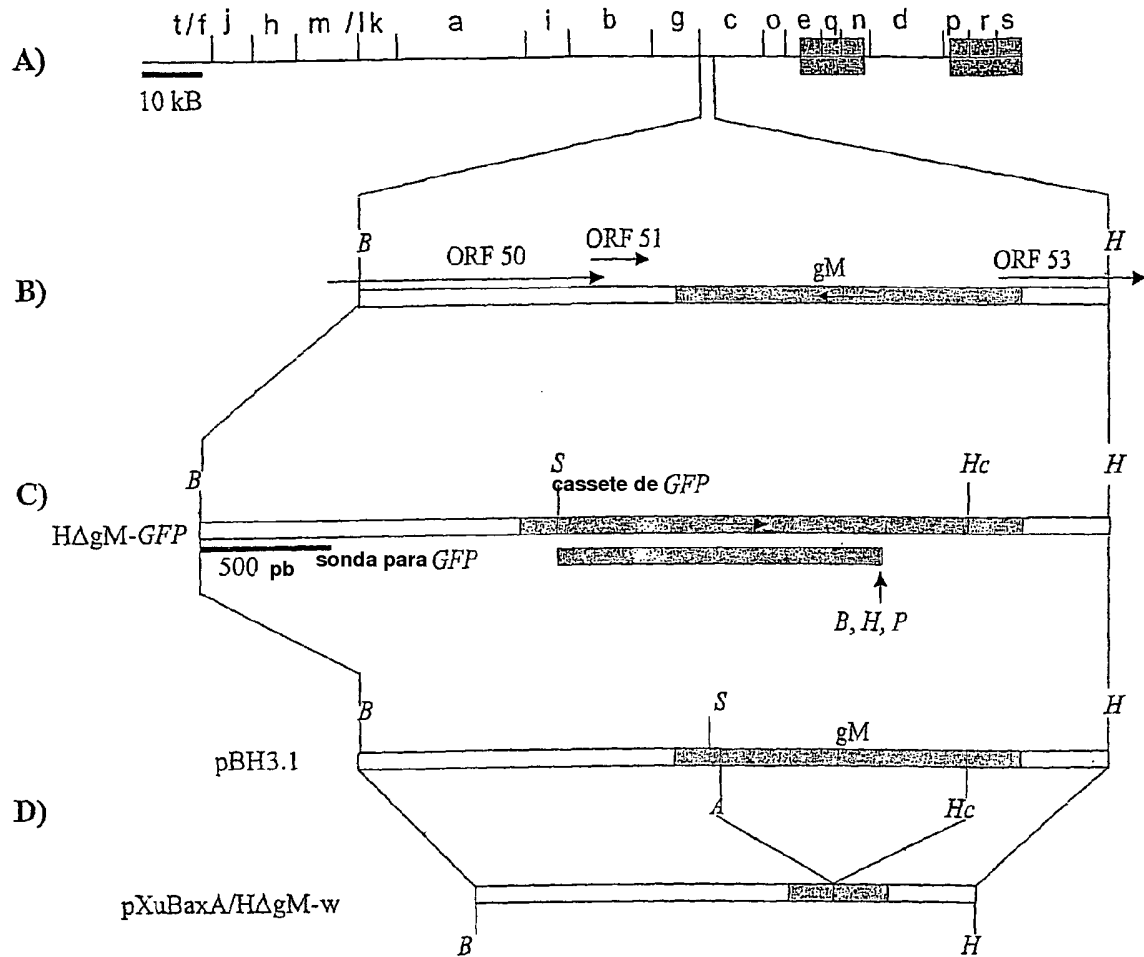


Fig. 1

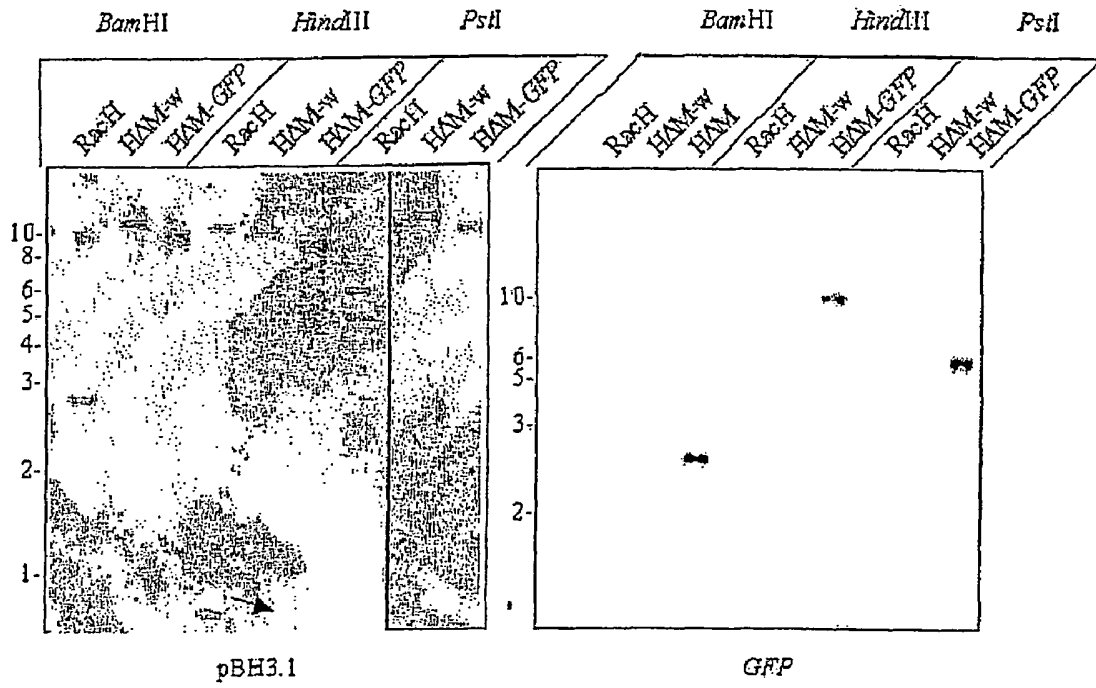


Fig. 2

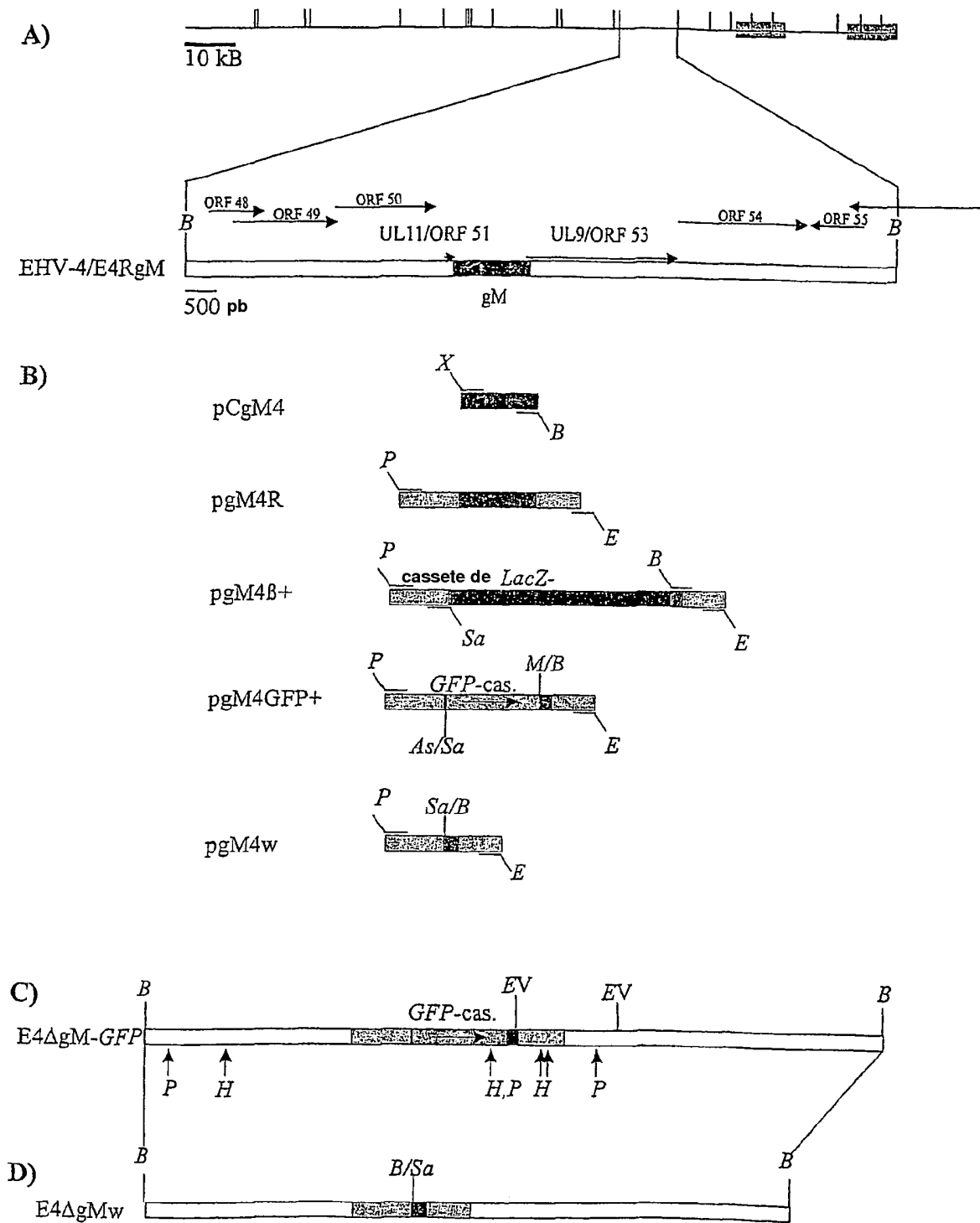


Fig. 3

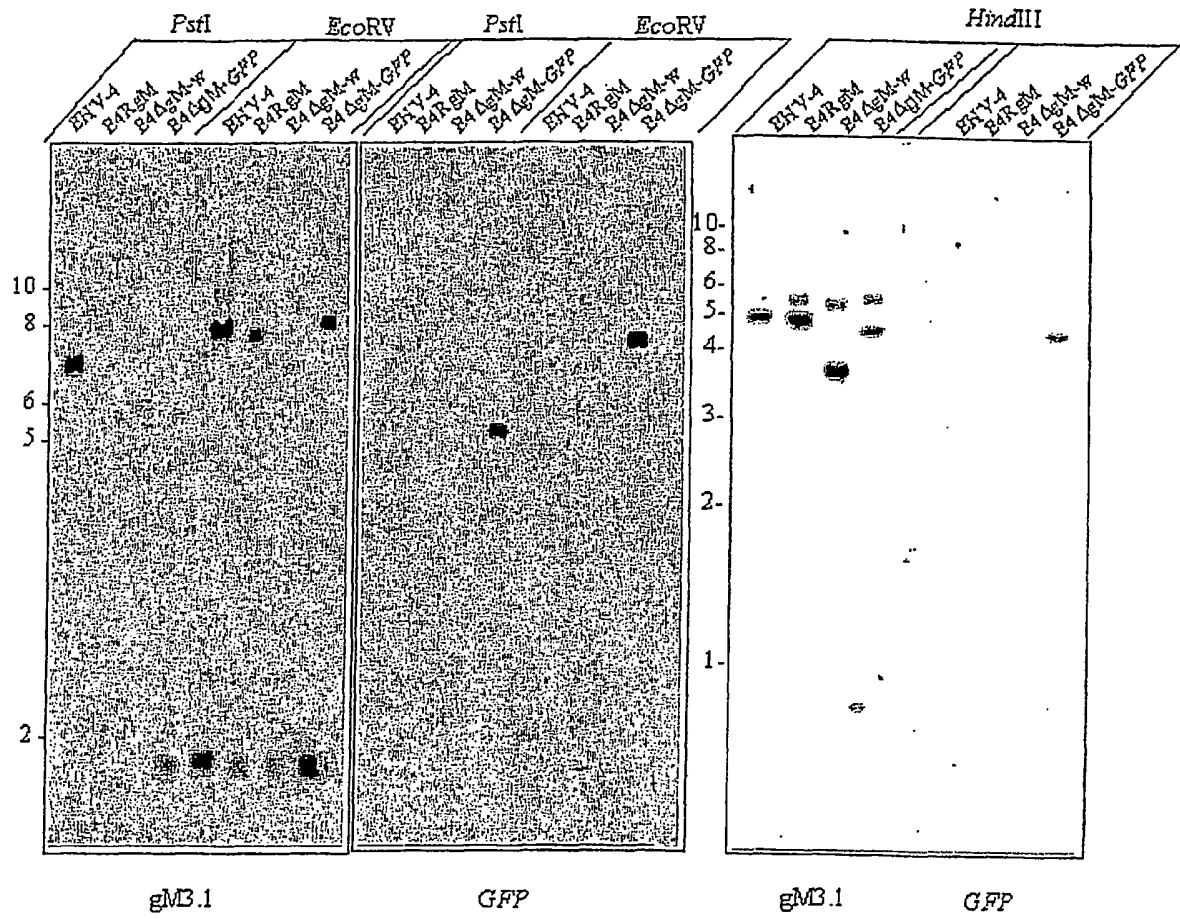


Fig. 4

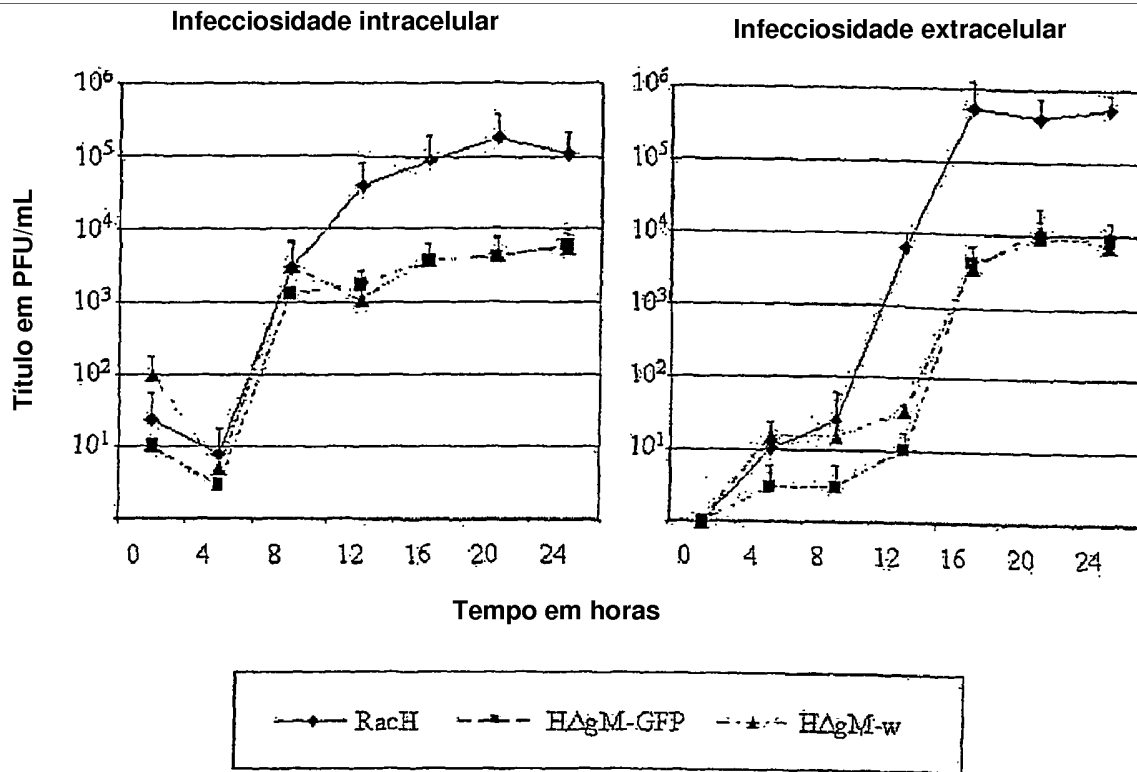


Fig.5

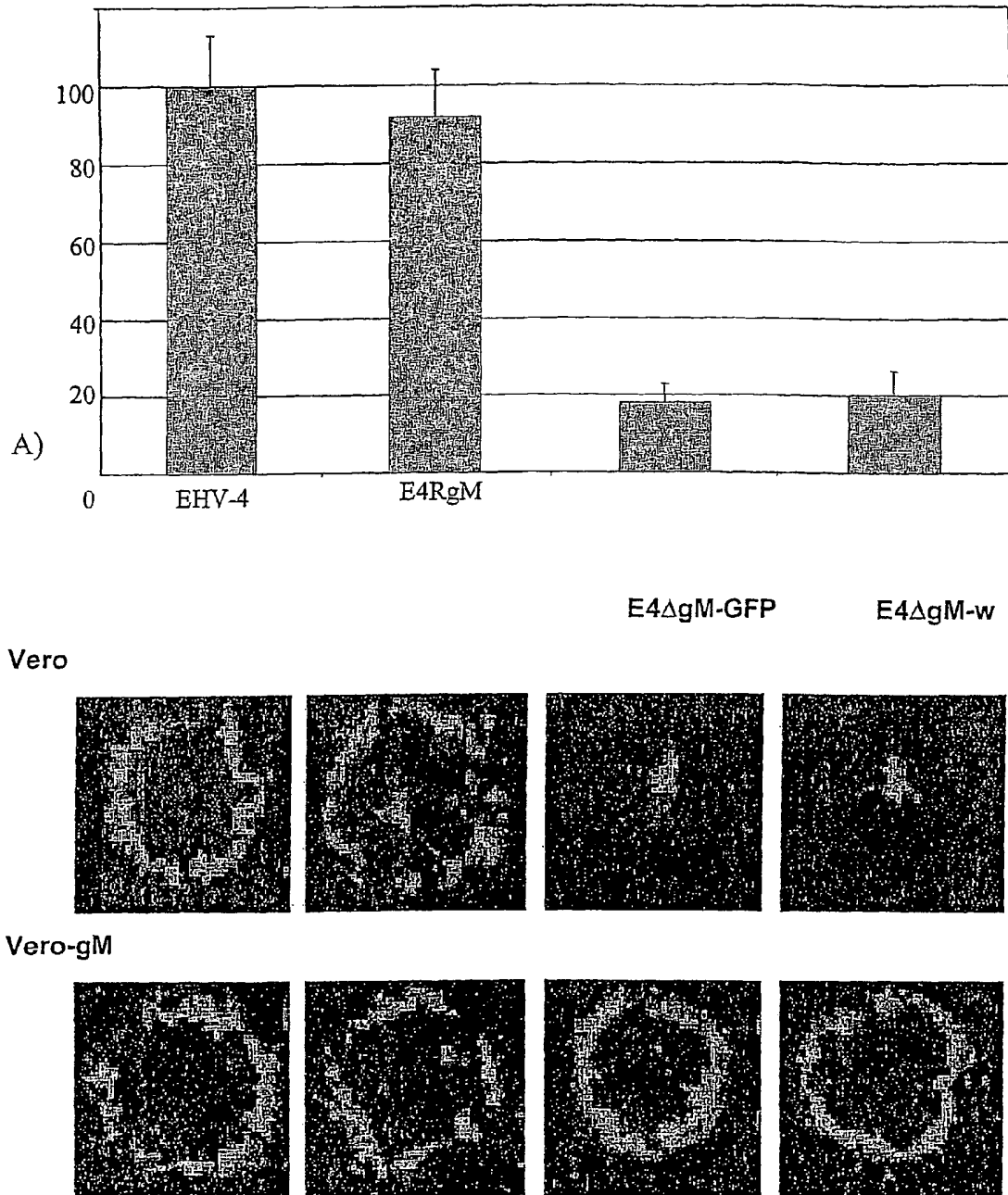


Fig. 6

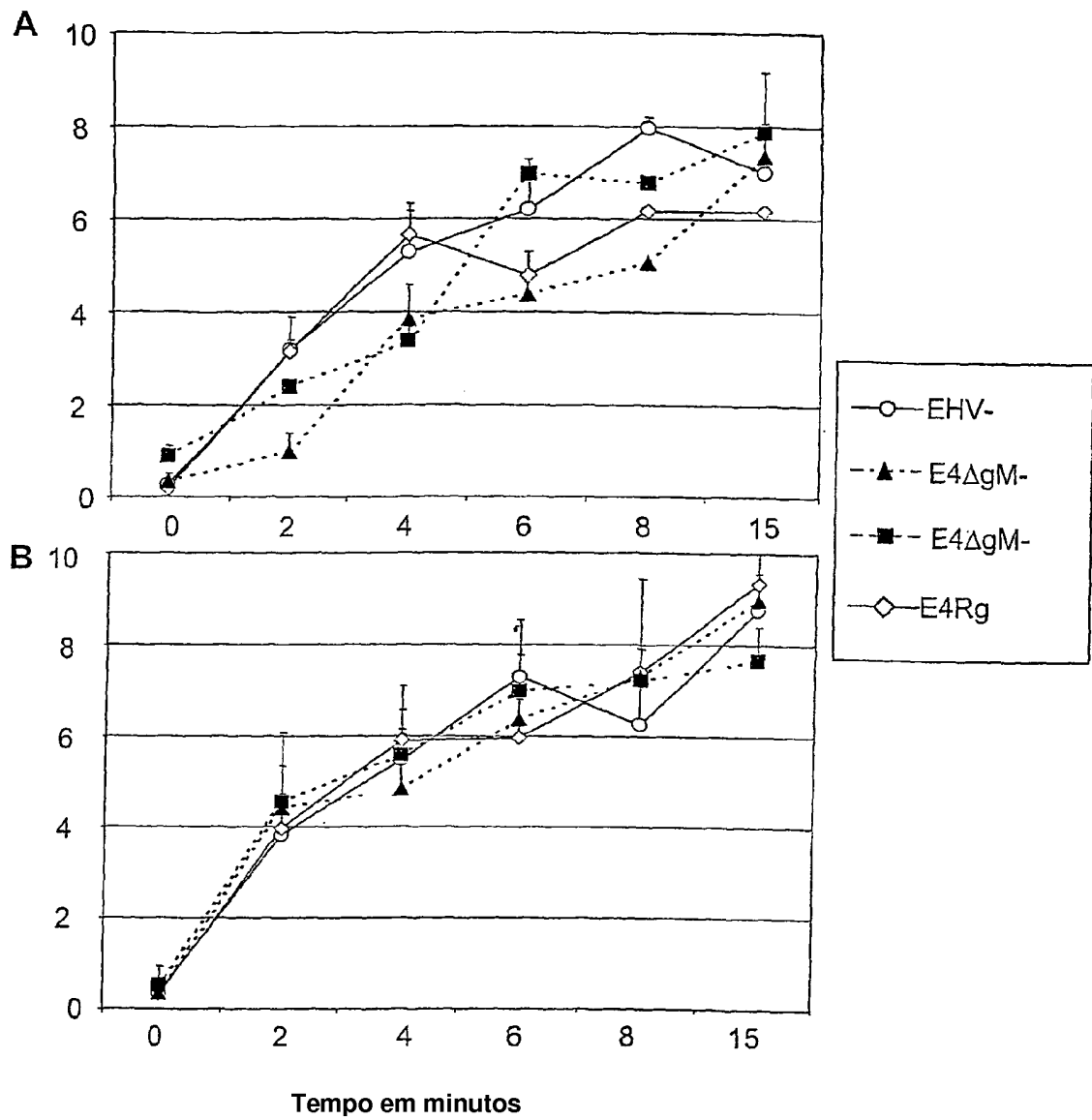


Fig. 7

Plasmídeo Resultante:	iniciador 5'	iniciador 3'	Comprimento do produto (localização)
pCgM4 vector : pCDNA1/Amp	5'gcctctagattaacggtaa tctctgcg3'; <i>XbaI</i>	5'aaggatceatggcagcagc tggcg3'; <i>BamHI</i>	1352 pb (nt 92681-94033)
pgM4R vector: pGEM3Zf+	5'aatctgcaggtagctacgg cctatg 3'; <i>PstI</i>	5'agaattcccgcaatacgtc cgtcc3'; <i>EcoRI</i>	3113 pb (nt 91699-94808)
pgM4Del1 vector: pTZ18R	5'ccggateccctaccagaga cccataa3'; <i>BamHI</i>	5'agaattcccgcaatacgtc cgtcc3'; <i>EcoRI</i>	983 pb (nt 93825-94808)
pgM4Del2 vector: pTZ18R	5'aatctgcaggtagctacgg cctatg 3'; <i>PstI</i>	5'ttaagtgcacatttgaataga aactcg 3'; <i>SaI</i>	1017 pb (nt 91699-92714)

Fig. 8

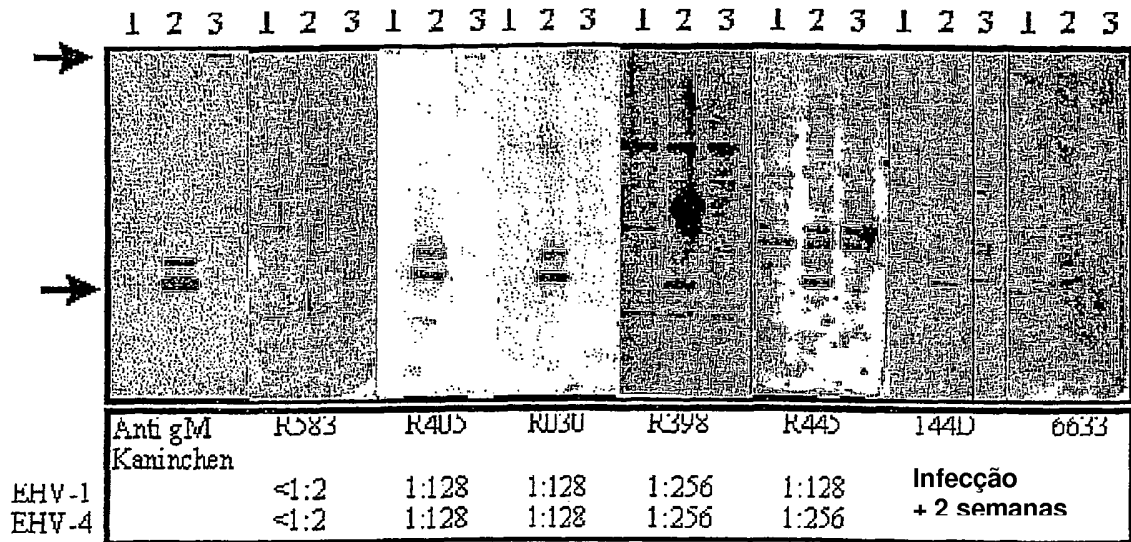


Fig. 9

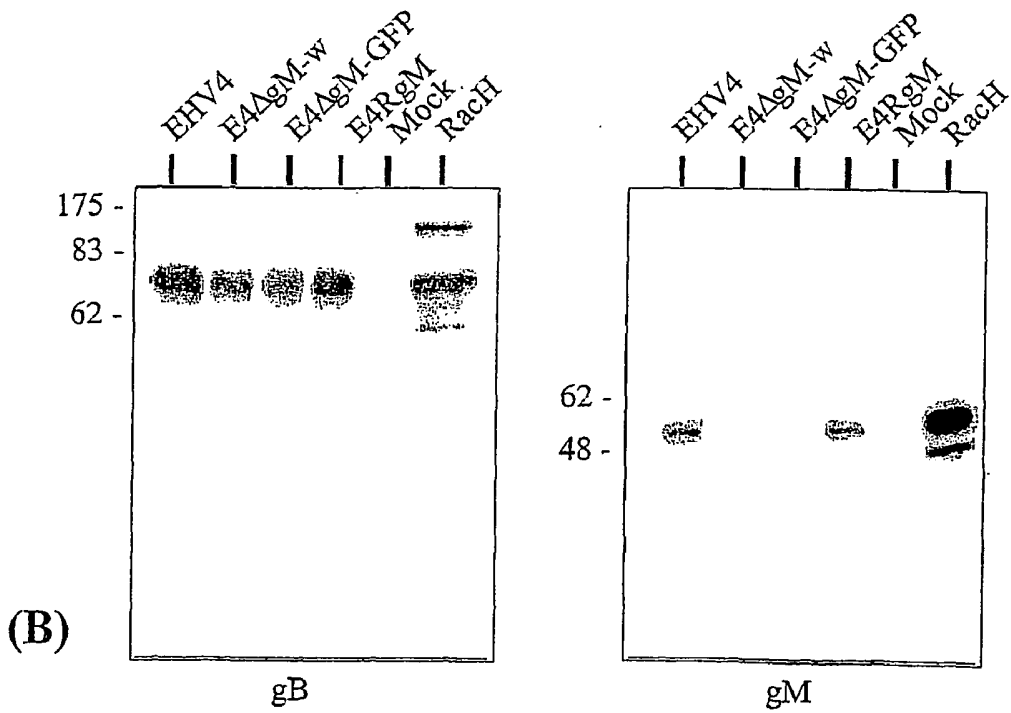
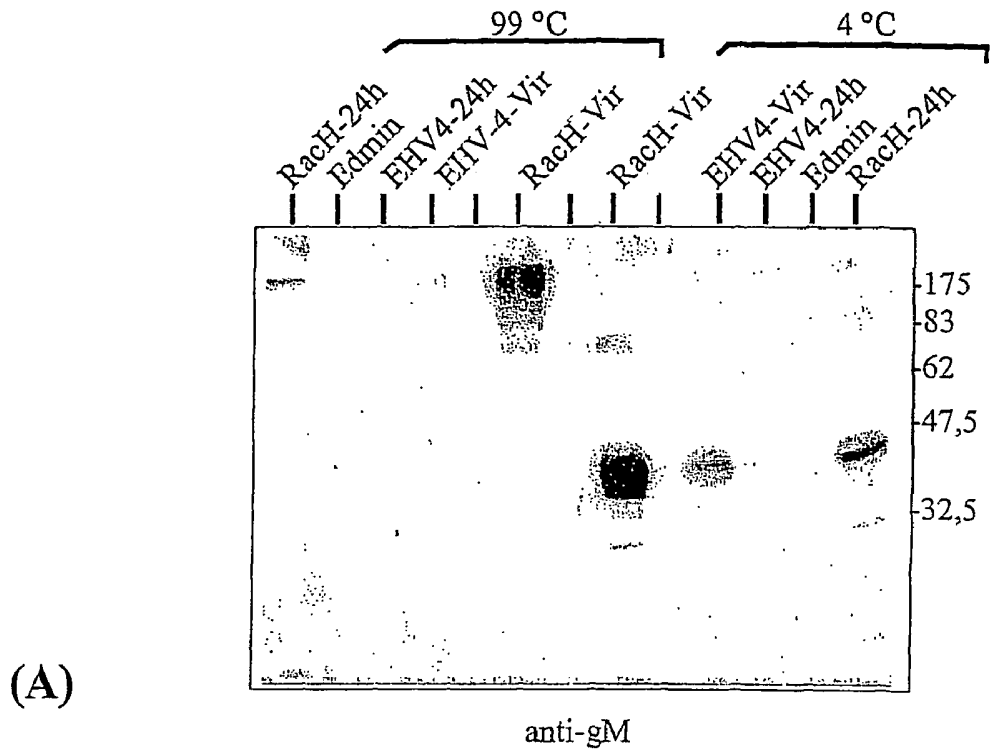


Fig. 10

RESUMO

"MUTANTES DE EHV GM-NEGATIVOS SEM ELEMENTOS HETERÓLOGOS"

A presente invenção refere-se ao campo da saúde animal e, em particular, de Vírus de Herpes Equino (EHV), em que o gene que codifica a proteína gM está ausente e que está isento de elementos heterólogos. Outros aspectos da invenção referem-se a composições farmacêuticas compreendendo os referidos vírus, as suas utilizações e métodos para a profilaxia e tratamento de infecções com EHV. A invenção também se refere a composições farmacêuticas compreendendo a combinação de vírus EHV-1 e EHV-4, em que o gene que codifica a proteína gM está ausente e que está isento de elementos heterólogos.